

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2014

Klára Šafaříková

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

In vitro testování toxicity, proliferace a viability buněk

Klára Šafaříková

Bakalářská práce

2014

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Klára Šafařková**
Osobní číslo: **C10460**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **In vitro testování toxicity, proliferace a viability buněk**
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 :

Vypracujte literární rešerši obsahující:

1. Přehled dostupných metod pro testování cytotoxicity in vitro.
2. Vyžití buněčných linií při testování in vitro toxicity chemických látek. Přehled nejužívanějších nádorových linií.
3. Monitorování cytotoxicity pomocí systému x-CELLigence.
4. Korelace cytotoxických dat získaných systémem x-CELLigence s daty získaných měření proliferace buněčných linií.
5. Návrh experimentu pro testování cytotoxicity systémem x-CELLigence.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Lenka Brůčková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **13. prosince 2013**

Termín odevzdání bakalářské práce: **18. července 2014**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 25. února 2014

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., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne.....

Klára Šafaříková

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat Mgr. Lence Brůčkové, Ph.D. za odborné vedení práce, ochotu, velkou trpělivost a hlavně za cenné rady, které mi pomohly celou práci zkompletovat.

Anotace

Bakalářská práce je věnována přehledu dostupných metod pro testování cytotoxicity *in vitro*. Využití buněčných linií při testování cytotoxicity a přehledu nejčastěji využívaných nádorových buněčných linií. Práce je také zaměřena na monitorování cytotoxicity v reálném čase systémem xCELLigence a na porovnání výsledků získaných systémem xCELLigence s klasickými metodami měřících proliferaci buněčných linií. Součástí práce je návrh praktického experimentu pro testování cytotoxicity systémem xCELLigence na buněčné linii SKBR3.

Klíčová slova: in vitro testy, cytotoxicita, viabilita, proliferace, buněčné linie, xCELLigence systém

Title:

In vitro toxicity, cell proliferation and cell viability testing

Annotation:

The bachelor's thesis is devoted to the overview of the available *in vitro* cytotoxicity testing methods. Use of cell lines for the cytotoxicity testing and there is a list of the most used tumor cell lines. The essay is also focused on monitoring cytotoxicity by real-time xCELLigence system and to compare the results obtained using xCELLigence system with classic cell proliferation measuring methods. Part of the essay is a practical proposal to test the cytotoxicity on SKBR3 cell line using xCELLigence system.

Keywords: in vitro tests, cytotoxicity, viability, proliferation, cell lines, xCELLigence system

OBSAH:

0	ÚVOD	12
1	TESTY <i>IN VITRO</i> CYTOTOXICITY.....	13
1.1	Účinky toxické látky na buňky	14
1.2	Hodnocení cytotoxicity.....	14
1.2.1	LD ₅₀ a LC ₅₀	14
1.2.2	EC ₅₀ a IC ₅₀	14
1.3	Kolorimetrické metody	15
1.3.1	MTT test.....	16
1.3.2	XTT test	17
1.3.3	MTS metoda.....	18
1.3.4	WST-1metoda	18
1.3.5	Sulforhodamin B (SRB) test	18
1.3.6	LDH test.....	18
1.3.7	Test cytotoxicity s Neutrální červení	19
1.3.8	Test viability trypanovou modří.....	19
1.4	Stanovení viability pomocí analyzátorů částic	21
1.4.1	Vi-CELL analyzátor.....	21
1.4.2	Cedex analyzátor	22
1.4.3	Z2 coulter counter	22
1.4.4	CASY technologie	23
1.4.5	Systémy Cellavista a IncuCyte.....	24
1.5	Luminiscenční a fluorescenční metody	24
1.5.1	ATP bioluminiscenční metoda.....	25
1.5.2	Resazurinový test	25
1.5.3	Kalcein-AM metoda.....	26
1.6	Ostatní metody	26
1.6.1	³ H-thymidin inkorporace	26
1.6.2	BrdU test	26
2	PRIMÁRNÍ BUNĚČNÉ KULTURY.....	27
2.1	Primární kultury hepatocytů	27
2.2	Primární kardiomyocyty	28
2.3	Pluripotentní kmenové buňky	28

3	BUNĚČNÉ LINIE	29
3.1	Přehled nádorových linií	29
3.1.1	Buněčná linie HeLa	29
3.1.2	Hepatomové buněčné linie	30
3.1.3	Nádorové buněčné linie HepG2 a HepaRG	30
3.1.4	Prostatické buněčné linie PNT1A a PC-3	31
4	XCELLIGENCE RTCA (REAL – TIME CELL ANALYZER)	32
4.1	Složení xCELLigence RTCA přístroje	32
4.2	Typy základních xCELLigence RTCA přístrojů	33
4.3	Jak xCELLigence pracuje	34
4.4	Monitorování cytotoxicity pomocí systému xCELLigence	36
4.5	Testování kardiotoxicity systémem xCELLigence	37
4.6	Monitorování buněčné viability a proliferace systémem xCELLigence	39
5	KORELACE DAT	40
5.1	Korelace dat získaných systémem xCELLigence s daty získaných měření WST-1 metodou	40
5.2	Srovnání WST-1 testu a systému xCELLigence	40
5.3	Porovnání metody MTT se systémem xCELLigence při zkoumání účinků fenethyl isothiokyanátu (PEITC) na plicní nádorové buněčné linie A549 a H1299	41
5.4	Zhodnocení a porovnání metod MTT a systému xCELLigence	42
6	NÁVRH REÁLNÉHO EXPERIMENTU PRO TESTOVÁNÍ SYSTÉMEM XCELLIGENCE	44
6.1	Cytotoxicita látky XY testované na buněčné linii SKBR3	44
6.2	Průběh experimentu	45
6.3	Vyhodnocení experimentu	46
7	ZÁVĚR	47
8	SEZNAM CITACÍ	48

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázky:

Obrázek č. 1: „Dose-response“ křivka	15
Obrázek č. 2: SpectraMax® Plus ³⁸⁴ Absorbance Microplate Reader.....	16
Obrázek č. 3: Princip redukce MTT na formazan	17
Obrázek č. 4: Začátek a konec redukce MTT	17
Obrázek č. 5: Neurální červeň.....	19
Obrázek č. 6: Počítací mřížka Bürkerovy komůrky	20
Obrázek č. 7: Bürkerova počítací komůrka.....	21
Obrázek č. 8: Trypanová modř.....	21
Obrázek č. 9: Analyzátor Vi-CELL XR.....	22
Obrázek č. 10: Cedex analyzátor.....	22
Obrázek č. 11: Z2 coulter counter	23
Obrázek č. 12: Casy model TT.....	23
Obrázek č. 13: Systém Cellavista.....	24
Obrázek č. 14: Systém IncuCyte	24
Obrázek č. 15: Složení přístroje xCELLigence RTCA SP.....	33
Obrázek č. 16: Stanice RTCA MP	34
Obrázek č. 17: Stanice RTCA DP	34
Obrázek č. 18: Princip analýzy buněk v reálném čase	36
Obrázek č. 19: Zobrazení cytotoxických účinků různých látek na HeLa buňky, z přístroje RTCA	37
Obrázek č. 20: Složení „RTCA cardio“ přístroje.....	38
Obrázek č. 21: Porovnání hodnot buněčné proliferace	41
Obrázek č. 22: Účinek PEITC na viabilitu buněk A549 a H1299 stanovený MTT testem	42
Obrázek č. 23: Monitorování inhibice růstu buněk A549 v reálném čase, systémem xCELLigence.....	43
Obrázek č. 24: Monitorování inhibice růstu buněk H1299 v reálném čase, systémem xCELLigence.....	43

Tabulky:

Tabulka č. 1: Dávkování látky XY do jednotlivých jamek (A –H)	44
Tabulka č. 2: Schéma dávkování použitých reagentů do E-destičky	45

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AMP	adenosinmonofosfát (Adenosine monophosphate)
ATCC	americká organizace skladující biologické vzorky - tkáně a buněčné kultury (American Tissue and Cultures Collection)
ATP	adenosintrifosfát (Adenosine triphosphate)
bb	buňky
BrdU	bromdeoxiuridin(5-brom-2-deoxyuridin)
CAR	konstitutivní androstanový receptor (Constitutive Androstane Receptor)
CI	buněčný index (Cell Index)
CYP	Cytochrom P450
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)
EC50	střední účinná koncentrace (Effective Concentration)
ECACC	evropská organizace poskytující buněčné kultury (European Collection of Cell Cultures)
ECE	Electrical Current Exclusion (měření buněk pomocí elektrického proudu)
GST	glutathion-s-transferáza
HCS	mikroskopický systém pro skladování a formátování sloučenin (High-content screening)
HTS	testování s vysokou propustností (High-throughput screening)
CHL	buněčná linie z plic čínského křečka (Chinese Hamster Lung)
CHO	buněčná linie z vaječníku čínského křečka (Chinese Hamster Ovary)
IC50	střední inhibiční koncentrace (Inhibition Concentration)
iPSC	indukovaná pluripotentní kmenová buňka (induced Pluripotent Stem Cell)

Kalcein-AM	acetoxymethyldiacetylesterkalceinu, derivát fluoresceinu
LC₅₀	střední letální koncentrace 50 (Lethal Concentration)
LD50	střední letální dávka 50 (Lethal Dose)
LDH	laktátdehydrogenáza
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid), MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium
NADH	redukováná forma nikotinamidadenindinukleotidu (Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide)
NCI	normalizovaný buněčný index (Normalized Cell Index)
PEITC	fenthyl isothiokyanát (Phenethyl isothiocyanate)
PMS	fenazin methosulfát (Phenazine methosulfate)
PXR	pregnanový X receptor (Pregnane X Receptor)
RTCA	analýtor buněk v reálném čase (Real - Time Cell Analyzer)
RTCA DP	RTCA stanice se třemi 16-jamkovými destičkami (Dual Plate)
RTCA MP	RTCA stanice složená ze šesti 96- jamových E-destiček (Multi Plate)
RTCA SP	RTCA stanice s jednou E-destičkou (Single Plate)
SRB	sulforhodamin B
UGT	Uridin-5-difosfát-glukuronosyltransferáza
WST-1	4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid

0 ÚVOD

Výzkum a vývoj nových léčiv jsou neodmyslitelně spjati s testováním bezpečnosti vyvinutých léků na lidské zdraví. Stejně tak nezávadnost kosmetických přípravků je nutné testovat před uvedením výrobku na trh. V minulosti byly pro tento typ testování hojně využívány testy *in vivo* s použitím živých zvířat. Testy byly poměrně finančně nákladné a drastické, zvířata byla při testech znetvořena a umírala pomalu ve velkých bolestech. Tento postup vyvolal nevoli nejen u ochránců zvířat, ale také u běžné populace a po celém světě byly vedeny kampaně proti testování léků a kosmetiky na zvířatech. Dalším problémem *in vivo* testů byla složitá extrapolace dat, získaných testováním na laboratorních zvířatech, na člověka. Tyto problémy byly hlavním důvodem pro omezení *in vivo* testů a pozornost se přesunula na vývoj testů *in vitro*.

Testy probíhající v prostředí *in vitro* se staly nejen levnější, ale hlavně humánnější variantou pro testování bezpečnosti léčiv a kosmetiky. Prostředím pro tento typ testu je zkumavka nebo hodinové sklíčko, díky tomu je možné otestovat velký počet vzorků za krátký čas. První test, který byl proveden *in vitro*, byl test na určení mutagenity látek provedený Dr. Brucem Amesem v roce 1971. Nejvýhodnější vlastností testů v *in vitro* prostředí je možnost zkoumat vzorky na buněčné a molekulární úrovni. K testování navíc mohou být použity lidské buněčné linie a tkáně, čímž odpadá nutnost extrapolace získaných dat a testy jsou tak přesnější. Při testování bezpečnosti léčiv a kosmetiky je nejdůležitějším ukazatelem cytotoxicita. Cytotoxicita je schopnost chemické látky poškodit nebo zahubit buňku. Pro odhalení cytotoxicity byla vyvinuta celá řada *in vitro* cytotoxických testů.

Mezi nejčastěji aplikované *in vitro* testy cytotoxicity patří kolorimetrické metody jako je MTT, XTT nebo MTS, využívající pro stanovení toxicity změnu zbarvení použitých reagensů. Další hojně využívané jsou luminiscenční a fluorescenční metody jako například ATP bioluminiscenční metoda. Neposlední možností je testovat životaschopnost buněk pomocí analyzátorů částic.

Nevýhodou těchto jednoduchých metod je nemožnost sledování testovaných buněk během experimentu v reálném čase. Klasické testy poskytují pouze konečný výsledek, ale není možné zjistit účinek chemické látky na buňky v jednotlivých časových bodech. Tento problém vyřešil vynález přístroje xCELLigence RTCA (Real – Time Cell Analyzer), který pomocí křivky zaznamenává buněčnou odpověď v daném časovém intervalu.

1 TESTY *IN VITRO* CYTOTOXICITY

Latinské slovní spojení *in vitro* je do češtiny překládáno jako ve zkumavce nebo mimo živé tělo [1]. Jedná se tedy o testy, které jsou prováděny ve zkumavkách, na sklíčku nebo Petriho miskách v laboratořích, s využitím tkáňových kultur a buněčných linií. *In vitro* testy byly vyvinuty jako alternativa k testování na zvířatech. Jedním z důvodů byla rostoucí kritika společnosti na hrubé a kruté zacházení se zvířaty [2].

V toxikologii byl *in vitro* test poprvé použit v roce 1971 Dr. Brucem Ameseem a sloužil k určení mutagenity látek [3]. Dnes tento test nese název po svém objeviteli Amesův test. *In vitro* metody poskytují prostředí pro snadnou manipulaci se vzorky a jejich pečlivou kontrolu. Na rozdíl od *in vivo* metod, umožňují zkoumání na buněčné a molekulární úrovni, jsou levné, snadno automatizované a přinášejí rychlé výsledky. Největší výhodou *in vitro* testů však je, že mohou být použity lidské tkáně a buňky, a tak je odstraněna potřeba extrapolace dat z laboratorních zvířat na člověka. Získané výsledky tak mají přímý význam pro hodnocení bezpečnosti léčiv na lidské zdraví [4].

Cytotoxicita je potenciál chemické látky způsobit buněčnou smrt pomocí změn v buněčném chování a v buněčných procesech [5]. Testy *in vitro* cytotoxicity se používají ke stanovení účinků chemických a toxických látek na buňkách rozmnožujících se *in vitro*. Tyto testy zahrnují jednoduché metody, které měří viabilitu neboli životaschopnost buněk vystavených testované látce. Takové metody sledují účinek léčiv na růst neboli proliferaci buněk a integritu jejich membrány, sleduje se vyloučené barvivo. Patří zde také metody, které měří viabilitu buněk nepřímo prostřednictvím posouzení schopnosti buňky redukovat sloučeniny jako jsou XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid), MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylyl tetrazolium bromid), MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium), SRB (sulforhodamin B) a resazurin nebo vytvořit ATP (adenosintrifosfát). Výhoda je, že tyto metody jsou jednoduché a díky použití 96-jamkových destiček je možné proměřit velký počet vzorků za krátkou dobu. Další testy měří například schopnost buňky začlenit radioaktivně značený thymidin do DNA nebo existuje časově náročná klonovací metoda [6].

Testy cytotoxicity pomáhají oddělit toxické materiály od netoxických a dávají nám zprávu o tom, zda látka nebo extrakt obsahuje významné množství biologicky škodlivých chemikálií [7]. Jsou důležité například pro určení nezávadnosti pitné vody nebo kvality kosmetických a farmaceutických výrobků. V takovém případě má důkaz o cytotoxicitě negativní dopad. Při testování by měly být použity testy s nejvyšší citlivostí, aby byly

minimalizovány falešně negativní výsledky. Pozitivní dopad má však ve vývoji léků proti rakovině, v takovém případě by měly být testy konzervativnější, aby se předešlo falešně pozitivním výsledkům [8].

1.1 Účinky toxické látky na buňky

V případě, že jsou buňky v kontaktu s toxickou látkou, reagují různými způsoby. Toxické činidlo může být metabolizováno a nelze pozorovat žádné účinky na konkrétní buněčné linii. Pokud jsou buňky vystaveny extrémním podmínkám, které se velmi liší od fyziologických nebo látce poškozující buněčnou membránu, nastává buněčná smrt, nekróza. Při nekróze dochází k prasknutí buňky a cytoplasma, včetně lysozomálních enzymů, je uvolněna do extracelulární tekutiny. Aktivita těchto enzymů v extracelulárním médiu je použita při stanovení stupně nekrózy. Za fyziologických podmínek může buňka spáchat buněčnou sebevraždu neboli apoptózu. Apoptóza je indukována fyziologickými signály (například změnami v hormonálním prostředí buňky) nebo apoptickými sloučeninami (například kyselina máselná) [7].

1.2 Hodnocení cytotoxicity

1.2.1 LD₅₀ a LC₅₀

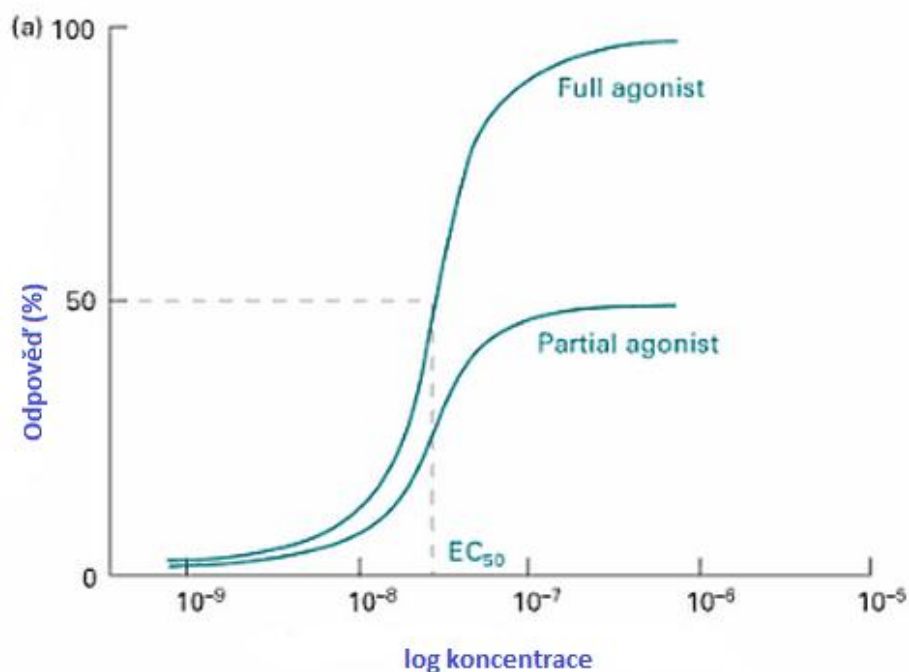
V *in vitro* prostředí se hodnotí akutní toxicita, jedná se o toxicitu, která je vyvolaná v důsledku krátkodobého vystavení toxické látky. Toxická účinnost chemické látky je měřena jako střední letální dávka 50 (LD₅₀) nebo střední letální koncentrace 50 (LC₅₀). Je to koncentrace toxické látky, která je schopna usmrtit 50% exponované populace. V případě *in vitro* cytotoxicity jde o populaci buněk. Cytotoxicita se hodnotí pomocí křivky závislosti odpovědi na dávce látky, tzv. dose-response křivky, kdy se vynese na osy závislost koncentrace neboli dávky toxické látky (na osu x se vynáší logaritmus koncentrace) na procentuální vyjádření přeživších buněk (osa y), jedná se tedy o odpověď na toxin (response) vyjádřenou v procentech. Křivka má esovitý tvar [9].

1.2.2 EC₅₀ a IC₅₀

Cytotoxicita je také hodnocena pomocí hodnot EC₅₀ a IC₅₀. Hodnota střední účinné koncentrace EC₅₀ je užitečná například při testování léků, v takovém případě udává koncentraci léku, která poskytuje 50% z maximální aktivity léku. Jinými slovy, pokud je lék cytotoxický, představuje EC₅₀ koncentraci látky, která je potřebná pro usmrcení 50% populace. Jestliže testovaný lék inhibuje navázání ligandu na receptor, je to tzv. antagonist,

poté se užívá označení IC_{50} , střední inhibiční koncentrace. Jinými slovy jde o koncentraci, která způsobí 50% inhibici, například růstu buňky [10].

Výsledné hodnoty jsou stejně jako hodnoty LD_{50} a LC_{50} zpracovány v dose-response křivce, která je znázorněna na obrázku č. 1.



Obrázek č. 1: „Dose-response“ (křivka závislosti odpovědi na dávce látky) křivka, převzato z [10]

1.3 Kolorimetrické metody

Kolorimetrické metody jsou založeny na měření absorpance použitých barviv pomocí spektrofotometru. Vzorky jsou spolu s reagenциemi dávkovány mikropipetami nejčastěji do 96- jamkových destiček, existují i 24- a 48- jamkové. Destičky se inkubují většinou 1 až 4 hodiny za daných podmínek při určité teplotě. Nakonec jsou vzorky vyhodnoceny při dané vlnové délce pomocí čtečky mikrotitračních destiček (plate reader), takovou čtečkou je například spektrofotometr SpectraMax® Plus³⁸⁴ (Obrázek č. 2) od společnosti Molecular Devices [6, 11].

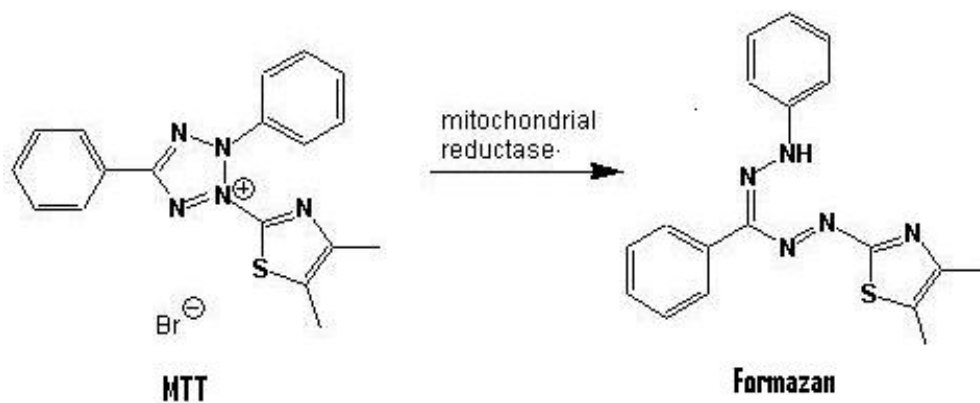


Obrázek č. 2: SpectraMax® Plus³⁸⁴ Absorbance Microplate Reader, převzato z [11]

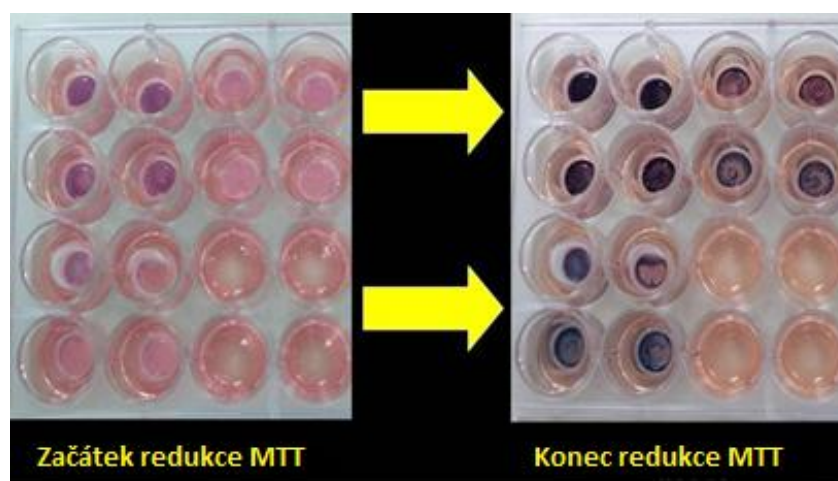
1.3.1 MTT test

MTT test je první kolorimetrická metoda, která byla poprvé představena v roce 1986 [12]. Test je využíván k hodnocení viability, proliferace a cytotoxicity buněk. Žlutý solubilní roztok tetrazoliové soli MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid) je redukován v živých a metabolicky aktivních buňkách mitochondriálními dehydrogenázami a redukčními činidly na purpurově zbarvenou sraženinu formazanu [5, 13]. Redukce MTT na formazan (Obrázek č. 3, Obrázek č. 4) je omezena při cytotoxickém poškození nebo zničení buňky [5]. K rozpuštění formazanu je potřeba silného detergentu. Za nejlepší rozpouštědlo je považován dimethylsulfoxid (DMSO), aplikuje se zejména tam, kde zůstává v jamkách použité mikrotitrační destičky velké množství zbytkového média [14]. Stupeň zbarvení roztoku se poté hodnotí spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm. Míra absorbance je přímo úměrná počtu živých buněk, to znamená, že čím tmavší je zbarvení roztoku, tím vyšší je procento živých buněk [15].

Tato metoda má však několik nevýhod. Pracovníci jsou při provádění tohoto testu vystaveni velkému množství nebezpečného dimethylsulfoxidu, který má škodlivé účinky také na laboratorní vybavení. Další nevýhodou je nedostatečná redukce MTT některých lidských buněčných linií. Tato omezení vedla k vývoji alternativního XTT testu [5].



Obrázek č. 3: Princip redukce MTT na formazan, převzato z [16]



Obrázek č. 4: Začátek a konec redukce MTT, převzato z [17]

1.3.2 XTT test

XTT metoda byla poprvé použita v roce 1988 pro stanovení viability buněk. Solubilní sloučenina XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid) je v živých buňkách redukována na ve vodě rozpustný oranžový formazan. Na rozdíl od MTT testu tedy nemusí být u XTT metody použito rozpouštědlo. Mnoho buněčných linií neredukuje XTT stejně účinně jako MTT. Do reakce je proto přidáván fenazin methosulfát (PMS). Po tomto přidavku dojde k výraznému zvýšení buněčné redukce XTT. Stupeň zabarvení roztoku získaného redukcí XTT je přímo úměrný počtu živých buněk ve vzorku. Absorbance při spektrofotometrickém stanovení se měří při vlnové délce 475 nm [12, 5, 18]. Díky všem těmto aspektům je použití XTT preferovanější než MTT.

Existují další modifikované tetrazoliové soli jako je MTS a WST-1, které mají značné výhody oproti MTT [5].

1.3.3 MTS metoda

MTS neboli (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium) je redukována živými buňkami na rozpustný formazan, stejně jako tomu je u metody XTT a MTT. Výhodou sloučeniny MTS je, že je rozpustnější a netoxická, použité buňky tak mohou být vráceny do média a znovu použity. Stejně jako u metody XTT je nutný přídavek PMS. Měření absorbance probíhá při vlnové délce 490 nm [6].

1.3.4 WST-1metoda

Jednoduchá a přesná metoda využívající jako reakční činidlo tetrazoliovou sůl WST-1 (4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát), které je redukováno mitochondriálními dehydrogenázami v živých buňkách na formazan. Jako ukazatel počtu živých buněk je změřena absorbance vzniklého formazanu při 440 nm. Celý test může být proveden v jedné mikrotitrační destičce, není potřeba používat rozpouštědlo [19]. Vyloučením rozpouštěcího kroku je sníženo riziko vzniku potenciálních chyb a doba přípravy vzorku je zkrácena [20]. Metoda WST-1 je rychlejší citlivější než MTT, XTT nebo MTS metoda [19].

1.3.5 Sulforhodamin B (SRB) test

SRB test byl vyvinut pro měření celkového obsahu bílkovin v séru. Po změření celkové bílkoviny je potom možné určit počet buněk. Princip této metody spočívá ve schopnosti bazických aminokyselin, které se nacházejí v buňkách, vázat negativně nabitě růžové fluorescenční barvivo sulforhodamin B. Čím vyšší je počet buněk, tím více barviva se naváže. Po fixaci a rozpadu buněk se barvivo uvolní a zbarvení výsledného roztoku je tak intenzivnější a absorbance je vyšší [12].

SRB metoda je jednoduchá, citlivá, dobře reprodukovatelná, na rozdíl od časově náročných MTT a XTT testů je rychlá a finančně výhodnější. Poskytuje větší lineární rozsah, stabilní koncové ukazatele a není závislá na aktivitě mitochondrií. Navíc může být SRB test v průběhu barvení v několika krocích přerušen [12, 5, 6].

Přes všechna tato pozitiva má SRB test i jednu nevýhodu. Pro fixaci buněk je nutný přídavek kyseliny trichloroctové, při přidání většího množství může dojít k uvolnění buněk a výsledky testu jsou znehodnoceny [6].

1.3.6 LDH test

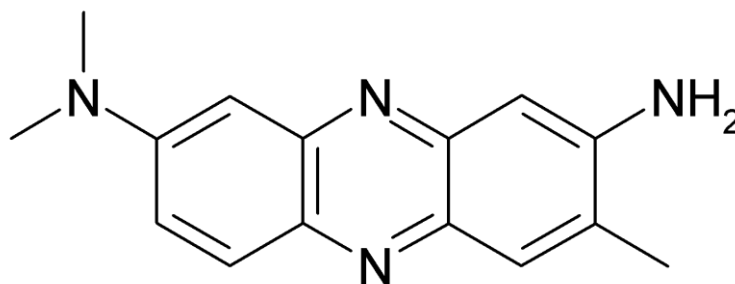
Laktátdehydrogenáza (LDH) je glykolytický tetramerní enzym skládající se ze dvou podjednotek známých jako M a H podjednotky. Podjednotky se navzájem kombinují a vzniká

tak 5 isoenzymů M_4 , M_3H , M_2H_2 , MH_3 a H_4 . Při poškození tkáně, kdy dochází k usmrcení a praskání buněk, je laktátdehydrogenáza vylučována do krve a její zvýšenou produkci je možné zjistit krevním testem [21].

LDH test na rozdíl od MTT testu slouží k určení počtu mrtvých buněk v kultuře. V důsledku poškození buněčné membrány dochází k úniku intracelulární laktátdehydrogenázy do kultivačního média. Extracelulární laktátdehydrogenáza je indikátorem nevratné buněčné smrti. Laktátdehydrogenáza má schopnost katalyzovat reverzibilní reakci přeměny pyruvátu na laktát při spotřebě NADH. Této schopnosti LDH je využíváno při určování koncentrace extracelulární laktátdehydrogenázy v médiu. K měření koncentrace LDH slouží různé diagnostické kity, například kit sloužící k detekci cytotoxicity od firmy Roche Diagnostics [5, 22, 23].

1.3.7 Test cytotoxicity s Neutrální červení

Metoda s neutrální červení je založena na použití supravitálního barviva neutrální červeně jako cytotoxického indikátoru. Jedná se o citlivý test, speciálně vyvinutý pro testování toxických látek. Metoda je využívána k měření buněčné smrti nebo poškození buněk účinkem toxických chemikálií. Neutrální červeně je zabudována do lysozomů živých savčích buněk, při poškození povrchu buňky nebo lysozomálních membrán dojde k poklesu absorpce barviva. [5]



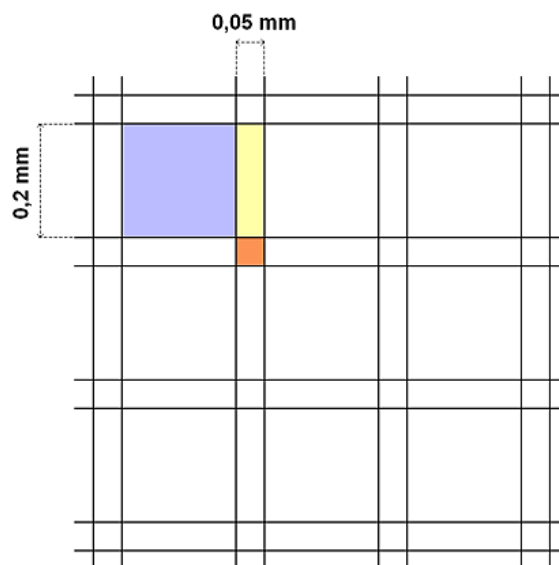
Obrázek č. 5: Neutrální červeně převzato z [24]

1.3.8 Test viability trypanovou modří

Jednoduchá a levná metoda pro rychlé zhodnocení životaschopnosti buněk. Při tomto testu je využíváno toho, že živé buňky jsou pro barvivo trypanovou modř nepropustné. Živé buňky při kontaktu s roztokem trypanové modři zůstávají bezbarvé, zatímco buňky s porušenou integritou membrány mají tmavě modré zbarvení. Trypanová modř je nejčastěji používané barvivo při počítání buněk a při hodnocení viability. Buňky se počítají pod

mikroskopem pomocí počítacích komůrek například Bürkerovy počítací komůrky (Obrázek č. 7) [6].

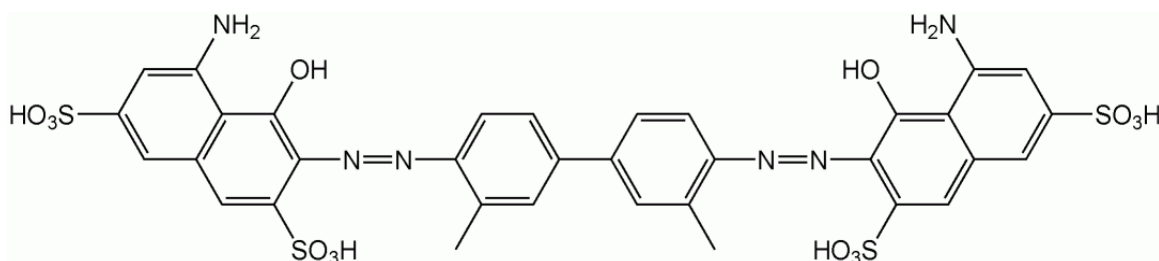
Bürkerova komůrka je skleněná destička, na které jsou vyryty dvě počítací mřížky, po přikrytí těchto mřížek krycím sklíčkem vzniká prostor na počítání buněk o hloubce 0,1 mm. Mřížky jsou rozděleny pomocí tří čar na devět čtvercových polí o délce strany 1 mm. [24]. Buňky se počítají v malých čtvercích, jejichž plocha je $1/400 \text{ mm}^2$ a objem činí $1/4000 \text{ mm}^3$ nebo ve velkých čtvercích o ploše $1/25 \text{ mm}^2$, další možností je počítat buňky ve velkých obdelnících s plochou $1/100 \text{ mm}^2$ (Obrázek č. 6) [25]. Před samotným počítáním se vyčištěná a osušená komůrka zakryje krycím sklíčkem a naplní se pomocí Pasteurovy pipety testovaným roztokem. Při plnění se dbá na to, aby nevznikaly vzduchové bubliny. Takto připravená komůrka se umístí na stolek mikroskopu a buňky se sledují při zvětšení 20x nebo 40x [24]. Počítají se pouze buňky, které se nacházejí uvnitř zvoleného geometrického útvaru a dotýkají se, zevnitř i zvenku, námi zvolených dvou stran (horní a levá strana nebo dolní a pravá strana) [25].



Obrázek č. 6: Počítací mřížka Bürkerovy komůrky, převzato z [26]



Obrázek č. 7: Bürkerova počítací komůrka, převzato z [26]



Obrázek č. 8: Trypanová modř, převzato z [27]

1.4 Stanovení viability pomocí analyzátorů částic

1.4.1 Vi-CELL analyzátor

Pro rychlou analýzu buněk byl zaveden automatický systém Vi-CELL analyzátor (Beckman Coulter, Obrázek č. 9) [6]. Vi-CELL analyzátor automaticky stanovuje pomocí trypanové modři nejen životaschopnost buněk, ale také je schopen podat informaci o počtu, velikosti nebo koncentraci buněk. Přístroj je schopen analyzovat až deset vzorků najednou. Vi-CELL analyzátor může být nastaven na různé typy buněk, tato funkce bere v úvahu parametry jako je průměr buněk, jas, shlukování buněk nebo cirkulaci, což umožňuje velmi přesné a rychlé měření. Výsledky jsou dostupné během několika minut [28].



Obrázek č. 9: Analyzátor Vi-CELL XR, převzato z [28]

1.4.2 Cedex analyzátor

Další možností automatického stanovení buněčné viability trypanovou modří je přístroj Cedex (Obrázek č. 10), jeden z prvních komerčně dostupných automatizovaných systémů pro počítání buněk. Systém směšovací komoru, ve které se mísí daný objem vzorku s roztokem trypanové modří, takto namíchaný a obarvený roztok je přečerpán do průtokové cely, zde software vyhodnotí získané mikroskopické snímky. Takto může být rychle a přesně analyzováno až 20 snímků pro každý vzorek [29].



Obrázek č. 10: Cedex analyzátor, převzato z [30]

1.4.3 Z2 coulter counter

Z2 coulter counter (Obrázek č. 11) je přístroj pro zjištění počtu, koncentrace a velikosti buněk. Metoda je založena na tzv. coulter principu, tedy měření elektrické impedance. Použití této techniky je všestranné a zajišťuje přesné a rychlé výsledky [31].



Obrázek č. 11: Z2 coulter counter, převzato z [31]

1.4.4 CASY technologie

Systém CASY je neinvazivní metoda bez nutnosti značení, která pracuje na principu propouštění elektrického proudu (ECE – Electrical Current Exclusion) skrz buněčnou membránu živých a neživých buněk. Vzorek buněk je odsáván přes měřící pór, kterým prochází elektrický proud. Živé buňky mají neporušenou membránu, přes kterou elektrický proud neprochází, díky tomu jsou zobrazeny ve své skutečné velikosti. Mrtvé buňky jsou z důvodu porušené membrány propouštějící elektrický proud zobrazeny ve velikosti svého buněčného jádra [32]. Pro analýzu buněk jsou k dispozici CASY model TT (Obrázek č. 12) a CASY model TTC, tyto analyzátoři jsou schopny rychle a přesně vyhodnotit buněčnou viabilitu, koncentraci, objem, agregaci a buněčné zbytky [32, 33].



Obrázek č. 12: Casy model TT, převzato z [33]

1.4.5 Systémy Cellavista a IncuCyte

Cellavista (Obrázek č. 13) je mobilní systém založený na zobrazovací analýze buněk kombinující techniku zobrazení ve světlém poli s inovativní fluorescenční optikou. Analýza je velmi rychlá, výhodou je také vysoká kvalita zobrazení. Cellavista se využívá pro výzkum kmenových buněk, zkoumání účinku léků na buněčné procesy, cytotoxicitu a proliferaci buněk [34].



Obrázek č. 13: Systém Cellavista, převzato z [34]

IncuCyte (Obrázek č. 14) je systém umožňující dlouhodobé snímání živých buněk v čase, tato zobrazovací technika tedy pomáhá lépe porozumět buněčnému růstu, chování a morfologii buněk. Systém umožňuje umístit mikroskop dovnitř inkubátoru, díky tomu je systém obzvláště vhodný pro dlouhodobé monitorování buněčného růstu, jelikož nejsou buňky během testování rušeny a eliminují se tak případné problémy [35].



Obrázek č. 14: Systém IncuCyte, převzato z [35]

1.5 Luminiscenční a fluorescenční metody

Jedná se o velmi citlivé metody, které jsou založeny na měření intenzity fluorescence či luminiscence barviv. Pro hodnocení se využívá velmi citlivých a rychlých HTS (high-

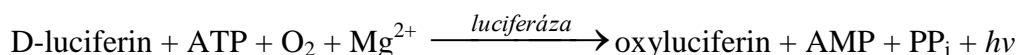
throughput screening) a HCS (high-content screening) systémů. HTS systém je složen z laboratorních robotů a mikrofluidních čipů v kombinaci s 96-, 384- a 1536- jamkovými destičkami, proměřováno je obrovské množství vzorků. V případě HCS se jedná o automatizovanou mikroskopii [5].

1.5.1 ATP bioluminiscenční metoda

ATP slouží živým buňkám, jako nejdůležitější zdroj chemické energie. Buněčná ATP, je jedním z nejcitlivějších ukazatelů při měření životaschopnosti buněk [5]. Poškození buňky vede nejen ke snížení syntézy ATP, ale také k úbytku endogenní ATP z důvodu uvolnění enzymu ATPázy. Posuzování metabolické funkce prostřednictvím buněčného obsahu ATP se široce využívá při měření buněčné toxicity například při testování bezpečnosti léčiv [36].

Nejcitlivější a nejspolehlivější metoda pro měření ATP je bioluminiscenční metoda založená na reakci, při které dochází za působení enzymu luciferázy k rozkladu substrátu D-luciferinu. Přeměnu D-luciferinu na oxyluciferin pohání ATP za přítomnosti kyslíku, hořečnatých iontů a luciferázy. Vzniklý oxyluciferin produkuje chemiluminiscenční signál (světlo s rozsahem vlnových délek 470 – 700 nm), jehož intenzita je přímo úměrná koncentraci ATP. Prvním, kdo tento jev objasnil, byl v roce 1947 W. D. McElroy [36, 37].

Průběh Reakce popisuje sumární rovnice:



Měření chemiluminiscenčního signálu se provádí na luminometru [6].

1.5.2 Resazurinový test

Resazurin známý také jako „Alamar Blue” je redukční barvivo, které se využívá pro měření cytotoxicity a životaschopnosti buněk v různých buněčných liniích. Resazurin je převeden mitochondriálními reductázami na fluorescenční barvivo resorufin. Zdravé buňky redukují resazurin účinněji než mrtvé nebo umírající buňky. Reakce je doprovázena změnou barvy z indigo modré na fluorescenční růžovou. Barvivo resorufin lze snadno monitorovat pomocí klasického spektrofotometru, spektrofluorimetru nebo spektrofotometrickou čtečkou mikrotitračních destiček [38, 39].

Resazurin na rozdíl od MTT nebo XTT není toxický, proto mohou být buňky vystavené tomuto barvivu vráceny zpět do kultury nebo mohou být použity pro jiné účely [6].

1.5.3 Kalcein-AM metoda

Kalcein-AM neboli acetoxymethyldiacetylerkalceinu je derivát fluoresceinu sloužící jako indikátor buněčné viability a cytotoxicity. Lipofilní vitální barvivo kalcein-AM rychle vstupuje do živých buněk, kde je převeden intracelulárními esterázami na kalcein, který produkuje intenzivně zelenou fluorescenci (vlnová délka 530nm). Kalcein je zadržován v buňkách s neporušenou plasmatickou membránou. Nehydrolyzované substráty a jejich fluorescenční produkty jsou z umírajících buněk nebo z buněk s poškozenou plasmatickou membránou rychle vytlačovány [5]. Fluorescenční signál proto vydávají pouze živé nepoškozené buňky.

1.6 Ostatní metody

1.6.1 ³H-thymidin inkorporace

Metoda je založena na začlenění radioaktivního nukleosidu, ³H-thymidinu, do nových vláken chromosomální DNA během mitotického buněčného dělení. Měří se radioaktivita DNA buněk, s cílem určit rozsah buněčného dělení, jako reakci na testovanou látku. Výhodou metody je přímé měření proliferace [40].

Nevýhoda metody spočívá v použití radioaktivity, kdy je potřeba rozsáhlá příprava vzorku, který je během testu zničen [6]. Z těchto důvodů byl vyvinut BrdU test, který odstranil nutnost použití radioizotopu [40].

1.6.2 BrdU test

BrdU neboli bromdeoxiuridin(5-brom-2-deoxyuridin) je pyrimidinový analog thymidinu, který je během S-fáze buněčného cyklu selektivně začleněn do buněčné DNA. Detekci replikace DNA v buňkách umožňuje specifická reakce monoklonálních protilátek s BrdU [41].

2 PRIMÁRNÍ BUNĚČNÉ KULTURY

Pro testování toxicity chemických látek *in vitro* jsou velmi cenným nástrojem primární tkáňové kultury, buněčné kultury a buněčné linie. Primární buněčná kultura neboli primokultura je kultura skládající se z buněk, které byly odebrány přímo z organismu [42]. Získává se přímo z fragmentu tkáně nebo také z materiálu, který vznikne po enzymovém či mechanickém rozrušení tkáně [43]. Je tvořena pouze jedním typem buněk, tyto buňky se uchovávají ve skleněných nebo umělohmotných nádobkách, které jsou naplněny médiem a jsou ponechány v termostatu při 37°C. Primokultura existuje pouze několik dní, do té doby než se buňky začnou dělit a dokud není kultura poprvé úspěšně subkultivována. K subkultivaci neboli pasážování se přistupuje v okamžiku, kdy jsou z média vyčerpány živiny a množící se buňky dosáhnou neúnosného počtu. Při pasážování se odebere část buněk a spolu s novým médiem se přenesou do jiné kultivační misky, tento postup se pravidelně opakuje a buněčná kultura je tak dlouhodobě uchovávána. Změny početnosti buněk v závislosti na čase zaznamenává tzv. růstová křivka, její průběh vyjadřuje proliferaci buněk v kultuře [42, 44].

2.1 Primární kultury hepatocytů

Pro testování toxicity chemických látek *in vitro* jsou velmi vhodné primární kultury hepatocytů. Lidské hepatocyty jsou špatně dostupné, proto se jaterní buňky odebírají z potkaních jater. Hlavním problémem je, že biotransformační enzymy primárních kultur hepatocytů rychle ztrácí svou aktivitu a diferencují se směrem k metabolismu fetálních hepatocytů. Dochází ke snížení exprese funkčních a morfologických hepatocytů *in vitro*. Klesá také funkční kapacita jaterních buněk a zároveň dochází k poklesu aktivity a obsahu cytochromu P450, zvyšuje se exprese P-glykoproteinu. Pro zachování dobrého stavu a zpomalení diferenciace primokultury hepatocytů je dobré se co nejbližší přiblížit *in vivo* stavu a zvolit vhodné kultivační podmínky. Nejčastější způsob kultivace hepatocytů je jejich přichycením na plastové povrchy kultivačních nádob, které jsou potažené složkou extracelulární matrix. Jedná se o konvenční formu „monolayeru“ (růst v jedné vrstvě). Pro testování toxického poškození buněk je nejzávažnější zejména pokles aktivity cytochromu P450 [45].

Cytochrom P450, ve zkratce CYP, je enzymatický systém, který metabolizuje cizorodé chemické látky, se kterými tělo přijde do styku. Další jeho funkcí je syntéza tělu vlastních důležitých látek, jako například steroidních hormonů. Je velmi důležitý pro

biotransformační procesy xenobiotik, podílí se na tvorbě cholesterolu, žlučových kyselin, steroidů, prostacyklinů a tromboxanu A₂. Cytochrom P450 se snadno přeměňuje na inaktivní formu. Jeho obsah v lidských tkáních závisí na mnoha faktorech (například věk, pohlaví, konzumace alkoholu), koncentrace může za určitých podmínek v daném orgánu či tkáni extrémně narůst [46].

2.2 Primární kardiomyocyty

V dřívější době bylo velmi technicky náročné získávat čisté primární kardiomyocyty jak z hlodavců, tak z lidských tkání v dostatečně vysoké výtěžnosti, což bylo překážkou v použití těchto buněk při testování kardiotoxicity. Až zdokonalení technologie diferenciac embryonálních a zejména indukovaných pluripotentních kmenových buněk poskytlo fyziologicky relevantní model pro testování bezpečnosti léčiv, tj. kardiomyocyty odvozené z indukovaných pluripotentních kmenových buněk. Kardiomyocyty jsou používány převážně pro testování kardiotoxicity v reálném čase systémem xCELLigence, čehož je hojně využíváno při vývoji nových léků [59].

2.3 Pluripotentní kmenové buňky

Další možností pro testování toxicity je použití pluripotentních kmenových buněk. Pluripotentní kmenové buňky jsou zcela nediferencované buňky, různé diferencované buňky z nich teprve vznikají. Kmenová buňka se může vícekrát rozdělit, díky tomu vznikne nová buňka se stejným nebo vyšším stupněm diferenciac. Podle signálů, které kmenová buňka dostává od sousedních buněk, a také podle potřeb organismu, se rozhodne o typu nové buňky. Kmenová buňka, která dosáhne konečného stupně diferenciac, ztrácí schopnost se dále dělit. Její život je ukončen smrtí způsobenou vnějšími faktory nebo apoptózou [56].

Kmenová buňka, která byla uměle vytvořena z obyčejné buňky z těla dospělého jedince, se nazývá indukovaná pluripotentní kmenová buňka (iPSC – induced pluripotent stem cell). Z iPSC může v těle vzniknout kterákoliv buňka [57]. Indukované kmenové buňky jsou schopny neomezeného množení a lze je vypěstovat každému z jeho vlastních kožních buněk [58]. Z indukovaných pluripotentních kmenových buněk odvozené kardiomyocyty jsou velmi důležité pro testování kardiotoxicity [59].

3 BUNĚČNÉ LINIE

Po první úspěšné subkultivaci se z primokultury stává buněčná linie. Buněčné linie zanikající po 40 až 50 děleních se nazývají diploidní buněčné linie nebo také buněčné kmeny [44]. Důvodem stárnutí a odumírání těchto buněk je inhibice produkce telomerázy a zkracování telomer.

Druhým typem je tzv. immortalizovaná neboli kontinuální buněčná linie, která je schopná neomezeného dělení (pasážování) a lze ji uchovávat po libovolně dlouhou dobu. Stálá produkce telomerázy zajišťuje těmto buňkám nesmrtelnost [42, 43]. Nevýhoda tohoto typu buněk je, že immortalizace mění jejich vlastnosti a funkce [47]. Kontinuální buněčná kultura je aneuploidní, její buňky mají větší počet chromosomů než *in vivo* buňky, ze kterých vznikly. Vznik takovýchto buněk je podmíněn mutacemi, které vedou k nekontrolovanému dělení, což souvisí s karcinogenitou. Normální buňky nejsou takového dělení schopny, proto se lidské buněčné linie s neomezeným počtem dělení získávají z buněk izolovaných z nádorů [42, 48].

Hlavními zdroji buněčných linií a primárních buněčných kultur jsou organizace ATCC (American Tissue and Cultures Collection) a ECACC (European Collection of Cell Cultures). ATCC byla založena roku 1925 a mimo jiné vlastní sbírku více 3400 lidských, zvířecích a rostlinných buněčných linií. European Collection of Cell Cultures vznikla v roce 1984. Sbírkou ECACC obsahuje přes 40 000 buněčných linií [49, 50].

Z laboratoří jsou poté buňky dodávány výzkumníkům po celém světě ve zmrazené formě. Zmrazené buněčné linie mohou být skladovány dlouhodobě a při potřebě lze snadno obnovit. Nejdůležitější pro studium toxicity jsou lidské buněčné linie. Použity by měly být pouze lidské linie, které byly získány eticky a odebrány přísně kontrolovanými postupy [51].

3.1 Přehled nádorových linií

Po prostudování odborných materiálů jsem došla k závěru, že mezi nejvíce využívané nádorové buněčné linie pro testování cytotoxicity *in vitro* patří: lidská buněčná linie HeLa, lidské nádorové buněčné linie HepG2 a novější hepatomová linie HepaRG, dále potom buněčná linie z vaječníku a z plic čínské křečka CHO a CHL.

3.1.1 Buněčná linie HeLa

Buněčná linie HeLa byla na počátku jedinou dostupnou kontinuální lidskou buněčnou linií. Tato buněčná linie byla izolována americkým biologem Georgem Otto Geyem v říjnu roku 1951 z karcinomu děložního krčku Henrietty Lacksové. Henrietta krátce po odběru

buněk ve 31 letech, 8 měsíců od objevení nádoru, zemřela na následky metastáz. Její buňky jsou využívány v biomedicínském průmyslu dodnes. Poprvé byly buňky použity v roce 1954 při testování nové vakcíny proti polioviru.

Případ Henrietty Lacksové vyústil dokonce v soudní spor, jelikož G. O. Gey odběr buněk provedl bez konzultace a ani Henriettina rodina dlouho nevěděla, že jsou její buňky používány v laboratořích po celém světě. O tomto případu bylo napsáno několik knih, nejnovější z nich byla vydána roku 2010 a nese název Nesmrtelný život Henrietty Lacksové [42, 52].

3.1.2 Hepatomové buněčné linie

Na rozdíl od primárních kultur lidských hepatocytů mají hepatomové buněčné linie několik výhod. Hlavní výhodou je jejich nesmrtelnost a kontinuální růst, dalším pozitivem je jejich vcelku stabilní fenotyp [53], i přesto je u nich poměrně často zaznamenána genotypová nestabilita, která se může projevit změnami fenotypu během kultivace [45]. Kultivační podmínky jsou pro buněčné linie méně náročné než je tomu u primokultur [53]. Buňky si uchovávají jen některé, pro hepatocyty specifické funkce.

Linie lze získat použitím virového vektoru, kterým je například virus SV 40, další možností je fúze hepatocytu s hematovou buňkou, kdy dochází ke vzniku hybridní buněčné linie. Je možné využít lidské, potkaní i prasečí hepatocyty, každý typ má jiný stupeň zachovaných funkcí hepatocytu a exprese biotransformačních enzymů [45]. Pro testování cytotoxicity se nejvíce využívá buněčná linie HepG2.

3.1.3 Nádorové buněčné linie HepG2 a HepaRG

HepG2 je jednou z nejvyužívanějších jaterních buněčných linií pro studium hepatotoxicity. Buňky byly poprvé izolovány v roce 1980 z primárního hepatoblastomu [54]. Morfologie buněk se podobá jaterním parenchymálním buňkám, buňky syntetizují a vylučují několik, pro lidské buňky charakteristických proteinů. Exprese hlavních jaderných transportérů a metabolických enzymů (například cytochrom P450) je více než 50 krát nižší, než je tomu u hepatocytů izolovaných *in vivo* a primární kultury. Rozdíly v expresi enzymů I. a II. fáze může vést k podhodnocení nebo nadhodnocení toxicity některých chemických látek [51]. Mezi enzymy I. fáze patří CYP1A, CYP2B, CYP3A a CYP2E. Pro vytvoření realističtějšího modelu pro měření hepatotoxicity byla provedena transfekce metabolických enzymů do buněčného systému [54]. HepG2 buněčná linie je používána k hodnocení toxicity chemických látek a léků, a také k testování genotoxicity [51].

Další lidskou jaterní buněčnou linií je HepaRG, jedná se o linii, která byla izolována z hepatocelulárního karcinomu. Buňky mají znaky dobře diferenciovaného hepatocytu. Exprimují vysoké hladiny cytochromů P450 (včetně CYP 1A2, 2B6, 2C9, 2E1 a 3A4), enzymů II. fáze (GST – glutathion-s-transferáza, thioreduxinu, UGT - uridin-5-difosfát-glukuronosyltransferáza) a různých proteinů. Koncentrace nukleárních receptorů CAR (konstitutivní androstanový receptor) a PXR (pregnanový X receptor) je na podobné úrovni jako u primárních kultur lidských hepatocytů. HepaRG je první jaterní linií, u které byla zjištěna vysoká koncentrace nukleárního receptoru CAR [51].

3.1.4 Prostatické buněčné linie PNT1A a PC-3

PNT1A je buněčná linie získaná imortalizací normálních epitelových buněk prostaty dospělého jedince transfekcí s plasmidem obsahujícím genom SV40. Primární kultura byla odebrána post-mortem z normální prostatické tkáně muže ve věku 35 let.

PC-3 je nádorová buněčná linie odvozená ze 4. stupně adenokarcinomu prostaty. Byla odebrána z metastází nacházejících se v kosti 62 let starého muže [55].

4 xCELLigence RTCA (REAL – TIME CELL ANALYZER)

System xCELLigence (Obrázek č. 15) umožňuje sledovat a analyzovat buňky nacházející se v destičce v reálném čase a to i po dobu několika dní. Je využíván ke kontrole kvality buněk, měření proliferace, sledování životaschopnosti buněk, stanovení cytotoxického účinku látek, buněčné přilnavosti, morfologie buněk a funkce buněčné bariéry [60, 61].

4.1 Složení xCELLigence RTCA přístroje

Každý xCELLigence systém se skládá ze 4 hlavních částí:

- RTCA stanice
- RTCA analyzátoru
- RTCA počítače s integrovaným softwarem
- jednorázové E-destičky

4.1.1 RTCA stanice

RTCA stanice je umístěna do standardního inkubátoru pro tkáňové kultury, který zajišťuje řízenou teplotu 15 až 40°C, relativní vlhkost 98% a je naplněn 5% CO₂ [62]. Úlohou RTCA stanice je přenášet signál vznikající v E-destičce do RTCA analyzátoru, kde je zpracován. Podle počtu použitých 96- jamkových E-destiček se rozdělují jednotlivé stanice na RTCA SP (Single Plate), DP (Dual Plate) a MP (Multi Plate) stanice, o tom více v kapitole 4.2 [63].

4.1.2 RTCA analyzátor

RTCA analyzátor je řízen RTCA softwarem a slouží k měření elektrické impedance v různých frekvencích signálu. Jeho úkolem je zpracování a analýza změřených dat, rychlé měření a automatické frekvenční skenování. Průměrná doba měření pro jednu jamku v E-destičce je 150 milisekund, což je přibližně 15 sekund pro celou 96- jamkou destičku. RTCA analyzátor je spolu s přenosným počítačem umístěn mimo inkubátor [63].

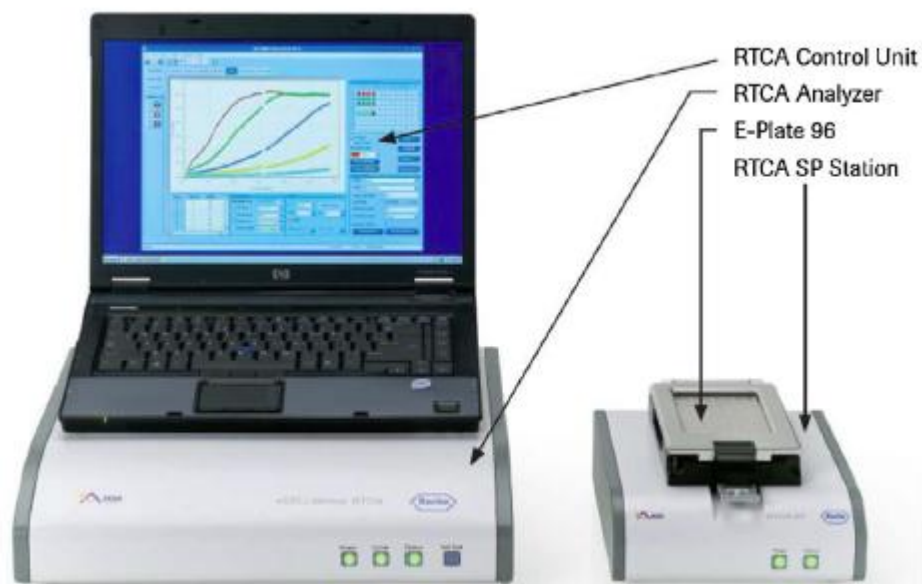
4.1.3 RTCA počítač s integrovaným softwarem

RTCA kontrolní jednotku představuje přenosný počítač s mobilním aplikátorem portů a instalovaným softwarem. Software je navržen tak, aby poskytoval uživateli jednoduché ovládání přístroje a plynulý provoz při provádění experimentu [63]. Díky RTCA softwaru je uživatel schopen získat parametry jako je průměrná hodnota, maximální a minimální hodnota, standardní odchylka (SD), buněčný index (CI), střední účinná koncentrace (EC50), střední

inhibiční koncentrace (IC50), vše je doplněno o příslušnou grafiku. Údaje v hodnotách buněčného indexu (CI) lze exportovat do Excelu pro jakýkoliv typ matematické analýzy [62].

4.1.4 E-destička

Jádrem systému xCELLigence je jednorázová 96- jamková E-destička, která má podobnou funkci jako standardní mikrotitrační destička. Na rozdíl od mikrotitrační destičky jsou na dně jamek E-destičky zabudovány zlaté mikroelektrody pokrývající povrch dna jamky z 80%. Víko E-destičky je upraveno tak, aby docházelo pouze k minimálnímu odpařování. Počet destiček je závislosti na typu použitého přístroje různý [63].



Obrázek č. 15: Složení přístroje xCELLigence RTCA SP, převzato z [61]

4.2 Typy základních xCELLigence RTCA přístrojů

Pro různé experimenty jsou k dispozici 3 typy XCELLigence RTCA přístrojů lišících se v počtu E-destiček: RTCA Single Plate (SP), RTCA Multi Plate (MP) a RTCA Dual Plate (DP). RTCA SP stanice se skládá z jedné 96- jamkové E-destičky (E-plate), stanice je schopná přepínat měření na různé jamky. Předností RTCA SP je rychlá doba měření, která je menší než 10 nebo 60 sekund pro 96 jamek, výkonnost, jednoduché nastavení a spolehlivost. RTCA MP stanice (Obrázek č. 16) se skládá ze šesti 96- jamkových E-destiček, největší výhodou je flexibilita. RTCA DP stanice (Obrázek č. 17) je složena ze tří 16- jamkových E-destiček [63, 64].



Obrázek č. 16: Stanice RTCA MP, převzato z [64]



Obrázek č. 17: Stanice RTCA DP, převzato z [64]

4.3 Jak xCELLigence pracuje

Testování systémem xCELLigence je založeno na měření změn elektrické impedance, které jsou vyvolány interakcí mezi testovanými buňkami a zlatými mikroelektrodami uloženými na dně jamek E-destiček [65, 63]. Buňky se v průběhu času množí a obsazují tak větší povrch mikroelektrod, čímž mění elektrickou impedanci. RTCA test tak může poskytnout informace o viabilitě a proliferaci buněk [66]. Nevýhoda systému xCELLigence je v možnosti měřit pouze adherentní buňky, které jsou přichyceny k mikroelektrodám nebo buňky, u nichž je adheze vyvolána určitou látkou [60].

Elektrická impedance je míra celkového odporu, který je kladený vůči střídavému proudu. Použití impedance při buněčném odečtu bylo poprvé popsáno v roce 1993 Giaeverem a Keesem. [67]. Napětí na elektrodách je asi 20mV. Impedance měřená mezi elektrodami v jednotlivých jamkách je závislá na geometrii elektrody, koncentraci iontu v jamce a na tom zda jsou buňky napojeny na elektrody. Míra impedance je přímo úměrná síle adherence buněk a počtu buněk přichycených na dně jamky. Impedance se vyjadřuje pomocí hodnot CI neboli buněčného indexu, což je relativní změna změřené elektrické impedance reprezentující stav buněk [60, 68].

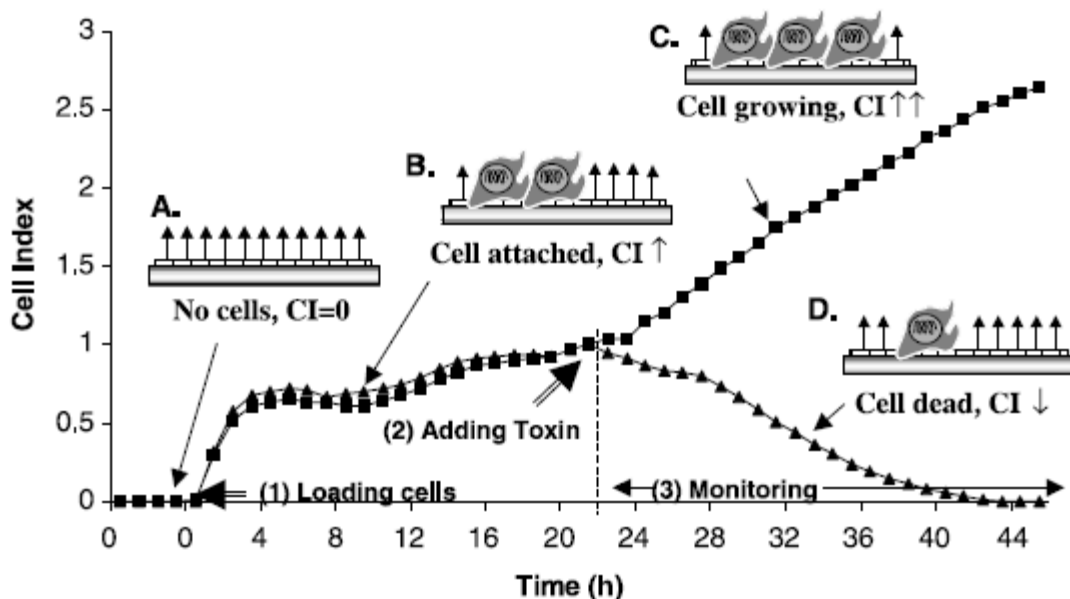
4.3.1 Buněčný index (CI)

Monitorování impedance v reálném čase se odráží ve výpočtu bezrozměrné veličiny, která se nazývá „buněčný index (CI)“. Vzorec pro výpočet buněčného indexu má tuto

podobu: $CI = (R_{tn} - R_{t0}) / F$, kde R_{tn} představuje hodnotu impedance v čase n , R_{t0} vyjadřuje hodnotu impedance před vložením buněk do jamek a F je faktor, který je konstantní pro přístroj za dané aktuální frekvence (například 10Ω pro 50kHz) [68].

Na obrázku č. 18 je znázorněno, jak se impedance a zároveň s ní i buněčný index mění v závislosti na různých situacích. Jestliže nejsou buňky k elektrodám správně přichyceny nebo nejsou přítomny vůbec, je změna impedance nulová CI neboli buněčný index roven nule [58]. Jsou-li buňky přítomny a adherovány k povrchu elektrod, působí jako izolátory měnící iontové prostředí na rozhraní elektroda/roztok, což vede ke zvyšování impedance [62]. S rostoucím počtem přichycených buněk a zvyšující se adhezí, stoupá také hodnota impedance a CI. Získané hodnoty buněčného indexu jsou nakonec RTCA softwarem zpracovány v podobě grafu [63].

V případě, že je k buňkám v jamce E-destičky aplikována cytotoxická látka a buňky začnou odumírat a snižovat svůj počet, dojde k poklesu měřené impedance na elektrodě, čímž se také sníží hodnota CI [60]. Někdy může dojít k situaci, že k buňkám aplikovaná toxická látka způsobí rozšíření buněk nebo vytvoření shluku, což vede k vytvoření větší kontaktní plochy (větší splývavosti buněk) mezi buňkami, proto senzory na elektrodách a hodnota CI vzroste. Takto způsobený nárůst hodnot CI je výrazný a rychlý, avšak přechodný a dochází k němu v časných nebo pozdních fázích expozice toxinu [65].



Obrázek č. 18: Princip analýzy buněk v reálném čase: (1) nasazení buněk na elektrody ; (2) přidavek toxické látky; (3) automatické monitorování stavu buněk, který je vyjádřen buněčným indexem (CI): A. CI=0, stav před vložením buněk na elektrody; B. Buňky jsou přítomny, roste hodnota CI i impedance; C. Buňky se neustále množí a pokrývají stále větší plochu mikroelektrod, dochází k prudkému nárůstu impedance, což vede k velkému zvýšení hodnot CI; D. Buňky po vystavení toxické látce umírají, klesá CI, převzato z [65]

4.3.2 Normalizovaný buněčný index (NCI)

K porovnání výsledků získaných z různých jamek se používá normalizovaný buněčný index neboli NCI, který byl vypočten podle vzorce $NCI = CI_{ti} / CI_{nml_time}$. Označení CI_{ti} ve vzorci udává hodnotu CI v daném časovém okamžiku a CI_{nml_time} značí hodnotu CI ve vybraném normalizovaném čase. Díky tomu je pro všechny jamky hodnota normalizovaného buněčného indexu ve vybraném časovém bodu rovna 1, jedná se o poslední časový bod před přidavkem zkoumané látky [69].

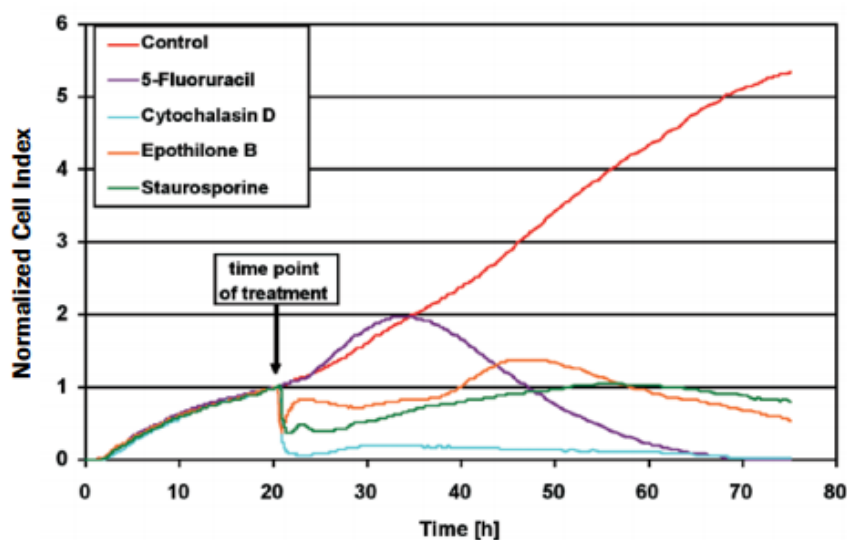
4.4 Monitorování cytotoxicity pomocí systému xCELLigence

Velmi důležitou aplikací systému xCELLigence je monitorování cytotoxických účinků toxických látek na buňky v reálném čase. Zkoumané buněčné linie, například nádorové buněčné linie HeLa, jsou vloženy do 96- jamkové E-destičky a sledovány RTCA přístrojem ve zvolených časových intervalech (například každých 15 minut) po dobu 20 až 24 hodin, poté jsou k buňkám přidány zkoumané látky o různých koncentracích, přičemž každá z látek má jiný mechanismus účinku. Po tomto ošetření jsou buňky dále sledovány po určitou dobu (většinou 3 - 7 dní), během které jsou do grafu zaznamenávány hodnoty CI v závislosti na čase [63].

Během jednoho testu je možné sledovat účinky několika různých látek najednou, v grafu je tak možné pozorovat dynamickou změnu stavu buněk, vyvolanou toxickými látkami s různými charakteristickými mechanismy účinku. Výsledný tvar křivky vypovídá o mechanismu účinku testované látky a je pro každou látku charakteristický. Díky tomu, je možné vypočítat koncentraci toxické látky, která vyvolala buněčnou odpověď cílové buňky, v každém zaznamenaném časovém bodě [61]. Výpočet hodnot střední inhibiční koncentrace (IC50) umožňuje kvantifikace pomocí RTCA softwaru, kdy je křivka vykreslena v podobě esovitě „dose-response“ křivky, hodnoty času na ose x jsou nahrazeny logaritmem koncentrace [63].

Jakmile je experiment ukončen, je pro statistickou analýzu křivka znázorňující hodnoty buněčného indexu v závislosti na čase normalizována na časový bod před začátkem expozice. V grafu je tedy zaznamenána závislost normalizovaného buněčného indexu na čase (Obrázek č. 19) [69].

Výsledkem experimentu bylo zjištění, že pro každou sloučeninu je charakteristický určitý tvar křivky, který závisí na koncentraci sloučeniny, jejím mechanismu účinku a také na čase jejího působení na buňky. Výsledky mohou být použity pro předpovídání mechanismu působení látek, u kterých není jejich mechanismus účinku dosud znám [63].



Obrázek č. 19: Zobrazení cytotoxických účinků různých látek na HeLa buňky, z přístroje RTCA, převzato z [63]

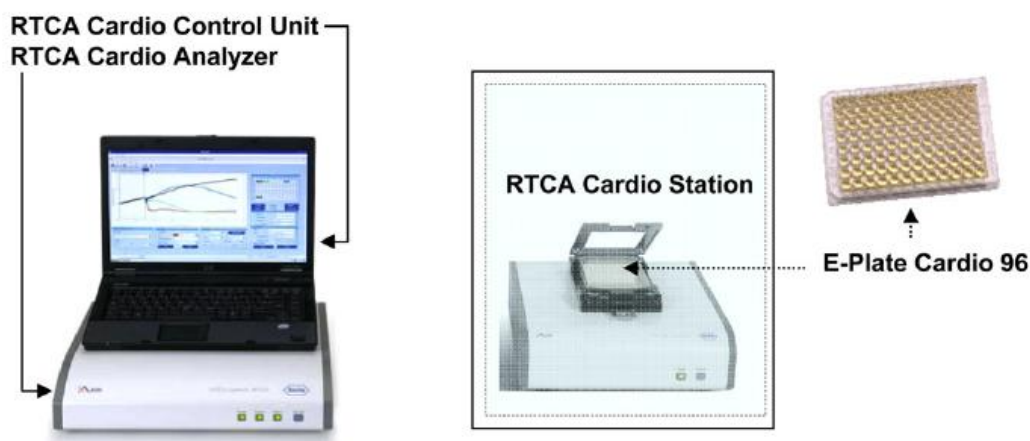
4.5 Testování kardiotoxicity systémem xCELLigence

Kardiotoxicita je velkým problémem ve vývoji nových léčiv a bývá hlavním důvodem pro stažení nového léku z trhu. Většina z těchto léků zasahuje do komplikovaného průchodu

iontů přes membránu kardiomyocytů, dochází k přerušení elektrické aktivity a zástavě srdce. Nicméně léky jako například antracykliny patřící do skupiny chemoterapeutik mohou způsobit kardiotoxicitu přímým strukturálním nebo buněčným poškozením. Farmaceutické společnosti proto při vývoji podrobují nové léky sérii přísných testů, které odhalí potenciální nežádoucí účinky ještě před zavedením léku na trh. Technicky náročné testy posuzující celkovou odpověď srdečního svalu na podávaný lék s použitím živých zvířat byly nahrazeny xCELLigence „RTCA cardio“ systémem (Obrázek č. 20) [59].

Přístroj „RTCA cardio“ je schopen citlivě posuzovat funkci kardiomyocytů a kardiotoxicity. Měření probíhá v reálném čase neinvazivně ve fyziologických podmínkách za použití 96- jamkové E-destičky. K testování jsou využívány kardiomyocyty odvozené z indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC) nebo primární kardiomyocyty [70]. Bylo zjištěno, že proarytmické sloučeniny vytvářejí charakteristický profil tepové frekvence, který může být ukazatelem rizika vzniku arytmií [59].

Přístroj „RTCA cardio“ nabízí možnost krátkodobého nebo dlouhodobého měření. Krátkodobé měření probíhá v řádu několika milisekund, dlouhodobé měření může trvat několik dní až týdnů. Přístroj je schopen měřit změny viability buněk a kontraktility myokardu najednou, v rámci jednoho experimentu [70]. Díky vlastnostem, které jsou popsány výše, je technologie xCELLigence velmi vhodná pro včasné preklinické hodnocení bezpečnosti léčivých látek [59].



Obrázek č. 20: Složení „RTCA cardio“ přístroje, převzato z [59]

4.5.1 Princip xCELLigence „RTCA cardio“ přístroje

Přístroj xCELLigence „RTCA cardio“ se skládá ze čtyř částí: 96- jamkové E-destičky s mikroelektrodami umístěnými na dně jamek, z „RTCA cardio“ stanice umístěné v buněčném inkubátoru, RTCA kontrolní jednotky, která řídí software a průběžně zobrazuje

získaná data a poslední částí je RTCA analyzátor, jehož funkcí je příjem a vysílání elektronických signálů mezi řídicí jednotkou a stanicí [59].

Přístroj xCELLigence „RTCA cardio“ pracuje na stejném principu jako xCELLigence RTCA SP, tedy měří změny elektrické impedance pomocí zlatých mikroelektrod, které pokrývají dno jamek v E-destičce. Hodnoty elektrické impedance jsou následně převedeny na buněčný index značený CI a získaná data se zobrazí na obrazovce počítače v podobě grafu. Rychlý sběr dat proběhne za 12,6 ms, během kterých je proměřená celá 96- jamková destička [59, 61].

4.6 Monitorování buněčné viability a proliferace systémem xCELLigence

Běžné metody hodnotící buněčnou viabilitu a proliferaci celých buněčných populací, například MTT a XTT testy, jsou časově náročné a nejsou schopny zaregistrovat velmi malé a rychlé změny v buněčné morfologii. Účinky studovaných látek, které jsou aplikované na buňky při různých experimentech, jsou vysoce dynamické a působí nejen na viabilitu buněk, ale také na jejich proliferaci, adhezi a změnu morfologie. Běžné kolorimetrické metody mohou analyzovat pouze koncový stav buněčné populace, nejsou schopny zachytit účinky látky na buňku v průběhu času, ani dynamiku růstu buněk. Tyto nedostatky vyřešil systém xCELLigence, který je ideálním nástrojem pro měření viability, proliferace a cytotoxicity buněk v reálném čase, bez nutnosti značení [55].

5 KORELACE DAT

5.1 Korelace dat získaných systémem xCELLigence s daty získaných měřením WST-1 metodou

Při experimentu se vyhodnocuje cytotoxicita nejprve systémem xCELLigence v reálném čase a následně pomocí kolorimetrické WST-1 metody, výsledky měření jsou na konci experimentu vzájemně porovnány. Buňky jsou nejprve umístěny do 96- jamkové E-destičky, počet buněk na jamku se pohybuje v různém rozmezí ve vztupné řadě. Poté je destička umístěna do běžného CO₂ inkubátoru, ve kterém je udržována stálá teplota 37°C , 95% vlhkost a 5% CO₂. Po ukončení měření cytotoxicity pomocí RTCA analyzátoru jsou zaznamenány hodnoty CI neboli buněčného indexu a na řadu přichází metoda WST-1 [63].

5.1.1 Princip WST-1 metody

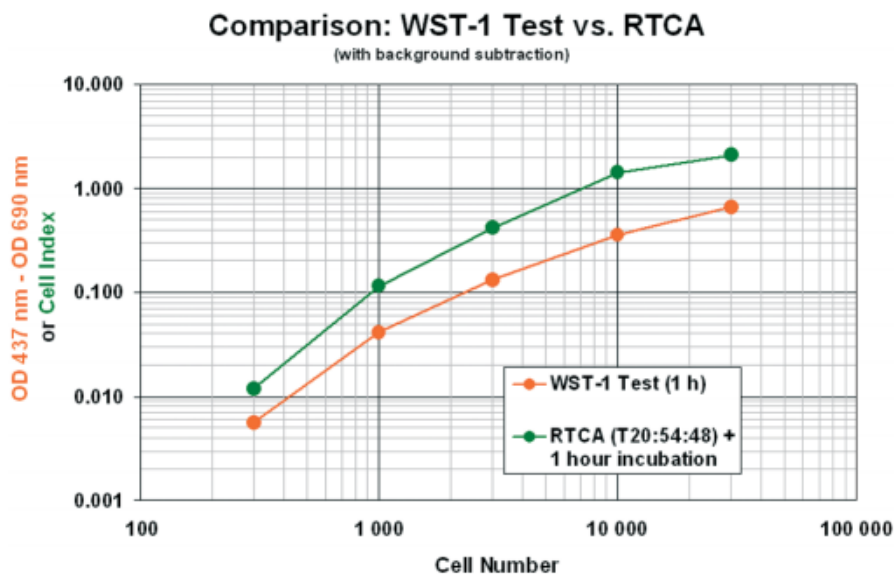
Tetrazoliová sůl WST-1 je redukována dehydrogenázami, které se nacházejí v mitochondriích živých buněk, na formazan, jehož absorbance je měřítkem pro počet živých buněk v testovaném médiu [19].

5.1.2 Postup provedení WST-1 metody

Do každé jamky v E-destičce obsahující 200μl kultury se přidá 20μl činidla WST-1. Po 4 hodinové inkubaci při 37°C se destička důkladně míchá po dobu 1 minuty v orbitální třepačce a supernatant se poté převede do nové 96- jamkové destičky. WST-1 metoda je vyhodnocena pomocí ELISA čtečky při 480 nm a referenční vlnové délce 680 nm nebo pomocí fotometru při 437 nm s referenční vlnovou délkou 690 nm. Jako slepý vzorek slouží jamky bez buněk obsahující kompletní médium a WST-1 činidlo. Hodnoty změřené absorbance neboli optické hustoty a hodnoty CI z měření systémem xCELLigence byly vyneseny do grafu proti počtu buněk [63, 69].

5.2 Srovnání WST-1 testu a systému xCELLigence

Výsledek testu lze vyčíst z grafu (Obrázek č. 21), oba testy vykazují srovnatelný lineární dynamický rozsah a citlivost. Data získaná RTCA analyzátozem v podobě impedance a hodnot CI mohou být přímo srovnatelná s jednobodovým testem buněčné proliferace jako je WST-1 metoda [63].



Obrázek č. 21: Porovnání hodnot buněčné proliferace, které byly změřeny pomocí RTCA SP přístroje a WST-1 testu, převzato z [61]

5.3 Porovnání metody MTT se systémem xCELLigence při zkoumání účinků fenethyl isothiokyanátu (PEITC) na plicní nádorové buněčné linie A549 a H1299

5.3.1 Fenethyl isothiokyanát (PEITC)

Fenethyl isothiokyanát (PEITC) je látka známá pro svůj antikarcinogenní potenciál, fenethyl isothiokyanát obsahuje zelenina jako ředice a v menší míře také čínské zelí a kořenová zelenina. PEITC je v lidském těle metabolizován cestou kyseliny merkapturové, která je vylučována močí [71].

5.3.2 Princip MTT testu

Princip metody spočívá v redukci žlutého vodného roztoku MTT v metabolicky aktivních buňkách na nerozpustný modrofialový formazan. Následně je formazan extrahován pomocí organického rozpouštědla a absorbance roztoku je změřena spektrofotometrem. Intenzita zbarvení roztoku je úměrná počtu živých buněk [13].

5.3.3 Provedení MTT testu na buněčných liniích A549 a H1299

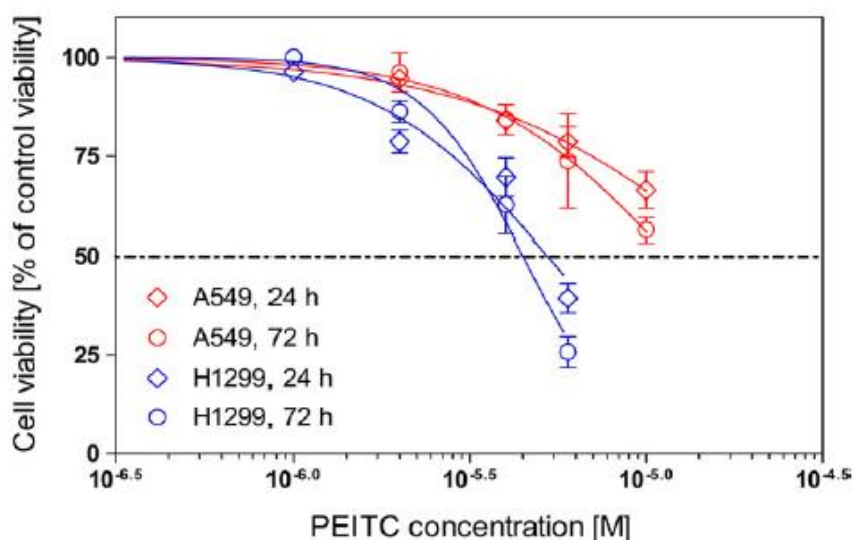
Po převedení buněčných kultur do 96- jamkové destičky byl proveden test MTT. Absorbance výsledného roztoku byla proměřena při vlnové délce 570 nm. Viabilita buněk byla převedena na procento redukce MTT a dále byla vyhodnocena 50% letální dávka LD₅₀ [71].

5.3.4 Monitorování proliferace buněčných linií A549 a H1299 systémem xCELLigence

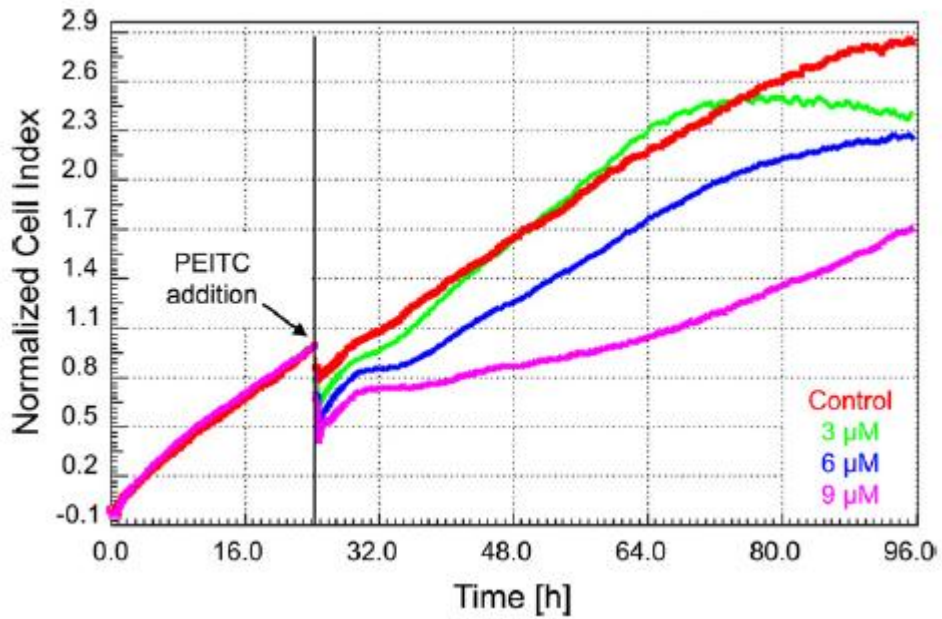
Zkoumané buněčné linie byly vloženy do 16- jamkové E-destičky. Každých 20 minut po dobu 24 hodin byla sledována proliferace měřením impedance. Následně bylo médium odstraněno a k buňkám byla kontinuálně aplikována sloučenina PEITC o příslušných koncentracích. Stav buněk byl dále sledován v reálném čase po dobu 72 hodin. V první hodině měření byla impedance změřena každých 15 minut, v následujících 2 hodinách každých 30 sekund a nakonec každých 20 minut až do ukončení testu. Nakonec byl vyhodnocen normalizovaný buněčný index NCI [71].

5.4 Zhodnocení a porovnání metod MTT a systému xCELLigence

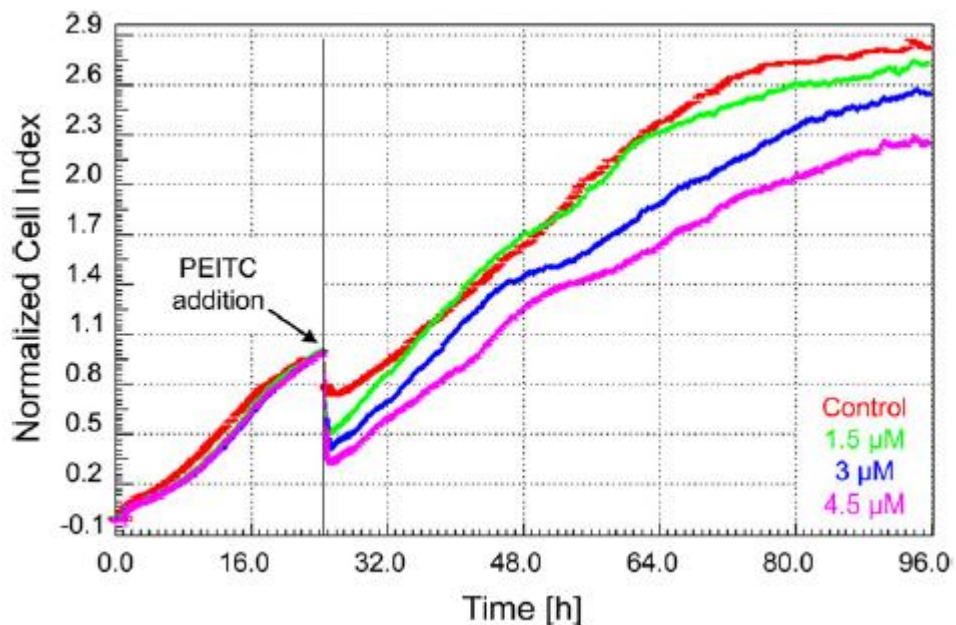
Obě metody vyhodnotily, že buňky H1299 jsou na látku PEITC více citlivé než buňky A549. Výrazné snížení viability buněk H1299 bylo testem MTT pozorováno po 72 hodinovém působení nejvyšší koncentrace PEITC, což se odrazilo v rozdílech hodnot LD_{50} . Analýza systémem xCELLigence vykazovala stejný trend, bez ohledu na nižší cytotoxický účinek. Výsledky také jasně ukazují, že PEITC inhibuje růst A549 buněk v závislosti na koncentraci. Závislost buněčné viability na čase, byla u obou zkoumaných buněčných linií pozorována pouze při vyšších dávkách PEITC, to může znamenat, že nižší dávky neovlivňují proliferaci buněk. Experiment prokázal, že výsledky testu MTT (Obrázek č. 22) a systému xCELLigence (Obrázek č. 23 a Obrázek č. 24) jsou srovnatelné [71].



Obrázek č. 22: Účinek PEITC na viabilitu buněk A549 a H1299 stanovený MTT testem. Buňky byly vystaveny různým koncentracím PEITC po dobu 24 a 72 hodin, převzato z [71]



Obrázek č. 23: Monitorování inhibice růstu buněk A549 v reálném čase, systémem xCELLigence. Různé koncentrace PEITC byly aplikovány na buňky po 24 hodinách, hodnoty NCI odrážející buněčnou adhesi a proliferaci byly zaznamenávány v různých intervalech po 72 hodin. převzato z [71]



Obrázek č. 24: Monitorování inhibice růstu buněk H1299 v reálném čase, systémem xCELLigence. Látka PEITC o vhodných koncentracích byla aplikována na buňky po 24 hodinách, hodnoty NIC odrážející buněčnou adhesi a proliferaci byly zaznamenávány v různých intervalech po 72 hodin. převzato z [71]

6 NÁVRH REÁLNÉHO EXPERIMENTU PRO TESTOVÁNÍ SYSTÉMEM xCELLigence

6.1 Cytotoxicita látky XY testované na buněčné linii SKBR3

Přístrojem x-CELLigence byla testována cytotoxicita látky XY v koncentračním rozmezí od 1 do 250 μM , pro experiment byla zvolena buněčná linie SKBR3. Do každé jamky bylo nanášeno 40 000 buněk a 200 μl média, do jamek A1 – A5 bylo nepipetováno pouze médium a do jamek B1 – B5 médium spolu s buňkami. Pro kontrolu živých buněk byly použity jamky C1 – C5, zde byl k médiu s buňkami přidán 0,1% roztok DMSO. Pro kontrolu mrtvých buněk byly použity buňky D1 – D5, do těchto buněk byl k médiu s buňkami přidán 5% roztok DMSO. Do ostatních jamek byla nepipetována látka XY o různých koncentracích rozpuštěna v roztoku 0,1% DMSO, schéma dávkování látky XY je znázorněno v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Dávkování látky XY do jednotlivých jamek (A –H), bb (buňky)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	Médium	Médium	Médium	Médium	Médium	12,5 μM	12,5 μM	12,5 μM	12,5 μM	12,5 μM
B	Médium_bb	Médium_bb	Médium_bb	Médium_bb	Médium_bb	20 μM	20 μM	20 μM	20 μM	20 μM
C	Médium_bb 0,1% DMSO	Médium_bb 0,1% DMSO	Médium_bb 0,1% DMSO	Médium_bb 0,1% DMSO	Médium_bb 0,1% DMSO	35 μM	35 μM	35 μM	35 μM	35 μM
D	Médium_bb 5% DMSO	Médium_bb 5% DMSO	Médium_bb 5% DMSO	Médium_bb 5% DMSO	Médium_bb 5% DMSO	55 μM	55 μM	55 μM	55 μM	55 μM
E	1 μM	1 μM	1 μM	1 μM	1 μM	100 μM	100 μM	100 μM	100 μM	100 μM
F	2,5 μM	2,5 μM	2,5 μM	2,5 μM	2,5 μM	150 μM	150 μM	150 μM	150 μM	150 μM
G	4,5 μM	4,5 μM	4,5 μM	4,5 μM	4,5 μM	250 μM	250 μM	250 μM	250 μM	250 μM
H	7,5 μM	7,5 μM	7,5 μM	7,5 μM	7,5 μM					

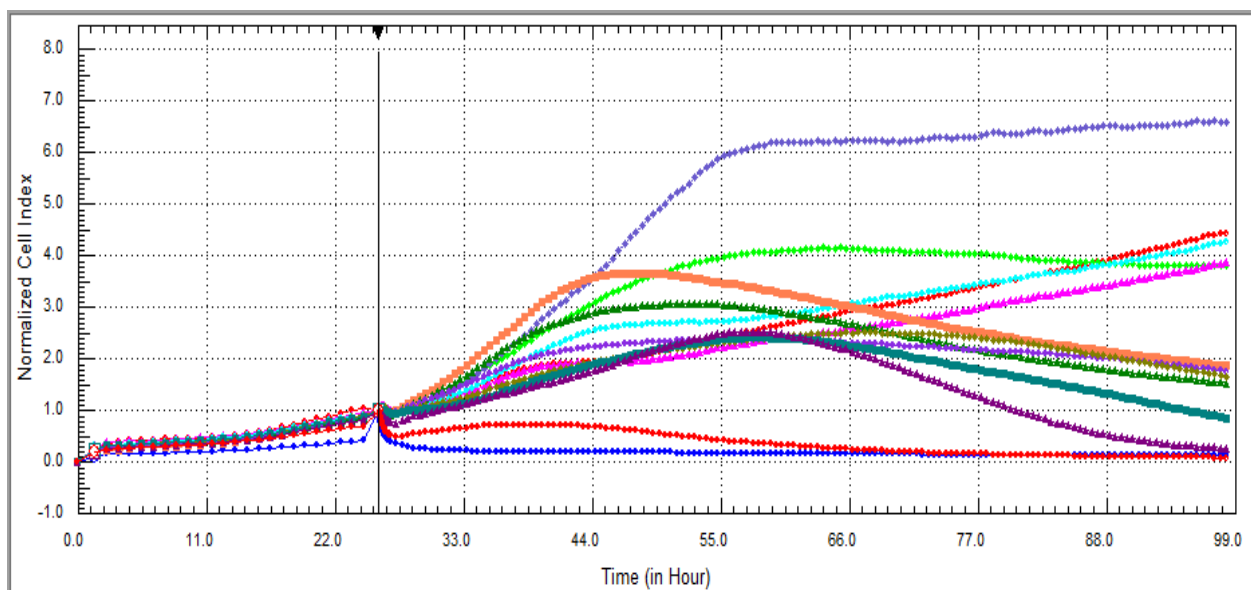
Tabulka č. 2: Schéma dávkování použitých reagensů do E-destičky, bb (buňky)

Jamka	Typ buněk	Počet buněk	
C1 – C5	SKBR3	40 000	Medium_bb_DMSO_0,1% = kontrola živé bb
D1 – D5	SKBR3	40 000	Medium_bb_DMSO_5% = kontrola mrtvé bb
E1 – E5	SKBR3	40 000	LÁTKA XY 1.00 μ M
F1 – F5	SKBR3	40 000	LÁTKA XY 2.50 μ M
G1- G5	SKBR3	40 000	LÁTKA XY 4.50 μ M
H1 – H5	SKBR3	40 000	LÁTKA XY 7.50 μ M
A6 – A10	SKBR3	40 000	LÁTKA XY 12.50 μ M
B6 – B10	SKBR3	40 000	LÁTKA XY 20.00 μ M
C6 – C10	SKBR3	40 000	LÁTKA XY 35.00 μ M
D6 – D10	SKBR3	40 000	LÁTKA XY 55.00 μ M
E6 – E10	SKBR3	40 000	LÁTKA XY 100.00 μ M
F6 – F10	SKBR3	40 000	LÁTKA XY 150.00 μ M
G6 – G10	SKBR3	40 000	LÁTKA XY 250.00 μ M

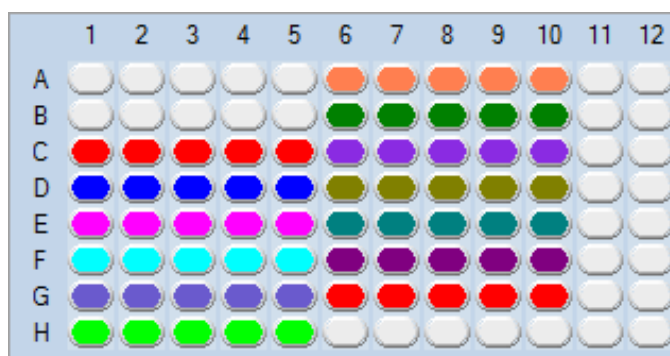
6.2 Průběh experimentu

Sledování buněk linie SKBR3 systémem x-CELLigence probíhalo po dobu 5 dnů. První den byly buňky naneseny na E-destičku, tak aby každá jamka obsahovala 40 000 buněk a 200 μ l média. Druhý den byla sledována odpověď buněk na látku XY (rozpuštěné v 0,1 % DMSO), okamžik přidavku látky XY ke sledovaným buňkám byl vztažen k buněčnému indexu o hodnotě 1.

Přístroj x-CELLigence měřil po celou dobu experimentu pomocí zlatých mikroelektrod umístěných na dně jamek E-destičky změny elektrické impedance. Hodnoty elektrické impedance byly pomocí softwaru převedeny na hodnoty normalizovaného buněčného indexu (NCI) a promítnuty do výsledného grafu (obrázek č. 25) v závislosti na čase.



Obrázek č. 25: Výsledný graf – testování cytotoxicity látky XY na buněčné linii SKBR3 pomocí systému xCELLigence



Obrázek č. 26: Obsah jamek E-destičky, doplňující obrázek k výslednému grafu (obrázek č. 25)

6.3 Vyhodnocení experimentu

Průběh křivek výsledného grafu ukazuje, že jamky E1 – E5 (růžová křivka) a F1 – F5 (světle modrá křivka) buňky neovlivňují, což potvrzují plynule rostoucí hodnoty NCI. Jamky G1 – G5 a H1 – H5 růst nádorových buněk naopak stimulují. Z grafu dále vyplývá, že testovaná látka XY je pro buněčnou linii SKBR3 toxická od koncentrace 12.50 μM (buňky A6 – A10). Tento fakt potvrzuje oranžovo-běžová křivka, která začíná po uplynutí asi 50 hodin klesat, díky snižujícím se hodnotám NCI. U vyšších koncentrací látky XY je cytotoxický účinek na buňky rychlejší, pro poškození buněk je nutná kratší doba. U koncentrace 250 μM klesá viabilita buněk linie SKBR3 již po 33 hodinách působení látky XY. Inhibice růstu buněk je tedy závislá na koncentraci a délce trvání expozice látky XY. Správnost experimentu potvrzují kontroly, pro mrtvé buňky vykazuje křivka nulové hodnoty NCI, naopak pro živé buňky mají hodnoty NCI rostoucí trend, tvar křivky je lineární.

7 ZÁVĚR

Testy *in vitro* cytotoxicity jsou důležitým nástrojem v oblasti výzkumu nových léčiv a to hlavně ve vývoji léků na rakovinu. Zjištění, že byt' jen jediná z použitých léčivých látek má toxické účinky na buňky, je důvodem pro neuvedení takového léku na trh. Pro odhalení cytotoxicity chemických látek slouží velká řada testů *in vitro* toxicity. Cytotoxicita může být stanovena kolorimetrickými metodami, mezi které patří MTT, XTT, WST-1, sulforhodamin B a LDH testy, testy cytotoxicity s neutrální červení a trypanovou modří. Dostupné jsou rovněž luminiscenční a fluorescenční metody jako je ATP bioluminiscenční metoda, resazurinový test a kalcein-AM metoda. Do své práce jsem také zahrnula principy BrdU testu a 3H-thymidin inkorporace. V dnešní době se často využívá analyzátorů částic Vi-CELL, Cedex, Z2 coulter counter, CASY, Cellavista nebo IncuCyte, kterými je možné stanovit viabilitu a sledovat proliferaci buněk. Nejmodernějším způsobem testování cytotoxicity je systém xCELLigence RTCA umožňující sledovat účinky chemických látek na buňky v reálném čase po celou dobu experimentu. Výsledné křivky vypovídají o chování buněk v jednotlivých časových bodech, což je pro vědce velmi cenná informace.

Pro testování cytotoxicity *in vitro* jsou také velmi důležité buněčné linie a primární buněčné kultury, mezi nejužívanější patří primokultury hepatocytů a kardiomyocytů, nádorové buněčné linie HeLa, HepG2, HepaRG, prostatické buněčné linie PNT1A a PC-3 a hepatomové buněčné linie.

Vyvíjené léky mohou být nebezpečné hlavně z hlediska kardiotoxicity. Přístroj xCELLigence „RTCA cardio“ nahradil náročné testy prováděné na laboratorních zvířatech. Umožnil tak testovat kardiotoxicitu na primárních kardiomyocytech v jejich fyziologickém prostředí v reálném čase. Díky tomu jsou dnes nebezpečné léky odhaleny dříve a nemohou tak působit nepříznivě na lidské zdraví.

Na rozdíl od ostatních testů cytotoxicity má xCELLigence mnoho výhod, práce se systémem je pohodlná a díky softwaru také poměrně jednoduchá. Buňky jsou během experimentu umístěny do inkubátoru a nejsou rušeny, to přináší přesnější výsledky. Analýza systémem xCELLigence je rychlá a není nutné buňky značit a znehodnocovat tak výsledky. Největším přínosem je ovšem sledování buněk v reálném čase. Díky všem těmto výhodám je velmi pravděpodobné, že systém xCELLigence v budoucnosti plně nahradí klasické *in vitro* testy cytotoxicity, jejichž výsledky jsou sice srovnatelné, což potvrzují různé experimenty porovnávající tyto dvě metody měření, avšak provedení je složitější a hlavně pracnější.

8 SEZNAM CITACÍ

1. *Všeobecná encyklopedie ve čtyřech svazcích*. 1. vyd. Praha: Nakladatelský dům OP Diderot, 1997, 700 s. Encyklopedie Diderot. ISBN 80-858-4117-7.
2. **BHANUSHALI, M., BAGALE V., SHIRODE A., JOSHI Y. a KADAM V.** An in-vitro toxicity testing - a reliable alternative to toxicity testing by reduction, replacement and refinement of animals. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*. 2010, vol. 1, issue 1, s. 15-31.
3. **STACEY, G. N., DOYLE A. a FERRO.** *Cell culture methods for in vitro toxicology*. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001. ISBN 14-020-0427-3.
4. **GÓMEZ-LECHÓN, Edited by José V. Castell a María José.** *In vitro methods in pharmaceutical research*. San Diego: Academic Press, 1997. ISBN 01-216-3390-X.
5. **MAHTO, S. K., CHANDRA P. a RHEE S. W.** In vitro Models, Endpoints and Assessment Methods for the Measurement of Cytotoxicity. *Toxicology and environmental health sciences*. 2010, vol. 2, issue 2, s. 87-93.
6. **CELIS, J. E.** *Cell biology: a laboratory handbook*. 3rd ed. /. Boston: Elsevier Academic, 2006. ISBN 978-012-1647-308.
7. **MIRET, S.** Comparison of In Vitro Assays of Cellular Toxicity in the Human Hepatic Cell Line HepG2. *Journal of Biomolecular Screening*. 2005, vol. 11, issue 2, s. 184-193.
8. **FRESHNEY, I. a VIVIANI B.** Application of Cell Cultures to Toxicology. *Cell Biology and Toxicology*. 2001, vol. 17, issue 4, s. 213-230.
9. **PANI, B.** *Textbook of toxicology*. New Delhi: I.K. International Publishing House, 2010. ISBN 978-938-0578-408.
10. **ZANDERS, E. D.** *The science and business of drug discovery: demystifying the jargon*. New York: Springer, 2011, 397 s. ISBN 14-419-9902-7.
11. **MOLECULAR DEVICES, LLC.** SpectraMax Plus384 | Absorbance Microplate Reader, Microplate Spectrophotometer. *Molecular Devices / Bioanalytical Systems For Drug Discovery, Life Science Research* [online]. US, ©2013 [cit. 2013-7-9]. Dostupné z: <http://www.moleculardevices.com/Products/Instruments/Microplate-Readers/Single-Mode-Readers/Absorbance/SpectraMax-Plus-384.html>
12. **HOUGHTON, P., FANG R., TECHATANAWAT I., STEVENTON G, HYLANDS P. J. a LEE C. C.** The sulphorhodamine (SRB) assay and other

approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*. 2007, issue 42, s. 377-387.

13. **STOCKERT, J. C., BLÁZQUEZ-CASTRO, CAÑETE M., HOROBIN R. W. a VILLANUEVA Á.** MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta histochemica: Zeitschrift für histologische Topochemie*. Jena: Veb Gustav Fischer Verlag, 2012, vol. 114, issue 8, s. 785-796.
14. **TWENTYMAN, P. R. a LUSCOMBE M.** A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British Journal of Cancer*. 1987, vol. 56, issue 3, s. 279-285.
15. **STUDIO R3D, s.r.o.** MTT test. *LEM - Laboratoř experimentální medicíny* [online]. [cit. 2013-4-16]. Dostupné z: <http://lem.ocol.cz/cs/info/mtt-test>
16. **BRESCIA, P. a BANKS P.** Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch™ Microplate Spectrophotometer. BIOTEK INSTRUMENTS, Inc. *Microplate readers, washers, dispensers and automated systems* [online]. 2009 [cit. 2013-4-16]. Dostupné z: <http://www.biotek.com/resources/articles/quontification-cell-viability-epoch.html>
17. **IIVS.** Phototoxicity Step-by-Step. *Your Partner for In Vitro Testing Services » Institute for In Vitro Sciences » Advancing Science and Animal Welfare Together* [online]. ©2013 [cit. 2013-4-16]. Dostupné z: <http://www.iivs.org/home/scientific-services/laboratory-services/phototoxicity/3-d-phototoxicity/step-by-step/5/>
18. **BIOTIUM.** XTT.. *Innovative fluorescent reagents for life science research, medical research and drug screening / Biotium* [online]. © 2013 [cit. 2013-4-17]. Dostupné z: <http://biotium.com/product/xtt-23-bis-2-methoxy-4-nitro-5-sulfohenyl-2h-tetrazolium-5-carboxanilide-disodium-salt/>
19. **BIOVISION, Inc.** Ready-to-use Cell Proliferation Reagent, WST-1. *BioVision - Life Science Source* [online]. © 2013 [cit. 2013-4-17]. Dostupné z: <http://www.biovision.com/ready-to-use-cell-proliferation-reagent-wst-1-5637.html>
20. **KABELITZ, Edited by Stefan H. E., Kaufmann and Dieter.** *Immunology of infection*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2002. 2nd ed. ISBN 01-252-1532-0
21. **ALMANSOUR et al.:** A bioactive peptide analogue for myxoma virus protein with a targeted cytotoxicity for human skin cancer in vitro. *Journal of Biomedical Science*. 2012, vol. 19, issue. 65.

22. **VLACHAKIS, D.** *ADIPOCYTE VIABILITY AND LDH*. 1. vyd. Bedfordshire University, England, UK, 2007. ISBN 978-0-6151-5238-7.
23. **KHATTAK, S. F., SPATARA M., ROBERTS L. a ROBERTS S. C.** Application of Colorimetric Assays to Assess Viability, Growth and Metabolism of Hydrogel-Encapsulated Cells. *Biotechnology Letters*. 2006, vol. 28, issue 17, s. 1361-1370.
24. **STŘEDNÍ ODBORNÁ ŠKOLA VETERINÁRNÍ, Hradec Králové-Kukleny, Pražská 68.** Počítání krevních elementů.. *Střední odborná škola veterinární* [online]. ©2008 [cit.2013-11-25]. Dostupné z: http://projekty.sosvet.cz/2006_hematologie/04_pocitani.htm
25. **ROUŠAR, T.** *Laboratorní cvičení z hematologie*. Vyd. 1. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2012, 72 s. ISBN 978-80-7395-462-8.
26. **TRUESCAN S.R.O.** Stanovení počtu erytrocytů v jednotce objemu krve. *Lékařská fakulta UK v Plzni* [online]. [cit. 2013-11-25]. Dostupné z: <http://www.lfp.cuni.cz/patofyziologie/materialy/krev/pocitani.htm>
27. **WIKIMEDIA FOUNDATION, Inc.** *Wikipedia, the free encyclopedia* [online]. 2001 [cit. 2013-7-7]. Dostupné z: http://commons.wikimedia.org/wiki/Main_Page
28. **BECKMAN COULTER, Inc.** The Vi-CELL Series Cell Viability Analyzers. *Research & Discovery | Clinical Diagnostics - Beckman Coulter, Inc.* [online]. © 2000-2013 [cit.2013-7-7]. Dostupné z: https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsrportal.portal?nfpb=true&windowLabel=UCM_RENDERER&urlType=render&wlpUCM_RENDERER_path=%2Fwsr%2Fresearch-and-discovery%2Fproducts-and-services%2Fflow-cytometry%2Fcell-counters%2Fvi-cell-series%2Findex.html
29. **HUANG, L., LIN W., YAGAMI M., TSENG D., MIYASHITA-LIN E., SINGH N., LIN A. a SHIH S.** Validation of cell density and viability assays using Cedex automated cell counter. *Biologicals*. 2010, vol. 38, issue 3, s. 393-400.
30. **F. HOFFMANN-LA ROCHE LTD.** Roche - Cedex HiRes. *Roche - Doing now what patients need next* [online]. © 2013 [cit. 2013-12-01]. Dostupné z: <http://www.roche.com/products/product-details.htm?type=product&id=136>
31. **BECKMAN COULTER, Inc.** Z™ Series COULTER COUNTER®. *Research & Discovery | Clinical Diagnostics - Beckman Coulter, Inc* [online]. © 2000-2013 [cit. 2013-12-01]. Dostupné z: <http://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsrportal/wsr/research-and->

[discovery/products-and-services/flow-cytometry/cell-counters/z-series/index.htm?i=6605700](http://www.rockwell.com/discovery/products-and-services/flow-cytometry/cell-counters/z-series/index.htm?i=6605700)

32. **ROCHE DIAGNOSTICS.** Cell Proliferation and Viability Assay Methods. *Roche Applied Science* [online]. © 1996-2013 [cit. 2013-12-02]. Dostupné z: <http://www.roche-applied-science.com/shop/en/cz/products/cell-proliferation-and-viability-assay-methods>
33. **ROCHE DIAGNOSTICS.** CASY Model TT – Cell Counter and Analyzer: Label-Free Viability Determination and Cell Sizing. *Roche Applied Science* [online]. © 1996-2013 [cit. 2013-12-02]. Dostupné z: http://www.roche-applied-science.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/05955653001_04.10_US.pdf
34. **SYNENTEC GMBH.** Cellavista: Automated Multiparameter Cell Analysis. *SyntenTec GmbH* [online]. Elmshorn, © 2012 [cit. 2013-12-02]. Dostupné z: http://www.synentec.com/Downloads/Cellavista_Brochure_WebVersion.pdf
35. **ESSEN BIOSCIENCE.** The INCUCYTE™ Kinetic Imaging System. *Kinetic Live Cell Imaging Within Your Incubator: Live Content Imaging from Essen BioScience: IncuCyte ZOOM, CellPlayer Assays, Discovery Services* [online]. 2013 [cit. 2013-12-02]. Dostupné z: http://www.essenbioscience.com/incucyte_overview.html
36. **LEE, M., PARK W., KIM Y., AHN W., KWON S. a HER S.** Intracellular ATP Assay of Live Cells Using PTD-Conjugated Luciferase. *Sensors*. 2012, vol. 12, issue 12, s. 15628-15637.
37. **SHAMA, G. a MALIK.** The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2013, vol. 216, issue 2, s. 115-125.
38. **MCMILLIAN, M. K., LI L., PARKER J. B., PATEL L., ZHONG Z., GUNNETT J. W., POWERS W. J. a JOHNSON M. D.** An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. *Cell Biology and Toxicology: An International Journal Devoted to Research at the Cellular Level*. 2002, Kluwer Academic Publishers, vol. 18, issue 3, s. 157-173.
39. **XIAO, J., ZHANG Y., WANG J., YU W., WANG W. a MA X.** Monitoring of Cell Viability and Proliferation in Hydrogel-Encapsulated System by Resazurin Assay. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, vol. 162, issue 7, s. 1996-2007.
40. **LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION.** Thymidine Incorporation Assay. *Life Technologies* [online]. © 2013 [cit. 2013-7-8]. Dostupné z:

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/protocols/cell-and-tissue-analysis/cell-proliferation-assay-protocols/Angiogenesis-Protocols/thymidine-incorporation-assay.html>

41. **SIGMA-ALDRICH CO. LLC. ALL.** BRDU Cell Proliferation Assay Reagents - Cell Biology. *Sigma-Aldrich* [online]. © 2013 [cit. 2013-7-8]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/cell-biology-products.html?TablePage=109585928>
42. **KOČÁREK, E., PÁNEK M. a NOVOTNÁ D.** *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 2., upr. vyd. Praha: Karolinum, 2010, 134 s. ISBN 978-802-4618-807.
43. **FUSEK, M.** *Biologická léčiva: teoretické základy a klinická praxe*. 1. vyd. Praha: Grada, 2012, 219 s. ISBN 9788070808108-
44. **BOURDEAU, P. et al.** *Short-term toxicity tests for non-genotoxic effects*. New York: Wiley, 1990, s. 75-91. SCOPE report, 41. ISBN 04-719-2506-3.
45. **KUČERA, O., LOTKOVÁ H., KŘIVÁKOVÁ P., ROUŠAR T. a ČERVINKOVÁ Z.** Modelové systémy pro studium toxického poškození hepatocytů. *Československá fyziologie*. 55/2006, č. 3., s. 52-59.
46. **DOSTÁLEK, M.** *Farmakokinetika*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 219 s. ISBN 80-247-1464-7.
47. **BHANUSHALI, M., BAGALE V., SHIRODE A., JOSHI Y. a KADAM V.** An in-vitro toxicity testing - a reliable alternative to toxicity testing by reduction, replacement and refinement of animals. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*. 2010, vol. 1, issue 1, s. 15-31.
48. **TYAGI, R., YADAV P. R.** *Cell culture*. 1st ed. New Delhi: Discovery Publishing House, 2005. ISBN 81-835-6019-9.
49. **ATCC.** *ATCC: The Global Bioresource Center* [online]. © 2012 [cit. 2013-7-30]. Dostupné z: <http://www.lgcstandards-atcc.org/>
50. **PHE.** *Culture Collections* [online]. ©2013 [cit. 2013-7-30]. Dostupné z: <http://www.phe-culturecollections.org.uk/>
51. **FAQI, Edited by Ali S.** *A comprehensive guide to toxicology in preclinical drug development*. 1st ed. London: Academic Press, 2013. ISBN 978-012-3878-151.
52. **PANNO, J.** *Cancer: the role of genes, lifestyle, and environment*. New York, NY: Facts On File, 2005, 162 p. ISBN 08-160-4950-5.

53. **GOMEZ-LECHON, M., DONATO M., LAHOZ A. a CASTELL J.** Cell Lines: A Tool for In Vitro Drug Metabolism Studies. *Current Drug Metabolism*. 2008, vol. 9, issue 1, s. 1-11.
54. **SAHU, S. C.** *Hepatotoxicity: from genomics to in vitro and in vivo models*. Hoboken, NJ: John Wiley, 2007, 682 s. ISBN 978-0-470-05716-2.
55. **MASARIK, M., GUMULEC J., HLAVNA M., SZTALMACHOVA M., BABULA P., RAUDENSKA M., PAVKOVA-GOLDBERGOVA M., CERNEI N., SOCHOR J., ZITKA O., RUTTKAY-NEDECKY B., KRIZKOVA S., ADAM V. a KIZEK R.** Monitoring of the prostate tumour cells redox state and real-time proliferation by novel biophysical techniques and fluorescent staining. *Integrative Biology*. 2012, vol. 4, issue 6, s. 672-.
56. **FERENČÍK, M.** *Imunitní systém: informace pro každého*. 1. vyd. Překlad Kristýna Pokorná. Praha: Grada Publishing, 2005, 236 s. ISBN 80-247-1196-6.
57. **QUONIA, s.r.o.** Biotech Dictionary - Gate2Biotech.cz. *Biotech Dictionary* [online]. © 2006 - 2013 [cit. 2013-11-10]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/dictionary.php?word=342>
58. **PETR, J.** Indukované pluripotentní kmenové buňky. In: *Lékařské zpravodajství - ZDN* [online]. 2009, roč. 2009, č. 3 [cit. 2013-11-10]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/mlada-fronta-zdravotnicke-noviny-zdn/indukovane-pluripotentni-kmenove-bunky-400403>
59. **XI, B., WANG T., LI N., OUYANG W., ZHANG W., WU J., XU X., WANG X. a ABASSI Y. A.** Functional Cardiotoxicity Profiling and Screening Using the xCELLigence RTCA Cardio System. *Journal of Laboratory Automation*. 2011, vol. 16, issue 6, s. 415-421.
60. **VONDRÁČKOVÁ, L., HORVATH V. a ŽŮREK D.** O zlatých elektrodách. In: *Roche diagnostic* [online]. 01/2010 [cit. 2013-9-10]. Dostupné z: <http://www.roche-diagnostics.cz/download/1a/0110/Elektrody.pdf>
61. **TENG, Z., KUANG X., WANG J. a ZHANG X.** Real-time cell analysis – A new method for dynamic, quantitative measurement of infectious viruses and antiserum neutralizing activity. *Journal of Virological Methods*. 2013, vol. 193, issue 2, s. 364-370.
62. **URCAN, E., HAERTEL U., STYLLOU M., HICKEL R., SCHERTHAN H. a REICHL F. X.** Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of

- dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dental Materials*. 2010, vol. 26, issue 1, s. 51-58.
63. **ACEA Biosciences, INC.** The xCELLigence system: Discover what you've been missing. In: *ACEA Biosciences -- xCELLigence System, Cell Index, E-Plat* [online]. San Diego (USA), 2013 [cit. 2013-9-10]. Dostupné z: http://www.aceabio.com/UserFiles/doc/literature/product_info/RTCA_SP_MP_ACEA_LoRes.pdf
 64. **ACEA BIOSCIENCES, INC.** ACEA Biosciences: xCELLigence System, Cell Index, E-Plate. *ACEA Biosciences: xCELLigence System, Cell Index, E-Plate* [online]. © 2012 [cit. 2013-11-10]. Dostupné z: <http://www.aceabio.com/productlist.aspx?cateid=265>
 65. **XING, J. Z., ZHU L., GABOS S. a XIE L.** Microelectronic cell sensor assay for detection of cytotoxicity and prediction of acute toxicity. *Toxicology in Vitro*. 2006, vol. 20, issue 6, s. 995-1004.
 66. **WEI, Y., XU Y., YIN L., WANG Y., RAN J., LIU Q., MA Z., LIU Y. a YANG Y.** Recombinant Rat CC10 Protein Inhibits PDGF-Induced Airway Smooth Muscle Cells Proliferation and Migration. *BioMed Research International*. 2013, vol. 2013, s. 1-8.
 67. **ATIENZAR, F. A., TILMANT K., GERETS H. H., TOUSSAINT G., SPEECKAERT S., HANON E., DEPELCHIN O. a DHALLUIN S.** The Use of Real-Time Cell Analyzer Technology in Drug Discovery: Defining Optimal Cell Culture Conditions and Assay Reproducibility with Different Adherent Cellular Models. *Journal of Biomolecular Screening*. 2011, vol. 16, issue 6, s. 575-587.
 68. **VLAD, S. a CIUPA R. V.** *International Conference on Advancements of Medicine and Health Care Through Technology, 29 August - 2nd September 2011, Cluj-Napoca, Romania*. Berlin: Springer, 2011, 403 p. ISBN 978-3-642-22586-4.
 69. **RAMIS, G., MARTÍNEZ-ALARCÓN L., QUEREDA J. J., MENDONÇA L., MAJADO M. J., GOMEZ-COELHO K., MROWIEC A., HERRERO-MEDRANO J. M., ABELLANEDA J. M., PALLARES F. J., RÍOS A., RAMÍREZ P. a MUÑOZ A.** Optimization of cytotoxicity assay by real-time, impedance-based cell analysis. *Biomedical Microdevices*. 2013, s. -.
 70. **ACEA BIOSCIENCES, INC.** XCELLigence RTCA Cardio Instrument: Monitor Cardiomyocyte Beating in Real Time for Drug Discovery Research. *Technologies for life science research* [online]. San Diego (USA), © 2013 [cit. 2013-10-5]. Dostupné z: http://www.biotech-europe.eu/files/pdf/Cardio_Brochure_ACEA_LoRes.pdf

71. PAWLIK, A., SZCZEPANSKI M. A., KLIMASZEWSKA A., GACKOWSKA L., ZURYN A. a GRZANKA A.. Phenethyl isothiocyanate-induced cytoskeletal changes and cell death in lung cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2012, vol. 50, issue 10, s. 3577-3594.