

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Bc. Andrea Jakubíčková

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Optimalizace kultivačních podmínek hepatocytů v primární kultuře

Bc. Andrea Jakubíčková

Diplomová práce

2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Andrea Jakubíčková**  
Osobní číslo: **C17442**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Optimalizace kultivačních podmínek hepatocytů v primární kultuře**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

#### Teoretická část:

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na optimalizaci kultivačních podmínek hepatocytů potkana (myši) v primárních kulturách.
2. V literární rešerši se rovněž věnujte typům jaterních buněk s důrazem na hepatocyty a modelovým systémům hepatocytů *in vitro*.
3. Ke zpracování tohoto přehledu využijte přednostně elektronické databáze (NCBI PubMed, ScienceDirect, apod.).

#### Experimentální část:

1. Naučte se pracovat s primárními kulturami hepatocytů potkana (hodnocení viability, stanovení density buněk, příprava primárních kultur hepatocytů v *monolayeru*, teoreticky izolace hepatocytů potkana metodou dvoustupňové kolagenázové perfúze).
2. Naučte se připravovat a zpracovávat biologické vzorky získané z primárních kultur hepatocytů potkana a následně u těchto vzorků stanovovat základní parametry poškození hepatocytů v podmínkách *in vitro* (aktivita laktátdehydrogenázy, resp. LDH *leakage*, aktivita celulárních dehydrogenáz (WST-1 test), aktivita kaspázy-3, mikroskopické hodnocení s pomocí fázového kontrastu).
3. Nosnou částí práce je optimalizace kultivačních podmínek s ohledem na densitu buněk na mikrotitračních destičkách a na dobu *seedingu*.
4. Získaná experimentální data statisticky zpracujte a diskutujte. Své výsledky následně porovnejte s výstupy jiných autorů.


Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce: **MUDr. Vladimíra Nováková Mužáková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **doc. MUDr. Otto Kučera, Ph.D.**  
Lékařská fakulta UK Hradec Králové  
Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**  
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

## **Prohlašuji:**

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

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 6. 5. 2019

.....  
Bc. Andrea Jakubíčková

**Tato práce vznikla za finanční podpory grantu Progres Q40/02.**

Tímto bych ráda poděkovala MUDr. Vladimíře Novákové Mužákové, Ph.D. za odborné vedení práce. Také bych ráda poděkovala doc. MUDr. Ottovi Kučerovi, Ph.D. za odborný dohled, konzultace a poskytování užitečných rad při tvorbě této práce. Poděkování patří i paním laborantkám za pomoc při práci v laboratoři a za příjemné pracovní prostředí, které vytvářely.

V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu a vstřícnost v průběhu celého studia.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce byla zaměřena na optimalizaci kultivačních podmínek hepatocytů v primární kultuře s ohledem na densitu buněk a dobu potřebnou pro přichycení buněk k povrchu mikrotitračních destiček (tzv. dobu *seedingu*). Primární kultury hepatocytů jsou používány pro toxikologické a farmakokinetické studie, pro studium metabolismu a genové exprese. Životaschopnost kultivovaných buněk a míra jejich poškození byla hodnocena pomocí aktivity buněčných dehydrogenáz (WST-1 test), aktivity laktátdehydrogenázy (LDH), resp. LDH-*leakage*, a aktivity kaspázy 3. Nejprve byla optimalizována densita buněk pro vybrané typy mikrotitračních destiček. Z výsledků vyplývá, že optimální density jsou 30 000 bb/j pro 96jamkové destičky, 200 000 bb/j pro 24jamkové destičky a 350 000 bb/j pro 12jamkové destičky. Tyto hodnoty odpovídají přibližně densitě  $1,0 \times 10^5$  bb/cm<sup>2</sup>. Druhým úkolem bylo optimalizovat dobu potřebnou pro přichycení buněk k povrchu kultivačních destiček. Bylo zjištěno, že testované doby nemají vliv na hodnocené parametry hepatocytů.

## **KLÍČOVÁ SLOVA:**

hepatocyty, primární kultura, buněčná viabilita, densita buněk, doba *seedingu*

## **TITLE**

Optimization of Culture Conditions of Hepatocyte in Primary Culture

## **ANNOTATION**

The thesis was focused on optimization of hepatocyte culture conditions in primary culture considering cell density and seeding time. Primary hepatocyte cultures are used for toxicological and pharmacokinetic studies, for the study of metabolism and gene expression. The viability of cultured cells and their damage rate was determined by cellular dehydrogenases activity (WST-1 test), lactate dehydrogenase activity (LDH), respectively LDH-leakage, and activity of caspase 3. At first, cell density for different well plate types was optimized. The results indicate that optimum densities are 30 000 cells/well for 96-well plates, 200 000 cells/well for 24-well plates and 350 000 cells/well for 12-well plates. These values correspond to a density  $1,0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>. Another aim of this work was to optimize the time of seeding. It was found that tested seeding times do not affect the evaluated parameters of hepatocytes.

## **KEYWORDS:**

hepatocytes, primary culture, cell viability, cell density, seeding time

# OBSAH

<b>ÚVOD.....</b>	<b>11</b>
<b>1. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>12</b>
1.1 Játra .....	12
1.2 Jaterní buňky .....	13
1.2.1 <i>Neparenchymové jaterní buňky</i> .....	13
1.2.2 <i>Hepatocyty</i> .....	14
1.3 Izolace hepatocytů.....	15
1.3.1 <i>Jednostupňová kolagenázová perfúze</i> .....	15
1.3.2 <i>Dvoustupňová kolagenázová perfúze</i> .....	16
1.3.3 <i>Ovlivnění kvality buněk během izolace</i> .....	16
1.4 Modelové systémy hepatocytů <i>in vitro</i> .....	17
1.4.1 <i>Model perfundovaných jater</i> .....	18
1.4.2 <i>Jaterní řezy</i> .....	18
1.4.3 <i>Buněčné suspenze hepatocytů</i> .....	19
1.4.4 <i>Primární kultury hepatocytů</i> .....	19
1.4.5 <i>Kokultivační techniky</i> .....	21
1.4.6 <i>Trojrozměrné modely</i> .....	21
1.4.7 <i>Subcelulární frakce</i> .....	23
1.4.8 <i>Kmenové buňky</i> .....	23
1.4.9 <i>Buněčné linie hepatocytů</i> .....	23
1.5 Kultivační podmínky primárních kultur hepatocytů.....	25
1.5.1 <i>Kultivační nádoby a extracelulární matrix</i> .....	25
1.5.2 <i>Kultivační média</i> .....	26
1.5.3 <i>Suplementy kultivačních médií</i> .....	27
1.5.4 <i>Densita buněčné kultury</i> .....	28
1.5.5 <i>Doba potřebná pro přichycení hepatocytů k povrchu kultivační nádoby</i> .....	29
1.5.6 <i>Vliv vnějších podmínek na kultivaci</i> .....	29
1.5.7 <i>Kryoprezervace hepatocytů</i> .....	30
1.6 Testování viability hepatocytů v primární kultuře .....	31
1.6.1 <i>Morfologické znaky primárních kultur hepatocytů</i> .....	31
1.6.2 <i>Testování viability pomocí barviv</i> .....	32
1.6.3 <i>Stanovení laktátdehydrogenázy</i> .....	33



1.6.4	<i>Detekce aktivity buněčných dehydrogenáz</i> .....	34
1.6.5	<i>Využití aktivity kaspázy-3 pro detekci apoptózy</i> .....	35
1.6.6	<i>Posouzení produkce reaktivních forem kyslíku</i> .....	36
1.6.7	<i>Testování syntetických vlastností hepatocytů</i> .....	38
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>METODICKÁ ČÁST</b> .....	<b>40</b>
3.1	Použité roztoky.....	40
3.2	Příprava hepatocytů pro kultivaci .....	42
3.2.1	<i>Izolace hepatocytů</i> .....	42
3.2.2	<i>Určení viability hepatocytů</i> .....	43
3.2.3	<i>Stanovení density hepatocytů</i> .....	43
3.2.4	<i>Příprava zásobních suspenzí hepatocytů</i> .....	43
3.2.5	<i>Příprava vícejamkových plastových destiček</i> .....	43
3.3	Optimalizace kultivačních podmínek primárních kultur hepatocytů .....	44
3.3.1	<i>Optimalizace density buněk pro vybrané vícejamkové destičky</i> .....	44
3.3.2	<i>Optimalizace doby přichycení hepatocytů k povrchu jednotlivých vícejamkových destiček</i> .....	46
3.4	Mikroskopická analýza .....	47
3.5	Stanovení aktivity laktátdehydrogenázy .....	47
3.6	Stanovení aktivity buněčných dehydrogenáz (test WST-1).....	48
3.7	Stanovení aktivity kaspázy 3.....	48
3.8	Statistické vyhodnocení výsledků .....	48
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKOVÁ ČÁST</b> .....	<b>50</b>
4.1	Optimalizace density buněk pro 96jamkové destičky.....	50
4.1.1	<i>Vliv density hepatocytů na aktivitu laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu – 24 h inkubace, 96jamkové destičky</i> .....	50
4.1.2	<i>Vliv density hepatocytů na aktivitu buněčných dehydrogenáz (WST-1 test) v kultivačním médiu – 24 h inkubace, 96jamkové destičky</i> .....	51
4.2	Optimalizace density buněk pro 24jamkové destičky.....	52
4.2.1	<i>Vliv density hepatocytů na extracelulární i intracelulární aktivitu laktátdehydrogenázy a na LDH-leakage – 24 h inkubace, 24jamkové destičky</i> .....	52
4.2.2	<i>Vliv density hepatocytů na extracelulární a intracelulární aktivitu kaspázy 3 – 24 h inkubace, 24jamkové destičky</i> .....	55
4.2.3	<i>Vliv density buněk na morfologii hepatocytů – 24 h kultivace, 24 WP</i> .....	57
4.3	Optimalizace density buněk pro 12jamkové destičky.....	59

4.3.1	<i>Vliv density hepatocytů na extracelulární i intracelulární aktivitu laktátdehydrogenázy a na LDH-leakage – 24 h inkubace, 12jamkové destičky .....</i>	59
4.3.2	<i>Vliv density hepatocytů na extracelulární a intracelulární aktivitu kaspázy 3 – 24 h inkubace, 12jamkové destičky .....</i>	61
4.3.3	<i>Vliv density buněk na morfologii hepatocytů – 24 h kultivace, 12 WP .....</i>	63
4.4	<b>Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 96jamkových destiček.....</b>	65
4.4.1	<i>Vliv doby nezbytné pro přichycení hepatocytů na aktivitu buněčných dehydrogenáz (WST-1 test) v kultivačním médiu – 24 h inkubace, 96jamkové destičky...</i>	65
4.5	<b>Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 24jamkových destiček.....</b>	66
4.5.1	<i>Vliv doby nezbytné pro přichycení hepatocytů na extracelulární i intracelulární aktivitu laktátdehydrogenázy a na LDH-leakage – 24 h inkubace, 24jamkové destičky ..</i>	66
4.5.2	<i>Vliv doby nezbytné pro přichycení hepatocytů na extracelulární a intracelulární aktivitu kaspázy 3 – 24 h inkubace, 24jamkové destičky.....</i>	68
4.6	<b>Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 12jamkových destiček.....</b>	70
4.6.1	<i>Vliv doby nezbytné pro přichycení hepatocytů na extracelulární i intracelulární aktivitu laktátdehydrogenázy a na LDH-leakage – 24 h inkubace, 12jamkové destičky ..</i>	70
4.6.2	<i>Vliv doby nezbytné pro přichycení hepatocytů na extracelulární a intracelulární aktivitu kaspázy 3 – 24 h inkubace, 12jamkové destičky.....</i>	72
<b>5</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>79</b>
	<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>80</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>81</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>82</b>
	<b>SEZNAM GRAFŮ .....</b>	<b>83</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>84</b>

## ÚVOD

Hepatocyty jsou jaterní buňky provádějící většinu funkcí jater. Zastávají důležitou úlohu zejména v metabolismu, při biotransformaci exogenních látek, při syntéze řady sloučenin a v regeneraci jaterního poškození. Existuje řada *in vitro* modelových systémů, na kterých lze tyto děje studovat. Jedním z nejpoužívanějších modelových systémů jsou primární kultury hepatocytů.

Primární kultury hepatocytů se staly důležitým systémem používaným pro studium hepatotoxicity, toxikologickým a farmakokinetickým studiím. Abychom měli k dispozici kvalitní primární kultury s velkým množstvím životaschopných hepatocytů, které si zachovávají své funkce po co nejdelší dobu, je potřeba definovat optimální podmínky pro izolaci a kultivaci hepatocytů.

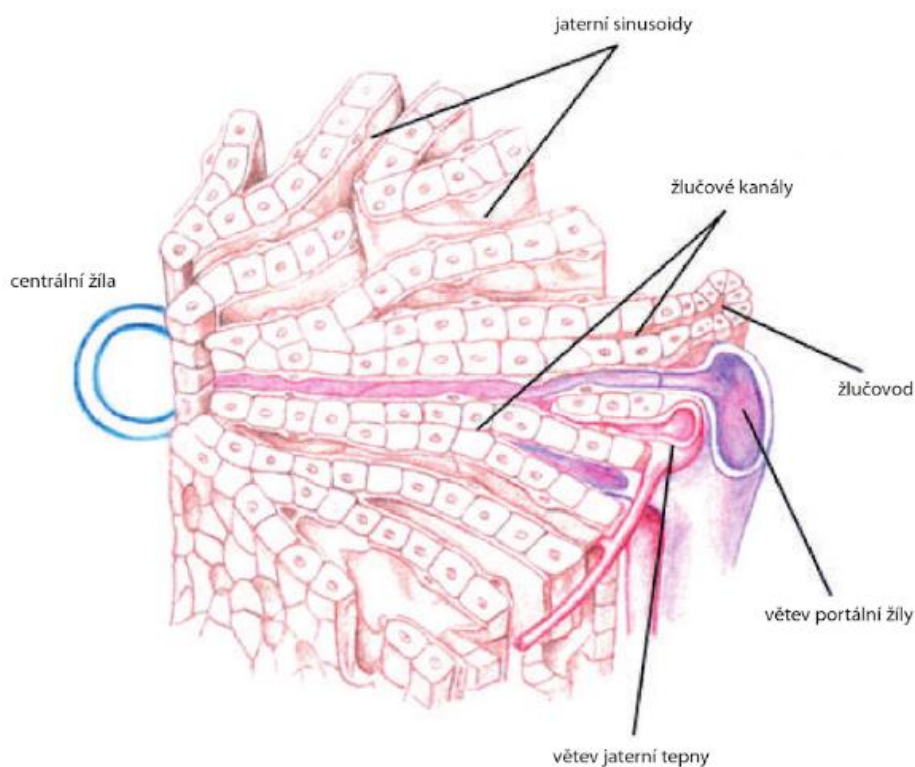
Cílem této práce je optimalizovat kultivační podmínky primárních kultur hepatocytů potkana s ohledem na densitu buněk v různých typech mikrotitračních destiček a s ohledem na dobu, která je potřebná pro přichycení hepatocytů k povrchu těchto destiček.

# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Játra

Játra zastávají klíčovou úlohu v metabolismu obratlovců. V játrech probíhá syntéza látek důležitých pro trávení a vstřebávání potravy. Syntetizovány jsou zde také plazmatické proteiny včetně srážecích faktorů. Játra mají také zásobní funkci, je zde skladován např. glykogen, vitamíny a železo. Probíhá zde biotransformace celé řady endogenních a většiny cizorodých látek. V játrech jsou také vytvářeny a skladovány signální molekuly, dochází zde také k jejich přeměně (Červinková 2005).

Základní morfológickou stavební jednotkou jater je jaterní lalůček, tzv. *lobulus* (viz obrázek 1). Velikost jaterního lalůčku je 0,8-2 mm.



**Obrázek 1:** Schéma jaterního lalůčku. (Převzato z: Ehrmann a Hůlek, 2010)

Jaterní lalůček je složen z hepatocytů uspořádaných do trámčů, které obklopují centrální žílu (*vena centralis*). Trámce jsou tvořeny dvěma vrstvami hepatocytů. Mezi sousedními buňkami se nacházejí žlučové kanálky, které ústí do žlučovodů. Žlučovody jsou uloženy mezi dvěma sousedními lalůčky. Větve portální žíly a jaterní tepny přivádějí

okysličenou krev a živiny do jaterních sinusoid. Mezi hepatocyty a endotelem sinusoid se nachází tzv. Disseho prostor, v němž dochází k výměně látek mezi krví a hepatocyty (Ehrmann a Hůlek, 2010).

## 1.2 Jaterní buňky

Buňky jater mohou být rozdělovány na buňky parenchymové a neparenchymové. Hepatocyty jsou parenchymové buňky, které představují přibližně dvě třetiny celkové buněčné populace jaterní tkáně. Zbylou jednu třetinu vytvářejí buňky neparenchymové. Mezi neparenchymové buňky patří endotelové buňky, Kupfferovy buňky, epitelové buňky žlučových cest (tzv. cholangiocyty), Itovy buňky a Pit buňky (Ehrmann a Hůlek, 2010).

### 1.2.1 *Neparenchymové jaterní buňky*

Do trámečku mezi hepatocyty jsou zvenčí vklíněny **Itovy buňky** (nazývané také jako buňky hvězdicovité, lipocyty nebo pericyty). Itovy buňky mají hvězdicovitý tvar. Svými výběžky obklopují jaterní sinusoidy, čímž mohou ovlivňovat portální tlak. Obsahují kontraktilní proteiny aktin a myozin. Sekretují proteiny extracelulární matrix (včetně kolagenu) a proteoglykany (např. fibronektinu). Ve zdravých játrech jsou v tukových kapénkách Itoových buněk skladovány retinoidy. Produkuje růstový faktor, který je důležitou složkou regenerace poškozených jater, a mají důležitou funkci při regeneraci po toxickém poškození hepatocytů. Po poškození hepatocytů ztrácejí Itovy buňky tukové kapénky, proliferují a migrují do perivenózního prostoru, mění svůj fenotyp na fenotyp buněk podobných myofibroblastům a produkují kolagen typu I, III, IV a laminin. Poškozené hepatocyty mohou být tímto způsobem nahrazovány vazivem (např. při rozvoji jaterní fibrózy a cirhózy) (Čihák et al., 2002; Ehrmann a Hůlek, 2010).

Výstelku jaterních sinusoid tvoří **endotelové buňky**. Od endotelových buněk nacházejících se v ostatních tkáních se liší tím, že nemají pravou bazální membránu. Vyznačují se velkým počtem fenestrací vytvářejících vysoce propustný filtr mezi tekutinou v Disseho prostoru a krví v sinusoidách. Endotelové buňky se významně podílejí na vychytávání částic z oběhu, např. modifikovaných lipoproteinů, transferinu, některých cytokinů, a mají schopnost endocytovat částice do velikosti 0,1  $\mu\text{m}$  (Ehrmann a Hůlek, 2010).

**Kupfferovy buňky**, nacházející se na lumenální povrchu endotelových buněk, se diferencují z monocytů a jsou součástí mononukleárního fagocytárního systému. Tyto buňky

mají schopnost fagocytovat imunokomplexy, staré erythrocyty, zbytky rozpadlých buněk a potenciálně škodlivé látky, které jsou do jater přiváděny portální krví, a tím mohou Kupfferovy buňky zabránit jejich vstupu do systémové cirkulace. Další důležitou funkcí Kupfferových buněk je sekrece proteinů, které mají vztah k imunitním dějům (Junqueira et al., 1997; Ehrmann a Hůlek, 2010).

**Pit buňky** jsou vysoce pohyblivé lymfocyty patřící do skupiny přirozených zabíječů (tzv. natural killers), sloužící k ochraně proti virům a metastatickým nádorovým buňkám (Ehrmann a Hůlek, 2010). **Cholangiocyty** jsou epitelové buňky žlučových cest, které se podílejí na úpravě žluči.

### 1.2.2 *Hepatocyty*

Hepatocyty mají tvar mnohostěnu s 6 a více plochami. Velikost hepatocytů je přibližně 20-30  $\mu\text{m}$ . Každý hepatocyt je svým povrchem v kontaktu se sousedícími hepatocyty a od stěny sinusoid jej odděluje Disseho prostor. Cytoplazma hepatocytů obsahuje jedno až dvě jádra, velký počet mitochondrií a hladkého endoplazmatického retikula (Junqueira et al., 1997).

Zralé hepatocyty jsou terminálně diferencované dlouhodobě stabilní buňky, které provádějí většinu jaterních funkcí (Helgason a Miller, 2004), mají vysokou schopnost proliferace a vykazují vysokou metabolickou aktivitu (Freshney et al., 2002; Gu et al., 2017). Hepatocyty mají důležitou úlohu při metabolismu lipidů, v detoxikaci exogenních xenobiotik, jsou místem tvorby močoviny a plazmatických proteinů. Také většina proteinů, které se podílejí na homeostáze jater, je produkována v hepatocytech a jejich počet je primárně regulován na úrovni transkripce (Baker et al., 2001).

Hepatocyty mají vysokou schopnost regenerace. Po působení toxických látek nebo po mechanické ztrátě tkáně např. chirurgickým výkonem může dojít ke tvorbě nových buněk nebo k úplnému obnovení funkcí poškozených hepatocytů. Nové buňky vznikají mitotickým dělením zbylých hepatocytů, zapojují se pravděpodobně i kmenové buňky (Diehl a Rai, 1996). Dělení hepatocytů probíhá ve dvou fázích. Nejprve dojde k mobilizaci malého počtu hepatocytů nacházejících se v G2 fázi buněčného cyklu. V průběhu jejich dělení jsou do okolí uvolňovány prozánětlivé cytokiny a růstové faktory (např. interleukin-6 a *tumor necrosis factor- $\alpha$* , *transforming growth factor- $\alpha$* ) a také jsou exprimovány některé protoonkogeny. V odpovědi na tyto děje nastává druhá fáze, ve které dochází k mohutnějšímu dělení hepatocytů a dalších typů buněk (Soni a Mehendale, 1998).

### 1.3 Izolace hepatocytů

Jaterní parenchym je protkán sítí kolagenních fibril, které jsou součástí extracelulární matrix. Extracelulární matrix je složena zejména ze směsi elastinu, proteoglykanu heparan sulfátu, fibronektinu a lamininu. Extracelulární matrix, společně s adhezními glykoproteiny,  $\text{Ca}^{2+}$  ionty a povrchovými receptory, je důležitá pro udržení tvaru, polarity a funkce buněk. Složení extracelulární matrix je u různých živočišných druhů rozdílné, což vede k různému stupni obtížnosti při izolaci buněk. Například prasečí játra obsahují více kolagenu a vláknité tkáně, proto je u nich separace hepatocytů obtížnější než u potkaních jater (Li et al., 2017).

Zvrat ve vývoji metod pro izolaci hepatocytů nastal už v roce 1967, kdy Howard a jeho spolupracovníci prokázali význam kolagenáz pro separaci jaterních buněk. Kolagenázy patří mezi matrixové metaloproteinázy, což jsou enzymy s proteolytickou aktivitou přednostně zaměřenou na extracelulární matrix (Guillouzo, 1998; Hladíková a Štourač, 2008).

M. N. Berry a D. S. Friend v roce 1969 vyvinuli techniku kolagenázové perfúze jater, díky které byly výrazně zvýšeny výtěžky hepatocytů. Od té doby bylo popsáno mnoho modifikací této metody, které zahrnují změny složení perfúzního média nebo dobu trvání perfúze, různé možnosti odstranění jater ze zvířete před perfúzí, nebo změny v promývacích procesech. Cílem perfúze je vždy získat maximální podíl životaschopných hepatocytů s minimálními biochemickými změnami a také s minimální příměsí kontaminujících neparenchymových buněk.

Metody kolagenázové perfúze vyžadují dva protichůdné požadavky. Na jednu stranu mohou být buňky vystaveny jen velmi nízké koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, aby bylo umožněno štěpení jaterních desmosomů. Na druhé straně stojí fakt, že  $\text{Ca}^{2+}$  ionty jsou nezbytné pro správnou aktivitu kolagenázy. Tyto požadavky byly vyřešeny dvěma způsoby, a to použitím jednostupňové nebo dvoustupňové perfúze (Guillouzo, 1998).

#### *1.3.1 Jednostupňová kolagenázová perfúze*

Jednostupňový postup kolagenázové perfúze je založen na faktu, že koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů potřebná pro správnou aktivitu kolagenázy je mnohem nižší než koncentrace, při které by bylo možné zachovat integritu desmosomálních spojů. Aplikována je tedy snížená koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a v jednom kroku dojde současně k rozrušení desmosomálních spojů mezi buňkami i k rozrušení extracelulární matrix díky dostatečné aktivitě kolagenázy (Guillouzo, 1998).

### 1.3.2 Dvoustupňová kolagenázová perfúze

Dvoustupňovou kolagenázovou perfúzi zavedl Seglen v roce 1976. Postup probíhá ve dvou krocích. Během tzv. pre-perfúze jsou játra proplachována asi 500 ml média bez  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, a to nejméně po dobu 10 minut. V tomto kroku tak dochází ke štěpení jaterních desmosomů. Ve druhém kroku je k perfuzátu přidána kolagenáza s  $\text{Ca}^{2+}$  ionty, aby byla narušena extracelulární matrix (Mitry et al., 2002).

Další postup je shodný s postupem jednostupňové perfúze, jaterní tkáň je mechanicky rozrušena, následně je filtrována a centrifugována, aby byla odstraněna pojivová tkáň, mrtvé hepatocyty a neparenchymální jaterní buňky. Pokud by nebyly mrtvé hepatocyty okamžitě odstraněny, došlo by k uvolnění velkého množství proteáz a fosfolipáz, které by mohly významně snížit viabilitu buněk.

Dvoustupňová kolagenázová perfúze poskytuje vysoký počet hepatocytů s dobrou životaschopností, jejichž kultury poskytují alespoň po krátkou dobu systém dobře srovnatelný s podmínkami *in vivo* (Vinken et al., 2012; Severgnini et al., 2012).

### 1.3.3 Ovlivnění kvality buněk během izolace

Oba postupy kolagenázové perfúze by měly poskytovat prakticky identické výtěžky a podíly neporušených buněk. Při jednostupňové perfúzi je sice aktivita kolagenázy nižší (kvůli nižší koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů), tento fakt je však kompenzován tím, že jednostupňová perfúze probíhá o něco delší dobu, než dvoustupňová.

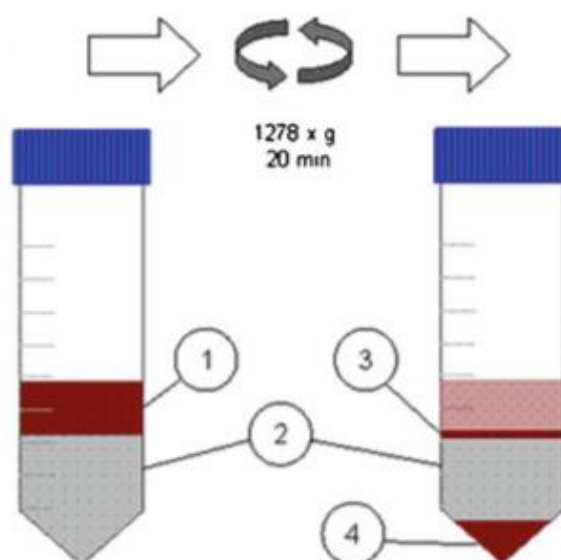
Surová kolagenáza je získávána izolací z bakterií *Clostridium histolyticum*. Kolagenáza typu IV byla dříve klasický enzym používaný pro izolaci primárních hepatocytů u všech živočišných druhů. Dnes je pro účely izolace používána směs enzymů, která kromě kolagenázy obsahuje také další proteázy (Mitry et al., 2002). Tyto izolační roztoky jsou specifické pro jednotlivé druhy organismů, zlepšila se tak čistota, životaschopnost a výtěžky izolovaných hepatocytů.

Izolační roztoky jsou citlivé na změnu teploty, ta by se optimálně měla pohybovat mezi 37-38 °C. Při změně teploty může být ovlivněna aktivita kolagenázy, což vede k poklesu viability izolovaných hepatocytů.

Pokud jsou výtěžky hepatocytů po izolaci nízké, je potřeba ze suspenze odstranit kontaminující neparenchymové buňky. Pro tyto účely byl vyvinut roztok Percoll (popř. Ficoll), kdy je využíváno rozdílné hustoty hepatocytů a neparenchymových buněk (Li et al., 2017). Percoll je koloidní roztok silikátových částic obalených inertní organickou



látkou. Centrifugací Percollu se částice rozdělí podle hustoty a vytvoří se tak kontinuální gradient. Když buněčnou suspenzi hepatocytů převrstvíme vrstvou Percollu, po centrifugaci se vytvoří třetí (horní) vrstva, která obsahuje mrtvé buňky a části buněk (viz obrázek 2). Po odstranění supernatantu může být buněčný pelet resuspendován v kultivačním médiu (Knobeloch et al., 2012).



**Obrázek 2:** Centrifugace v hustotním gradientu s použitím roztoku Percoll. (1) buněčná suspenze; (2) vrstva Percollu; (3) části buněk a mrtvé buňky, které zůstávají na povrchu Percollu; (4) buněčný pelet živých buněk. (Převzato z Knobeloch et al., 2012)

Tímto způsobem získáme suspenzi jednotlivých hepatocytů s vysokou životaschopností, která neobsahuje buněčné agregáty a jiné typy buněk. Centrifugace v hustotním gradientu s použitím roztoku Percoll je používána hlavně při izolaci lidských hepatocytů (Kreamer et al., 1986).

#### 1.4 Modelové systémy hepatocytů *in vitro*

Součástí výzkumů nově syntetizovaných látek je testování jejich toxicity. V minulosti k tomu byly používány pouze testy *in vivo*. Ekonomické, legislativní a etické důvody vedly k rozvoji modelových *in vitro* systémů, které umožňují sledovat studované děje na buněčné až molekulární úrovni.

Modelové systémy *in vitro* by měly být bezpečné, cenově dostupné, práce s nimi by neměla být příliš složitá a nemělo by u nich docházet ke změnám aktivity enzymů. Práci s těmito systémy bychom měli docílit stejných výsledků jako v podmínkách *in vivo*.

Ideální *in vitro* model pro studium hepatotoxicity prakticky neexistuje. Buňky jsou často kultivovány v uměle vytvořeném kultivačním médiu za nefyziologických podmínek, proto nemohou zcela nahrazovat modely *in vivo*. Snahou je docílit toho, aby byly při studiu nových látek používány primárně *in vitro* modely a modely *in vivo* poté sloužily pouze k ověření získaných výsledků (Kučera et al., 2006).

Mezi nejčastěji používané modelové systémy patří model perfundovaných jater, jaterní řezy, stabilizované buněčné linie, izolované hepatocyty ve formě buněčných suspenzí nebo primárních kultur, kokultivace hepatocytů s jinými typy buněk a významné jsou také subcelulární frakce. Výsledky studií získaných z jednotlivých modelových systémů se navzájem doplňují a je vhodné je mezi sebou porovnávat (Soldatow et al., 2013; Červenková et al., 2001).

#### **1.4.1 Model perfundovaných jater**

Model perfundovaných izolovaných jater má nejbliže k podmínkám *in vivo*. Je zde zachována trojrozměrná struktura, mezibuněčné kontakty, tvorba žluči a možný sběr žluči. Tento model je používán ke studiu toxických a lékových poškození jater. Mezi jeho nevýhody patří časová a prostorová náročnost, obtížná manipulace a krátkodobá životnost (2-3 hodiny). Také zde není možnost testovat více látek nebo koncentrací současně (Kučera et al., 2006; Guillouzo, 1998).

#### **1.4.2 Jaterní řezy**

Jaterní řezy jsou používány od roku 1980. Přípravovány jsou plátky jaterní tkáně o šířce 250  $\mu\text{m}$ . Tento systém je vhodný i pro studie na lidských játrech, protože jaterní řezy mohou být snadno připravovány také z bioptického materiálu (Lerche-Langrand a Toutain, 2000; Guillouzo, 1998).

Výhodou jaterních řezů je zachování integrity vazeb mezi buňkami a extracelulární matrix. Na rozdíl od modelů využívajících izolované hepatocyty nevyžaduje příprava řezů použití proteolytických enzymů, které narušují mezibuněčné interakce a mohou být pro buňky toxické. Další výhodou je, že jaterní řezy obsahují všechny typy buněk, které jsou v játrech přítomny, přičemž je zachováno i rozmístění těchto buněk podobně jako v játrech *in vivo*

(Andria et al., 2010; Olinga et al., 1997). Řezy tedy obsahují i neparenchymové buňky, ve kterých je sice exprimováno jen malé množství enzymů metabolizujících léky, ale i přesto mohou mít velmi důležitou úlohu při studiu toxicity (Lerche-Langrand a Toutain, 2000).

U jaterních řezů však nezůstávají stabilní všechny jaterní funkce příliš dlouhou dobu. Metabolicky aktivní zůstávají po dobu dvou až tří dnů. Hlavní příčinou nestability metabolických funkcí je špatná difuze kyslíku a živin z inkubačního média. Doba životnosti jaterních řezů lze zvýšit kryokonzervací (Andria et al., 2010; Groneberg et al., 2002).

### **1.4.3 Buněčné suspenze hepatocytů**

Čerstvě izolované nebo kryokonzervované hepatocyty v suspenzi jsou dalším příkladem snadno dostupných *in vitro* systémů, které se běžně používají při zkoumání metabolických nebo toxických účinků xenobiotik. Výhoda buněčných suspenzí spočívá v tom, že je možné zajistit dostatečný přenos látek mezi kultivačním médiem a samotnými hepatocyty (Andria et al., 2010).

Jak už bylo řečeno výše, hepatocyty jsou obvykle získávány dvoustupňovou kolagenázovou perfúzí. Kolagenáza narušuje mezibuněčné kontakty a komunikační systémy. Mezibuněčné kontakty jsou však důležité pro zachování některých důležitých vlastností diferencovaných buněk. Po štěpení kolagenázou buňky ztrácejí svůj polární charakter a mění tvar. Nevýhodou těchto systémů tedy může být rychle klesající viabilita hepatocytů, která je často omezená na několik hodin. Buňky jsou ale schopny opravit defekty svých membrán a zachovat si většinu svých funkcí alespoň po omezenou dobu. Doba životnosti hepatocytů v buněčných suspenzích je dostatečná alespoň pro identifikaci základních metabolitů testované látky (Kučera et al., 2006; Andria et al., 2010, Elaut et al., 2005; Červenková et al., 2001).

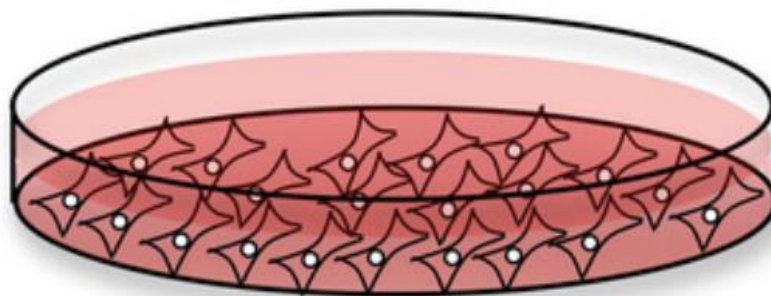
Použití buněčných suspenzí není standardizováno a různé laboratoře používají různá média, která mohou ovlivňovat viabilitu hepatocytů. Při kultivaci buněk v suspenzi je potřebný přísun oxidu uhličitého (Elaut et al., 2005).

### **1.4.4 Primární kultury hepatocytů**

Primární kultury hepatocytů se staly standardním a vůbec nejpoužívanějším *in vitro* modelem pro studium hepatotoxicity. Hepatocyty si v primární kultuře zachovávají specifické funkce jako je metabolismus sacharidů, lipidů, syntéza močoviny, žlučových kyselin, schopnost biotransformace léčiv atd. (Gómez-Lechón et al., 2014). Tyto kultury jsou

používány k metabolickým, toxikologickým a farmakokinetickým studiím, ke sledování růstu buněk a buněčného dělení, ke studiu xenobiotik, a také pro studium genové exprese (Baker et al., 2001).

Oproti buněčným liniím mají diploidní sadu chromozomů a nepozměněný genotyp. Ke kultivaci hepatocytů *in vitro* jsou nejčastěji používány plastové kultivační nádoby potažené vrstvou extracelulární matrix, na kterou se mohou hepatocyty přichytávat a vytvářet jednu vrstvu buněk, tzv. monolayer, která je znázorněna na obrázku 3 (Soldatow et al., 2013).



**Obrázek 3:** Buňky rostoucí na Petriho misce v jedné vrstvě (Převzato z: Chow, 2010)

Hepatocyty bývají nejčastěji izolovány z čerstvě vyjmutých jater. Používání lidských hepatocytů je možné, ale z řady důvodů obtížné, a proto většina laboratoří používá k přípravě primárních kultur převážně potkaní nebo myší hepatocyty (Bachmann et al., 2015).

V ideálním případě by měly *in vitro* modely poskytovat prostředí, které umožňuje dlouhodobé zachování diferencovaných hepatocytů (Baker et al., 2001). Nevýhodou primárních kultur však je, že napodobují stav *in vivo* pouze po krátkou dobu kultivace, jejich funkční aktivita přetrvává po dobu 24-72 hodin (Soldatow et al., 2013). Hepatocyty v monolayer kulturách podléhají rychlým změnám morfologie, struktury, polaritě, v průběhu času hepatocyty ztrácejí své funkce, především schopnost metabolizovat léky (Gómez-Lechón et al., 2014). Problémem je relativně rychlý pokles aktivit biotransformačních enzymů a tzv. dediferenciace, při které se metabolismus kultivovaných hepatocytů posouvá směrem k fenotypu fetálních hepatocytů (Fraczek et al., 2013).

Proces dediferenciace je iniciován již během samotné izolace, kdy jsou izolované buňky vytrženy ze svého běžného mikroprostředí, ztrácejí mezibuněčné kontakty a jsou vystaveny působení chemických látek (Soldatow et al., 2013). Narušení integrity jaterní tkáně během izolace způsobí aktivaci zánětlivé a proliferační odpovědi, prostřednictvím aktivace

nukleárního faktoru  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) a mitogenem aktivované protein kinázy. Zánětlivou reakci dále stupňují přísady kolagenázy, kdy se k buňkám dostávají bakteriální lipopolysacharidy a dochází tak k aktivaci Kupfferových buněk. Po aktivaci signálních kaskád prostřednictvím výše zmíněných faktorů vstupují hepatocyty do G1 fáze buněčného cyklu, což má nepříznivý účinek na expresi genů pro biotransformační enzymy. Tyto změny na úrovni messengerové ribonukleové kyseliny (mRNA) jsou nejvýraznější mezi 24 a 48 hodinami kultivace. Dediferenciace se projevuje sníženou aktivitou některých enzymových systémů, jako je např. syntéza močoviny nebo aktivita cytochromu P450 (CYP). Naopak dochází k upregulaci genů kódujících proteiny akutní fáze a cytoskeletární proteiny, např.  $\beta$ -aktin, tubulin, vimentin, apod., což může odrážet reakci hepatocytů na buněčný stres během izolace a narušení jejich morfologie (Fraczek et al., 2013).

Dediferenciaci lze zpomalit napodobením *in vitro* podmínek co nejlépe podmínkám *in vivo*. K udržení hepatocytů v diferencovaném stavu je nezbytné zachování mezibuněčných interakcí. Stav kultury primárních hepatocytů je ovlivňován densitou kultivovaných buněk, výběrem vhodného kultivačního média, obohacením standardních kultivačních médií fyziologickými i nefyziologickými aditivami, kontaktem s extracelulární matrix a kokultivací s jinými typy buněk, jak bude pojednáno v kapitole 1.5 (Gouliarmou et al., 2015).

#### **1.4.5 Kokultivační techniky**

Bylo prokázáno, že jednou z nejúspěšnějších metod pro udržení funkčních hepatocytů po delší dobu je využití kokultivace s neparenchymovými buňkami. Hepatocyty lze kokultivovat například s Kupfferovými buňkami, endotelovými buňkami nebo také s fibroblasty. Hepatocyty kokultivované s Itovými buňkami přežívají funkční až po dobu dvou měsíců (Krause et al., 2009).

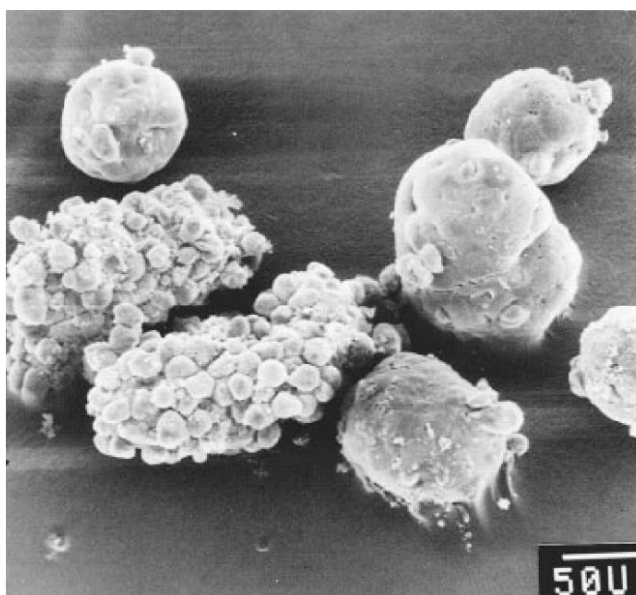
#### **1.4.6 Trojrozměrné modely**

Ve snaze oddálit proces dediferenciace jsou neustále vyvíjeny modelové systémy a dochází k rozvoji trojrozměrných (3D) kultivačních modelů. Trojrozměrnou strukturu lze vytvořit buď pomocí vhodné extracelulární matrix, použitím hydrogelu, nebo syntetických pórovitých scaffoldů (Bachman et al., 2015).

Aby bylo zachováno větší množství mezibuněčných kontaktů, mohou se používat tzv. **sendvičové kultivace**, kdy jsou hepatocyty kultivovány mezi dvěma vrstvami kolagenového gelu. Pro tyto účely je používán tradičně kolagen nebo komerčně dostupný

Matrigel® tj. mezibuněčná hmota získaná z myšního Engelbreth-Holm-Swarmova sarkomu (EHS sarkom) (Soldatow et al., 2013). Mezi hlavní složky extraktů z EHS sarkomu patří laminin, kolagen typu IV a proteoglykan heparan sulfát. Matrigel obsahuje také růstové faktory, které se vyskytují v EHS sarkomu, např. transformující růstový faktor  $\beta$ , aktivátor tkáňového plazminogenu a další (Zeisberg et al., 2006). Hepatocyty kultivované na Matrigelu nejsou zploštělé, ale zachovávají si kubický tvar. Kultivací buněk v sendvičovém uspořádání dediferenciaci zcela nezabráníme, nicméně jejich životaschopnost může být zachována až po dobu 7 týdnů, zachovány jsou i některé důležité funkce. Zatímco exprese některých genů v průběhu času rychle klesá (geny pro enzymy fáze I), hladiny enzymů II. fáze zůstávají stabilní (Soldatow et al., 2013).

**Mnohobuněčné sféroidy** vznikají při kultivaci v nádobách s pozitivně nabitým nepřilnavým povrchem. V takovýchto podmínkách jsou vytvářeny shluky buněk, které si udržují strukturní i funkční polaritu a vysoký počet mezibuněčných interakcí (Kučera et al., 2006). Jaterní sféroidy jsou, ve srovnání s hepatocyty kultivovanými ve formě monolayeru, schopny dlouhodobě udržovat specifické funkce, jako je produkce albuminu, syntéza močoviny a aktivita cytochromu P450. Jejich nevýhodou je však tendence neustále se shlukovat až do vzniku velkých agregátů, uvnitř kterých následně dochází ke smrti buněk (Lin a Chang, 2008). Mnohobuněčné sféroidy jsou znázorněny na obrázku 4.



**Obrázek 4:** Fotografie sféroidů myších hepatocytů pořízená z elektronového mikroskopu (Převzato z: Hu et al., 1997)

### **1.4.7 Subcelulární frakce**

Do subcelulárních frakcí patří membránové vezikuly, mikrosomy, organely (např. mitochondrie a jádra), proteiny apod. Mikrosomy jsou používány např. k detekci peroxidace lipidů vyvolané hepatotoxiny a k vyšetřování enzymů metabolizujících xenobiotika. Na izolovaných mitochondriích mohou být studovány účinky chemických látek na oxidativní fosforylaci, syntézu ATP a oxidaci mastných kyselin. Izolovaná buněčná jádra lze využít při analýzách transkripce genů. Proteiny, receptory nebo různé enzymy jsou ideální pro identifikaci enzymů odpovědných za určitou metabolickou přeměnu, např. pro identifikaci cytochromu P450 (Mortensen et al., 2008; Guillouzo, 1998).

Příprava subcelulárních frakcí je relativně jednoduchá. Stejně jako modely perfundovaných jater a suspenze izolovaných hepatocytů jsou subcelulární frakce funkční pouze krátkodobě. Zmrazené však mohou být uchovávány po poměrně dlouhou dobu (Červenková et al., 2001; Guillouzo, 1998).

### **1.4.8 Kmenové buňky**

Nejnovější a dynamicky se rozvíjející skupinou hepatálních *in vitro* modelů jsou kmenové buňky, které mohou mít původ buď embryonální, nebo mohou pocházet z dospělých jedinců. Kmenové buňky dospělých jedinců jsou nejčastěji získávány z kostní dřeně. Embryonální kmenové buňky jsou získávány z embryí ve stádiu blastocysty, proto může být jejich použití v rozporu s etickými aspekty. Zvláštní kategorii představují indukované pluripotentní kmenové buňky, které jsou získávány genetickou modifikací buněk somatických (Fraczek et al., 2013; Soldatow et al., 2013).

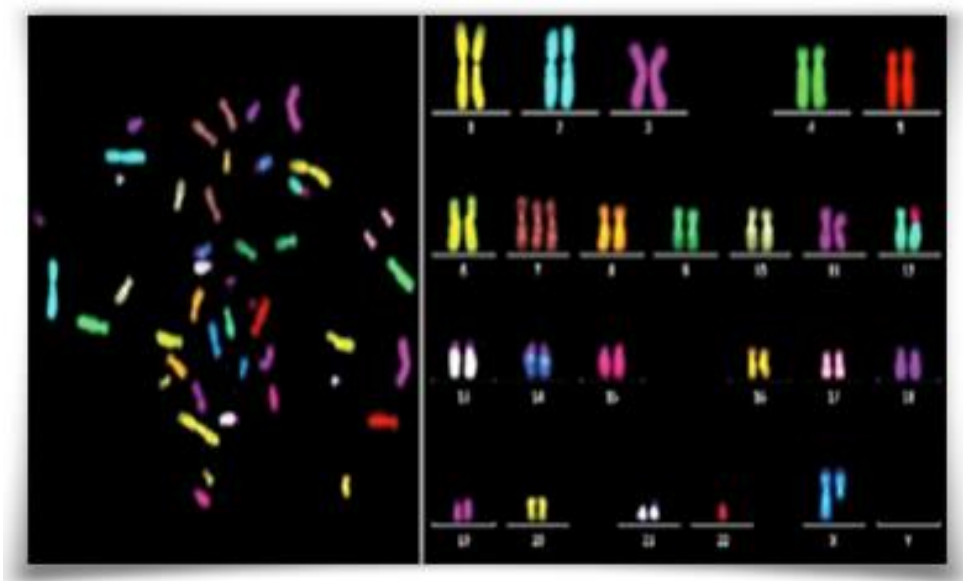
Kmenové buňky by mohly do budoucna poskytnout neomezený přísun hepatocytů pro screening a zlepšila by se reprodukovatelnost prováděných testů. V současné době však postupy pro diferenciaci kmenových buněk v hepatocyty prozatím vedou ke vzniku buněk s nižšími hladinami enzymové aktivity a s nižší expresí některých genů, než u hepatocytů izolovaných z jaterní tkáně (Gómez-Lechón et al., 2014).

### **1.4.9 Buněčné linie hepatocytů**

Dalším populárním *in vitro* systémem jsou buněčné linie hepatocytů, které jsou snadno dostupné, subkultivovatelné a k dispozici je velké množství buněk. Buněčné linie hepatocytů mohou být získány z hepatomů, transformací s virovou či buněčnou

deoxyribonukleovou kyselinou (DNA), izolací hepatocytů z transgenních zvířat, nebo immortalizací buněk virovými geny nebo onkogeny. Buněčné linie vykazují vysoký potenciál stát se významným nástrojem pro předklinické testování léčiv, avšak používané linie prozatím nemají schopnost plně napodobit fyziologii hepatocytů na úrovni srovnatelné s *in vivo* modely. Významnou nevýhodou buněčných linií je nestabilní genotyp, který se v průběhu kultivace může projevit fenotypovými změnami. Ve farmakotoxikologických studiích proto stále zůstávají zlatým standardem primární kultury hepatocytů (Fraczek et al., 2013; Wilkening et al., 2003).

Mezi nepoužívanější buněčné linie lidských hepatocytů odvozené od nádorů jsou linie HepG2, HepaRG, BC2, Hep3B, PLC/PRFs Huh7, HBG (Guguen-Guillouzo a Guillouzo, 2010). U dříve často používané buněčné linie lidských hepatomových buněk HepG2 docházelo ke ztrátám některých funkcí, zejména ke snížení exprese enzymů fáze I (CYP) a transportérů léčiv. Proto jsou v současnosti buněčné linie HepG2 nahrazovány relativně novou buněčnou linií HepaRG, jejichž karyotyp je znázorněn na obrázku 5 (Fraczek et al., 2013; Wilkening et al., 2003).



**Obrázek 5:** Karyotyp HepaRG buněk 12. pasáže (Převzato z: [www.heparg.com](http://www.heparg.com))

HepaRG je lidská hepatomální buněčná linie původem cholangiokarcinomu. Po působení dimethylsulfoxidu (DMSO) se začnou komerčně dostupné HepaRG buňky diferencovat, polarizovat, vytvářet ostrůvky hepatocytů a tzv. BC struktury podobné žlučovým kanálkům. Diferencované buňky začnou vykazovat klíčové charakteristiky jater, jako je exprese mnoha izoform CYP, transportních látek a jaderných receptorů pro



xenobiotika (jako je např. pregnanový X receptor). Úroveň exprese těchto markerů je srovnatelná s jejich expresí u čerstvě izolovaných hepatocytů (Mayati et al., 2018; Fraczek et al., 2013). Protože DMSO může být pro HepaRG buňky toxický a tím ovlivňovat jejich funkci, je snaha najít alternativy k jeho použití. Proto byly analyzovány například účinky forskolinu. Forskolin je přírodní sloučenina, diterpen, který generuje cyklický adenosinmonofosfát a podporuje diferenciaci různých typů buněk. Náhrada dimethylsulfoxidu jinými látkami by mohla pomoci zlepšit použití HepaRG buněk jako náhrady za lidské hepatocyty (Mayati et al., 2018).

Dalším příkladem lidské hepatomální linie je BC2. Jedná se o buněčnou linii lidského hepatokarcinomu, která má schopnost růstu a diferenciaci *in vitro* po vytvoření konfluence. Diferencované BC2 buňky mají vysokou schopnost syntetizovat plazmatické proteiny, glykogen, močovinu a některé izoformy CYP a zůstávají stabilní po dobu několika týdnů. Vzhledem k vysoké stabilitě jsou používány pro hodnocení toxicity po opakovaném dávkování toxinu (Castell et al., 2006).

Pro studium hepatotoxicity mohou být použity také geneticky modifikované buňky, které vznikají transfekcí některých genů. Transfekované buňky exprimují enzymy pro biotransformaci xenobiotik. Například pro screening hepatotoxicity jsou používány buňky, které vznikly transfekcí plazmidového vektoru kódujícího lidské enzymy CYP s lidskými epitelovými buňkami jater. Používána je také například transdukce adenoviru do buněk HepG2, která umožňuje expresi více transgenů najednou (Gómez-Lechón et al., 2014).

Příkladem imortalizovaných buněčných linií je buněčná linie Fa2N-4, která pochází z lidských hepatocytů transfekovaných s velkým T-antigenem opičího viru 40 (označovaného SV40 z angl. simian virus 40) (Guguen-Guillouzo a Guillouzo, 2010). Buňky linie Fa2N-4 exprimují pregnanové X receptory a arylové uhlovodíkové receptory na srovnatelné úrovni jako lidské hepatocyty, exprese konstitutivních androgenových receptorů je však významně nižší (Hariparsad et al., 2008).

## **1.5 Kultivační podmínky primárních kultur hepatocytů**

### **1.5.1 Kultivační nádoby a extracelulární matrix**

Dříve byly hepatocyty v médiu kultivovány v nepovrstvených plastových nádobách za přidání séra obsahujícího fibronectin, který zajišťoval lepší přichycení kultivovaných buněk k povrchu nádoby. Dnes jsou běžně používány plastové Petriho misky nebo vícejamkové

mikrotitrační destičky (WP, z angl. well plate) potažené matrixovými proteiny, protože k samotnému plastu mají hepatocyty nižší afinitu.

Bylo prokázáno, že obnovení kontaktů buněk s komponentami extracelulární matrix (popř. jinými typy buněk), které jsou podobné kontaktům nalezeným *in vivo*, může pomoci udržovat buněčnou morfolonii a metabolické funkce lépe, než pokud jsou buňky kultivovány na nepovrstveném plastovém povrchu. Primární kultury hepatocytů kultivované v přítomnosti extracelulární matrix vykazují vyšší expresi genů pro albumin a podobná seskupení aktinových vláken, jako hepatocyty v prostředí *in vivo*. Kontakt buněk se složkami extracelulární matrix aktivuje buněčné povrchové receptory z rodiny integrinů. Integriny jsou transmembránové proteiny složené z nekovalentně spojených  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek. Každá  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotka obsahuje extracelulární doménu vázající ligand. Ačkoliv integriny nemají žádnou vnitřní enzymatickou aktivitu, umožňují přenos extracelulárních signálů přímým kontaktem s buněčným cytoskeletem, a tím aktivovat přidružené signalizační kaskády, což poté může vyvolat celou řadu intracelulárních signálů, které vedou k celkové kontrole růstu a diferenciaci buněk. Pro každý typ extracelulární matrix jsou aktivovány odlišné typy integrinových receptorů (Page et al., 2007).

Složkou extracelulární matrix bývá nejčastěji kolagen typu I, ale může být používán také fibronektin nebo laminin. Přichytávání buněk ke kolagenu typu I podporuje přítomnost inzulinu. Důležitá je také přítomnost vápenatých a hořečnatých iontů. Fibronektinu a lamininu je pro správné přichycení hepatocytů potřeba větší množství, než u kolagenu. Vhodnější, ale podstatně odlišný zdroj materiálu extracelulární matrix Matrigel, byl vyvinut na základě zjištění, že EHS sarkom produkuje velké množství materiálu, který je více rozpustný než biomatrix z intaktní tkáně (Andria et al., 2010).

### **1.5.2 Kultivační média**

Obecně ke kultivaci různých typů buněčných kultur mohou být používána různá komerčně dostupná kultivační média s přesně definovaným složením (Andria et al., 2010). Nejjednodušším médiem je klasický Ringerův roztok, který definovali S. Ringer a D. W. Buxton v roce 1887. Ringerův roztok obsahuje optimální koncentraci různých solí pro kultivaci tkání srdeční svaloviny. Pro udržení buněk a tkání po delší dobu by mělo médium obsahovat dostatečné množství živin a pufrující látky. Základní typ média formuloval Harry Eagle v roce 1955. Eaglovo médium, známé také pod zkratkou MEM (z anglických slov Minimal Essential Medium), obsahuje aminokyseliny, glukózu a vitamíny.

K udržení životnosti buněk a pro zajištění jejich proliferace, migrace a diferenciaci bývá základní médium doplněno několika faktory (Van der Valk et al., 2010). Dnes je na trhu k dostání mnoho typů kultivačních médií, jako např. Williamsovo médium, Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium (známé pod zkratkou DMEM), Hanksovo médium, Leibovitzovo médium, Chee's médium atd. Volba média vždy závisí na typu buněčné kultury (Andria et al., 2010).

Bylo prokázáno, že volba média pro úspěšnou kultivaci primárních kultur hepatocytů závisí na druhu organismu, ze kterého hepatocyty pocházejí. Pro potkaní hepatocyty je široce používané Williamsovo E médium. Objevují se však i studie, ze kterých vyplývá, že pro potkaní hepatocyty je vhodnější použití Chee's média (Watts et al., 1995).

### ***1.5.3 Suplementy kultivačních médií***

Změnu genové exprese, které kultivované hepatocyty podléhají, lze oddálit použitím vhodně obohacených médií. Kultivační média často obsahují řadu suplementů, jako fetální bovinní sérum, aminokyseliny, hormony, růstové faktory, peptidy, cytokiny apod. (Andria et al., 2010).

Fetální bovinní sérum (FBS) je složitá směs látek potřebných pro růst a diferenciaci buněk. Obsahuje velké množství složek, jako jsou růstové faktory, proteiny, vitamíny, stopové prvky, hormony, atd. (Van der Valk et al., 2010).

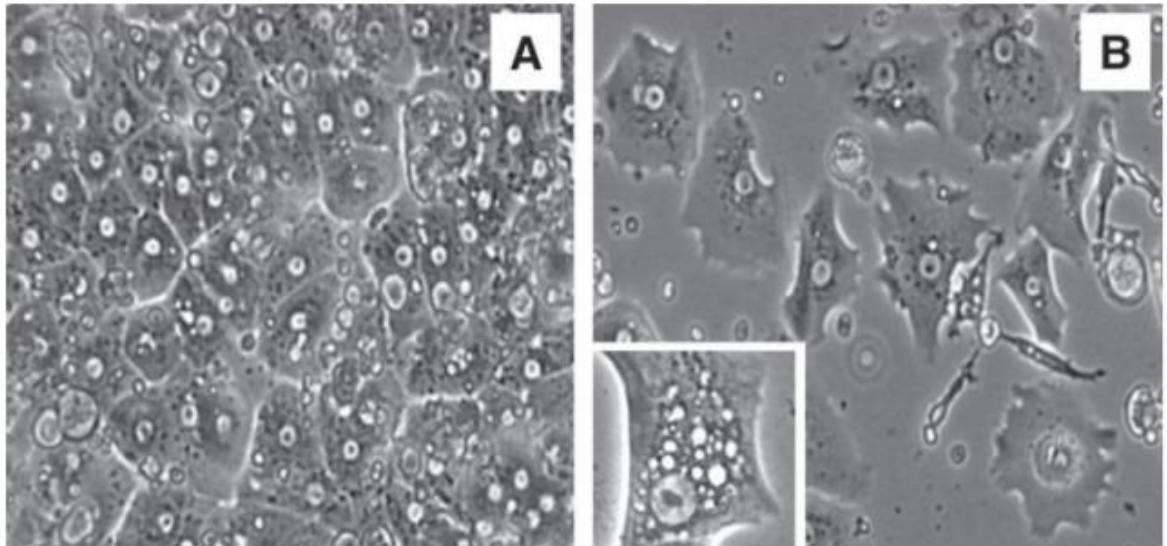
Mezi látky, které napomáhají udržet specifické funkce hepatocytů a tím prodloužit životnost kultury patří například směs inzulínu, glukagonu a některých glukokortikoidů (dexametazonu nebo hydrokortizonu) v určitém poměru (Berry et al., 1991; Fraczek et al., 2013).

Glukagon přidávaný do kultivačních médií stimuluje syntézu DNA a společně s inzulínem se podílí na metabolismu sacharidů (Kučera et al., 2006). Glukagon stimuluje enzymatickou aktivitu laktátdehydrogenázy, pyruvát kinázy, glukokinázy a také tvorbu močoviny a glukoneogenezi. Dexametazon zvyšuje expresi některých transkripčních faktorů, podporuje zachování polygonálního tvaru hepatocytů a napomáhá formování struktur podobných žlučovým kanálkům (Fraczek et al., 2013).

Pro účely toxikologických studií je vždy potřeba přesné složení kultivačních médií zvážit s ohledem na zamýšlené cíle dané studie, protože některé suplementy mohou ovlivňovat expresi některých enzymů metabolizujících dané léčivo (např. dexametazon zvyšuje expresi isoformy CYP3A4) (LeCluyse, 2001).

#### 1.5.4 Densita buněčné kultury

Důležitou úlohu má také hustota buněčné kultury. Buňky kultivované v příliš nízkých densitách rychle ztrácejí své metabolické funkce. Můžeme u nich pozorovat změny buněčné morfologie a zvýšenou tvorbu vakuol (viz obrázek 6) (Helgason a Miller, 2004).



**Obrázek 6:** Mikrofotografie monovrstev hepatocytů kultivovaných při (A) normální a (B) nízké densitě. Na obrázku (B) lze pozorovat zvýšenou vakuolizaci (Převzato z: Helgason a Miller, 2004)

Pokud je densita buněk naopak příliš vysoká, klesne schopnost jejich přichycení, protože dojde k vytvoření husté monolayer a další buňky zaujmají místo v druhé vrstvě, po určité době se také mohou začít oddělovat od povrchu (Hewitt et al., 2007). Při správné densitě vznikají seskupení tří až šesti buněk a jsou obnovována a udržována těsná spojení mezi nimi (Berry et al., 1991). Jako optimální densita je pro tvorbu monovrstev lidských hepatocytů považováno rozmezí 125 000-150 000 buněk na  $\text{cm}^2$  (viz Tabulka 1). Potřebnou densitu buněk lze získat naředěním buněčné suspenze používaným kultivačním médiem (LeCluyse, 2001).

**Tabulka 1:** Doporučená densita lidských hepatocytů pro různé typy kultivačních nádob. (Upraveno podle: Helgason a Miller, 2004).

<i>Typ kultivační nádoby</i>	<i>Počet viabilních buněk na 1 ml</i>	<i>Celkový objem na jamku</i>	<i>Celkový počet viabilních buněk</i>
<b>100 mm Petriho miska</b>	$1,5 \times 10^6 - 1,75 \times 10^6$	6 ml	$9 \times 10^6 - 10,5 \times 10^6$
<b>60 mm Petriho miska</b>	$1 \times 10^6 - 1,33 \times 10^6$	3 ml	$3 \times 10^6 - 4 \times 10^6$
<b>6 WP</b>	$5 \times 10^5 - 7,5 \times 10^5$	2 ml	$1 \times 10^6 - 1,5 \times 10^6$
<b>12 WP</b>	$5 \times 10^5 - 7,5 \times 10^5$	1 ml	$5 \times 10^5 - 7,5 \times 10^5$
<b>24 WP</b>	$5 \times 10^5 - 7,5 \times 10^5$	0,5 ml	$2,5 \times 10^5 - 3,75 \times 10^5$
<b>96 WP</b>	$5 \times 10^5$	125 $\mu$ l	$6,25 \times 10^4$

### **1.5.5 Doba potřebná pro přichycení hepatocytů k povrchu kultivační nádoby**

Důležitý vliv na životnost primární kultury může mít také samotná doba, po kterou buňky přisedají k povrchu kultivační nádoby. Tato doba se označuje jako doba *seedingu*. Vhodná doba pro přichycení hepatocytů k extracelulární matrix se pohybuje mezi 1-2 hodinami. Obecně platí, že čím nižší jsou density buněk, tím rychleji jsou schopny se k podkladu přichytit. Viabilní hepatocyty se přichytávají k podkladu rychleji než buňky poškozené, proto by příliš dlouhá doba přichycení mohla znamenat, že se k podkladu přichytí i neviabilní hepatocyty. Na druhé straně však stojí fakt, že během doby přichycení odeznívá reakce hepatocytů na izolační stres a samotná viabilita buněk se může zvyšovat (Berry et al., 1991).

Přichytávání hepatocytů k povrchu kultivačních nádob probíhá snáze v přítomnosti FBS v médiu. Po uplynutí doby vhodné pro přisednutí buněk by mělo být médium odstraněno a vyměněno za čerstvé médium bez obsahu FBS. Obnovením kultivačního média jsou odstraněny nepřichycené buňky, nahromaděné katabolity a obnoveny živiny (Andria et al., 2010).

### **1.5.6 Vliv vnějších podmínek na kultivaci**

Správné přichycení buněk a jejich rozptýlení do jedné vrstvy je závislé na teplotě (Berry et al., 1991). Buňky jsou obecně inkubovány za dobře zavedených podmínek v inkubátorech, kde se teplota obvykle udržuje na 37 °C v přítomnosti 5% CO<sub>2</sub> (Van der Valk et al., 2010).

Je nutno zajistit sterilní podmínky, které zabraňují bakteriální a houbové kontaminaci materiálu, proto práce s buněčnými kulturami obvykle probíhá v laminárních boxech a s použitím ochranných pomůcek (Andria et al., 2010).

Viabilitu hepatocytů v primární kultuře by mohl ovlivňovat také objem kultivačního média a s tím související tenze kyslíku. Vysoké objemy kultivačního média by mohly vést k hypoxii a nežádoucím účinkům na viabilitu buněk (Buck et al., 2014).

### ***1.5.7 Kryoprezervace hepatocytů***

Špatná dostupnost kvalitní lidské tkáně pro izolaci viabilních hepatocytů vedla k potřebě dlouhodobě uchovávat získané hepatocyty. Vzorke lidských tkání navíc často umožňují izolaci velkého množství viabilních buněk, které převyšují potřebu okamžitého použití. Jediný způsob pro dlouhodobé uchovávání čerstvě izolovaných hepatocytů, který je v současné době k dispozici, je kryoprezervace. Kryoprezervace využívá faktu, že živé buňky lidského nebo živočišného původu mohou být úspěšně uchovávány po dlouhou dobu, pokud jsou uchovávány při velmi nízké teplotě (Gómez-Lechón et al., 2003).

Úspěšná kryoprezervace izolovaných hepatocytů je dána mnoha parametry, mezi které patří zdroj jater, složení kryoprezervačního média, rychlost zmrazování i rozmrazování a stupeň poškození membrány hepatocytů během izolace. Nejčastěji používaným kryoprezervačním médiem pro izolované hepatocyty je Wisconsinův roztok, který obsahuje laktobionát, rafinózu a DMSO. Nejúčinnější a běžně používanou kryoprotektivní látkou je DMSO, který zabraňuje tvorbě ledových krystalků během zmrazování a stabilizuje buněčné membrány. Pro zvýšení viability kryokonzervovaných hepatocytů se používá kombinace DMSO s polyvinylpyrrolidonem nebo s oligosacharidy, tento pozitivní účinek byl však pozorován pouze u potkaních hepatocytů. Kryoprezervační roztoky často obsahují FBS nebo lidský albumin, zajišťující optimální viabilitu a aktivitu CYP. Dalším zajímavým kryoprotektantem může být extrakt z pšeničných proteinů, který s největší pravděpodobností umožňuje dlouhodobé uchovávání životaschopných buněk, udržení sekrece albuminu a tvorby močoviny po dobu 4 dnů po rozmrazení hepatocytů. Navíc byla u potkaních hepatocytů kryoprezervovaných s extrakty pšeničných proteinů prokázána podobná indukce některých izoform CYP, jako u čerstvě izolovaných hepatocytů (Gouliarmou et al., 2015).

## 1.6 Testování viability hepatocytů v primární kultuře

K optimalizaci kultivačních podmínek buněk neodmyslitelně patří posuzování jejich viability, neboli životaschopnosti. Určením buněčné viability získáme informace o počtu zdravých buněk v kultuře. Prováděno může být mnoho typů metod, kterými lze sledovat morfologické změny buněk, testování integrity buněčné membrány, stanovení aktivit enzymů uvolněných z poškozených buněk, odchylky v normálním buněčném metabolismu, apoptické signály buněk, oxidační stres nebo kondenzaci chromatinu.

### 1.6.1 Morfologické znaky primárních kultur hepatocytů

Hodnocení morfologických znaků hepatocytů poskytuje první informace o kvalitě izolovaných buněk. Pozorování morfologie buněk je nejčastěji prováděno mikroskopicky s využitím fázového kontrastu. Principem fázového kontrastu je posun fáze světla od přímého odrazu světelného zdroje o  $\frac{1}{4}$  vlnové délky. Oproti klasickému pozorování ve světelném poli máme tedy možnost lépe rozlišit zobrazované struktury bez nutnosti jejich barvení.

Vzácné je použití transmisní elektronové mikroskopie, díky které je možno hodnotit zejména poškození plazmatické membrány, mitochondrií, degranulaci endoplazmatického retikula vaskularizaci Golgiho aparátu a vakuolizaci cytoplazmy poškozených hepatocytů (Li et al., 2017; Berry et al., 1991).

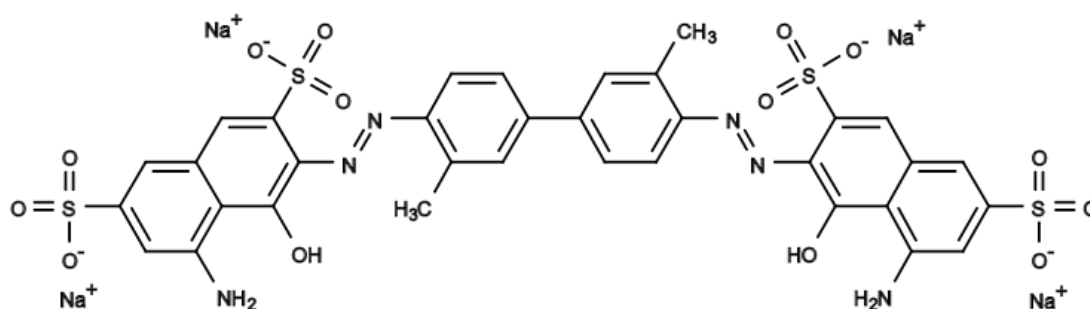
Buňky se ve fázovém kontrastu jeví jako tmavé objekty obklopené světlým pozadím. Během kultivace v monolayer systému získávají hepatocyty opět svůj polygonální tvar, který ztratily v průběhu izolace, jsou v kontaktu s okolními buňkami a vytvářejí útvary, které jsou podobné žlučovým kanálkům. Nepoškozené hepatocyty mají výrazně viditelné jádro a zřetelnou buněčnou membránu. Poškozené buňky mají vysoce granulovanou cytoplazmu a není dobře patrné ohraničení buněk od okolního média. Jádra poškozených buněk nejsou patrná. Vzhled poškozených buněk závisí na tom, zda je poškození reverzibilní (Tuschl a Mueller, 2006).

Charakteristickým znakem poškozených hepatocytů je tvorba tzv. blebů. Bleby plazmatické membrány jsou průsvitné, neobsahují organely a vznikají v důsledku absorpce kapaliny poškozenými buňkami. Bleby však mohou vznikat také v odezvě na působení některých látek, především takových, které vyvolávají oxidační stres a vyčerpání glutationu hepatocytů. Druhý typ tvorby blebů je nevratný, ale během inkubace jsou bleby oddělovány od buněčné membrány, která se znovu uzavírá (Guillouzo, 1998; Berry et al., 1991).

### 1.6.2 Testování viability pomocí barviv

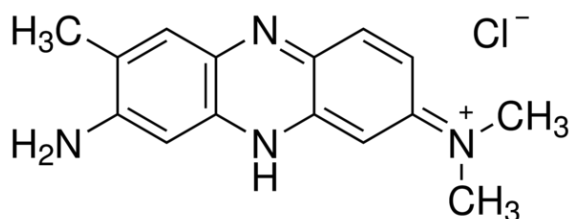
Jednoduchými a rychlými testy k určení počtu viabilních buněk jsou metody, které využívají schopnosti buněk vylučovat nebo absorbovat barvivo. K dispozici je několik barviv, které k těmto účelům lze využít, jako například trypanová modř, eosin, propidium jodid nebo neutrální červeně.

Trypanová modř je barvivo, které má schopnost pronikat přes porušenou cytoplazmatickou membránu dovnitř do buněk. Viabilní hepatocyty tedy zůstávají neobarvené, zatímco hepatocyty s porušenou cytoplazmatickou membránou v sobě kumulují barvivo a jsou zbarveny do modrofialova. Podobný výsledek dávají testy s eosinem nebo propidium jodidem, viabilní buňky zůstávají neobarveny (Repetto et al., 2008; Strober et al., 1997). Vzorec trypanové modři je znázorněn na obrázku 7.



**Obrázek 7:** Vzorec trypanové modři. (Převzato z: [www.aatbio.com](http://www.aatbio.com))

Opačný princip má reprodukovatelný a citlivý test s neutrální červení. Neutrální červeně (viz obrázek 8) je barvivo vycíťované lysosomy viabilních savčích buněk. Pokud mají buňky poškozenou cytoplazmatickou nebo lysosomální membránu, ztrácejí schopnost absorbovat barvivo a zůstávají nezbarvené, což může být detekováno spektrofotometricky (Mahto et al., 2010).



**Obrázek 8:** Vzorec neutrální červeně (Převzato z: [www.qaci.sial.com](http://www.qaci.sial.com))



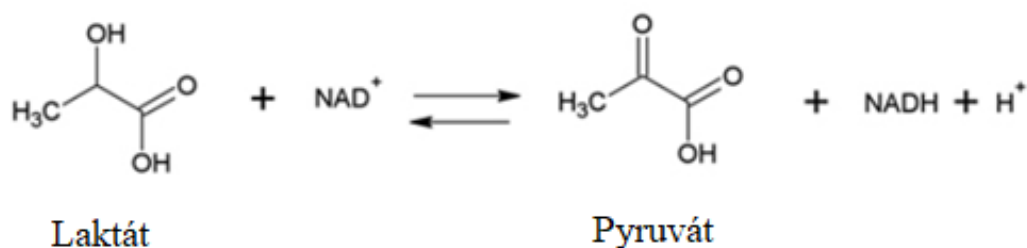
Nevýhodou těchto testů je, že ukazují pouze na poškození buněk, které souvisí s poškozením buněčné membrány. Buňky však nemusejí být viabilní i pokud jejich membrána zůstává celistvá. Oproti tomu existují také případy, kdy mají buňky sice poškozenou membránu, mohou ale samy své defekty opravit a stát se plně životaschopné. Dalším problémem může být subjektivní hodnocení malého množství buněk (Singh et al., 2018; Mahto et al., 2010).

### 1.6.3 Stanovení laktátdehydrogenázy

Enzym laktátdehydrogenáza (LDH) je tetramer, který obsahuje dva typy podjednotek. Podjednotky jsou pojmenovány podle typu tkáně, ve které daná podjednotka převažuje – M (z angl. muscle) a H (z angl. heart). Podle zastoupení obou podjednotek rozlišujeme celkem 5 isoenzymů (LDH-1 – LDH-5). Isoenzym LDH-1 obsahuje 4 podjednotky H, zatímco isoenzym LDH-5 obsahuje všechny čtyři podjednotky M. V játrech převažuje isoenzym LDH-5 (MMMM).

LDH je cytoplazmatický enzym, který je z buněk uvolňován po narušení cytoplazmatické membrány. Proto se stanovení laktátdehydrogenázy stalo citlivým ukazatelem buněčného poškození. Poměrně dobrým ukazatelem viability buněk je tzv. LDH-*leakage* (LDH-L), kterou lze získat jako poměr aktivity LDH v extracelulárním prostoru (EC) ku celkové aktivitě LDH, tj. součet aktivity LDH v extracelulárním a intracelulárním prostoru (IC) (Guillouzo, 1998; Singh et al., 2018).

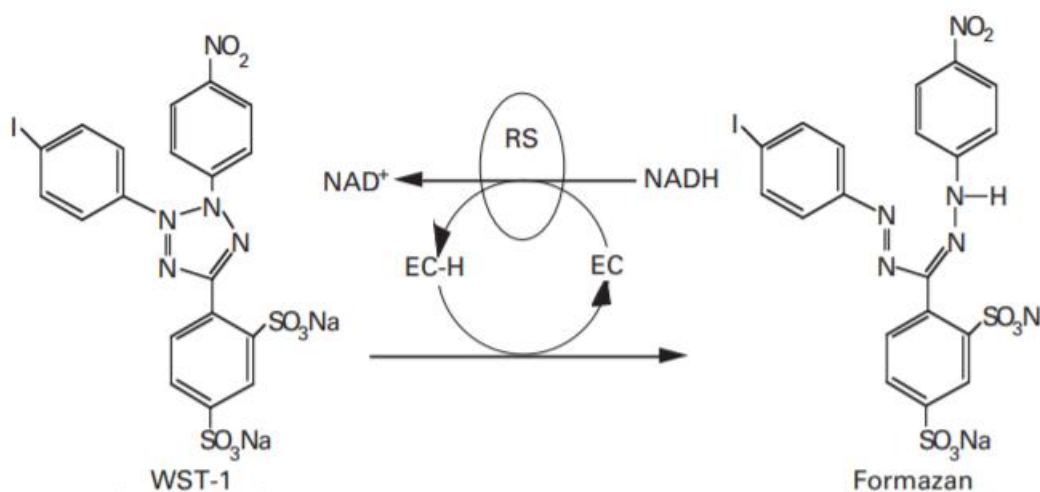
Při stanovení LDH je využívána reakce, kdy laktátdehydrogenáza katalyzuje reverzibilní oxidaci laktátu na pyruvát (viz obrázek 9). Kofaktorem reakce je nikotinamid adenin dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ). Přeměna  $\text{NAD}^+$  na jeho redukovanou formu ( $\text{NADH} + \text{H}^+$ ) je doprovázena nárůstem absorpance, kterou lze měřit spektrofotometricky při 340 nm.



**Obrázek 9:** Reakce katalyzovaná LDH (Upraveno podle: [www.aaltoscientific.com](http://www.aaltoscientific.com))

### 1.6.4 Detekce aktivity buněčných dehydrogenáz

Účinným testem pro zjištění úrovně buněčného metabolismu je test WST-1, který společně s MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) a XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid) testy spadá do metod určených k detekci aktivity buněčných dehydrogenáz. Reakční činidlo WST-1 patří mezi tetrazoliové soli, jedná se konkrétně o (4-(3-(4-iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2-H-5-tetrazolio)-1,3-benzen-disulfonát). Činidlo WST-1 je buněčnými dehydrogenázami (konkrétně reakcí s mitochondriální sukcinát-tetrazolium reduktázou) redukováno na vysoce rozpustný formazan (viz obrázek 10). Při této reakci dochází ke změně absorbance, kterou lze spektrofotometricky stanovit při 420-480 nm. K reakci dochází pouze u metabolicky aktivních, a tedy u viabilních buněk (Yin et al., 2013; Ngamwongsatit et al., 2008; Stockert et al., 2012).



**Obrázek 10:** Přeměna tetrazoliové soli WST-1 na formazan. (EC = činidlo vázající elektrony. RS = mitochondriální sukcinát-tertrazolium reduktáza) (Upraveno podle: [www.clontech.com](http://www.clontech.com)).

Oproti WST testu je metoda MTT složitější a časově náročnější, celý postup zabere asi 44-52 hodin. Redukcí MTT totiž vzniká purpurově zbarvená formazanová sraženina, která je nerozpustná ve vodě. Před samotným spektrofotometrickým měřením je proto nutné formazan rozpustit pomocí silného detergentu, např. dimethylsulfoxidu nebo isopropanolu. Činidlo XTT je v přítomnosti aktivních dehydrogenáz redukováno na oranžově zbarvený formazan, který absorbuje světlo při 430-490 nm, který je sice rozpustný ve vodě, ale jeho rozpustnost je nižší, než rozpustnost formazanu vzniklého redukcí činidla WST-1 (Mahto et al., 2010; Yin et al., 2013).

### ***1.6.5 Využití aktivity kaspázy-3 pro detekci apoptózy***

Apoptóza je vysoce regulovaná forma programované buněčné smrti. U buněk, které podléhají apoptóze je možno pozorovat morfologické změny, jako fragmentaci DNA a kondenzaci chromatinu, rozpad cytoskeletární opory buňky, ztrátu mitochondriálního transmembránového potenciálu, následně dochází k zakulacení buněčné membrány a vytváření tzv. blebů, přičemž se buňky rozpadají na malé fragmenty obklopené membránou (tzv. apoptická tělíska), která jsou poté pohlcována fagocytujícími buňkami (Kurokawa a Kornbluth, 2009; Carrasco et al., 2003).

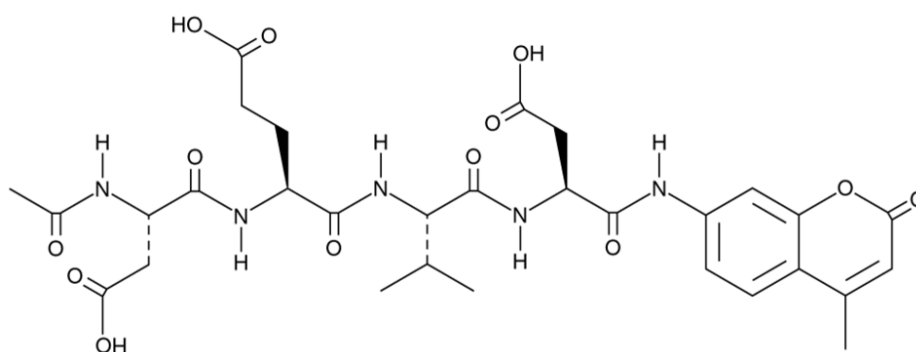
Tyto změny jsou způsobené rodinou cysteinových proteáz, které jsou nazývány kaspázy. Proto může být detekce aktivovaných kaspáz použita jako biochemický marker pro apoptózu (Köhler et al., 2002).

Kaspázy jsou syntetizovány jako zymogeny, jejichž aktivace může být vyvolána rozmanitou skupinou vnitřních a vnějších podnětů. Poté, co buňka přijme apoptické stimuly, dochází u ní k aktivaci iniciačních kaspáz, (např. kaspáza-2, -8, -9 a -10). Iniciační kaspázy následně proteolyticky štěpí a aktivují kaspázy efektorové, mezi které patří (např. kaspáza-3, -6 a -7). Jakmile jsou efektorové kaspázy aktivovány, mohou proteolyticky štěpit řadu buněčných proteinů, což postupně vede ke smrti buňky (Kurokawa a Kornbluth, 2009). Kaspázy působí v oblasti tří až čtyř aminokyselin a štěpí vždy v místě, které následuje po kyselině asparagové.

Klíčovým efektozem je kaspáza-3, která štěpí poly-ADP-Ribóza-polymerázu, DNA-dependentní protein kinázu, protein kinázu C $\delta$  a aktin (Carrasco et al., 2003). Aktivace kaspázy-3 ukazuje, že apoptická dráha už pokročila do nezvratného stupně a měření její aktivity je proto citlivým ukazatelem indukce apoptózy (O'Brien et al., 2005). K identifikaci a kvantifikaci aktivity kaspázy-3 bylo vyvinuto několik testů, jako je afinitní značení aktivovaných kaspáz fluorescenčními sondami, imunoblotové techniky nebo analýza enzymové aktivity štěpením specifických substrátů.

Princip techniky štěpení specifických substrátů poprvé popsali Pennington a Thronberry v roce 1994. Od této doby byly techniky dále vyvíjeny a dnes je k dispozici řada komerčně dostupných substrátů, které obsahují tetrapeptidové sekvence napodobující štěpná místa pro kaspázy. Tetrapeptidy mohou být konjugovány např. s fluorochromem a po štěpení substrátu lze uvolněný fluorochrom spektrofotometricky kvantifikovat (Köhler et al., 2002). Syntetickým tetrapeptidovým fluorogenním substrátem pro kaspázu-3 je např. N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylkumarin (Ac-DEVD-AMC), jehož vzorec je znázorněn na

obrázku 11. Tento substrát obsahuje aminokyselinovou sekvenci DEVD, kde D – kyselina asparagová (Asp); E – kyselina glutamová (Glu); V – valin (Val). Kaspáza-3 štěpí tetrapeptid mezi kyselinou asparagovou a AMC, čímž dojde k uvolnění fluorogenního AMC, který lze kvantifikovat fluorimetricky (může být excitován při 340-360 nm a k emisi dochází při 440-460 nm).



**Obrázek 11:** Vzorec Ac-DEVD-AMC. (Převzato z: [www.caymanchem.com](http://www.caymanchem.com))

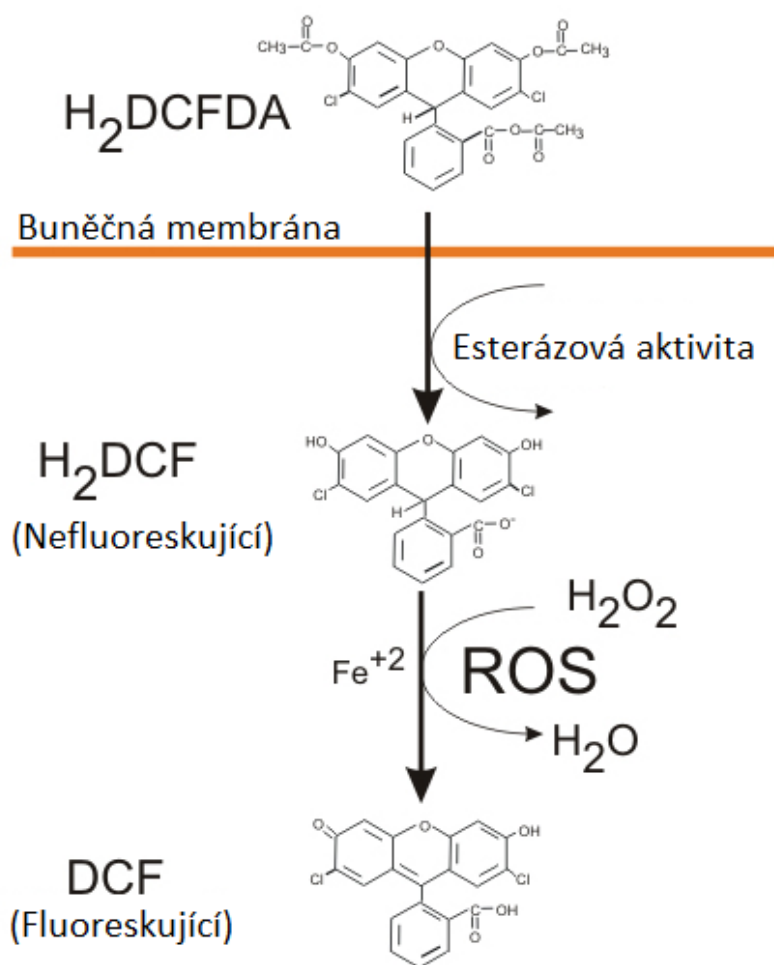
### 1.6.6 Posouzení produkce reaktivních forem kyslíku

Mezi reaktivní formy kyslíku (ROS) patří superoxidový anion, singletový kyslík, hydroxylový radikál, různé peroxyly, peroxid vodíku (který neobsahuje volný radikál) a další. Zatímco nízké hladiny peroxidu vodíku mohou vést k apoptóze, jeho vysoké hladiny vedou k nekróze nebo k apoptóze nezávislé na kaspázách. Jako primární obranné mechanismy proti peroxidu vodíku slouží kataláza a glutationperoxidáza. Zatímco kataláza je přítomna pouze v peroxisomech, redoxní cyklus glutationu je přítomen v cytosolu a mitochondriích a jedná se pravděpodobně o nejdůležitější obranný systém buňky.

Za normálních podmínek jsou ROS neustále vytvářeny v důsledku aerobního metabolismu (např. v komplexech I a III dýchacího řetězce). Pokud ROS překonají obranné systémy buňky a dojde k narušení redoxní homeostázy, je výsledkem oxidační stres, což může vést k oxidačnímu poškození buněk (Eruslanov a Kusmartsev, 2010; Young et al., 2002).

Pro posouzení intracelulární produkce ROS v potkaních hepatocytech jsou používány nejrůznější fluorescenční sondy. Jednou z nejčastěji používaných fluorescenčních sond je 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát (DCFDA). Jedná se o vysoce citlivou a specifickou metodu, která umožňuje sledování změn produkce ROS v průběhu času.

Princip tohoto testu, který je znázorněn na obrázku 12, spočívá v tom, že díky diacetátu může sonda prostupovat do nitra buněk, kde dochází k enzymatické hydrolýze intracelulárními esterázami. Uvnitř buněk se hromadí nefluoreskující redukovaná forma dichlorofluoresceinu ( $H_2DCF$ ). V případě, že jsou v buňce přítomny ROS, je tato látka rychle oxidována na fluoreskující dichlorofluorescein (DCF), tato reakce je poté fluorimetricky detekována (Eruslanov a Kusmartsev, 2010; Shen et al., 1996).



**Obrázek 12:** Princip testu DCFDA. (Upraveno podle: [www.biotek.com](http://www.biotek.com))

Metoda DCFDA byla původně vyvinuta pro kvantitativní stanovení peroxidu vodíku ve vodném roztoku, později začala být používána ke studiu rychlosti tvorby ROS v různých typech buněk a tkání (Eruslanov a Kusmartsev, 2010; Shen et al., 1996).

### ***1.6.7 Testování syntetických vlastností hepatocytů***

Hepatocyty mají schopnost syntetizovat řadu látek, z nichž mnohé mohou sloužit jako parametry funkčních poruch izolovaných hepatocytů. Nejvíce testované jsou plazmatické proteiny syntetizované v játrech (např. albumin, transferin a proteiny akutní fáze), dále může být testována schopnost syntézy glykogenu, močoviny, lipoproteinů, cytochromu P450 nebo žlučových kyselin (Guillouzo, 1998).

Ke stanovení albuminu v kultivačním médiu mohou být použity specifické protilátky, jejichž navázání na cílové struktury může být dále analyzováno imunochemickými metodami (např. ELISA). Močovina je stanovována v kultivačním médiu s využitím enzymu ureázy, který katalyzuje hydrolýzu močoviny na amoniak a oxid uhličitý. Za bazálních podmínek jsou hepatocyty v monovrstvě schopny syntetizovat močovinu rychlostí 2,5-3,5 nmol/mg buněčného proteinu za minutu. Syntéza močoviny, a s ní související rychlost odbourání amoniaku, může být do značné míry snížena přítomností inzulínu, ale zvyšuje se s přidáním aminokyselin (Gomez-Lechon et al., 2003).

## 2 CÍL PRÁCE

### 1. Příprava primárních kultur hepatocytů potkana:

hodnocení viability izolovaných buněk, stanovení density buněk, příprava primárních kultur hepatocytů v monovrstvě

### 2. Zpracování vzorků získaných z primárních kultur hepatocytů potkana:

stanovení základních parametrů - aktivita buněčných dehydrogenáz (WST-1 test), aktivita laktátdehydrogenázy (resp. LDH-*leakage*) aktivita kaspázy-3, mikroskopické hodnocení s použitím fázového kontrastu

### 3. Optimalizace density potkaních hepatocytů při přípravě primárních kultur pro vybrané typy mikrotitračních destiček

### 4. Optimalizace doby nezbytné pro přichycení (tzv. doba *seedingu*) potkaních hepatocytů při přípravě primárních kultur

## 3 METODICKÁ ČÁST

### 3.1 Použité roztoky

- **Roztok A**

8 g NaCl; 2,188 g NaHCO<sub>3</sub>; 0,4 g KCl; 0,19 g EGTA; 0,1206 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O; 0,0977 g MgSO<sub>4</sub>.xH<sub>2</sub>O; 0,06 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Vše bylo doplněno do 1000 ml destilovanou vodou.

- **Roztok B**

4,8 g NaCl; 1,314 g NaHCO<sub>3</sub>; 0,3528 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,24 g KCl; 0,07236 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O; 0,05862 g MgSO<sub>4</sub>.xH<sub>2</sub>O; 0,036 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Vše doplněno do 600 ml destilovanou vodou; obvykle se používá 0,2 g surové kolagenázy do 200 ml recirkulačního roztoku. Pozn.: množství surové kolagenázy může být upraveno podle aktivity používané šarže

- **Roztok C (Krebs – Henseleitovo médium)**

6,9 g NaCl; 2g NaHCO<sub>3</sub>; 0,9 g glukózy; 0,374 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,36 g KCl; 0,1441 g MgSO<sub>4</sub>.xH<sub>2</sub>O; 0,13 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, doplněný do 1000 ml destilovanou vodou pro infúze. 1,333 g albuminu do 100 ml C roztoku pro práci s izolovanými buňkami.

- **Kolagen typu I (Collagen type I from Rat tail, Sigma-Aldrich)**

2 mg roztoku Collagen type I bylo smícháno s 6,66 ml CH<sub>3</sub>COOH (20 mmol/l)

- **Williamsovo E médium kompletní**

Fetální bovinní sérum (FBS – 6%), glutamin (2 mmol/l), penicilin (100 IU/ml), streptomycin (10 mg/ml), inzulin (0,08 IU/ml), dexamethason (4 mg/ml) a glukagon (0,008 µg/ml)



- **Williamsovo E médium inkompletní**

Podobně jako kompletní Williamsovo E médium, pouze neobsahuje FBS.

- **Trypanová modř** (Trypan blue solution, Sigma-Aldrich)

Kat. č. 93595 – 0,4%, for microscopy

- **LDH činidlo** (DiaSys)

Činidlo R1 – LDH FS DKGK, 800 ml; (fosfátový pufr 65 mmol/l, pH 7,5; pyruvát 0,8 mmol/l)

Činidlo R2 – LDH FS DGKC, 200 ml; (Good's pufr, pH 9,6; NADH 1 mmol/l)

Činidla ředěna vždy v poměru 1:4

- **Kyselina trichloroctová (TCA)** (Trichloroacetic acid, Sigma Aldrich)

Roztok o koncentraci 20 %

- **Hydroxid sodný (NaOH)** (Sodium Hydroxide, Sigma Aldrich)

Roztok o koncentraci 2 mol/l

- **WST-1 činidlo** (Cell proliferation reagent, Roche)

Činidlo bylo naředěno inkompletním Williamsovým E médiem v poměru 1:10

- **Činidlo pro stanovení kaspázy 3**

150 ml assay pufru o pH 7,4 obsahuje: 15 mg HEPES; 150 mg CHAPS (0,1%); 115 mg DTT; 87 mg EDTA; z assay pufru bylo odpipetováno 60  $\mu$ l a smícháno s 33  $\mu$ l substrátu pro kaspázu 3 (tento substrát byl rozpuštěn v DMSO, pH 7)

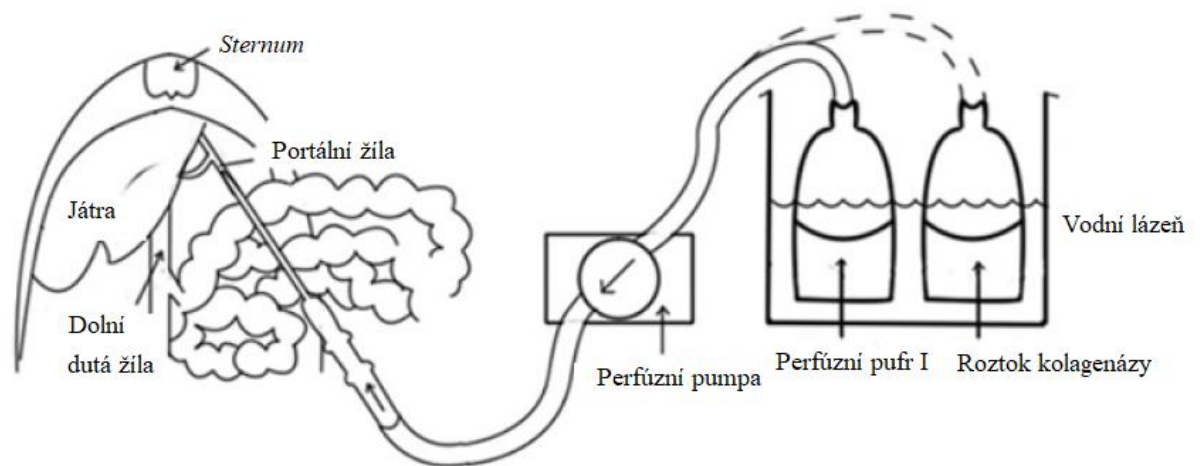
## 3.2 Příprava hepatocytů pro kultivaci

### 3.2.1 Izolace hepatocytů

Pro účely daných pokusů byli používáni samci albino potkanů kmene Wistar o hmotnosti 210 až 240 g, chováni za laboratorních podmínek.

Zvíře bylo nejprve uvedeno do etherové narkózy a přemístěno na operační stůl. Břišní dutina byla otevřena chirurgickým stříhem ve tvaru písmene „V“. Následně byl do *vena cava inferior* aplikován heparin ve fyziologickém roztoku. Poté byla do *vena portae* zavedena kovová kanyla napojená na perfúzní aparaturu. Roztokem A (viz kapitola 3.1) bylo provedeno promývání jater. Kvůli riziku poškození jater tlakem byla *vena cava inferior* po začátku perfúze prostráhnuta.

Játra byla následně perfundována roztokem B, který obsahuje mimo jiné kolagenázu a vápenaté ionty. Tato recirkulační perfúze jater trvala celkem 14 minut a její schéma je znázorněno na obrázku 13. Správný tlak v obou stupních promývání byl zajištěn výškou spádu perfúzního roztoku.



**Obrázek 13:** Schéma jaterní perfúze (Upraveno podle: Shen, 2012)

Po ukončení recirkulační perfúze byla játra vložena do kádinky obsahující roztok C, který obsahuje albumin. Jemným třením v kádince byla játra mechanicky rozvolněna, a tím byla získána suspenze hepatocytů. Získaná suspenze byla přefiltrována přes 8 vrstev gázy do centrifugační zkumavky.

Centrifugace probíhala 5 minut při 500 otáčkách (28 g) při 4°C, po odlití supernatantu byl do zkumavky přidán opět roztok C a celý proces byl dvakrát opakován. Zkumavka s výslednou suspenzí buněk byla vložena do nádoby s ledem a ihned bylo provedeno počítání viability a density hepatocytů.

### ***3.2.2 Určení viability hepatocytů***

Počty živých a mrtvých buněk byly stanoveny pomocí barvení Trypanovou modří. Vlastní hodnocení probíhalo na podložním sklíčku, kde bylo smícháno 10 µl stokrát naředěné suspenze buněk (0,99 ml kompl. Williamsova E média + 0,01 ml resuspendovaných buněk) s 10 µl Trypanové modří. Připravený preparát byl následně přikryt krycím sklíčkem a počty živých a mrtvých buněk byly počítány pod mikroskopem v 10 zorných polích. Výsledná množství živých buněk byla uváděna v procentech. Za optimální viabilitu pro další zpracování byl považován výsledek nad 90 % u potkaních hepatocytů.

### ***3.2.3 Stanovení density hepatocytů***

Hepatocyty byly počítány za použití automatického přístroje Cellometer<sup>TM</sup>, auto T4 propojeného s počítačem. Postup stanovení byl následovný: do c-chipu bylo napipetováno 20 µl stokrát naředěných buněk. Výsledné density hepatocytů byly vždy udávány v milionech buněk/ml (bb/ml), jako průměr alespoň 4 měření.

### ***3.2.4 Příprava zásobních suspenzí hepatocytů***

Nejprve byla potřeba připravit zásobní suspenze hepatocytů o densitách 0,5 mil bb/ml a 1 mil bb/ml. Tyto zásobní suspenze byly připraveny naředěním původní suspenze o známé densitě buněk kompletním Williamsovým médiem E.

### ***3.2.5 Příprava vícejamkových plastových destiček***

Práce byla prováděna v laminárním boxu s použitím ochranných pomůcek. Kultivace primárních kultur hepatocytů byla prováděna v 96jamkových, 24jamkových a 12jamkových (tzv. well plate (WP) ), které bylo nejprve potřeba nakolagenovat. Do jamek bylo pipetováno vždy takové množství předem připraveného roztoku kolagenu typu I, aby jím došlo k rovnoměrnému pokrytí dna jednotlivých jamek. Po 10 minutách inkubace mohl být kolagen stažen zpět a uchován pro další kolagenování.

Poté bylo do jamek pipetováno stejné množství neutralizačního roztoku (roztok C), který byl v jamkách ponechán po dalších cca 5-10 minut. Následně byla destička vyklepnuta. Teprve poté mohly být do jamek pipetovány příslušné objemy buněčných suspenzí hepatocytů.

### 3.3 Optimalizace kultivačních podmínek primárních kultur hepatocytů

#### 3.3.1 Optimalizace density buněk pro vybrané vícejamkové destičky

Do připravených vícejamkových destiček byly pipetovány příslušné objemy zásobních suspenzí hepatocytů, které byly dále ředěny kompletním Williamsovým E médiem, za účelem získání různých densit buněk v jednotlivých jamkách. Density hepatocytů jsou uváděny v počtech buněk na jamku (bb/j). Pipetované objemy obou roztoků jsou uvedeny v tabulkách 2-4. Během pipetování bylo potřeba suspenzi hepatocytů pečlivě promíchávat, aby nedocházelo k sedimentaci buněk.

- **96jamkové destičky**

Pro 96 WP byla používána zásobní suspenze o densitě 0,5 mil bb/ml. Celkový objem v jednotlivých jamkách byl 100  $\mu$ l. První sloupec sloužil jako slepý vzorek, proto zde buněčná suspenze nebyla pipetována.

*Tabulka 2:* Pipetované objemy pro 96jamkové destičky

<i>Sloupec</i>	<i>Densita buněk [tisíc bb/j]</i>	<i>Objem zásobní suspenze [<math>\mu</math>l]</i>	<i>Objem kompletního Williamsova E média [<math>\mu</math>l]</i>
<b>1</b>	Slepý vzorek	0	100
<b>2</b>	5	10	90
<b>3</b>	10	20	80
<b>4</b>	15	30	70
<b>5</b>	20	40	60
<b>6 a 11</b>	25	50	50
<b>7 a 12</b>	30	60	40
<b>8</b>	35	70	30
<b>9</b>	40	80	20
<b>10</b>	50	100	0

- **24jamkové destičky**

Pro každý pokus byly použity dvě 24 WP, jejichž jamky byly předem očíslovány (celkem tedy 48 jamek). Používána byla zásobní suspenze o densitě 1 mil bb/ml. Celkový objem na jamku činil 400  $\mu$ l.

*Tabulka 3:* Pipetované objemy pro 24jamkové destičky

<i>Jamky</i>	<i>Densita buněk [tisíc bb/j]</i>	<i>Objem zásobní suspenze [<math>\mu</math>l]</i>	<i>Objem kompletního Williamsova E média [<math>\mu</math>l]</i>
<b>1 - 6</b>	50	50	350
<b>7 - 12</b>	100	100	300
<b>13 - 18</b>	150	150	250
<b>19 - 24</b>	200	200	200
<b>25 - 30</b>	250	250	150
<b>31 - 36</b>	300	300	100
<b>37 - 42</b>	350	350	50
<b>43 - 48</b>	400	400	0

- **12jamkové destičky**

Pro každý pokus byly použity čtyři 12 WP, jejichž jamky byly předem očíslovány (celkem tedy 48 jamek). Používána byla zásobní suspenze o densitě 0,5 mil bb/ml. Celkový objem na jamku činil 1 ml.

*Tabulka 4:* Pipetované objemy pro 12jamkové destičky

<i>Jamky</i>	<i>Densita buněk [tisíc bb/j]</i>	<i>Objem zásobní suspenze [<math>\mu</math>l]</i>	<i>Objem kompletního Williamsova E média [<math>\mu</math>l]</i>
<b>1 - 6</b>	100	200	800
<b>7 - 12</b>	150	300	700
<b>13 - 18</b>	200	400	600
<b>19 - 24</b>	250	500	500
<b>25 - 30</b>	300	600	400
<b>31 - 36</b>	350	700	300
<b>37 - 42</b>	400	800	200
<b>43 - 48</b>	500	1000	0

Po napipetování byly všechny destičky vloženy do CO<sub>2</sub> inkubátoru (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 % relativní vlhkost vzduchu) na čas potřebný k přichycení hepatocytů ke kolagenu (tj. 2 h). Po 2 hodinách bylo vyměněno médium za příslušné objemy Williamsova E média bez FBS (tj. 96 WP – 100 µl; 24 WP – 400 µl a 12 WP - 1 ml). Původní obsah jamek jednotlivých destiček byl před výměnou média vyklepnut. Destičky byly vloženy zpět do CO<sub>2</sub> inkubátoru, kde byly ponechány 19-24 hodin. Po ukončení kultivace v inkubátoru lze médium buď ihned spektrofotometricky analyzovat, nebo zmrazené při -20 °C uchovat pro pozdější testování.

### 3.3.2 *Optimalizace doby přichycení hepatocytů k povrchu jednotlivých vícejamkových destiček*

Do připravených mikrotitračních destiček byly pipetovány příslušné objemy zásobních suspenzí hepatocytů o densitě 0,5 mil bb/ml, nebo 1 mil bb/ml (pouze pro 24 WP), dále ředěné kompletním Williamsovým E médiem, a to podobně jako v podkapitole 3.3.1 (viz tabulky 2-4) tak, abychom získali density buněk uvedené v tabulce 5. První sloupec v 96 WP sloužil jako slepý vzorek, do kterého nebyla pipetována buněčná suspenze.

*Tabulka 5:* Density buněk pro příslušné destičky

<i>Typ destičky</i>	<i>Celkový objem/j</i>	<i>Densita buněk [tisíc bb/j]</i>
<b>96 WP</b>	100 µl	30
<b>24 WP</b>	400 µl	200
<b>12 WP</b>	1 ml	400

Destičky byly vloženy do CO<sub>2</sub> inkubátoru (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 100 % relativní vlhkost vzduchu). Výměna média za příslušné objemy inkompletního Williamsova E média (tj. 96 WP – 100 µl; 24 WP – 400 µl; 12 WP - 1 ml) probíhala vždy po 30 minutách pro jednotlivé skupiny jamek (viz tabulky 6 a 7).

*Tabulka 6:* Doby přichycení hepatocytů v 96jamkových destičkách

<i>Sloupec</i>	2	3 a 10	4	5 a 11	6	7 a 12	8	9
<i>Doba přichycení [min]</i>	30	60	90	120	150	180	210	240

**Tabulka 7:** Doby přichycení hepatocytů ve 24jamkových a 12jamkových destičkách

<i>Jamky</i>	1-6	7-12	13-18	19-24	25-30	31-36	37-42	43-48
<i>Doba přichycení [min]</i>	30	60	90	120	150	180	210	240

Stejně jako v předchozí úloze byl původní obsah jamek jednotlivých destiček odstraněn a bylo vyměněno médium tak, aby objemy pipetovaného inkompletního Williamsova média odpovídaly celkovým objemům v jamkách před vyklepnutím.

Po výměně média byly destičky vloženy zpět do CO<sub>2</sub> inkubátoru, kde byly ponechány 19-24 hodin. Po ukončení kultivace v inkubátoru lze médium opět buď ihned spektrofotometricky analyzovat, popř. uchovávat zmrazené při -20 °C pro pozdější testování.

### **3.4 Mikroskopická analýza**

Primární kultury hepatocytů byly pozorovány mikroskopicky pomocí mikroskopu Olympus IX51 s využitím fázového kontrastu při zvětšení objektivu 40x. Pro nafocení výsledného obrazu byl použit digitální fotoaparát Olympus E-600, který byl připojený k mikroskopu.

### **3.5 Stanovení aktivity laktátdehydrogenázy**

Aktivita LDH byla analyzována ve vzorcích kultivačního média potkana vždy po ukončení kultivace buněk v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Z jednotlivých vícejamkových destiček bylo přepipetováno vždy 10 µl vzorku do 96 WP. Vybrané jamky byly ponechány pro slepý vzorek (tj. 10 µl Williamsova E média), a pro 10 µl LDH kalibrátou. Následně bylo přidáno 250 µl LDH činidla temperovaného na 37 °C. Po přidání činidla byla destička ihned vložena do přístroje a kineticky proměřena při vlnové délce 340 nm po dobu 5 minut. Tímto postupem byla získána extracelulární aktivita LDH.

Po odpipetování zbytku média byly destičky ponechány v mrazícím boxu při -20 °C po dobu 10 minut, tím došlo k lyzi buněk. Poté byl do jamek napipetován stejný objem destilované vody, jako byl objem média v jamkách před odsátím. Následně byla obdobným způsobem opět provedena analýza aktivity LDH, nyní však byla získána aktivita intracelulární.

### **3.6 Stanovení aktivity buněčných dehydrogenáz (test WST-1)**

Test WST-1 byl prováděn u vzorků potkaních hepatocytů v 96 WP po ukončení kultivace buněk v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Obsah destiček byl nejprve vyklepnut a poté bylo přidáno 100 µl činidla WST-1. Destičky byly vloženy do přístroje a absorbance byla měřena při vlnové délce 440 nm v čase 0, a poté v čase 1 po jedné hodině inkubace a v čase 2 po dvou hodinách inkubace (při 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

### **3.7 Stanovení aktivity kaspázy 3**

Aktivita kaspáz byla stanovována ve vzorcích kultivačního média vždy po ukončení kultivace hepatocytů. Z jednotlivých destiček, ve kterých byly buňky kultivovány (24 WP a 12 WP), bylo přepipetováno vždy 50 µl vzorku do 96 WP. Následně bylo přidáno 150 µl předem připraveného činidla pro kaspázy 3. Poté byla destička vložena do analyzátoru a kineticky proměřena fluorescence při excitační vlnové délce (360 nm) a emisní vlnové délce (465 nm). Měření bylo následně opakováno po 30 minutách, 60 minutách, 90 minutách, 120 minutách a 150 minutách inkubace (při 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Tímto postupem byla získána extracelulární aktivita kaspázy 3.

V případě, že měřené hodnoty fluorescence byly příliš nízké či vysoké, bylo potřeba v módu přístroje změnit tzv. gain. Tímto byl zesílen nebo zeslaben signál fluorescence.

Po odpipetování zbytku média byly destičky ponechány v mrazícím boxu při -20 °C po dobu 10 minut, došlo tak k lyzi buněk. Poté byl do jamek napipetován stejný objem destilované vody, jako byl objem média v jamkách před odsátím a následně byla provedena analýza intracelulární aktivity kaspázy 3 obdobným způsobem, jako analýza extracelulární aktivity kaspázy 3.

### **3.8 Statistické vyhodnocení výsledků**

Naměřená data byla nejprve zpracována v programu Microsoft Excel 2016 a vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka (AVG ± STD). Z pěti provedených pokusů byly vybrány výsledky vždy jednoho pokusu reprezentujícího typické výsledky všech provedených pokusů. Poté byla data vyhodnocena pomocí statistických testů v programu GraphPad Prism 8. Nejprve byly provedeny testy normality (D'Agostino & Pearson test, Shapiro-Wilk test, Kolmogorov-Smirnov test), pomocí kterých bylo zhodnoceno, zda data vykazují normální či



nenormální rozdělení. Na základě výsledku testů normality byla data dále statisticky vyhodnocena a porovnána s kontrolní skupinou buď testy parametrickými (parametrická 1-faktorová ANOVA následovaná Tukey-Kramer post testem) nebo neparametrickými (nejprve Kruskal-Wallis test následovaný testem Dunnett's multiple comparisons).

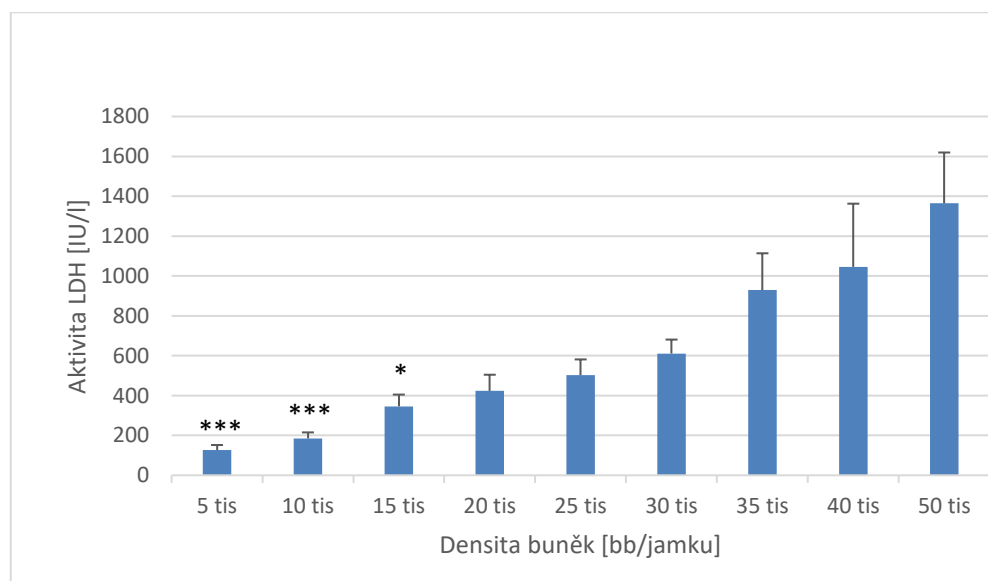
## 4 VÝSLEDKOVÁ ČÁST

### 4.1 Optimalizace density buněk pro 96jamkové destičky

#### 4.1.1 Vliv density hepatocytů na aktivitu laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu

##### – 24 h inkubace, 96jamkové destičky

U hepatocytů nasazených do 96 WP o postupně zvyšujících se densitách v jednotlivých skupinách jamek byl po 24 h kultivace pozorován postupný nárůst extracelulární aktivity laktátdehydrogenázy. Oproti běžně používané densitě 30 000 bb/j byly získané absorbance signifikantně odlišné u buněk v densitách do 15 000 bb/j. Bylo zjištěno, že podíl aktivity LDH EC ku počtu buněk v jamce byl nejnižší u density 25 000 bb/j a 30 000 bb/j (viz tabulka 8).



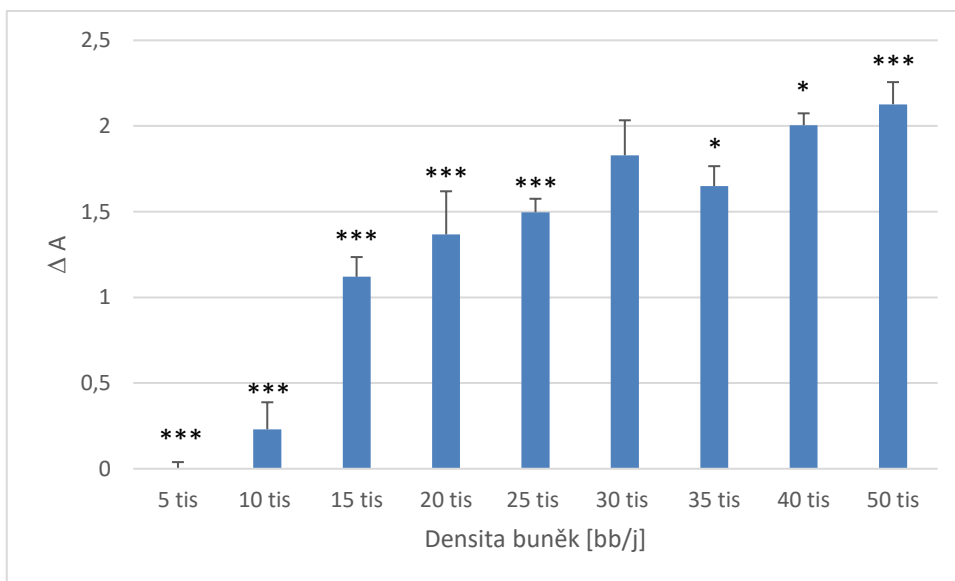
**Graf 1:** Optimalizace density buněk pro 96 WP - aktivita LDH EC; AVG + STD; (n = 8; nenormální rozdělení; \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001 vs. 30 000 bb/j)

**Tabulka 8:** Podíl extracelulární aktivity LDH ku počtu buněk, 96WP

Densita [bb/jamku]	5 tis	10 tis	15 tis	20 tis	25 tis	30 tis	35 tis	40 tis	50 tis
LDH EC / počet buněk	0,0253	0,0208	0,0231	0,0212	0,0201	0,0204	0,0265	0,0261	0,0273

#### 4.1.2 Vliv density hepatocytů na aktivitu buněčných dehydrogenáz (WST-1 test) v kultivačním médiu – 24 h inkubace, 96jamkové destičky

Hepatocyty nasazené do jamek 96 WP o postupně zvyšujících se densitách kultivované 24 h vykazovaly postupný nárůst aktivity buněčných dehydrogenáz závislý na densitě. Maxima aktivity buněčných dehydrogenáz, resp. ukončení rychlého nárůstu aktivity buněčných dehydrogenáz začínaly buňky dosahovat při densitě 30 000 bb/j. Aktivita buněčných dehydrogenáz při densitě 30 000 bb/j byla signifikantně odlišná od ostatních hodnot.



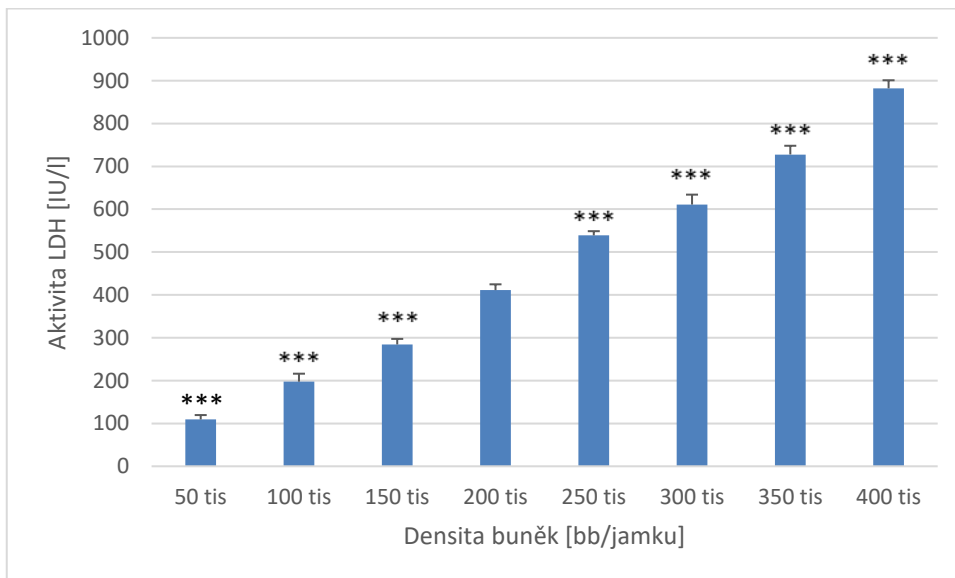
**Graf 2:** Optimalizace density buněk pro 96 WP - WST-1 test - měřeno po 1 h inkubace s činidlem WST-1; AVG + STD; (n = 8; normální rozdělení; \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001 vs. 30 000 bb/j)

## 4.2 Optimalizace density buněk pro 24jamkové destičky

### 4.2.1 Vliv density hepatocytů na extracelulární i intracelulární aktivitu

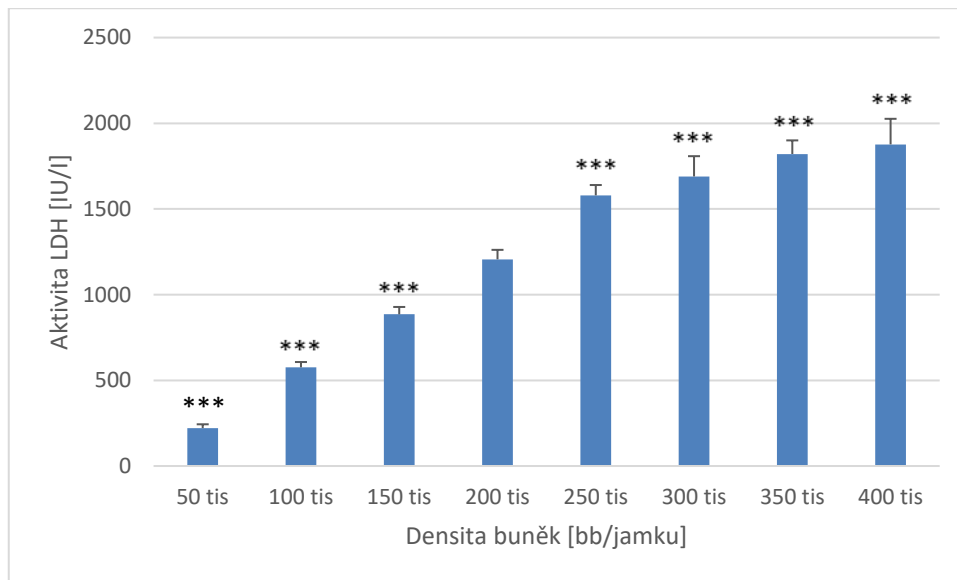
#### *laktátdehydrogenázy a na LDH-leakage – 24 h inkubace, 24jamkové destičky*

Byla měřena extracelulární aktivita laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu hepatocytů nasazených o postupně zvyšujících se densitách v jednotlivých skupinách jamek 24jamkových destiček po 24 h kultivace. S rostoucí densitou buněk byl pozorován lineární nárůst extracelulární aktivity LDH. Hodnota absorbance při densitě 200 000 bb/j byla signifikantně odlišná od ostatních hodnot ( $p < 0,001$ ).



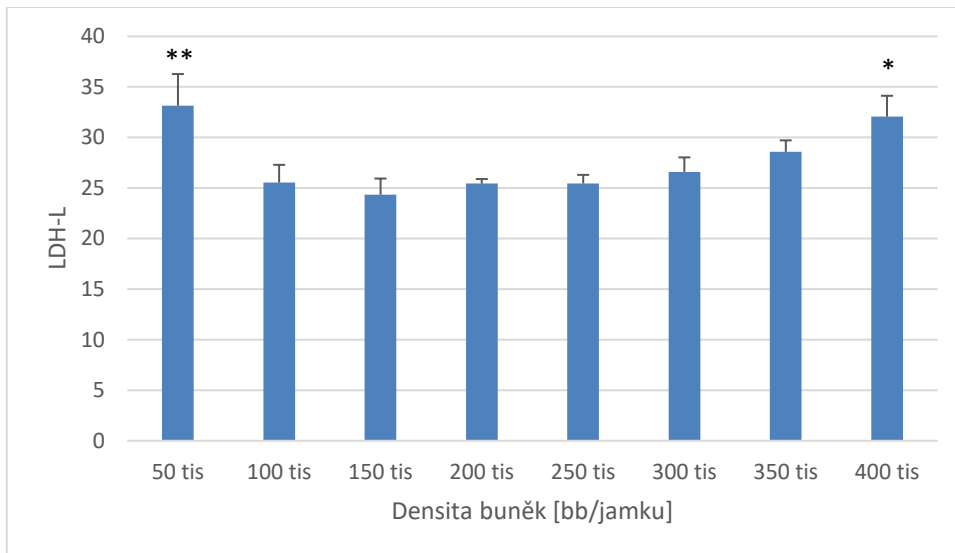
**Graf 3:** Optimalizace density buněk pro 24 WP - aktivita LDH EC; AVG + STD; ( $n = 6$ ; normální rozdělení; \*\*\* $p < 0,001$  vs. 200 000 bb/j)

Intracelulární aktivita LDH měřená u hepatocytů nasazených o postupně zvyšujících se densitách v jednotlivých skupinách jamek 24jamkových destiček vykazovala po 24 h kultivace postupný nárůst do density 250 000 bb/j, u vyšších densit statisticky významný nárůst nebyl zaznamenán. Hodnota absorbance při densitě 200 000 bb/j byla signifikantně odlišná od ostatních hodnot ( $p < 0,001$ ).



**Graf 4:** Optimalizace density buněk pro 24 WP - aktivita LDH IC; AVG + STD; ( $n = 6$ ; normální rozdělení; \*\*\* $p < 0,001$  vs. 200 000 bb/j)

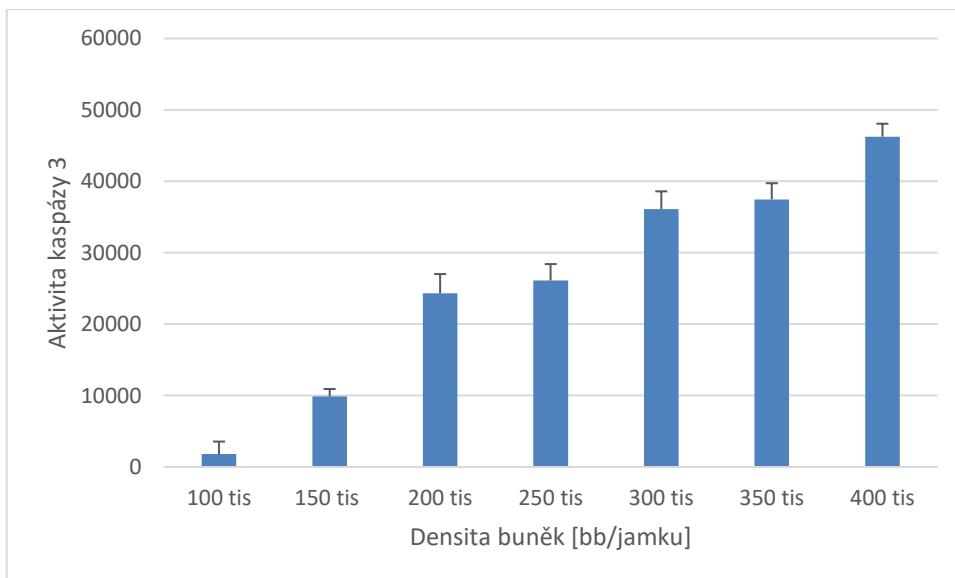
Mezi hodnotami LDH-L v densitách 100 000-350 000 bb/j byly pozorovány statisticky nevýznamné odchylky, nicméně nejnižší hodnota byla nalezena u density 150 000 bb/j. U densit 50 000 bb/j a 400 000 bb/j byla LDH-L signifikantně odlišná od hodnoty nalezené při běžně používané densitě 200 000 bb/j.



**Graf 5:** Optimalizace density buněk pro 24 WP - LDH-leakage; AVG + STD; (n = 6; nenormální rozdělení; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 vs. 200 000 bb/j)

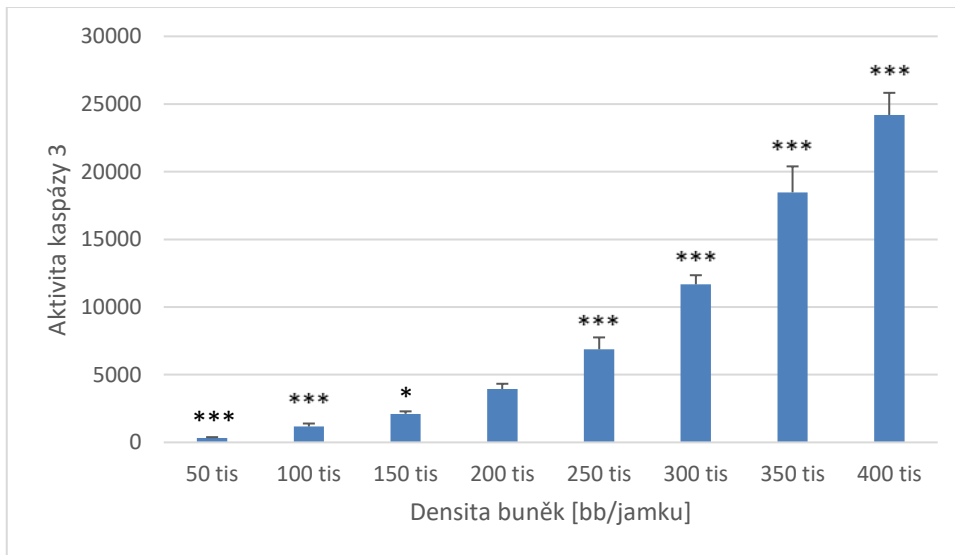
#### 4.2.2 *Vliv density hepatocytů na extracelulární a intracelulární aktivitu kaspázy 3 – 24 h inkubace, 24jamkové destičky*

Byla měřena extracelulární aktivita kaspázy 3 v kultivačním médiu hepatocytů kultivovaných ve 24 WP o postupně zvyšujících se densitách po 24 h kultivace. U buněk inkubovaných v densitě 50 000 bb/j byla extracelulární aktivita kaspázy 3 pod mezí detekce metody, tato hodnota není v grafu uvedena. S postupně zvyšující se densitou buněk se intenzita fluorescence postupně zvyšovala. Extracelulární aktivita kaspázy 3 při běžně používané densitě 200 000 bb/j nebyla kvůli nenormálnímu rozdělení signifikantně odlišná od ostatních hodnot.



**Graf 6:** Optimalizace density buněk pro 24 WP - aktivita kaspázy 3 EC - měřeno po 1 h inkubace s činidlem pro kaspázu 3; AVG + STD; (n = 6; nenormální rozdělení)

V případě intracelulární aktivity kaspázy 3 byl zaznamenán nelineární nárůst intenzity fluorescence s rostoucí densitou buněk. Intracelulární aktivita kaspázy 3 při běžně používané densitě 200 000 bb/j byla signifikantně odlišná od ostatních hodnot. Od density 250 000 bb/j byl pozorován strmý nárůst intracelulární aktivity kaspázy 3.

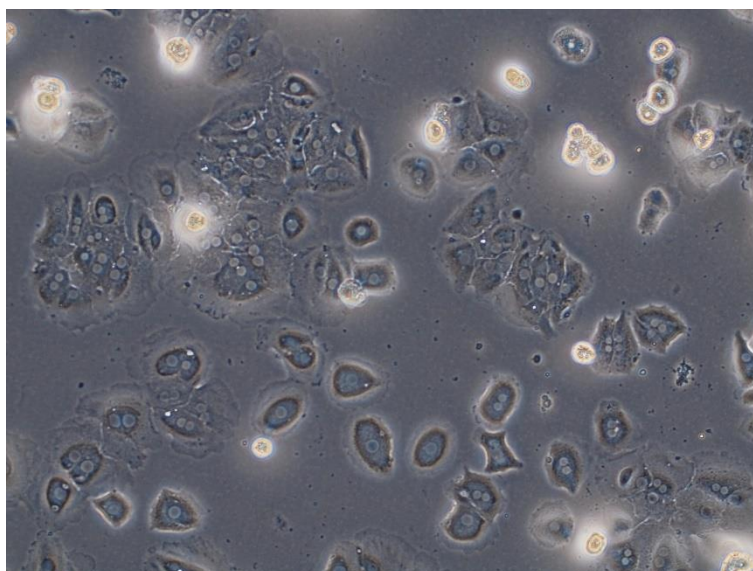


**Graf 7:** Optimalizace density buněk pro 24 WP - aktivita kaspázy 3 IC - měřeno po 2,5 h inkubace s činidlem pro kaspázu 3; AVG + STD; (n = 6; normální rozdělení; \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001 vs. 200 000 bb/j)



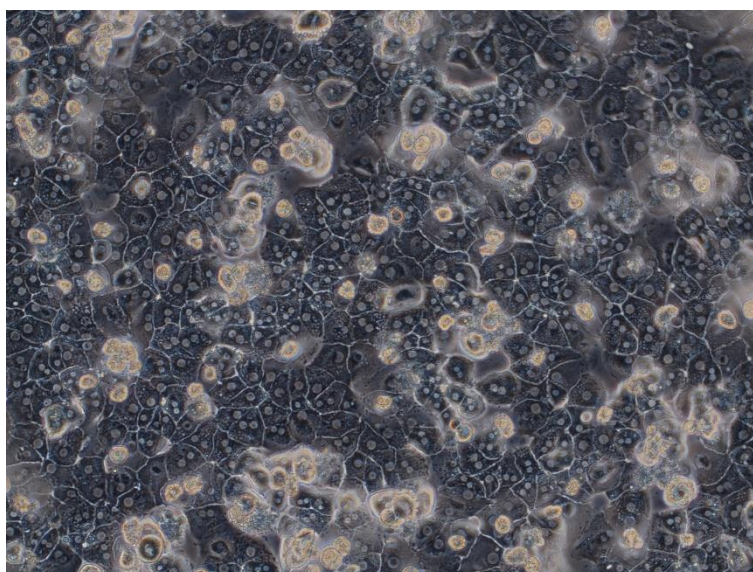
### 4.2.3 Vliv density buněk na morfologii hepatocytů – 24 h kultivace, 24 WP

U buněk kultivovaných v densitách 50 000-100 000 bb/j bylo patrné vytváření drobných shluků buněk. U density 50 000 bb/j bylo znatelné poškození buněčné membrány (viz obrázek 14).



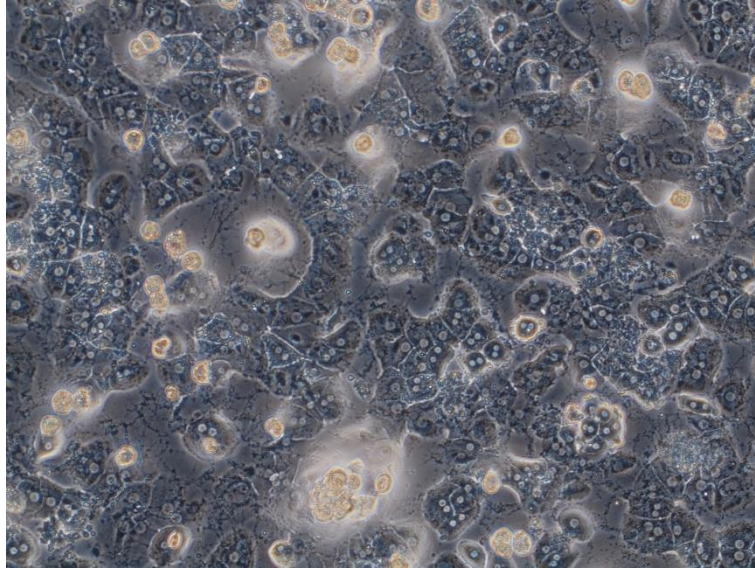
**Obrázek 14:** Morfologie hepatocytů; densita 50 000 bb/j; 24 WP; (Fázový kontrast, 20x zvětšení objektivu)

Hepatocyty kultivované v densitách 200 000 bb/j na jamku vytvářely souvislou monovrstvu, byla patrná jádra s jadérky a jemně granulovaná cytoplazma (viz obrázek 15).



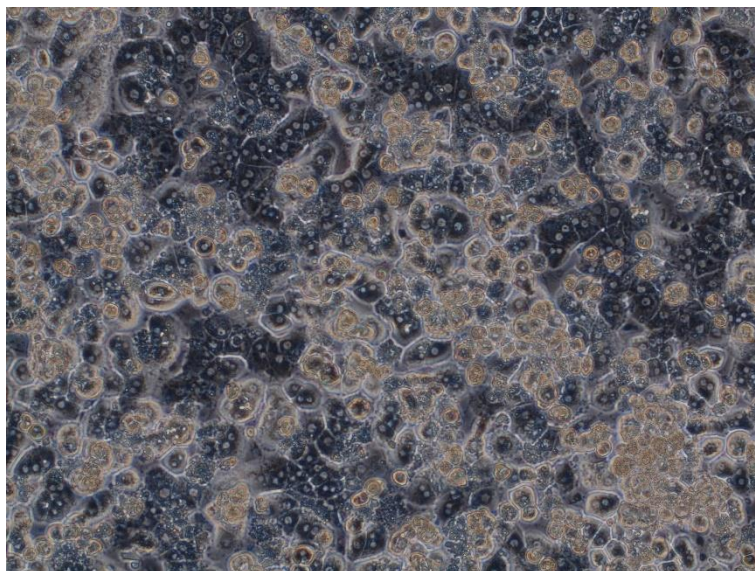
**Obrázek 15:** Morfologie hepatocytů; densita 200 000 bb/j; 24 WP; (Fázový kontrast, 20x zvětšení objektivu)

Hepatocyty v densitách 250 000-300 000 bb/j vykazovaly známky apoptózy s tvorbou tzv. blebů. Morfologie hepatocytů kultivovaných v densitě 300 000 bb/j je znázorněna na obrázku 16.



**Obrázek 16:** Morfologie hepatocytů; densita 300 000 bb/j; 24 WP; (Fázový kontrast, 20x zvětšení objektivu)

U vyšších densit bylo patrné velké množství zakulacených buněk nepřisednutých ke kolagenu s kondenzovaným jádrem bez jadérek, poškozenou buněčnou membránou, vykazující známky apoptózy (viz obrázek 17).



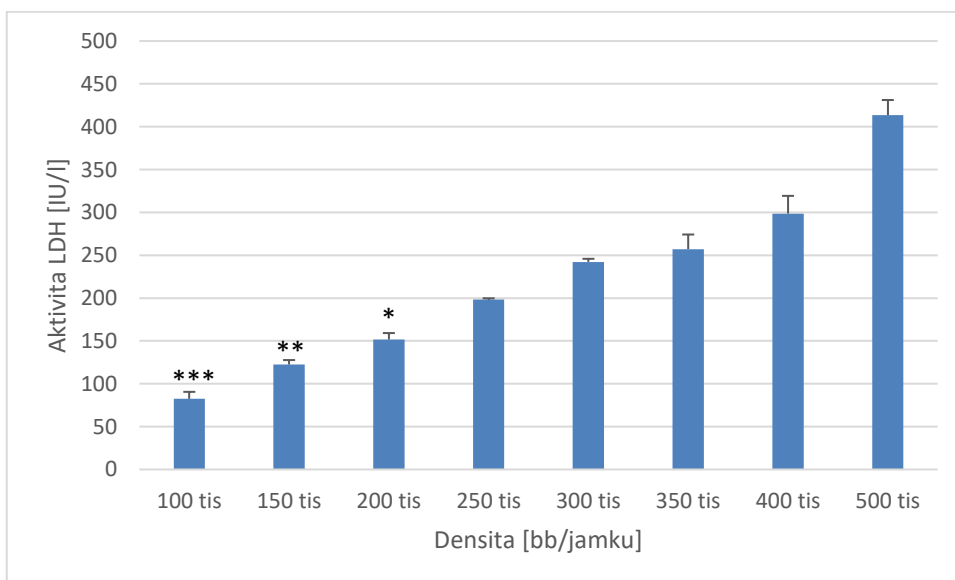
**Obrázek 17:** Morfologie hepatocytů; densita 400 000 bb/j; 24 WP; (Fázový kontrast, 20x zvětšení objektivu)

### 4.3 Optimalizace density buněk pro 12jamkové destičky

#### 4.3.1 Vliv density hepatocytů na extracelulární i intracelulární aktivitu

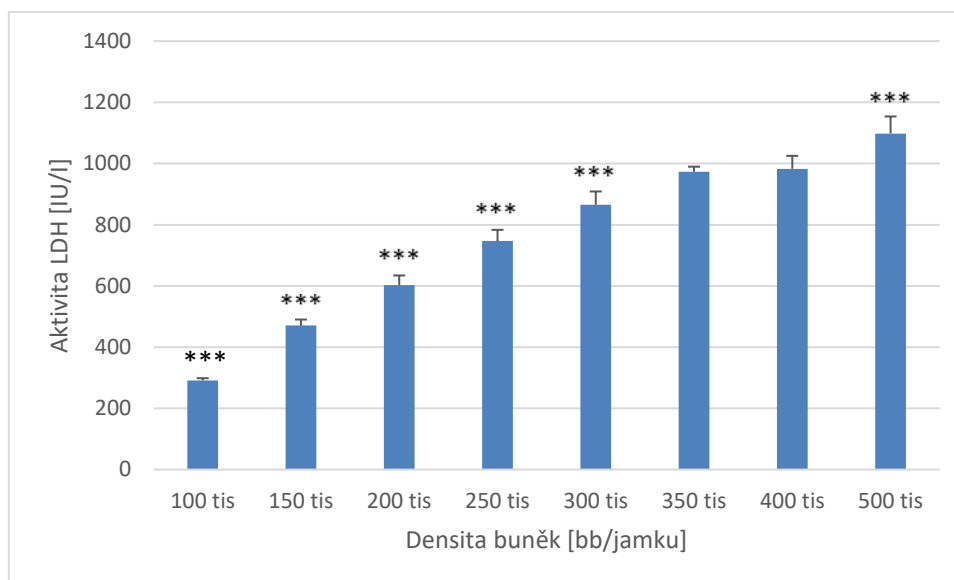
##### *laktátdehydrogenázy a na LDH-leakage – 24 h inkubace, 12jamkové destičky*

Byla sledována extracelulární aktivita laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu hepatocytů nasazených o postupně zvyšujících se densitách v jednotlivých skupinách jamek 24jamkových destiček po 24 h kultivace. Se zvyšující se densitou buněk docházelo k postupnému zvyšování extracelulární aktivity LDH, nicméně nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi naměřenými aktivitami LDH EC v rozmezí 250 000 bb/j až 500 000 bb/j oproti aktivitě v běžně používané densitě 400 000 bb/j.



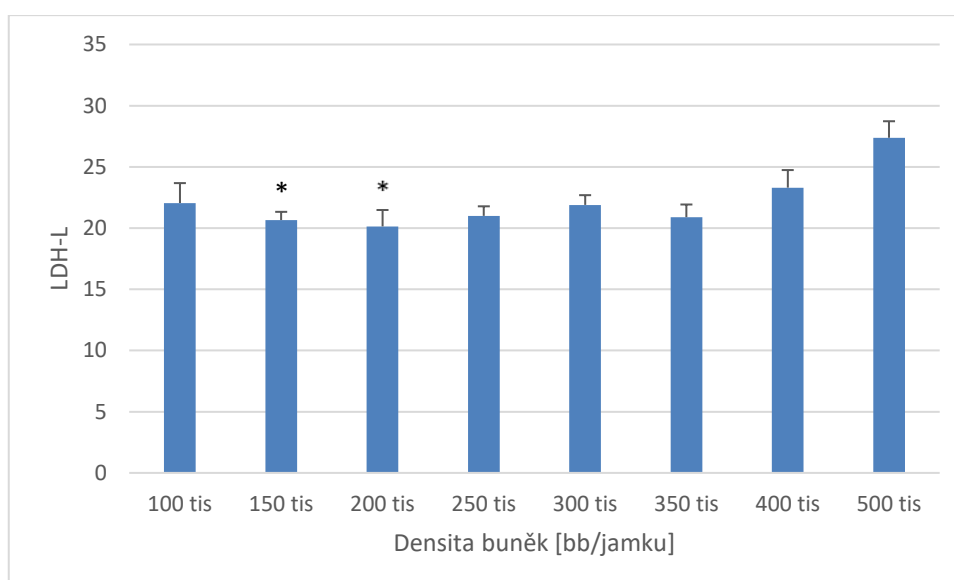
**Graf 8:** Optimalizace density buněk pro 12 WP - aktivita LDH EC; AVG + STD; (n = 6; nenormální rozdělení; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001)

U měření intracelulární aktivity LDH ve 12 WP byl pozorován postupný nárůst absorbance do density 350 000 bb/j. U hodnot absorbance mezi densitou 350 000 bb/j a 400 000 bb/j nebyl pozorován statisticky významný rozdíl.



**Graf 9:** Optimalizace density buněk pro 12 WP - aktivita LDH IC; AVG + STD; (n = 6; normální rozdělení; \*\*\*p < 0,001 vs. 400 000 bb/j)

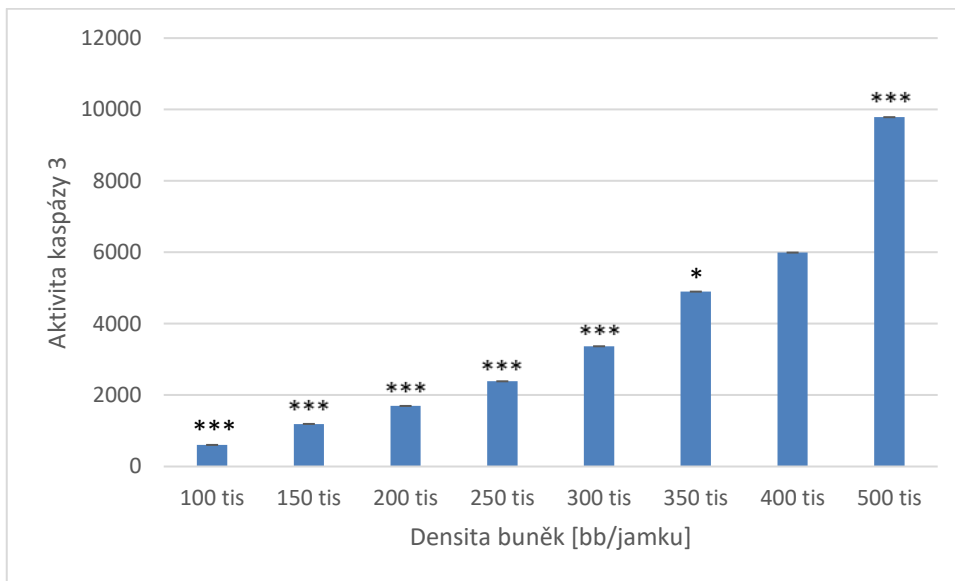
Statisticky nevýznamný nárůst LDH-L byl zaznamenán od density 400 000 bb/j. Mezi hodnotami LDH-L získanými u densit 150 000 bb/j a 200 000 bb/j byl pozorován signifikantní rozdíl (p < 0,05) oproti hodnotě LDH-L u density 400 000 bb/j.



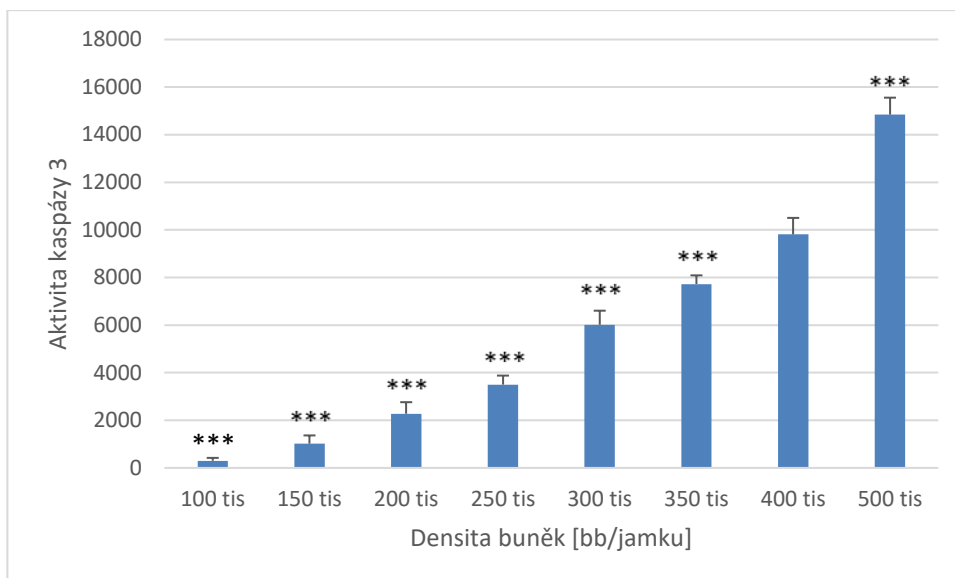
**Graf 10:** Optimalizace density buněk pro 12 WP - LDH-leakage; AVG + STD; (n = 6; nenormální rozdělení; \*p < 0,05 vs 400 000 bb/j)

### 4.3.2 Vliv density hepatocytů na extracelulární a intracelulární aktivitu kaspázy 3 – 24 h inkubace, 12jamkové destičky

U hepatocytů kultivovaných v postupně zvyšujících se densitách ve 12 WP po 24h kultivaci byl zaznamenán postupný nárůst extracelulární i intracelulární aktivity kaspázy 3 se zvyšující se densitou buněk. Velmi významný nárůst aktivity kaspázy 3 byl pozorován u density 500 000 bb/j. Aktivita kaspázy 3 při densitě 400 000 bb/j byla signifikantně odlišná od ostatních hodnot.



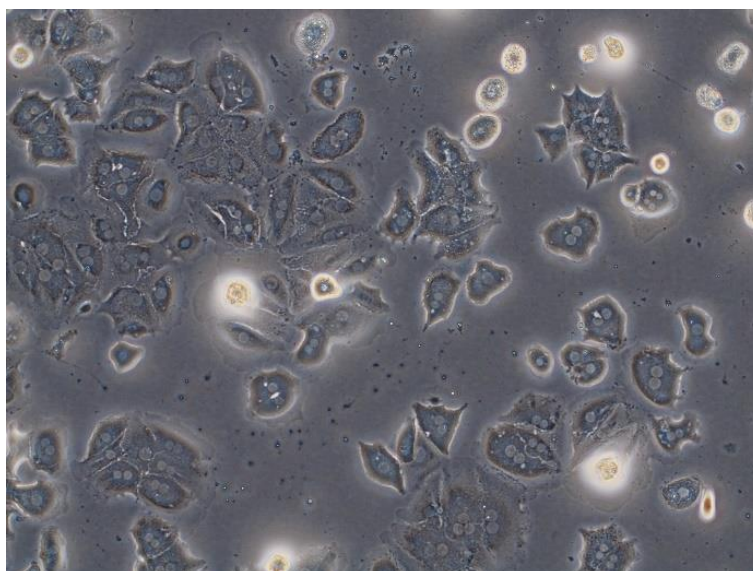
**Graf 11:** Optimalizace density buněk pro 12 WP - aktivita kaspázy 3 EC - měřeno po 2,5 h inkubace s činidlem pro kaspázu 3; AVG + STD; (n = 6; normální rozdělení; \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001 vs. 400 000 bb/j)



**Graf 12:** Optimalizace density buněk pro 12 WP - aktivita kaspázy 3 IC - měřeno po 2,5 h inkubace s činidlem pro kaspázu 3; AVG + STD; (n = 6; normální rozdělení; \*\*\* p < 0,001 vs. 400 000 bb/j)

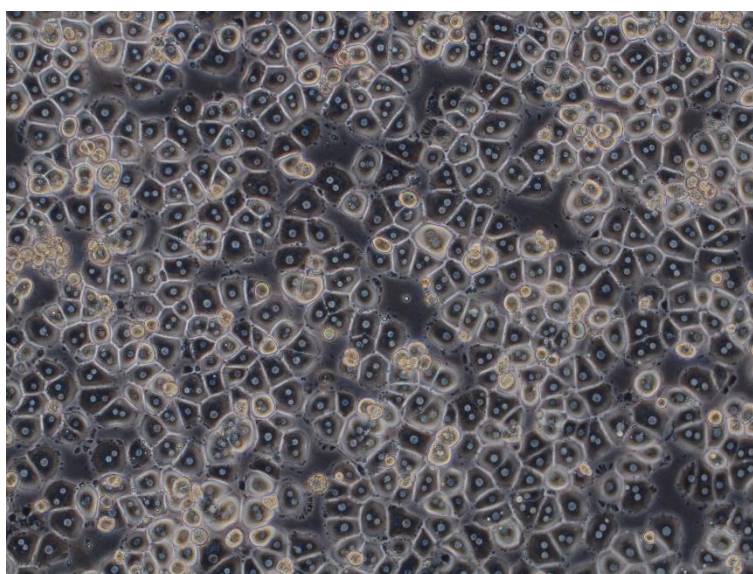
### 4.3.3 Vliv density buněk na morfologii hepatocytů – 24 h kultivace, 12 WP

Při densitách 100 000-250 000 bb/j měly hepatocyty atypický tvar (viz obrázek 18). Buňky nevytvářely souvislou monovrstvu, ale vytvářely se pouze drobné shluky buněk. Některé hepatocyty vykazovaly známky poškození buněčné membrány.



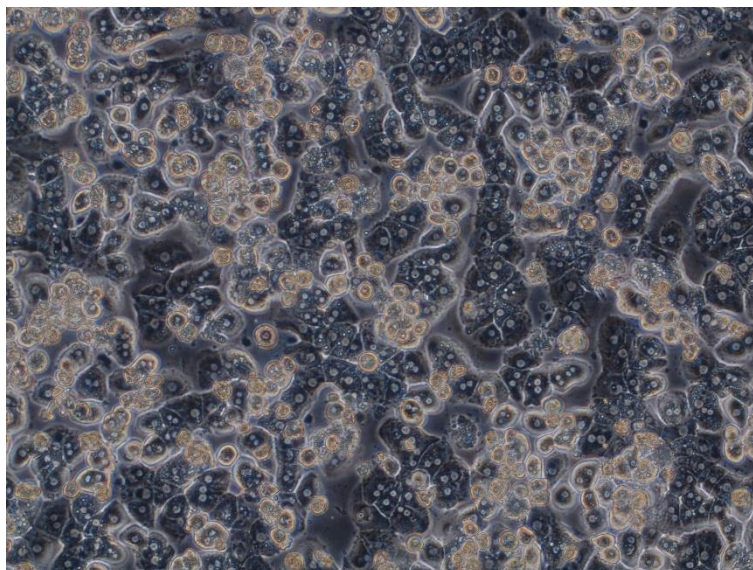
**Obrázek 18:** Morfologie hepatocytů; densita 100 000 bb/j; 12WP; (Fázový kontrast, 20x zvětšení objektivu)

U hepatocytů kultivovaných v densitách 300 000-350 000 bb/j začala být pozorována tvorba souvislé monovrstvy, v buňkách byla dobře viditelná jádra s jadérky, hepatocyty byly dobře ohraničené od okolí (viz obrázek 19).



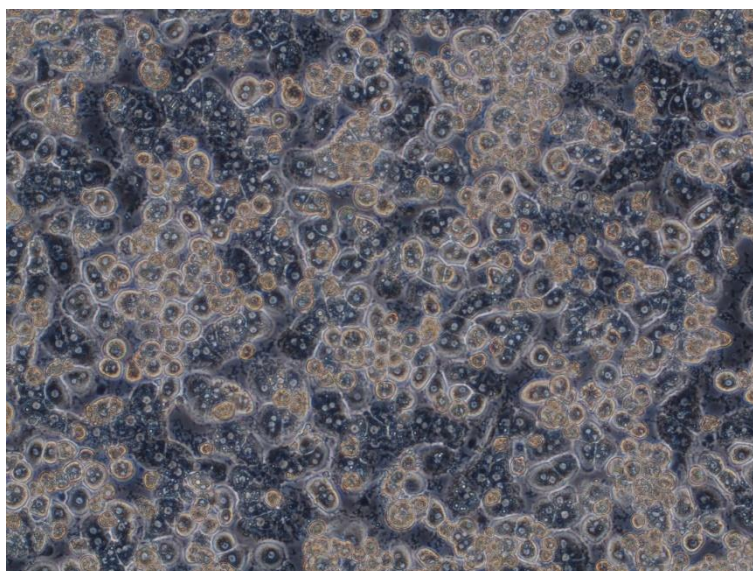
**Obrázek 19:** Morfologie hepatocytů; densita 350 000 bb/j; 12WP; (Fázový kontrast, 20x zvětšení objektivu)

U buněk v densitě 400 000 bb/j začínalo být patrné mírné poškození buněčné membrány (viz obrázek 20).



**Obrázek 20:** Morfologie hepatocytů; densita 400 000 bb/j; 12WP; (Fázový kontrast, 20x zvětšení objektivu)

Hepatocyty kultivované v densitě 500 000 bb/j (viz obrázek 21) vykazovaly vysoký stupeň kondenzace jader bez viditelných jadérek a velké množství zakulacených buněk, které se odlučovaly od podkladu nebo nebyly přisednuté ke kolagenu. Buňky ve zvýšené míře podléhaly apoptóze.



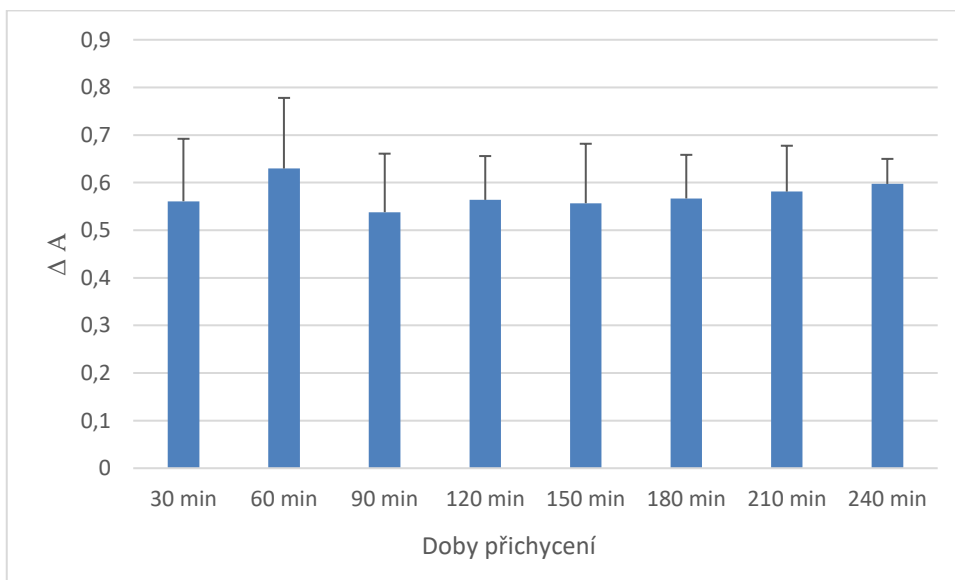
**Obrázek 21:** Morfologie hepatocytů; densita 500 000 bb/j; 12WP; (Fázový kontrast, 20x zvětšení objektivu)



## 4.4 Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 96jamkových destiček

### 4.4.1 Vliv doby nezbytné pro přichycení hepatocytů na aktivitu buněčných dehydrogenáz (WST-1 test) v kultivačním médiu – 24 h inkubace, 96jamkové destičky

Byla sledována aktivita buněčných dehydrogenáz u vzorků hepatocytů kultivovaných v 96 WP při postupně zvyšujících se dobách přichytávání hepatocytů (vždy po 30 minutách v jednotlivých skupinách jamek) a po následné 24 hodinové kultivaci. Nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly v dobách přichycení ve zkoumaném časovém rozmezí.

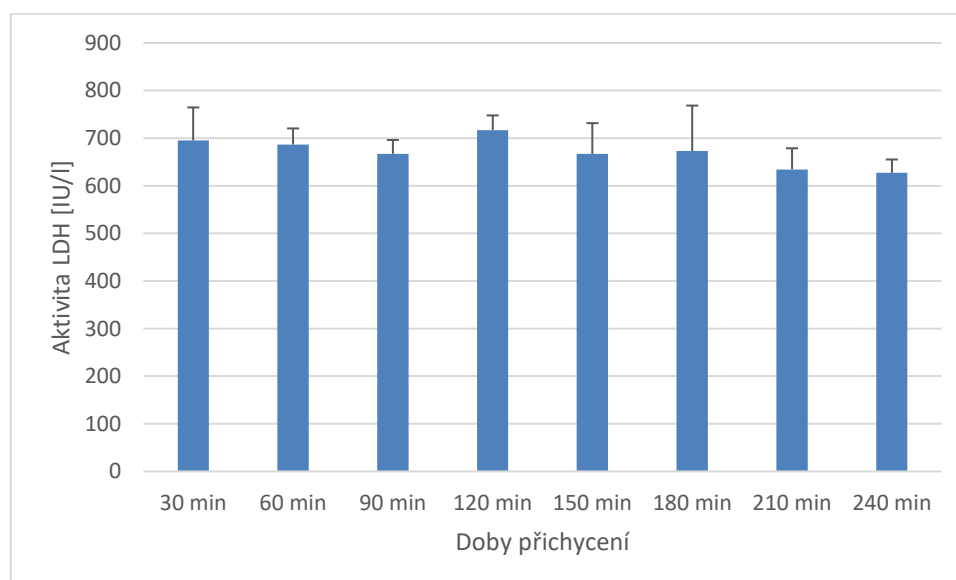


**Graf 13:** Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 96 WP - WST-1 test - měřeno po 1 h inkubace s činidlem WST-1; AVG + STD; (n = 8; normální rozdělení)

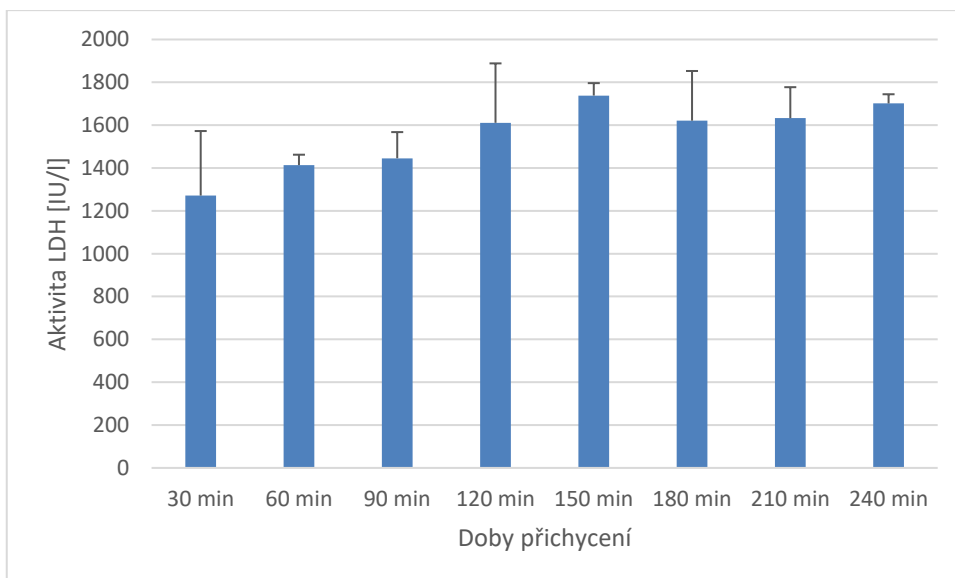
## 4.5 Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 24jamkových destiček

### 4.5.1 Vliv doby nezbytné pro přichycení hepatocytů na extracelulární i intracelulární aktivitu laktátdehydrogenázy a na LDH-leakage – 24 h inkubace, 24jamkové destičky

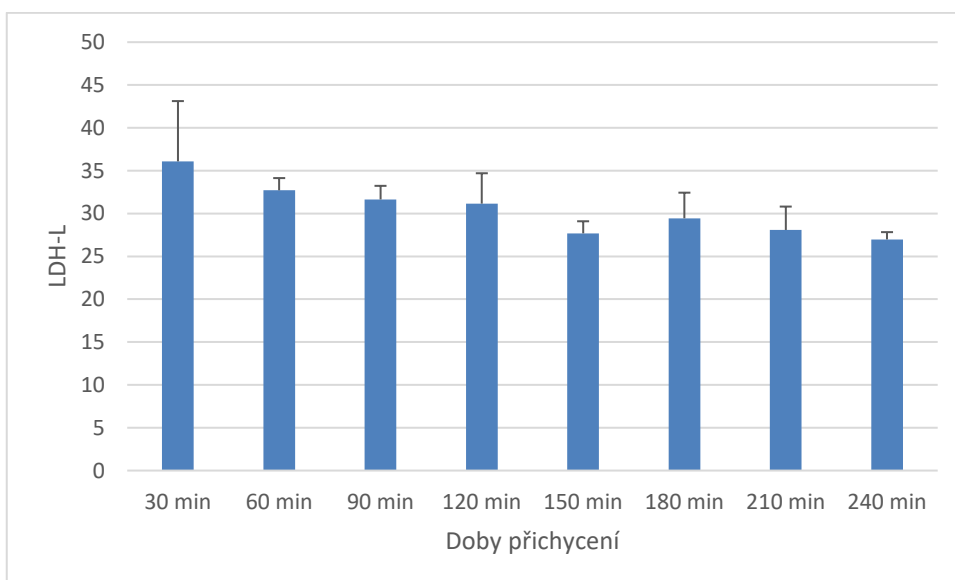
Byla měřena aktivita laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu hepatocytů ve 24 WP při postupně zvyšujících se dobách přichycení hepatocytů (vždy po 30 minutách v jednotlivých skupinách jamek) a po následné kultivaci 24 h. U extracelulární aktivity, intracelulární aktivity LDH, ani u LDH-leakage nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými testovanými dobami pro přichycení hepatocytů.



**Graf 14:** Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 24 WP - aktivita LDH EC; AVG + STD; (n = 6; normální rozdělení)



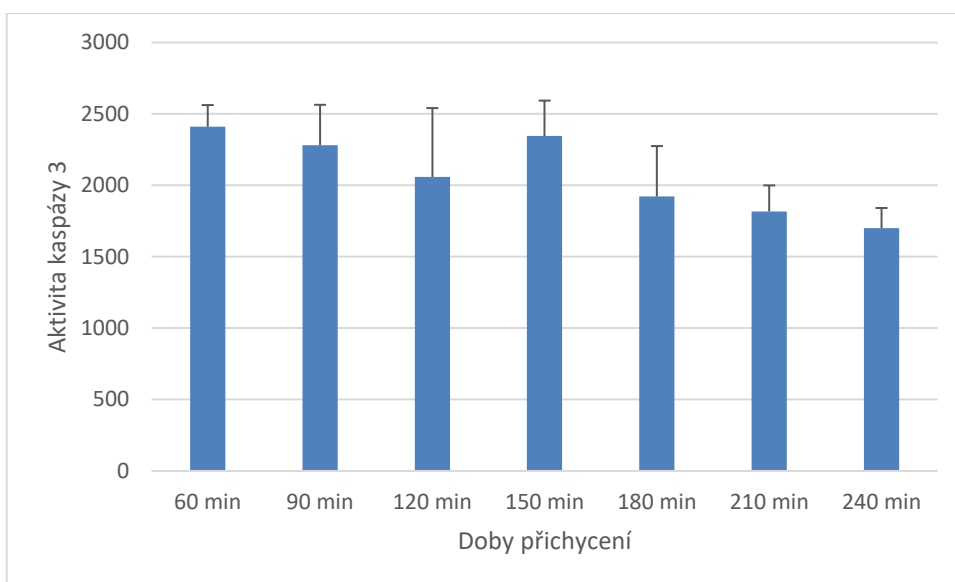
**Graf 15:** Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 24 WP - aktivita LDH IC; AVG + STD; (n = 6; nenormální rozdělení)



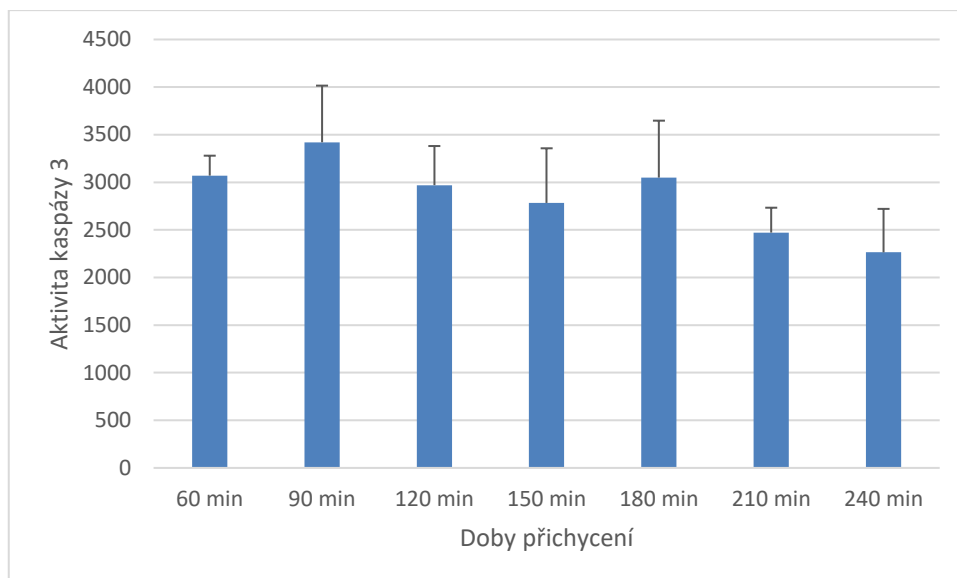
**Graf 16:** Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 24 WP - LDH-leakage; AVG + STD; (n = 6; nenormální rozdělení)

#### 4.5.2 Vliv doby nezbytné pro přichycení hepatocytů na extracelulární a intracelulární aktivitu kaspázy 3 – 24 h inkubace, 24jamkové destičky

Byla sledována aktivita kaspázy 3 u vzorků hepatocytů kultivovaných ve 24 WP při postupně zvyšujících se dobách přichytávání hepatocytů (vždy po 30 minutách v jednotlivých skupinách jamek) a po následné 24hodinové kultivaci. Hodnoty extracelulární i intracelulární kaspázy 3 u doby přichycení 30 min nejsou uvedeny v grafu, jelikož byly pod mezí detekce metody. Nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly mezi aktivitami kaspázy 3 v jednotlivých testovaných dobách pro přichycení oproti hodnotám v běžně používané době 120 min.



**Graf 17:** Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 24 WP - aktivita kaspázy 3 EC – měřeno po 2,5 h inkubace s činidlem pro kaspázu 3; AVG + STD; (n = 6; normální rozdělení)

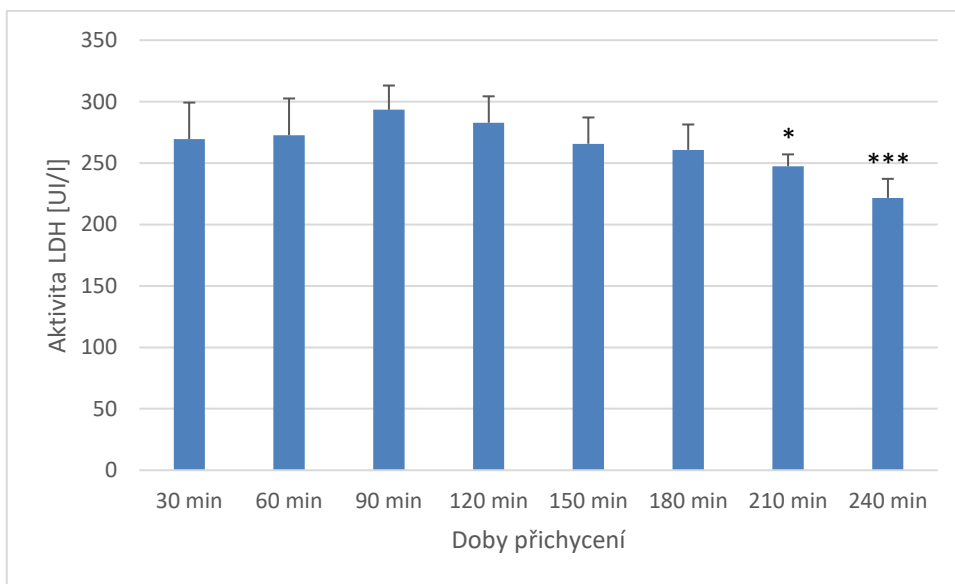


**Graf 18:** Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 24 WP - aktivita kaspázy 3 IC – měřeno po 2,5 h inkubace s činidlem pro kaspázu 3; AVG + STD; (n = 6; normální rozdělení)

## 4.6 Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 12jamkových destiček

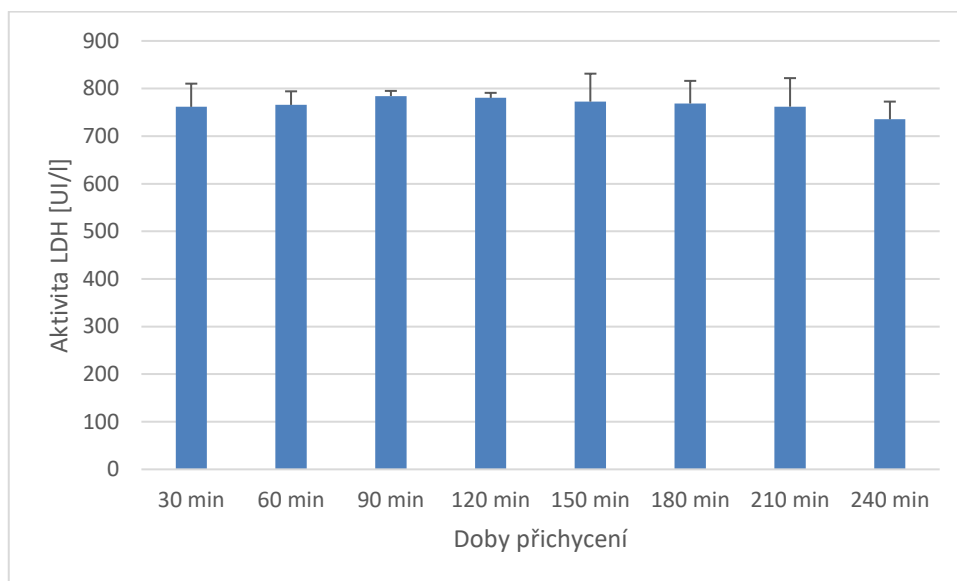
### 4.6.1 Vliv doby nezbytné pro přichycení hepatocytů na extracelulární i intracelulární aktivitu laktátdehydrogenázy a na LDH-leakage – 24 h inkubace, 12jamkové destičky

Byla měřena aktivita laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu hepatocytů ve 12 WP při postupně zvyšujících se dobách přichytávání hepatocytů (vždy po 30 minutách v jednotlivých skupinách jamek) a po následné kultivaci 24 h. Rozdíly v hodnotách extracelulární aktivity LDH u buněk přichytávajících se v dobách mezi 30-180 min nebyly statisticky významné. V době 210 a 240 min bylo pozorováno snížení extracelulární aktivity LDH oproti hodnotě v době 120 min.



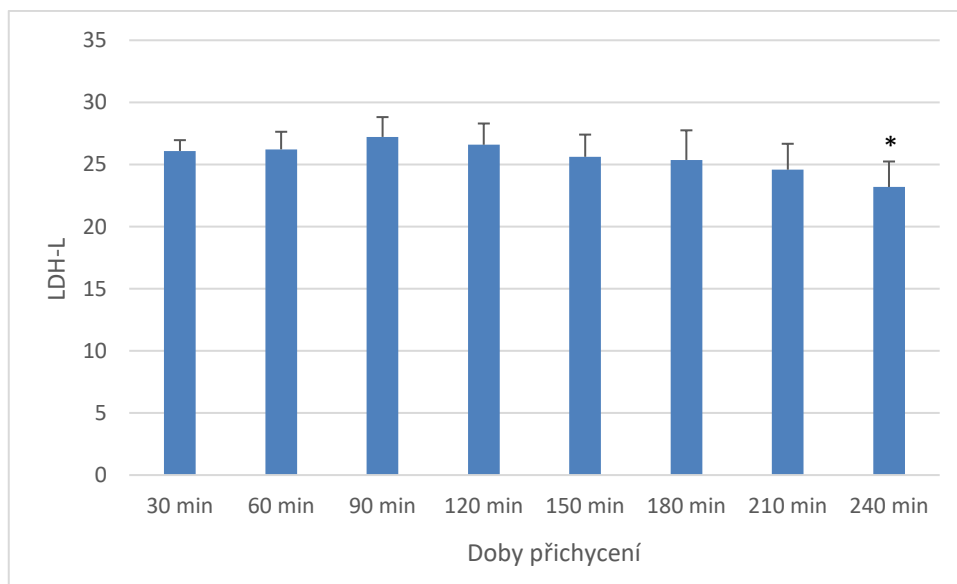
**Graf 19:** Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 12 WP - aktivita LDH EC; AVG + STD; (n = 6; normální rozdělení; \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001 vs. 120 min)

U jednotlivých dob přichytávání nebyly pozorovány statisticky významné odchylky v intracelulární aktivitě LDH.



**Graf 20:** Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 12 WP - aktivita LDH IC; AVG + STD; (n = 6; normální rozdělení)

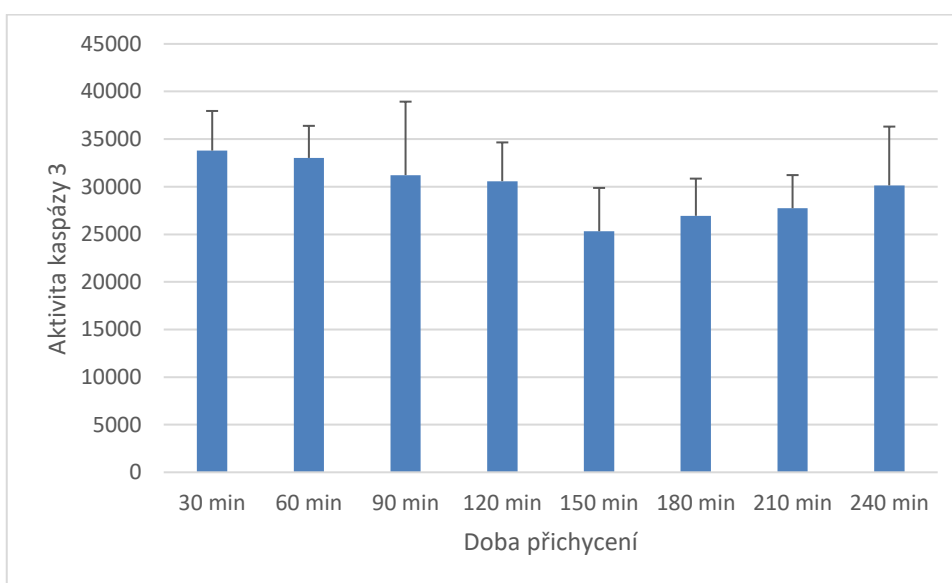
Při výpočtu LDH-leakage byly pozorovány statisticky nevýznamné odchylky v jednotlivých dobách přichycení. K mírnému snížení LDH-leakage došlo pouze u hepatocytů kultivovaných 240 min ( $p < 0,05$ ) oproti hodnotě v době 120 min.



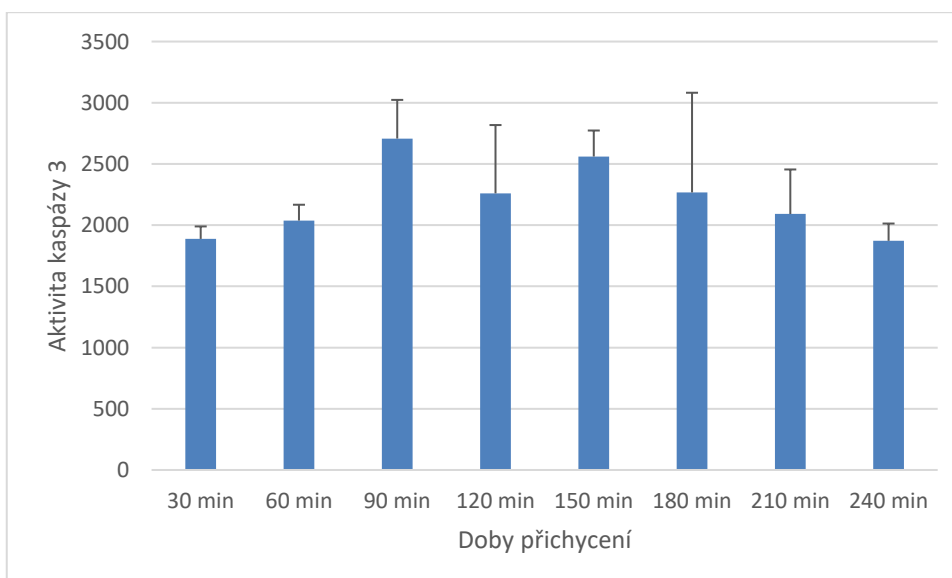
**Graf 21:** Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 12 WP - aktivita LDH-leakage; AVG + STD; (n = 6; normální rozdělení; \* $p < 0,05$  vs. 120 min)

#### 4.6.2 Vliv doby nezbytné pro přichycení hepatocytů na extracelulární a intracelulární aktivitu kaspázy 3 – 24 h inkubace, 12jamkové destičky

Byla sledována aktivita kaspázy 3 u vzorků hepatocytů kultivovaných ve 12 WP při postupně zvyšujících se dobách přichytávání hepatocytů (vždy po 30 minutách v jednotlivých skupinách jamek) a po následné 24hodinové kultivaci. Rozdíly v extracelulárních a intracelulárních aktivitách kaspázy 3 byly statisticky nevýznamné.



**Graf 22:** Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 12 WP - aktivita kaspázy 3 EC – měřeno po 1 h inkubace s činidlem pro kaspázu 3; AVG + STD; (n = 6; normální rozdělení)



**Graf 23:** Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 12 WP - aktivita kaspázy 3 IC – měřeno po 2 h inkubace s činidlem pro kaspázu 3; AVG + STD; (n = 3; nenormální rozdělení)



## 5 DISKUZE

Primární kultury hepatocytů patří k nejčastěji používaným modelovým systémům *in vitro* pro studium hepatotoxicity, biotransformace xenobiotik, k farmakokinetickým a toxikologickým studiím, a také pro studium buněčného dělení a genové exprese. Oproti některým jiným *in vitro* modelům si zachovávají nepozměněnou genotypovou výbavu.

U čerstvě izolovaných hepatocytů se však potýkáme s problémem dediferenciace, se změnami morfologie hepatocytů a ztrátami některých pro hepatocyty specifických funkcí, a tedy s poměrně krátkou dobou životaschopnosti plně funkčních buněk. Tyto problémy vznikají v reakci na jejich vyjmutí z fyziologického prostředí, na pro buňky nefyziologické podmínky kultivace, uměle vytvořená kultivační média, nepřítomnost neparenchymových jaterních buněk, rozdílné podmínky parciálních tlaků plynů, a podobně. Snahou u *in vitro* modelů je navodit optimální podmínky pro kultivaci buněk tak, aby byly co nejlépe napodobeny podmínky *in vivo*.

Cílem této práce bylo optimalizovat kultivační podmínky primárních kultur hepatocytů s ohledem na densitu buněk v jednotlivých mikrotitračních destičkách a na dobu potřebnou pro přichycení buněk k povrchu, tzv. dobu *seedingu*. K těmto účelům byly používány hepatocyty izolované z jater samců potkanů kmene Wistar. Pro průkaz životaschopnosti nebo poškození buněk byly sledovány aktivity buněčných dehydrogenáz (test WST-1), aktivity LDH, aktivity kaspázy 3 a morfologické změny hepatocytů mikroskopicky s použitím fázového kontrastu. Získaná data byla zpracována v programu Microsoft excel 2016 a následně statisticky vyhodnocena v programu GraphPad Prism 8.

Reakční činidlo WST-1 patří mezi tetrazoliové soli, které jsou buněčnými dehydrogenázami redukovány na formazan, což se projeví změnou absorbance, kterou lze spektrofotometricky stanovit. Laktátdehydrogenáza je cytoplazmatický enzym uvolňující se do extracelulárního prostoru při poškození buněčné membrány. Viabilitu buněk lze poměrně dobře sledovat výpočtem LDH-*leakage*, což je poměr aktivity LDH v extracelulárním prostoru ku celkové aktivitě LDH. Aktivita LDH lze stanovit spektrofotometricky měřením nárůstu koncentrace NADH+H<sup>+</sup> při oxidaci laktátu na pyruvát, kterou LDH katalyzuje. Intracelulární aktivita LDH (měřená v buněčném lyzátu) odpovídá počtu buněk, které se přichytily k povrchu kultivačních nádob. Citlivým ukazatelem indukce apoptózy je sledování aktivity kaspázy 3, kterou lze stanovit fluorimetricky díky štěpení specifických substrátů značených např. fluorogenním 7-amido-4-methylkumarinem.

Nejprve byla optimalizována densita hepatocytů pro vybrané typy mikrotitračních destiček, a to 96 WP (plocha jamky 0,3 cm<sup>2</sup>), 24 WP (plocha jamky 1,9 cm<sup>2</sup>) a 12 WP (plocha jamky 3,5 cm<sup>2</sup>). Při správné densitě vytvoří hepatocyty monovrstvu, jsou obnovována těsná spojení mezi buňkami a hepatocyty si zachovávají své metabolické funkce. Hepatocyty kultivované v příliš nízkých densitách ztrácejí své metabolické funkce a lze u nich pozorovat morfologické změny. Kultivace v příliš vysokých densitách zapříčiní, že ne všechny buňky mohou přisednout ke kolagenu (Hewitt et al., 2007). Pro vytvoření souvislé monovrstvy potkaních hepatocytů jsou dle (Freshney et al., 2002) doporučené density 1,0-1,3×10<sup>5</sup> bb/cm<sup>2</sup>. V naší laboratoři jsou běžně používány density 30 000 bb/j pro 96 WP, 200 000 bb/j pro 24WP a 400 000 bb/j pro 12 WP, tj. 1,0-1,1×10<sup>5</sup> bb/cm<sup>2</sup>. Podle studie (LeCluyse, 2001) je pro lidské hepatocyty optimální densita o něco vyšší, a to 1,3-1,5 ×10<sup>5</sup> bb/cm<sup>2</sup>.

U 96 WP byly testovány density 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50 tisíc bb/j. Naměřené hodnoty v jednotlivých densitách byly srovnávány s hodnotami získanými v densitě 30 000 bb/j, což je počet buněk běžně používaný v naší laboratoři.

Nejprve byla provedena analýza aktivity laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu. Pozorován byl postupný nárůst aktivity laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu (Graf 1). Poté byly vypočítány podíly aktivity laktátdehydrogenázy ku celkovému počtu buněk v jamce (Tabulka 8). Nejnížší podíly byly nalezeny u density 25 000 a 30 000 bb/j (tj. 0,8×10<sup>5</sup> bb/cm<sup>2</sup> a 1,0×10<sup>5</sup> bb/cm<sup>2</sup>), tudíž lze tyto density považovat v závislosti na aktivitě laktátdehydrogenázy za optimální pro tento typ destiček.

Následně byl proveden test WST-1. Aktivity buněčných dehydrogenáz opět vykazovaly postupný nárůst závislý na densitě, kdy maxima začaly dosahovat při densitě 30 000 bb/j (Graf 2). Při této densitě začaly buňky dosahovat vysoké metabolické aktivity, a proto můžeme densitu 30 000 bb/j (tj. 1,0×10<sup>5</sup> bb/cm<sup>2</sup>) považovat za optimální pro tento typ destiček.

Námi zjištěná optimální densita přibližně 1,0×10<sup>5</sup> bb/cm<sup>2</sup> se shoduje s densitou doporučovanou v literatuře.

Dále byla provedena optimalizace density buněk pro kultivaci primárních kultur hepatocytů ve 24jamkových destičkách. Testovány byly density 50; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400 tisíc bb/j. V naší laboratoři je pro tento typ destiček běžně používána densita 200 000 bb/j, s touto byly srovnány hodnoty naměřených veličin při jednotlivých densitách.

Z Grafu 3 byl s rostoucí densitou buněk patrný lineární nárůst extracelulární aktivity laktátdehydrogenázy. Rostoucí intracelulární aktivita laktátdehydrogenázy značí zvyšující se množství buněk přisednutých ke kolagenu. V Grafu 4 byl pozorován nárůst intracelulární aktivity laktátdehydrogenázy do density 250 000 bb/j, u vyšších densit nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly v počtu přisednutých buněk. LDH-*leakage* (Graf 5) ukazovala signifikantní rozdíly oproti densitě 200 000 bb/j, pouze u densit 50 000 a 400 000 bb/j. Od density 300 000 bb/j však začal být pozorován statisticky nevýznamný nárůst LDH-*leakage*, tudíž by se dalo usuzovat, že hepatocyty kultivované v densitách 100 000-250 000 bb/j ( $0,8-1,3 \times 10^5$  bb/cm<sup>2</sup>) jevíly nejmenší známky poškození buněčné membrány.

Pro srovnání bylo provedeno měření aktivity kaspázy 3. Od density 250 000 bb/j byl pozorován strmý nárůst intracelulární aktivity kaspázy 3 (Graf 7), což znamená, že u této density začínají buňky ve zvýšené míře podléhat apoptóze. U buněk kultivovaných v densitě 200 000 bb/j ( $1,0 \times 10^5$  bb/cm<sup>2</sup>) byla sice statisticky nevýznamně zvýšená aktivita extracelulárních kaspáz (Graf 6), zatím však nedošlo k maximálnímu nárůstu intracelulární aktivity kaspázy 3, a proto lze tuto densitu z hlediska aktivity kaspáz považovat za optimální pro tento typ destiček.

Fakt, že by mohla být densita 200 000 bb/j optimální pro 24jamkové destičky potvrzuje i morfologický nále, kdy při této densitě vytvářely hepatocyty souvislou monovrstvu (Obrázek 15). Při výrazně nižších (Obrázek 14) nebo výrazně vyšších densitách (Obrázky 16 a 17) docházelo k nefyziologickým změnám v morfologii hepatocytů. Na obrázku 16 je patrné množství buněk procházejících apoptózou, což se shoduje s výsledky měření aktivity kaspázy 3. U density 400 000 bb/j (Obrázek 17) bylo patrné množství zakulacených buněk nepřisednutých ke kolagenu, které, jak uvádí (Hewit et al., 2007), zaujímały místo v druhé vrstvě z důvodu příliš vysoké density.

Námi zjištěná optimální densita 200 000 bb/j, tedy přibližně  $1,0 \times 10^5$  bb/cm<sup>2</sup>, se shoduje s densitou doporučovanou v odborné literatuře.

Následně byla provedena optimalizace density buněk pro 12jamkové destičky. Testovány byly density 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400 a 500 tisíc bb/j. Naměřené hodnoty byly srovnávány s hodnotami získanými u buněk kultivovaných v densitě 400 000 bb/j (densita buněk běžně používaná pro tento typ destiček v naší laboratoři).

Se zvyšující se densitou buněk docházelo k postupnému zvyšování extracelulární aktivity laktátdehydrogenázy (Graf 8). Z měření intracelulární aktivity laktátdehydrogenázy (Graf 9) bylo zjištěno, že počet přisednutých buněk významně narůstal do density

350 000 bb/j, přičemž v densitách 350 000 bb/j a 400 000 bb/j nebyl počet přisednutých buněk signifikantně odlišný. Výpočet LDH-*leakage* ukazoval statisticky nevýznamný nárůst od density 400 000 bb/j (Graf 10). Fakt, že byl nárůst statisticky nevýznamný, mohl být způsoben nenormálním rozdělením hodnot. Densitu 350 000 bb/j ( $1,0 \times 10^5$  bb/cm<sup>2</sup>) lze proto považovat za optimální pro 12 WP v závislosti na aktivitě laktátdehydrogenázy.

V závislosti na aktivitě kaspázy 3 se jako optimální jeví density 300 000-400 000 bb/j, protože u těchto densit ještě nedošlo k maximálnímu nárůstu aktivity kaspáz (Graf 11 a Graf 12), zatímco při vyšší densitě (500 000 bb/j) už hepatocyty ve zvýšené míře podléhaly apoptóze a odlučovaly se od povrchu kultivačních destiček.

Posouzení morfologie hepatocytů s použitím mikroskopie s fázovým kontrastem ukázalo jako optimální density okolo 350 000 bb/j, při kterých byla pozorována tvorba souvislé monovrstvy (Obrázek 19), hepatocyty byly dobře ohraničené od okolí a měly viditelná jádra s jadérky. Density 100 000-250 000 bb/j (Obrázek 18) byly pro hepatocyty příliš nízké, buňky nemohly vytvořit souvislou monovrstvu, pozorován byl atypický tvar hepatocytů a u některých densit rovněž poškození buněčné membrány. U hepatocytů kultivovaných v densitě 400 000 bb/j (Obrázek 20) začínalo být patrné mírné poškození buněčné membrány. Buňky kultivované v densitě 500 000 bb/j (Obrázek 21) ve zvýšené míře podléhaly apoptóze, což dokládá také měření aktivity kaspázy 3.

Při porovnání výsledků měření aktivity laktátdehydrogenázy a kaspázy 3 pro 12jamkové destičky se jako optimální jeví density okolo 350 000 bb/j (tj. přibližně  $1,0 \times 10^5$  bb/cm<sup>2</sup>), tedy density o něco nižší, než je densita 400 000 bb/j ( $1,1 \times 10^5$  bb/cm<sup>2</sup>), která je doporučována v literatuře, např. podle (Zhang et al., 1990).

Námi zjištěné optimální density pro vybrané typy vícejamkových destiček se mezi sebou shodovaly v densitě  $1,0 \times 10^5$  bb/cm<sup>2</sup>. Tato densita také odpovídá densitám doporučovaným v literatuře. Pro detailnější analýzu vlivu density buněk na funkční parametry by bylo vhodné doplnit stanovení aktivity biotransformačních enzymů (např. cytochromu P450) a stanovení produkce albuminu či močoviny.

Druhým úkolem bylo optimalizovat dobu pro přichycení buněk k povrchu vícejamkových destiček potažených vrstvou kolagenu, tzv. dobu *seedingu*. Podle (Berry et al., 1991) se optimální doba pro přichycení pohybuje mezi 60-120 minutami. Někteří autoři používají pro přichycení i dobu 180 min (Gorla et al., 2001). Během přichytávání hepatocytů ke kolagenu odeznívá jejich reakce na izolační stres, čímž se může zvyšovat viabilita buněk.

Izolačním stresem rozumíme reakci hepatocytů na jejich odebrání z fyziologického mikroprostředí, při kterém hepatocyty ztrácejí mezibuněčné kontakty a působí na ně nepříznivý vliv proteolytických enzymů. Na druhou stranu by příliš dlouhá doba pro přichycení mohla způsobit, že se k podkladu přichytí i nedostatečně viabilní hepatocyty (Berry et al., 1991). Při výměně média jsou navíc odstraněny katabolity, nepřichycené i rozpadlé buňky a dojde k obnovení živin (Andria et al., 2010).

Pro jednotlivé vícejamkové destičky byly doby přichycení testovány pro 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min, 210 min a 240 min. Po těchto dobách, kdy se hepatocyty přichytávaly ke kolagenu typu I, bylo z příslušných jamek vždy odstraněno kultivační médium a nahrazeno příslušnými objemy inkompletního Williamsova E média. Naměřené hodnoty byly srovnávány s hodnotami v době 120 min, tato doba je pro přichycení hepatocytů k povrchu kultivačních nádob v literatuře doporučována nejčastěji.

Nejprve byla provedena optimalizace doby nezbytné pro přichycení v nakolagenovaných 96jamkových destičkách. Viabilita buněk zde byla stanovena pomocí testu WST-1. Mezi aktivitami buněčných dehydrogenáz nebyly nalezeny statisticky významné odchylky v dobách přichycení (Graf 13), nebyl tedy pozorován vliv doby pro přichycení na viabilitu buněk v 96jamkových destičkách.

Následně byla provedena optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu nakolagenovaných 24jamkových destiček. U extracelulární aktivity laktátdehydrogenázy, intracelulární aktivity laktátdehydrogenázy, ani u LDH-*leakage* nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly v dobách přichycení (Grafy 14, 15, 16). Ve 24jamkových destičkách tudíž bylo prokázáno, že testované doby přichycení nemají vliv na integritu buněčné membrány.

Pro srovnání bylo u hepatocytů kultivovaných ve 24jamkových destičkách provedeno stanovení aktivity kaspázy 3 (Graf 17 a 18). Zde opět nebyly patrné statisticky významné odchylky v naměřených intenzitách fluorescence, což znamená, že nebyl zaznamenán vliv doby pro přichycení na extracelulární ani intracelulární aktivitu kaspázy 3. Hodnoty extracelulární i intracelulární kaspázy 3 byly u doby přichycení 30 min pod mezí detekce metody.

Doba potřebná pro přichycení hepatocytů ke kolagenu byla testována také v nakolagenovaných 12jamkových destičkách. Z Grafu 19 byl patrný trend pouze mírného snižování extracelulární aktivity laktátdehydrogenázy, kdy nejnižších aktivit bylo dosaženo v dobách 210 min a 240 min. Ze stanovení aktivit LDH IC (Graf 20) bylo patrné, že

v jednotlivých dobách nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v počtu přisednutých buněk. Nejnižší LDH-*leakage* (Graf 21) byla nalezena pouze u hepatocytů přisedávajících po dobu 240 minut, ostatní hodnoty nevykazovaly signifikantní rozdíly. Důvod, proč by se s delší dobou pro přichycení měly snižovat aktivity laktátdehydrogenázy ve 12jamkových destičkách nebyl nalezen.

Pro porovnání byla měřena také aktivita kaspázy 3 u vzorků hepatocytů kultivovaných ve 12 WP při postupně zvyšujících se dobách přichytávání hepatocytů. Rozdíly v extracelulárních i intracelulárních aktivitách kaspázy 3 byly statisticky nevýznamné (Grafy 22, 23), tudíž nebyl prokázán vliv testovaných dob přichycení ani na indukci apoptózy ve 12jamkových destičkách.

Souhrnně lze z výsledků optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu vybraných nakolagenovaných vícejamkových destiček usuzovat, že překvapivě nebyl prokázán zásadní vliv doby přichycení (tzv. doby *seedingu*) na viabilitu buněk. Za optimální je z tohoto důvodu možné považovat doby *seedingu* doporučené v literatuře (60-180 min), neboť jsou vhodné pro získání kvalitní primární kultury hepatocytů.

## 6 ZÁVĚR

Byla provedena optimalizace kultivačních podmínek hepatocytů v primární kultuře s ohledem na densitu buněk ve vícejamkových mikrotitračních destičkách a na dobu potřebnou pro přichycení hepatocytů k povrchu destiček pokrytých vrstvou kolagenu (doba *seedingu*). Optimalizace byla provedena na základě aktivity buněčných dehydrogenáz (test WST-1), aktivity LDH a aktivity kaspázy 3.

Jako optimální byly určeny density 30 000 bb/j pro 96jamkové destičky (LDH, WST-1), 200 000 bb/j pro 24jamkové destičky (LDH, kaspázy 3) a 350 000 bb/j (LDH, kaspázy 3) pro 12jamkové destičky. Tyto hodnoty odpovídají densitě přibližně  $1,0 \times 10^5$  bb/cm<sup>2</sup>. Bylo prokázáno, že testované doby pro přichycení (30 - 240 min) nemají zásadní vliv na funkční parametry hepatocytů v kultuře, jak bylo původně předpokládáno.

Pro detailnější analýzu vlivu kultivačních podmínek by bylo vhodné doplnit stanovení o další parametry, jako je měření aktivity biotransformačních enzymů nebo stanovení funkčních parametrů (produkce albuminu a močoviny).

## SEZNAM ZKRATEK

<b>AC-DEVD-AMC</b>	N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylkumarin, (kde Asp - kyselina asparagová, Glu - kyselina glutamová; Val - valin)
<b>bb</b>	počet buněk
<b>bb/j</b>	počet buněk na jamku
<b>CYP</b>	cytochrom P450
<b>DCFDA</b>	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>EC</b>	extracelulární prostor
<b>EHS</b>	Engelbreth-Holm-Swarmův sarkom
<b>FBS</b>	fetální bovinní sérum
<b>IC</b>	intracelulární prostor
<b>LDH</b>	laktátdehydrogenáza
<b>LDH-L</b>	LDH- <i>leakage</i>
<b>NAD<sup>+</sup>; NADH+H<sup>+</sup></b>	nikotinamid adenin dinukleotid (oxidovaná; redukována forma)
<b>ROS</b>	reaktivní formy kyslíku (z angl. Reactive Oxygen Species)
<b>WP</b>	vícejamková destička (z angl. Well Plate)
<b>WST-1</b>	(4-(3-(4-iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2-H-5-tetrazolio)-1,3- benzen-disulfonát)



## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1:</b> Schéma jaterního lalůčku.....	12
<b>Obrázek 2:</b> Centrifugace v hustotním gradientu s použitím roztoku Percoll.....	17
<b>Obrázek 3:</b> Buňky rostoucí na Petriho misce v jedné vrstvě.....	20
<b>Obrázek 4:</b> Fotografie sféroidů myších hepatocytů pořízená z elektronového mikroskopu....	22
<b>Obrázek 5:</b> Karyotyp HepaRG buněk 12. pasáže.....	24
<b>Obrázek 6:</b> Mikrofotografie monovrstev hepatocytů kultivovaných při normální a nízké densitě.....	28
<b>Obrázek 7:</b> Vzorec trypanové modři.....	32
<b>Obrázek 8:</b> Vzorec neutrální červeně.....	32
<b>Obrázek 9:</b> Reakce katalyzovaná LDH.....	33
<b>Obrázek 10:</b> Přeměna tetrazoliové soli WST-1 na formazan.....	34
<b>Obrázek 11:</b> Vzorec Ac-DEVD-AMC.....	36
<b>Obrázek 12:</b> Princip testu DCFDA.....	37
<b>Obrázek 13:</b> Schéma jaterní perfúze.....	42
<b>Obrázek 14:</b> Morfologie hepatocytů; densita 50 000 bb/j; 24 WP.....	57
<b>Obrázek 15:</b> Morfologie hepatocytů; densita 200 000 bb/j; 24 WP.....	57
<b>Obrázek 16:</b> Morfologie hepatocytů; densita 300 000 bb/j; 24 WP.....	58
<b>Obrázek 17:</b> Morfologie hepatocytů; densita 400 000 bb/j; 24 WP.....	58
<b>Obrázek 18:</b> Morfologie hepatocytů; densita 100 000 bb/j; 12 WP.....	63
<b>Obrázek 19:</b> Morfologie hepatocytů; densita 350 000 bb/j; 12 WP.....	63
<b>Obrázek 20:</b> Morfologie hepatocytů; densita 400 000 bb/j; 12 WP.....	64
<b>Obrázek 21:</b> Morfologie hepatocytů; densita 500 000 bb/j; 12 WP.....	64

## SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1:</i> Doporučená densita lidských hepatocytů pro různé typy kultivačních nádob.....	29
<i>Tabulka 2:</i> Pipetované objemy pro 96jamkové destičky.....	44
<i>Tabulka 3:</i> Pipetované objemy pro 24jamkové destičky.....	45
<i>Tabulka 4:</i> Pipetované objemy pro 12jamkové destičky.....	45
<i>Tabulka 5:</i> Density buněk pro příslušné destičky.....	46
<i>Tabulka 6:</i> Doby přichycení hepatocytů v 96jamkových destičkách.....	46
<i>Tabulka 7:</i> Doby přichycení hepatocytů ve 24 jamkových a 12jamkových destičkách.....	47
<i>Tabulka 8:</i> Podíl extracelulární aktivity LDH ku počtu buněk, 96WP.....	50

## SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf 1:</b> Optimalizace density buněk pro 96 WP - aktivita LDH EC .....	50
<b>Graf 2:</b> Optimalizace density buněk pro 96 WP - WST-1 test.....	51
<b>Graf 3:</b> Optimalizace density buněk pro 24 WP - aktivita LDH EC.....	52
<b>Graf 4:</b> Optimalizace density buněk pro 24 WP - aktivita LDH IC.....	53
<b>Graf 5:</b> Optimalizace density buněk pro 24 WP - LDH-leakage.....	54
<b>Graf 6:</b> Optimalizace density buněk pro 24 WP - aktivita kaspázy 3 EC.....	55
<b>Graf 7:</b> Optimalizace density buněk pro 24 WP - aktivita kaspázy 3 IC.....	56
<b>Graf 8:</b> Optimalizace density buněk pro 12 WP - aktivita LDH EC.....	59
<b>Graf 9:</b> Optimalizace density buněk pro 12 WP - aktivita LDH IC.....	60
<b>Graf 10:</b> Optimalizace density buněk pro 12 WP - LDH-leakage.....	60
<b>Graf 11:</b> Optimalizace density buněk pro 12 WP - aktivita kaspázy 3 EC.....	61
<b>Graf 12:</b> Optimalizace density buněk pro 12 WP - aktivita kaspázy 3 IC.....	62
<b>Graf 13:</b> Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 96 WP - WST-1 test.....	65
<b>Graf 14:</b> Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 24 WP - aktivita LDH EC.....	66
<b>Graf 15:</b> Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 24 WP - aktivita LDH IC.....	67
<b>Graf 16:</b> Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 24 WP - LDH-leakage....	67
<b>Graf 17:</b> Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 24 WP - aktivita kaspázy 3 EC.....	68
<b>Graf 18:</b> Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 24 WP - aktivita kaspázy 3 IC.....	69
<b>Graf 19:</b> Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 12 WP - aktivita LDH EC.....	70
<b>Graf 20:</b> Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 12 WP - aktivita LDH IC.....	71
<b>Graf 21:</b> Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 12 WP - LDH-leakage....	71
<b>Graf 22:</b> Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 12 WP - aktivita kaspázy 3 EC.....	72
<b>Graf 23:</b> Optimalizace doby pro přichycení hepatocytů k povrchu 12 WP - aktivita kaspázy 3 IC.....	72

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AALTO SCIENTIFIC, LTD. Lactate Dehydrogenase (Lactic Dehydrogenase/LDH/LD). [online]. [cit. 2019-1-10]. Dostupné z: <http://www.aaltoscientific.com/product/lactate-dehydrogenase/>

AAT BIOQUEST®. Trypan Blue, sodium salt [online]. [cit. 2018-11-24]. Dostupné z: <https://www.abcam.com/trypan-blue-staining-solution-ab233465.html>

ANDRIA, B., BRACCO, A., CIRINO, G. a CHAMULEAU, R. A. F. M. (2010): Liver cell culture devices. *Cell medicine*. Vol. 1(1), s 55-70. DOI: 10.3727/215517910X519274

BACHMANN, A., MOLL, M., GOTTWALD, E., NIES, C., ZANTL, R., WAGNER, H., DAMM, G., et al. (2015): 3D cultivation techniques for primary human hepatocytes. *Microarrays*, Vol. 4(1), s 64-83. DOI: 10.3390/microarrays4010064

BAKER, T. K., CARFAGNA, M. A., GAO, H., DOW, E. R., LI, Q., SEARFOSS, G. H. a RYAN, T. P. (2001): Temporal gene expression analysis of monolayer cultured rat hepatocytes. *Chemical research in toxicology*. Vol. 14(9), s 1218-1231. DOI: 10.1021/tx015518a

BERRY, M. N., BARRITT, G. J. a EDWARDS, A. M. (1991): *Isolated Hepatocytes: Preparation, Properties and Applications: Preparation, Properties and Applications*. Elsevier Vol. 21. ISBN: 9780080858906

BIOTEK INSTRUMENTS, INC. Figure 14: Formation of fluorescent Compound DCF by ROS. [online]. [cit. 2019-1-12]. Dostupné z: <https://www.biotek.com/resources/white-papers/an-introduction-to-reactive-oxygen-species-measurement-of-ros-in-cells/>

BUCK, L. D., INMAN, S. W., RUSYN, I. a GRIFFITH, L. G. (2014): Co-regulation of primary mouse hepatocyte viability and function by oxygen and matrix. *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 111(5), s 1018-1027. DOI 10.1002/bit.25152

CARRASCO, R. A., STAMM, N. B. a PATEL, B. K. (2003): One-step cellular caspase-3/7 assay. *Biotechniques*, Vol 34(5), s 1064-1067. DOI: 10.2144/03345dd02

CASTELL, J. V., JOVER, R., MARTNEZ-JIMNEZ, C. P. a GMEZ-LECHN, M. J. (2006): Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, Vol. 2(2), s 183-212. DOI: 10.1517/17425255.2.2.183

CAYMAN CHEMICAL. Ac-DEVD-AMC [online]. [cit. 2019-1-12]. Dostupné z: <https://www.caymanchem.com/product/14986>

CLONTECH LABORATORIES, INC. (2007): *Premixed WST-1 Cell Proliferation Reagent*. Cleavage of the tetrazolium salt WST-1 to Formazan [online] [cit. 2018-11-20] Dostupné z: [http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Manuals/WST-1\\_Clontech.pdf](http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Manuals/WST-1_Clontech.pdf)

ČERVENKOVÁ, K., BELEJOVA, M., VESELY, J., CHMELA, Z., RYPKA, M., ULRICHOVÁ, J., MODRIANSKÝ, M., et al. (2001): Cell suspensions, cell cultures, and tissue slices-important metabolic in vitro systems. *Biomedical Papers-Palacký University in Olomouc*. Vol. 145(2), s 57-60.

ČERVINKOVÁ, Z. (2005): *Metabolismus a játra*. *Sanquis*;40:14-16.

ČIHÁK, R., GRIM, M., DRUGA, R. a HELEKAL, I. (2002): *Anatomie*. Grada. s 470. ISBN: 80-247-0143-X

DIEHL, A. M. a RAI, R. M. (1996): Liver regeneration 3: Regulation of signal transduction during liver regeneration. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal (The FASEB Journal)*, Vol. 10(2), s 215-227. DOI: 10.1096/fasebj.10.2.8641555

EHRMANN, J. a HŮLEK, P. (2010): *Hepatologie*. Grada. s 590. ISBN: 978-80-247-3118-6

ELAUT, G., VANHAECKE, T., VANDER HEYDEN, Y. a ROGIERS, V. (2005): Spontaneous apoptosis, necrosis, energy status, glutathione levels and biotransformation capacities of isolated rat hepatocytes in suspension: effect of the incubation medium. *Biochemical pharmacology*. Vol 69(12), s 1829-1838. DOI: 10.1016/j.bcp.2005.03.020

ERUSLANOV, E. a KUSMARTSEV, S. (2010): Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. In *Advanced protocols in oxidative stress II* (pp. 57-72). Humana Press, Totowa, NJ. DOI: 10.1007/978-1-60761-411-1\_4

FRACZEK, J., BOLLEYN, J., VANHAECKE, T., ROGIERS, V. a VINKEN, M. (2013): Primary hepatocyte cultures for pharmaco-toxicological studies: at the busy crossroad of various anti-dedifferentiation strategies. *Archives of toxicology*. Vol. 87(4), s 577-610. DOI: 10.1007/s00204-012-0983-3

FRESHNEY, R. I.; FRESHNEY, M G., eds. (2002): *Culture of epithelial cells*. New-York: Wiley-Liss. ISBNs: 0-471-40121-8

GOMEZ-LECHON, M. J., DONATO, M. T., CASTELL, J. V. a JOVER, R. (2003): Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Current drug metabolism*, Vol. 4(4), s 292-312. DOI: 10.2174/1389200033489424

GOMEZ-LECHON, M. J., TOLOSA, L., CONDE, I. a DONATO, M. T. (2014): Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, Vol. 10(11), s 1553-1568. DOI: 10.1517/17425255.2014.967680

GOULIARMOU, V., PELKONEN, O. a COECKE, S. (2015): Differentiation-promoting medium additives for hepatocyte cultivation and cryopreservation. *In Protocols in In Vitro Hepatocyte Research* (pp. 143-159). Humana Press, New York. Vol. 1250. DOI 10.1007/978-1-4939-2074-7\_10

GRONEBERG, D. A., GROSSE-SIESTRUP, C. a FISCHER, A. (2002): In vitro models to study hepatotoxicity. *Toxicologic pathology*, Vol. 30(3), s 394-399. DOI: 10.1080/01926230252929972

GU, X., HUANG, D., CI, L., SHI, J., ZHANG, M., YANG, H., WANG, Z., SHENG, Z., et al. (2017): Fate tracing of hepatocytes in mouse liver. *Scientific reports*. Vol. 7(1), 16108. DOI:10.1038/s41598-017-15973-7

GUGUEN-GUILLOUZO C. a GUILLOUZO A. (2010): General Review on In Vitro Hepatocyte Models and Their Applications. In: Maurel P. (eds) Hepatocytes. *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Vol 640. DOI: 10.1007/978-1-60761-688-7\_1

GUILLOUZO, A. (1998): Liver cell models in in vitro toxicology. *Environmental health perspectives*. Vol 106(suppl 2), s 511-532. DOI: 10.1289/ehp.981065114

HARIPARSAD, N., CARR, B. A., EVERS, R. a CHU, X. (2008): Comparison of immortalized Fa2N-4 cells and human hepatocytes as in vitro models for cytochrome P450 induction. *Drug Metabolism and Disposition*, Vol. 36(6), s 1046-1055. DOI: 10.1124/dmd.108.020677

HELGASON, CH. D. a MILLER C. L., (2004): *Basic Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology*. (Book 290). Humana Press; 3. vydání. ISBN: 978-1588292841

HEPARG™. HepaRG™ karyotype at passage 12. [online]. [cit. 2018-11-24]. Dostupné z: <https://www.heparg.com/rubrique-features>

HEWITT, N. J., GÓMEZ LECHÓN, M. J., HOUSTON, J. B., HALLIFAX, D., BROWN, H. S., MAUREL, P., GUILLOUZO, A., et al. (2007): Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug metabolism reviews*, Vol 39(1), s 159-234. DOI: 10.1080/03602530601093489

HLADÍKOVÁ, M. a ŠTOURÁČ, P. (2008): Matrixové metaloproteinázy v patogenezi roztroušené sklerózy. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. Vol. 71/10(5). s 530-536

HU, W. S., FRIEND, J. R., WU, F. J., SIELAFF, T., PESHWA, M. V., LAZAR, A., CERRA, F. B., et al. (1997): Development of a bioartificial liver employing xenogeneic hepatocytes. *Cytotechnology*, Vol. 23(1-3), s 29-38. DOI: 10.1023/A:1007906512616

CHOW, A. Y. (2010): Cell cycle control by oncogenes and tumor suppressors: driving the transformation of normal cells into cancerous cells. *Nature Education*, Vol. 3(9), s 7

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. a KELLEY, R. O. (1997): *Základy histologie*. 1. české vydání Jinočany : H & H. s 502. ISBN: 80-85787-37-7

KNOBELOCH, D., EHNERT, S., SCHYSCHKA, L., BÜCHLER, P., SCHOENBERG, M., KLEEFF, J., NUSSLER, A. K., et al. (2012): Human hepatocytes: isolation, culture, and quality procedures. *Human Cell Culture Protocols*, s 99-120. Humana Press. DOI: 10.1007/978-1-61779-367-7\_8

- KÖHLER, C., ORRENIUS, S. a ZHIVOTOVSKY, B. (2002): Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *Journal of immunological methods*, Vol. 265(1-2), s 97-110. DOI: 10.1016/S0022-1759(02)00073-X
- KRAUSE, P., SAGHATOLISLAM, F., KOENIG, S., UNTHAN-FECHNER, K. a PROBST, I. (2009): Maintaining hepatocyte differentiation in vitro through co-culture with hepatic stellate cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, Vol. 45(5-6), s 205-212. DOI: 10.1007/s11626-008-9166-1
- KREAMER, B. L., STAECKER, J. L., SAWADA, N., SATTLER, G. L., HSIA, M. S. a PITOT, H. C. (1986): Use of a low-speed, iso-density percoll centrifugation method to increase the viability of isolated rat hepatocyte preparations. *In vitro cellular & developmental biology*, Vol. 22(4), s 201-211.
- KUČERA, O., LOTKOVÁ, H., KŘIVÁKOVÁ, P., ROUŠAR, T. a ČERVINKOVÁ, Z. (2006): Modelové systémy pro studium toxického poškození hepatocytů in vitro. *Československá fyziologie*. Vol. 55, s 103-110.
- KUROKAWA, M. a KORNBLUTH, S. (2009): Caspases and kinases in a death grip. *Cell*, Vol 138(5), s 838-854. DOI: 10.1016/j.cell.2009.08.021
- LECLUYSE, E. L. (2001): Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *European journal of pharmaceutical sciences*, Vol. 13(4), s 343-368. DOI: 10.1016/S0928-0987(01)00135-X
- LERCHE-LANGRAND, C. a TOUTAIN, H. J. (2000): Precision-cut liver slices: characteristics and use for in vitro pharmaco-toxicology. *Toxicology*. Vol. 153(1-3), s 221-253. DOI: 10.1016/S0300-483X(00)00316-4
- LI, Y., GAO, M., WU, D. a BAO, J. (2017): *Isolations and Cultures of Primary Hepatocytes*. *Clinical & Experimental Pathology* Vol. 7(5), s 322. DOI: 10.4172/2161-0681.1000322
- LIN, R. Z. a CHANG, H. Y. (2008): Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, Vol. 3(9-10), s 1172-1184. DOI: 10.1002/biot.200700228



- MAHTO, S. K., CHANDRA, P. a RHEE, S. W. (2010): In vitro models, endpoints and assessment methods for the measurement of cytotoxicity. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, Vol 2(2), s 87-93. DOI: 10.1007/BF03216487
- MAYATI, A., MOREAU, A., LE VÉE, M., BRUYÈRE, A., JOUAN, E., DENIZOT, C., PARMENTIER, Y., et al. (2018): Functional polarization of human hepatoma HepaRG cells in response to forskolin. *Scientific reports*, Vol. 8(1), s 16115. DOI: 10.1038/s41598-018-34421-8
- MITRY, R. R., HUGHES, R. D. a DHAWAN, A. (2002): Progress in human hepatocytes: isolation, culture & cryopreservation. In *Seminars in cell & developmental biology*, Vol. 13, No. 6, s 463-467. Academic Press. DOI: 10.1016/S1084-9521(02)00135-0
- MORTENSEN, A., SORESENSEN, I. K., WILDE, C., DRAGONI, S., MULLEROVÁ, D., TOUSSAINT, O., ZLOCH, Z., et al. (2008): Biological models for phytochemical research: from cell to human organism. *British Journal of Nutrition*. Vol. 99(E-S1), s ES118-ES126. DOI: 10.1017/S0007114508965806
- NGAMWONGSATIT, P., BANADA, P. P., PANBANGRED, W. a BHUNIA, A. K. (2008): WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic Bacillus species using CHO cell line. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 73(3), s 211-215. DOI: 10.1016/j.mimet.2008.03.002
- O'BRIEN, M. A., DAILY, W. J., HESSELBERTH, P. E., MORAVEC, R. A., SCURRIA, M. A., KLAUBERT, D. H., WOOD, K. V., et al. (2005): Homogeneous, bioluminescent protease assays: caspase-3 as a model. *Journal of Biomolecular Screening*, Vol 10(2), s 137-148. DOI: 10.1177/1087057104271865
- OLINGA, P., MEIJER, D. K. F., SLOOFF, M. J. H. a GROOTHUIS, G. M. M. (1997): Liver slices in in vitro pharmacotoxicology with special reference to the use of human liver tissue. *Toxicology in vitro*, Vol. 12(1), s 77-100. DOI: 10.1016/S0887-2333(97)00097-0
- PAGE, J. L., JOHNSON, M. C., OLSAVSKY, K. M., STROM, S. C., ZARBL, H. a OMIECINSKI, C. J. (2007): Gene expression profiling of extracellular matrix as an effector of human hepatocyte phenotype in primary cell culture. *Toxicological sciences*, Vol 97(2), s 384-397. DOI: 10.1093/toxsci/kfm034

REPETTO, G., DEL PESO, A. a ZURITA, J. L. (2008): Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*, Vol 3(7), s 1125. DOI: 10.1038/nprot.2008.75

SEVERGNINI, M., SHERMAN, J., SEHGAL, A., JAYAPRAKASH, N. K., AUBIN, J., WANG, G., FITZGERALD, K., et al. (2012): A rapid two-step method for isolation of functional primary mouse hepatocytes: cell characterization and asialoglycoprotein receptor based assay development. *Cytotechnology*. Vol 64(2), s 187-195. DOI 10.1007/s10616-011-9407-0

SHEN, H. M., SHI, C. Y., SHEN, Y. I. a ONG, C. N. (1996): Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1. *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 21(2), s 139-146. DOI: 10.1016/0891-5849(96)00019-6

SHEN, L., HILLEBRAND, A., WANG, D. Q. H. a LIU, M. (2012): Isolation and primary culture of rat hepatic cells. *Journal of Visualized Experiments*, Vol. (64), s e3917. DOI: 10.3791/3917

SIGMA-ALDRICH. Neutral Red solution [online]. [cit. 2019-1-12]. Dostupné z: <https://qaci.sial.com/catalog/product/sial/57993?lang=en&region=CZ>

SINGH, S., KHANNA, V. K. a PANT, A. B. (2018): Development of In Vitro Toxicology: A Historic Story. In *In Vitro Toxicology* (pp. 1-19). Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-804667-8.00001-8

SOLDATOW, V. Y., LECLUYSE, E. L., GRIFFITH, L. G. a RUSYN, I. (2013): In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicology research*, Vol. 2(1), s 23-39. DOI: 10.1039/C2TX20051A

SONI, M. G. a MEHENDALE, H. M. (1998): Role of tissue repair in toxicologic interactions among hepatotoxic organics. *Environmental health perspectives*, Vol. 106(suppl 6), s 1307-1317. DOI: 10.1289/ehp.98106s61307

STOCKERT, J. C., BLÁZQUEZ-CASTRO, A., CAÑETE, M., HOROBIN, R. W. a VILLANUEVA, Á. (2012): MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta histochemica*, Vol. 114(8), s 785-796. DOI: 10.1016/j.acthis.2012.01.006

- STROBER, W. (1997): Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, Vol 21(1), s A-3B. DOI: 10.1002/0471142735.ima03bs21
- TUSCHL, G. a MUELLER, S. O. (2006): Effects of cell culture conditions on primary rat hepatocytes—cell morphology and differential gene expression. *Toxicology*, Vol. 218(2-3), s 205-215. DOI: 10.1016/j.tox.2005.10.017
- VAN DER VALK, J., BRUNNER, D., DE SMET, K., SVENNINGSEN, Å. F., HONEGGER, P., KNUDSEN, L. E., LINDL, T., et al. (2010): Optimization of chemically defined cell culture media—replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in vitro*. Vol.24(4), s 1053-1063. DOI:10.1016/j.tiv.2010.03.016
- VINKEN, M., VANHAECKE, T. a ROGIERS, V. (2012): Primary hepatocyte cultures as in vitro tools for toxicity testing: quo vadis?. *Toxicology in Vitro*. Vol. 26(3), s 541-544. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.01.002
- WATTS, P., SMITH, M. D., EDWARDS, I., ZAMMIT, V., BROWN, V. a GRANT, H. (1995): The influence of medium composition on the maintenance of cytochrome P-450, glutathione content and urea synthesis: a comparison of rat and sheep primary hepatocyte cultures. *Journal of hepatology*. Vol. 23(5), s 605-612. ISSN 0168-8278
- WILKENING, S., STAHL, F. a BADER, A. (2003): Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug metabolism and disposition*. Vol. 31(8), s 1035-1042. DOI: 31:1035–1042
- YIN, L. M., WEI, Y., WANG, Y., XU, Y. D. a YANG, Y. Q. (2013): Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells. *International journal of medical sciences*, Vol 10(1), s 68. DOI: 10.7150/ijms.5256
- YOUNG, T. A., CUNNINGHAM, C. C. a BAILEY, S. M. (2002): Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: studies using myxothiazol. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 405(1), 65-72. DOI: 10.1016/S0003-9861(02)00338-7

ZEISBERG, M., KRAMER, K., SINDHI, N., SARKAR, P., UPTON, M. a KALLURI, R. (2006): De-differentiation of primary human hepatocytes depends on the composition of specialized liver basement membrane. *Molecular and cellular biochemistry*, Vol 283(1-2), s 181-189. DOI: 10.1007/s11010-006-2677-8

ZHANG, S. Z., LIPSKY, M. M., TRUMP, B. F. a HSU, I. C. (1990): Neutral red (NR) assay for cell viability and xenobiotic-induced cytotoxicity in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Cell biology and toxicology*, Vol. 6(2), s 219-234. DOI: 10.1007/BF00249595