

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2017

Iveta Stodůlková

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

In vitro testování látek s potenciálním terapeutickým účinkem

Iveta Stodůlková

Bakalářská práce

2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Iveta Stodůlková**
Osobní číslo: **C13386**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **In vitro testování látek s potenciálním terapeutickým účinkem**
Zadávací 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 metod používaných při testování látek na buněčných kulturách.
2. Stanovení biologické aktivity nových látek s potenciálním terapeutickým účinkem. Testování cytotoxicity léčiv a doplňků stravy.
3. Testování látek s potenciálním protizánětlivým a protivirovým efektem.
4. Studium látek s potenciálním protinádorovým působením.
5. Testování látek s potenciálem k regeneraci tkáně a hojení ran.

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:

18. prosince 2015

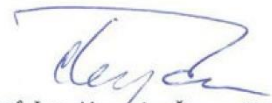
Termín odevzdání bakalářské práce:

3. července 2016



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2016

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.

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, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Iveta Stodůlková

Poděkování:

Děkuji Mgr. Lence Brůčkové, Ph.D. za její čas a úsilí vynaložené s opravami této práce, ale také za rady, díky kterým jsem tuto práci dokončila.

Anotace:

Bakalářská práce je věnována *in vitro* metodám využívající se pro testování cytotoxicity, což je nezbytnou součástí výzkumu nového léčiva. Ten zahrnuje preklinické a klinické studie *in vivo*, ale také studie počítačové simulace *in silico*. Práce je zaměřena na testování potencionálně účinných látek a jejich biologické aktivity pomocí vhodných modelů a testů, jejich popisu a způsobu využití.

Klíčová slova: *In vitro* testy, cytotoxicita, biologická aktivita, modely kůže, viabilita, preklinické testy, 3R

Title: In vitro testing of substances with potential therapeutic effect

Annotation:

The bachelor thesis is devoted to *in vitro* methods used for cytotoxicity testing, a necessary part of the research of new drug. Tem includes preclinical and clinical studies *in vivo*, but also computer simulation *in silico*. The work is focused on the testing of potentially active substances and their biological activity using suitable models and tests, their description and use.

Keywords:

In vitro tests, cytotoxicity, biological activity, skin models, viability, preclinical tests, 3R

Obsah

Úvod	12
1 Testování toxicity	13
1.1 Koncept 3R.....	14
1.2 Toxicita <i>in vitro</i>	16
1.2.1 Markery cytotoxicity	16
1.2.2 Testy cytotoxicity	17
1.2.2.1 MTT test	19
1.2.2.2 XTT test.....	20
1.2.2.3 MTS test	20
1.2.2.4 WST – 1 metoda	20
1.2.2.5 Sulforhodamin B test (SRB) test.....	20
1.2.2.6 LDH test	21
1.2.2.7 Test s trypanovou modří	21
1.2.2.8 Metoda neutrální červeně	22
1.2.2.9 Resazurinová metoda	22
1.3 Toxicita <i>in vivo</i>	22
1.4 Toxicita <i>in silico</i>	23
2 Biologická aktivita léčiv	24
2.1 Testování léčiv.....	26
2.1.1 <i>In silico</i> metody v preklinickém výzkumu	26
2.1.2 <i>In vitro</i> stadium preklinického výzkumu.....	26
2.1.3 <i>In vivo</i> stadium preklinického výzkumu	28
2.1.3.1 Mutagenita.....	28
2.1.3.2 Karcinogenita.....	29
2.1.3.3 Teratogenita	30
2.1.3.4 Interakce s kůží a okem	30
2.1.3.5 Testy odezvy imunitního systému.....	31
2.1.4 <i>In homo</i> stadium klinického výzkumu	31
2.1.4.1 I. Fáze	32
2.1.4.2 II. Fáze.....	32
2.1.4.3 III. Fáze	32

2.2	Registrace nového léčiva.....	33
2.3	Doplňky stravy	34
3	Testování látek s potenciálem k regeneraci tkáně a hojení ran	34
3.1	Lidská kůže.....	34
3.1.1	Mechanismy vedoucí k podráždění kůže:	35
3.2	Ekvivalent lidské kůže	36
3.3	Tkáňové modely	36
3.3.1	Testované parametry:.....	37
3.3.1.1	Fototoxicita.....	37
3.3.1.2	Dráždivost.....	38
3.3.1.3	Údaje o transportu.....	38
3.3.1.4	Korozivita	38
3.4	Konkrétní typy kožních modelů	38
3.4.1	SkinEthic	38
3.4.2	EpiSkin.....	39
3.4.3	Epiderm.....	41
4	Testování látek s protizánětlivým účinkem	43
4.1	Aktivace imunitního systému	43
4.2	Markery zánětu	43
4.2.1	Interleukin 6.....	43
4.2.2	Prokalcitonin PCT.....	44
4.2.3	CRP.....	44
4.2.4	TNF α (tumor nekrozující faktor α)	44
4.2.5	β - glukany.....	45
4.3	Metody pro stanovení protizánětlivých a protivirových markerů	45
4.3.1	ELISA test	45
4.3.2	PCR.....	46
5	Testování cytostatik.....	47
6	Závěr.....	49
7	SEZNAM CITACÍ	50

Seznam ilustrací a tabulek

Obrázky:

Obrázek 1 Struktura Cytochromu P450, Obrázek 2 Cyklus cytochromu P450.....	17
Obrázek 3 Přeměna MTT na formazan,	19
Obrázek 4 Vazebná místa receptoru a vyvolání odpovědi na základě afinity a vnitřní aktivity.....	25
Obrázek 5 Vývoj nového léčiva,.....	33
Obrázek 6 Morfologie modelu SkinEthic,	39
Obrázek 7 Morfologie modelů EpiSkin,	41
Obrázek 8 Morfologie modelu Epiderm,	42
Obrázek 9 Porovnání morfologií používaných tkáňových modelů.....	42
Obrázek 10 Reakce PCR	47

Tabulky:

Tabulka 1 Přehled alternativních metod pro stanovení akutní systémové toxicity	15
Tabulka 2 Přehled parametrů hodnocení cytotoxicit	18
Tabulka 3 Parametry hodnocené při stanovení biologické aktivity	27

Seznam zkratek

3R	Nahrazení, zredukování, zjemnění (Replacement Reduction Refinement)
APP	proteiny akutní fáze (proteins of acut phase)
API	aktivní léčivá látka (active pharmaceutical ingredient)
ANN	umělá neuronová síť (artificial Neural Network)
ATC	Třída akutní toxicity (Acute Toxicity Class)
ATP	adenosintrifosfát
CARS	kompensační protizánětlivé odpovědi (Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome)
CFU-GM	Jednotky tvořící koloniegranulocyty/makrofágy (Colony Forming Unit-Granulocyte/ Macrophage)
cDNA	komplementární Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)
CRP	C reaktivní protein
DLM	dominant lethal assay dominantní letální mutace
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)
DMF	soubor hlavních léčivých složek (Drug masters file)
ELISA	enzymová imunoadsorpční metoda (enzym-linked immunosorbent essay)
FDA	Food and Drug Administration ústav léčiv a potravin
FDP	Metoda fixní dávky (Fixed Dose Procedure)
GCP	good clinical practice
GLP	Good laboratory practice správná laboratorní praxe
GMP	good manufacturing practice správná výrobní praxe
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high – performance liquid chromatography)
IL – 1- α	interleukin 1 alfa
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
LDH	laktátdehydrogenasa
LD50	střední letální dávka 50 (Lethal Dose)
LC50	střední letální koncentrace 50 (Lethal Concentration)
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)-2Htetrazolium
MFO	Smíšená funkce oxidas (mixed function oxidases)
MI	mutační index
MOF)	multisystémovému selhání multiorgan Failure
MODS	multiorgánovému selhání (multiorgan Dysfunction Syndrome)

MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)- 2H-tetrazolium
mRNA	mediátorová Deoxyribonukleová kyselina(messenger Deoxyribonucleic acid)
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NDA	nová aplikace léčivé látky (New Drug Application)
NHK	Normální lidské keratinocyty (Normal human keratinocytes)
NRU	Metoda stanovení cytotoxicity založená na příjmu neutrální červeně (Neutral Red Uptake assay)
NK	přírodní zabijáci nature's killers
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (Organisation for Economic Co-operation and Development)
PCT	prokalcitonin
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
QSAR	kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou jednotek a jejich biologickou činností (Quantitative StructureActivity Relationships)
REACH	Chemická legislativa EU (Registrace, Evaluace a Autorizace Chemických látek (Regulation on Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals)
SKALP	antileukoproteinasový kožní derivát (Skin – derived Antileukoproteinase)
SPRR	na prolin bohatý protein
SRB	sulforhodamin B
SÚKL	státní útvar pro kontrolu léčiv
SZPI	Státní zemědělské a potravinářské inspekce
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography)
UDP	Metoda stanovení využívající zvyšování a snižování dávky (Up and Down Procedure)
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid
WST-1	4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfo

Úvod

Bakalářská práce je zaměřena na *in vitro* metody, pomocí kterých testujeme cytotoxicitu.

U všech látek, ať už léčivých nebo využívaných v kosmetickém průmyslu, je potřeba ověřit jejich zdravotní nezávadnost. To děláme v prvních krocích právě pomocí těchto testů, kterými dokážeme stanovit jestli, nebo do jaké míry je daná látka toxická. Tento způsob testování je sofistikovanější, levnější a často i rychlejší, než dříve využívané testy *in vivo*, ke kterým se využívala testovací zvířata. Tyto metody je mají zastoupit a tak snížit utrpení a zabránit újmě na zdraví zvířat. Tyto testy byly pro ně velmi zatěžující, stresující, bolestivé, zdlouhavé a prakticky ve všech případech kvůli těmto studiím musela umírat.

O vývoj těchto alternativních metod, jako vhodných, ale plnohodnotných náhrad se tedy zasloužili jistým způsobem i ochránci zvířat, kteří bojovali za jejich práva. Jedna z nejnovějších změn nastala při přijetí konceptu 3R, jehož cíl je právě snížení utrpení a počtu potřebných zvířat ve výzkumech. Současně se tyto metody stále vyvíjejí, a modely pro testování toxicity se neustále inovují, aby výsledky byly co nejpřesnější a bylo je tak možné interpretovat i pro *in vivo* výzkum. Toho se snažíme docílit zejména tím, že se pokoušíme vytvořit strukturně velmi podobné prostředí pro působení látky.

Jestliže je látka toxická, způsobuje poškození buněk, narušuje jejich fyziologickou funkci, nebo způsobuje programovanou buněčnou smrt neboli apoptózu. Právě na této skutečnosti se tyto testy zakládají a využívají tedy možnosti detekce životaschopných, popřípadě usmrcených buněk, nebo detekují enzymatické změny, způsobené změnou vnitřních pochodů v buňce. K tomu využíváme mnoha metod, které jsou dnes běžně dostupné, jako jsou kolorimetrické testy, mezi které patří zejména testy MTT nebo XTT, fluorescenční metody (resazurinový test) nebo testy enzymatické (LDH test). Většina těchto testů využívá k detekci barevnou změnu, kterou je možné měřit spektrofotometricky, a intenzitu zbarvení je možno vztáhnout ke koncentraci.

Zřejmě největší nevýhodou těchto testů spočívá v tom, že proces při aplikaci potencionálně toxické látky nemůžeme těmito jednoduchými testy sledovat v čase, ale pouze odečíst výsledné změny na buněčné kultuře. To v dnešní době řeší buněčné analyzátoary.

1 Testování toxicity

Toxicita je negativní vliv na testované systémy a je vyvolána účinkem dané látky nebo jejich směsí. Míra negativní reakce je dána mnoha faktory, jako jsou například koncentrace látky nebo doba, po kterou byl systém dané látky vystaven. Tuto dobu nazýváme expozicí. Důležité jsou i faktory, které ovlivňují celkový fyziologický stav. Mezi tyto faktory patří ovlivnění teploty nebo regulace příjmu živin. Testování toxicity zahrnuje soubor experimentů, během kterých pozorujeme změny organismu vystaveného určitým podmínkám, a určité dávce zkoumané látky, a to v porovnání s těmi, které jí vystaveny nebyly, nebo jsme zvolili jiné podmínky [1].

Potencionálně cytotoxické látky jsou schopny indukovat buněčnou smrt. Na to se zaměřují i testy, kterými cytotoxicitu prokazujeme. Indikujeme tedy buněčnou smrt neboli apoptózu. Jedná se o mechanismus buněčné smrti, kterou vyhodnocujeme mnoha různými metodami. Tímto studujeme v závislosti na čase a dávce toxické účinky látky na buňky. Během testování pozorujeme účinky na buněčný cyklus, ale také mechanismus účinku a typ způsobené toxicity. Sem patří například bazální cytotoxicita, což je vnitřní schopnost látky způsobit buněčnou smrt, a to v důsledku poškození jejich základních buněčných funkcí. Testy cytotoxicity nám odhalují podrobnější údaje o probíhajících dějích, jako jsou genotoxicita, mutagenita nebo programovaná buněčná smrt. Dále sem řadíme akutní systémovou toxicitu. Tyto údaje se získávají zejména testy *in vivo*. Zda je toxicita akutní určuje především míra poškození vnitřních funkcí buněk [2].

In vitro metody jsou nejen alternativou, ale také náhradou za používané *in vivo* metody. Doslova v překladu znamená termín *in vitro* „ve skle“ a jednoduše znamená testování bez použití zvířat. Tyto metody využívají zejména použití buněčných nebo tkáňových systémů, ale i izolovaných orgánů [3].

Toto testování má mnoho výhod oproti testování v organismu jako celku na zvířatech, a to jak z ekonomické stránky, tak i z důvodu testovat pomocí *in vitro* metod přímo na konkrétním typu lidských buněk (například kožní keratinocity). Výhodou je také menší časová náročnost, ale i etický náhled na danou problematiku. Mimo jiné jsou většinou spolehlivější, a poskytují nám dobrou experimentální kontrolu určených dávek chemikálií [4].

Testování na buňkách má samozřejmě i své nevýhody, mezi které patří například to, že látku nevidíme fungovat v systému jako celku, a tak máme pouze omezený náhled na specifickou orgánovou toxicitu [1].

1.1 Koncept 3R

Dnes se zabýváme zejména rozvojem alternativních metod, které se řídí konceptem 3R. Ten zahrnuje redukci v počtu využívaných zvířat na bezprostředně nutné minimum, jejich vhodnou alternativní náhradu a zjemnění, tedy snížení jejich utrpení. Odtud tedy pochází název 3R (Reduction, Replacement, Reinement). Tento koncept zahrnuje fyziologii založenou na farmakokinetickém modelování, metody bez užití savců, variace tkáňových a buněčných kultur nebo například lidské klinické studie využívající metody mikrodávek a epidemiologických studií [5].

V Rámci konceptu 3R se snažíme aktuální *in vivo* metody upravovat nebo nahrazovat tak, aby docházelo k co největšímu snížení používání testovaných zvířat, a tak i jejich utrpení. Proto byly pro testování akutní orální toxicity vyvinuty a validovány zejména tři hlavní alternativy snižující množství potřebných zvířat. Těmi jsou zejména metody využívající stanovení třídy akutní toxicity ATC(Acute Toxicity Class) OECD423 OECD Organisation for Economic Co-operation and Development (Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj) metoda zvyšování a snižování dávky (UDP; OECD 425) a metoda fixní dávky (FDP; OECD 420), tímto je nahrazen dříve používaný test OECD401, který nepatří do seznamu doporučených testů již od roku 2002 [6].

K omezení jak utrpení zvířat i jejich použití přispíváme taky tím, že každá metoda, která se dnes využívá, aplikuje více dávek v řadě, kdy první dávku nazýváme jako výchozí dávku, kterou určíme právě z již dostupných dat *in vitro* nebo *in vivo* testů, sledování cytotoxicity *in vitro* nebo můžeme také použít takzvané nástřelové *in vivo* studie s pouze omezeným počtem použitých zvířat [7].

Mezi nejšetnější metody patří metoda FDP Fixed Dose Procedure (Metoda fixní dávky) a to hlavně proto, že u této metody není nutné úmrtí zvířete. Zde se orientujeme podle již zjištěné toxicity, kterou jsme dokázali předešlými například *in vitro* testy, čímž se zcela vyhneme jakékoliv expozici živých jedinců, a tím jejich úmrtí [8].

V případě inhalační systémové toxicity můžeme použít jako náhradu dosavadně používaného *in vivo* testu například ATC. Metoda FDP se pro testování tohoto typu toxicity prozatím nevyužívá. Dalším typem je akutní systémová dermální toxicita, která je zařazena až na konec hlavně proto, že zde existuje jen velmi malá pravděpodobnost intoxikace touto cestou. Hlavní směrnicí, zda tyto látky vůbec testovat je zejména to, zda daná látka může absorbovat přes kůži. V tomto případě by bylo možné v budoucnu využít i metodu FDP [9].

Metody, které nyní používáme pro stanovování akutní systémové toxicity, můžeme rozdělit do třech základních kategorií a to na orgánově – specifické testy, toxikokinetické

metody a testy cytotoxicity. Srovnání alternativních metod pro stanovení systémové toxicity shrnuje tabulka č. 1.

Toxikokinetika popisuje procesy absorpce, metabolismu, distribuce a exkrece látky. Zabývá se tedy osudem dané látky v organismu. Studovanou látku a její metabolity potom stanovujeme jak v tkáních a tělních tekutinách, tak i v exkrementech testovaných objektů. Toxikokinetika nám pomáhá stanovovat akutní systémovou toxicitu při aplikaci na *in vitro* modely, a to zejména za využití buněčných organel, lidských hepatocytů nebo mikrosomů bohatých na metabolické enzymy, které stanovujeme v první fázi probíhající v játrech (Biotransformaci). Dále hodnocení permeability přes intesitnální stěnu (bariéry jako například tkáň – krev) v *in vitro* modelech obsahující intestinální buňky, afinitu látek k plazmatickým proteinům a distribuci látky v těle na základě rozdělovacích koeficientů mezi tkáněmi a plazmou [7,10].

Jako další sem řadíme orgánově-specifické testy toxicity. Abychom mohli vybrat vhodný *in vitro* model, je třeba zvolit vhodný typ lidských buněk, tkání, nebo jejich orgánových soustav. Zde je nutno zvolit zvláštní podmínky pro uchování kultur, zejména kvůli zabránění ztrátě funkčnosti, nebo morfologickým změnám. S tím musíme také vybrat nejen vhodnou referenční látku, ale i zvolit ověřený korelující parametr toxicity a to pro každý orgánový systém [11].

Tabulka 1 Přehled alternativních metod pro stanovení akutní systémové toxicity Whitehead, A, 2004

Akutní systémová toxicita	Test	Koncept 3R	Účel testu	Validace	Implementace
<i>Orální</i>					
Stanovení třídy akutní toxicity ATC	<i>In vivo</i>	↓počet	Stanovení toxicity <i>in vivo</i>		OECD TG ^a 423
Metoda fixní dávky FDP	<i>In vivo</i>	↓počet/ utrpení	Stanovení toxicity <i>in vivo</i>		OECD TG 420
Postup zvyšování a snižování dávky UDP	<i>In vivo</i>	↓počet	Stanovení toxicity <i>in vivo</i>	ICCVAM	OECD TG 425
Test NHK NRU ^b	<i>In vitro</i>	↓počet	Stanovení výchozí dávky <i>in vivo</i>	ICCVAM	Návrh OECD TG
Test 3T3 NRU ^c	<i>In vitro</i>	↓počet	Stanovení výchozí dávky <i>in vivo</i> Skrining netoxických Látek	ICCVAM ECVAM	Návrh OECD TG
<i>Inhalační</i>					
Stanovení třídy akutní toxicity ATC	<i>In vivo</i>	↓počet	Stanovení toxicity <i>in vivo</i>		OECD TG 436
Metoda fixní dávky FDP	<i>In vivo</i>	↓počet/ utrpení	Stanovení toxicity <i>in vivo</i>		Návrh OECD TG 433
<i>Dermální</i>					
Metoda fixní dávky FDP	<i>In vivo</i>	↓počet/ utrpení	Stanovení toxicity <i>in vivo</i>		Návrh OECD TG 434
<i>Dermální penetrace</i>					
<i>In vitro</i> absorpce kůži	<i>In vitro</i>	↓počet	Stanovení penetrace přes kůži	OECD	OECD TG 428
<i>Hematotoxicita</i>					
Test CFU-GM ^d	<i>In vivo</i>	↓počet nahrazení	Akutní neutropenie, náhrada za testování na 2. zvířecím druhu	ECVAM	Návrh OECD TG
<i>Toxikinetika</i>					
cryoHepaRG	<i>In vitro</i>	↓počet	Metabolismus →	ECVAM	
primární lidské hepatocyty	<i>In vitro</i>	↓počet	indukce enzymů cytochromů P450		

1.2 Toxicita *in vitro*

Testování toxicity je nezbytnou součástí každé studie nových léčiv a stejně tak jsou důležité pro určování hygienických norem. Své využití mají také v potravinářství i průmyslu. Je vhodné také stanovit toxicitu *in vitro* (cytotoxicitu) zejména u nově syntetizovaných látek s potencionálním biologickým účinkem určit i jejich vliv na buněčnou úroveň. Podle typu látky je možné odhadnout (mechanismu účinku), které orgány jsou nejvíce ohroženy, a tak vybrat správnou tkáňovou kulturu. Z toho vyplývá důležitost výběru vhodné tkáňové kultury. V některých případech je vhodné použití kultur specializovaných buněk, jakými jsou například epidermální keratinocyty nebo hepatocyty, jako model pro výzkum mechanismu hepatotoxicity [1].

Abychom zjistili přesný mechanismus účinku u nově objevených látek, je zapotřebí je testovat jak *in vitro*, tak *in vivo*. Nemusíme ale objevovat stále nové látky, mnohdy stačí modifikovat již známou strukturu specifickým způsobem tak, aby byly vylepšeny její účinky nebo potlačena přílišná cytotoxicita. V tomto případě se zabýváme zejména receptorovými a enzymatickými studii. Většinou je však snaha objevovat nové struktury s vlastním, novým, „lepším“ mechanismem účinku [12].

1.2.1 Markery cytotoxicity

Díky těmto markerům jsme schopni určit stresové reakce na znečišťování životního prostředí, teplotní změny a jiné změny prostředí je možno je rozdělit na markery buněčné a biochemické.

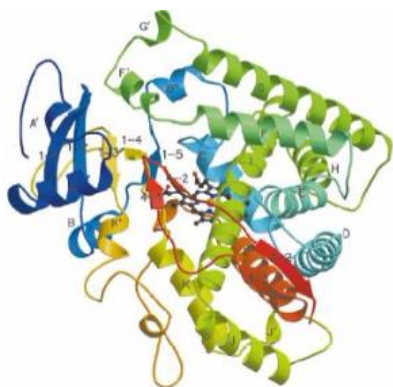
Mezi příznaky, které můžeme pozorovat, jsou zejména změny na buněčné úrovni, mezi které patří například změna exprimovaných molekul na povrchu buňky, změna v jejím tvaru, množství produkovaných enzymů, velikosti, deformace nebo poškození organel posuzujeme tedy celkovou morfologii buňky. Velmi důležitá je detekce ve změnách buněčné syntézy enzymů a proteinů. Tyto změny jsme schopni detekovat metabolickým značením, imunochemicky nebo cDNA sondou [13].

Touto metodou jsme schopni zjistit množství mRNA. Enzymy značíme takzvanými chromogenními substráty, kterých máme k dispozici mnoho. Mezi ty nejsledovanější patří cytochrom P-450, který zodpovídá za detoxikaci. Při jeho sledování můžeme tedy detekovat potencionálně nebezpečné látky a to podle druhu expresovaného cytochromu. Tyto cytochromy nově označujeme jako proteiny P450. Je to jeden z velmi důležitých enzymů, který se podílí na metabolismu látek tělu cizích (xenobiotik) a tím, že molekuly cizích látek mění na polárnější molekuly a usnadňuje tak jejich vylučování a zároveň

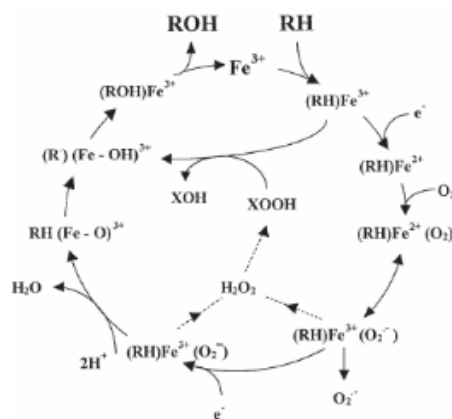
zabraňuje jejich shromažďování. Vedle toho může docházet ale i přeměna na bioaktivnější látky, což není vždy výhodou. Činit aktivnějšími mohou totiž jak API, tak i tyto látky modifikovat na mutagenní nebo karcinogenní. U některých léčiv mají schopnost dokonce snížit míru nežádoucích účinků a upravovat vedlejší účinky. Mezi ty nejdůležitější enzymy, které se podílejí na metabolismu xenobiotik, jsou mikrosomální monooxygenasy (oxidasy), které mají především funkci smíšenou (MFO), z angl. „mixed function oxidases“. Zde jako terminální oxidasa působí zejména hemový enzym cytochrom P450 [14].

Dále zde můžeme zahrnout i hemové enzymy peroxidasy, které působí samostatně. Ty mohou být jak specifické (prostaglandin H) tak i nespecifické [15].

Tyto látky jsou v těle zodpovědné zejména za I. fázi biotransformace chemických látek – detoxikace a II. fáze – eliminace. Pomáhá látku tedy eliminovat a exkretovat z organismu [16].



Obrázek 1 Struktura Cytochromu P450
William et al., 2003



Obrázek 2 Cyklus cytochromu P450
Anzenbacher & Anzenbachová, 2001

1.2.2 Testy cytotoxicity

Cytotoxické testy dělíme podle různých kritérií, jako jsou například různé organismy a kultury, které látce vystavujeme, dále koncentrace a doba expozice. Podle doby je možné je rozdělit na akutní, subchronické a chronické. Rozdíl mezi chronickými a subchronickými stanovuje zejména dávka zkoumané látky.

In vitro metody pro testování cytotoxicity pomocí kultivovaných buněk jsou běžné, a často se využívají pro citlivá stanovení chemikálií, protože jsou rychlé, ekonomické a nevyžadují použití zvířat. Mezi tyto metody patří například: MTT test, neutrální červen nebo krystalová violet. Tyto jsou velmi známé a využívají se velmi dlouho. Jedná se o barviva, která mění barvu v závislosti na životaschopnosti buněk, a tím umožňují

kolorimetrické stanovení viability buněk [1]. Přehled parametrů, pomocí kterých cytotoxicitu hodnotíme, je uveden v tabulce č. 2.

Tabulka 2 Přehled parametrů hodnocení cytotoxicity,

O'BRIEN PJ, HASKINS JR., 2006

1. Buněčná membrána a její propustnost
<ul style="list-style-type: none">· uvolnění buněčného obsahu z buňky (např. test s laktátdehydrogenasou)· průnik barviva do buňky (test s tryptanovou modří)
2. Jádro a buněčná proliferace
<ul style="list-style-type: none">· počet buněk· velikost jádra: zmenšení následkem apoptózy a nabobtnání ve fázi inhibice· syntéza proteinu (např. inkorporace ¹⁴C-methioninu)· inkorporace triciovaného thymidinu DNA· množství barviva v lysozomech či mitochondriích
3. Mitochondrie a energetická homeostáza
<ul style="list-style-type: none">· oxidace barviva (redukce tetrazoliových solí MTT, MTS)· koncentrace ATP (luciferasový test)· spotřeba kyslíku (např. kyslíkovými elektrodami)· syntéza proteinů mitochondrií a nukleových kyselin· množství mitochondriální hmoty, které se akumulují v mitochondriích
4. Antioxidační systém a oxidativní stres
<ul style="list-style-type: none">· produkty oxidace (test s dihydroethidinem, dichlorfluoresceinem)· antioxidační mechanismy (např. glutathion, enzymy antioxidačního systému rezistentní na barevnou oxidaci)· oxidace makromolekul (test s malondialdehydem, 8- hydroxyguanosinem)
5. Likvidace buněk prostřednictvím lysozomů či makromolekul
<ul style="list-style-type: none">· fosfolipidasa (test s nilovou červení – barvivem hromadícím se v lysozomech)· elektronovou mikroskopií lysozomů· vakuolizace· autofagie
6. Buněčný útvar a cytoskelet
<ul style="list-style-type: none">· rozrušení plasmatické membrány
7. Systém regulace vápníku
<ul style="list-style-type: none">· koncentrace celkového ionizovaného vápníku
8. Přenos signálu transdukci a adaptivní genetická exprese
<ul style="list-style-type: none">· translokace jádra (např. vztažení imunochemického barvení na NF-kB se zánětem a AP-1 a Nrf2 s oxidativním stresem)
9. Zánik buňky a apoptóza
<ul style="list-style-type: none">· kondenzace a lobulace jádra· aktivace kaspasy· uvolnění fosfatidylserinu, anexinů· imunochemie· fragmentace DNA· označením dUTP zavedením terminální deoxynukleotidyl-transferasy

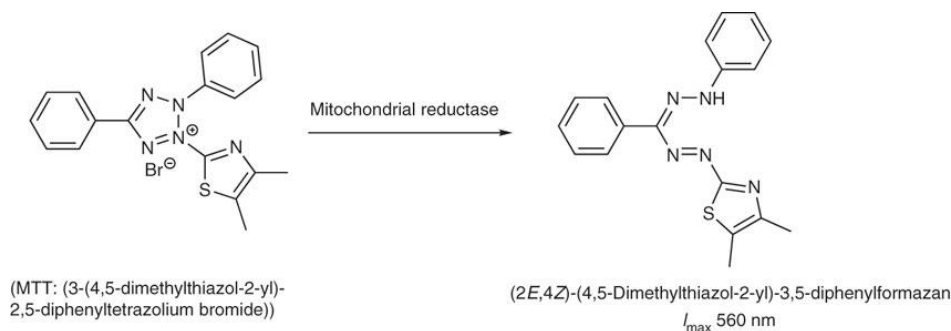
10. Intermediární metabolismus a aktivita specifických enzymů nebo koncentrace metabolitů

- zkoušky buněčných lyzátů jako klíčových enzymů
- metabolismus antioxidantů a antioxidační systém transport iontů

11. Účinnost založena na funkcích živých buněk

- zkoušky založené na funkci živých buněk, ve kterých jsou hodnoceny buněčné funkce, které mohou být inhibovány cytotoxicitou

1.2.2.1 MTT test



Obrázek 3 Přeměna MTT na formazan, Spatzenger, M., Jaeger, W. 1995

Jedno z nejvyužívanějších metod je metoda MTT, což je 3- [4,5-dimethyl-thiazol-2-yl] - 2,5-difenyltetrazolium bromid. Je to ve vodě rozpustná tetrazoliová sůl, která se podle štěpení tetrazoliového kruhu sukcinát dehydrogenasou v mitochondriích převede na nerozpustný formazan. Ten je nepropustný pro buněčné membrány, a proto se hromadí ve zdravých buňkách. Redukce MTT může být také zprostředkována NADH nebo NADPH uvnitř buňky [20].

Umožňuje rychlé hodnocení buněčné proliferace a cytotoxicity. Jedná se o kolorimetrickou metodu pro měření buněčného metabolismu. Množství vzniklých krystalů formazanu je úměrné počtu buněk a jejich činnosti. Měřením absorbance měříme optickou hustotu a výsledná hodnota odpovídá počtu přežívajících buněk a tím i s metabolickou aktivitou. V současnosti je tato metoda nejčastěji využívaná pro testování rychlosti růstu buněk a měření cytotoxicity. Tato metoda však poměrně časově náročná [21].

V buněčných kulturách je třeba dbát na pečlivé promytí a to z důvodu odstranění maximálního počtu interferujících fytochemikálií a to již před přidáním tetrazoliového barviva. Tetrazoliové testy mohou být ovlivněny množstvím aktivitou mitochondrií, to ovlivňují například flavonoidy. Ty indukují zástavu G2/M buněčného cyklu, po čemž následuje buněčná smrt nádorových buněk. V důsledku blokace G2/M buněk je skryto větší množství mitochondrií a z toho vyplývá také větší redukční kapacita [22].

1.2.2.2 XTT test

Podobnou metodou je metoda XTT. Jedná se také o kolorimetrickou metodu, která využívá 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT), což je tetrazoliové barvivo, pomocí kterého jsme schopni zjistit množství životaschopných buněk, které určuje přítomnost mitochondriálních dehydrogenas. Ve vodě se XTT přeměňuje na oranžové barvivo formazan [23].

1.2.2.3 MTS test

Jedná se o biochemický test, kterým stanovujeme buněčnou životaschopnost a proliferaci. MTS nebo-li 3- (4,5-di-methylthiazol-2-yl) -5- (3-karboxymethoxyfenyl) -2- (4 - sulfofenyl) -2H-tetrazolium) je test, ve kterém je toto barvivo redukováno na hnědý formazan a to díky NADPH nebo NADP, které jsou produkovány mitochondriálními enzymy v živých buňkách. Intenzita barvení je přímo úměrná množství viabilních buněk. Se zvýšením intenzity barvení roste také množství životaschopných buněk, což znamená buněčnou proliferaci. Intenzitu barvení opět vyhodnocujeme spektrofotometricky [24].

1.2.2.4 WST – 1 metoda

Jedná se o měření metabolické aktivity, a to pomocí 4- [3- (4-jodfenyl) -2- (4 nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio] -1,3-benzendisulfonát). Test je využíván k monitorování toxických účinků na buňky (savčí a jiné). Tento test má podobný princip jako test MTT a to je reakce s mitochondriální sukcinát – tetrazolium reduktázou. Poté opět indikujeme barevnou změnu způsobenou přeměnou na barevný formazan. Zde je však produkt oproti produktu z metody MTT více rozpustný ve vodě [25].

1.2.2.5 Sulforhodamin B test (SRB) test

Indikátor je jasně růžové aminoxantathenové barvivo se dvěma sulfonovými skupinami. Jeho histochemická struktura se velmi podobá například Coomassie brilantní modři, bromfenolové modři nebo naftol žluté soli, které se obecně všechny využívají pro proteinové značení.

V mírně kyselých podmínkách se SRB váže na základní proteinové aminokyselinové zbytky ve stabilních buňkách. Jeho citlivost je srovnatelná s citlivostí některých fluorescenčních barviv. Linearita tohoto testu je velmi vysoká a tímto parametrem tak převyšuje i testy jako jsou Lowry nebo Bradford testy. Výhodou je hlavně malé ředění vzorků, což vede k menší chybě v analýze vzorků s vysokým obsahem bílkovin. Změna barvy vzorku je rychlá, stabilní a viditelná. Lze je také měřit v širokém rozsahu vlnových délek. Zachycení koncového bodu zprostředkovává vhodně optimalizovaný protokol, díky čemuž

nemusí být výsledky měřeny v předem stanovenou dobu. Ve chvíli, kdy při této metodě zvolíme sušení vzorků vzduchem, je možné je skladovat po neomezenou dobu, a to bez snížení kvality vzorku. Lze využít také tris – solubilizovaný SRB. Ten je také stabilní poměrně dlouhou dobu, ale jen za předpokladu, že při skladování nedochází k odpařování. Tris sloučenina však může poškodit morfologii buněk nebo změnu proteinové struktury buňky. Po modifikaci této metody ji lze také využít pro slabě adherentní jednovrstvé buňky nebo přilnavé kultury, vrhající plovoucí buňky do okolního média, nebo i malé shluky. Pomocí SRB testu je možno zachytit různou citlivost lidských nádorových linií k cisplatině a fluoracillu. Metoda poskytuje citlivé měření lékové cytotoxicity v kultuře. Oproti metodám XTT nebo MTT sčítá mnoho výhod jako například větší rychlost, citlivost nebo jednoduchost [26].

SRB se využívá pro měření obsahu buněčných bílkovin. Barvivo se váže na zásadité aminokyseliny celulárních proteinů a vyhodnocujeme je kolorimetricky, stejně jako metody MTT nebo XTT. Touto metodou můžeme stanovit odhad, kolik proteinů se v buňce váže a tím můžeme tedy stanovit i jejich množství [27].

1.2.2.6 LDH test

Laktát dehydrogenáza je parametr velmi využívaný jak v toxikologii, tak v chemické diagnóze pro hodnocení míry poškození buněk, buněčných kultur i orgánových systémů. LDH je velmi důležitý glykolytický enzym, který je přítomný prakticky ve všech tkáních [28].

Metoda je založena na měření aktivity LDH v tkáních savců. Jednou z nejčastěji využívaných metod tohoto stanovení je spektrofotometrie, která byla popsána Vassaultem v roce 1983, který kvantifikoval přeměnu pyruvátu na laktát. Měření této konkrétní metody probíhá při 30°C. Aktivita LDH je měřena jako množství přeměněného pyruvátu s nepřetržitým monitorováním hladiny absorbance, což způsobuje oxidace NADH a to při 339 nm [29].

1.2.2.7 Test s trypanovou modří

Tento test využívá trypanové modři, jako barviva, které barví pouze mrtvé buňky. Tudíž po obarvení buněk tímto barvivem můžeme mikroskopicky vyhodnotit množství viabilních, respektive poškozených buněk. Celkové počty vyhodnocujeme pomocí Bürkerovy komůrky [30].

1.2.2.8 Metoda neutrální červeně

Je určená k měření buněčné viability. Dále se používá také jako indikátor cytotoxicity pro kultury s primárními hepatocyty a jinými buněčnými liniemi. Živé buňky naváží neutrální červeně, která je koncentrovaná uvnitř lysozomů [20].

Výsledky se hodnotí spektrofotometricky a lineárně korelují s počtem viabilních buněk. Při fyziologickém pH, což je i pH vhodné pro buněčné linie, je náboj nulový a tak je barvivo umožněno proniknout membránou pasivní difuzí. Po proniknutí lysozomů, kde je pH nižší, se barvivo kladně nabíjí, a tím je zamezen jeho další postup.

Využíváme zde pufovaných médií, která brání změně pH, což by mohlo ovlivnit vstup barviva. Použitím vyšších koncentrací nebo delší inkubační doby, nižší teploty nebo pH, může vést k vysrážení neutrální červeně [31].

1.2.2.9 Resazurinová metoda

Jedná se o fluorescenční metodu, jejíž podstata je v barvení resazurinem. Sledujeme tedy kdy je podíl non-fluorescenčního resazurinu snížen, a to o počet metabolicky aktivní buňky látkou resorcin, která je fluorescenční. V tomto případě je tedy fluorescence přímo úměrná počtu viabilních buněk. Přesněji je třeba fluorescenci sledovat v průběhu času a tak stanovit potřebný čas k dosažení určité minimální a maximální hodnoty fluorescence. Tyto časové body odpovídají počtu životaschopných buněk, tento parametr pak porovnáme s výchozím počtem životaschopných buněk [32].

1.3 Toxicita *in vivo*

In vivo testy jsou pro testované subjekty zatěžující, poškození způsobuje již po krátké expozici a negativně je ovlivňuje i jako celek. Tyto testy se většinou provádějí zejména na vyšších obratlovcích, což lze označit za „testy na zvířatech“. Tímto způsobem nelze přesně prozkoumat přímý mechanismus účinku nových látek. To vše vede ke stálému vývoji *in vitro* metod, které snižují samotnou potřebu zvířat, ale i jejich utrpení. Stejně jako mnoho dalších metod je tyto metody nejdříve v rámci změn, které v nynější době probíhají nutné validovat. Testy na zvířatech, jestliže není k dispozici jiná funkční náhrada, je dle dnešní platné legislativy možné využít jen v případě, že v rámci testování cytotoxicity, bylo v evropské unii přijato nařízení REACH, které se týká registrace, hodnocení kvůli ochraně, povolování a omezování různých chemických látek, a to hlavně kvůli ochraně zdraví i životního prostředí. Alternativní metoda může být ta, která se řídí konceptem 3R. Ten byl popsán vhodnými efektivními metodami již v roce 1959 a zabývá se právě alternativami, které by je

mohly nahradit. Těmi jsou *in vitro*, zvířata nebo také počítačové simulace a matematické modely [33].

Výsledek hodnotíme pomocí *ex-vivo* metody, které využívají buněčné kultury, tkáně, orgány nebo počítačovou modelaci, pomocí kterých stanovíme dvě základní hodnoty, a to jsou střední letální dávka (LD_{50}) a střední letální koncentrace (LC_{50}). Tyto hodnoty statisticky stanovuje dávka, nebo látka, kterou jsme podali jednorázově, a způsobí úmrtí u 50% zvířat v testované skupině koncentrací studované látky. Tyto postupy jsou normovány mezinárodními institucemi, jako je například Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) [34].

1.4 Toxicita *in silico*

Jedná se o metody počítačové, které mají také za účel snížit počet zvířat, ale hlavně splňují podmínky 3R. Tyto metody využívají toxikologické údaje stanovené testy *in vivo*, na základě kterých vytváří predikční počítačové modely. Vlastní proces potom probíhá výpočtem, který předpokládá, jak je zkoumaná látka toxická. Je také potřeba používané údaje z pokusů a jiných studií využít obecně. Nejčastěji používanou metodu pro tento postup je QSAR (z angl. Quantitative Structure Activity Relationships, tj. kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou jednotek a jejich biologickou činností) [35].

In silico testy můžeme rozdělit na různé typy, jakými jsou modely využívající kineticko-fyziologických simulací nebo jiných biologických podobností, využívající souboru znalostí a pravidel (PBMS) modely vytvořené a vyhodnocované počítačem (QSAR), modely, které využívají alometrických rovnic ve specializovaném systému, modely pracující na principu molekulové grafiky, které byly vytvořeny přístroji a nakonec modely využívající umělou neuronovou síť (ANN), nebo její kombinace.

Tyto metody samozřejmě nemusí být úplně přesné ani nemusí naprosto odpovídat skutečnosti. To závisí hlavně na tom, jak byly dodrženy podmínky při pokusu (zahrnutí doby expozice věk podobně). To vše ovlivňuje konečnou správnost výsledku. Velmi důležité je také zahrnout konkrétní interakce mezi použitými látkami při pokusu. Nakonec je samozřejmostí stanovit pravděpodobnost správnosti těchto metod [36].

Nejpoužívanější metodou je metoda QSAR, a to zejména proto, že má mezi všemi metodami největší možnost využití, jejímž základem je souvislost mezi souborem vztahů, chemickou konstitucí a míry biologických účinků v praxi, a lze tak brát ohled na výsledky při studiu cytotoxicity látek výzkum této metody začal již v roce 1973 [37].

Jedná se o soubor matematických rovnic, které jsou schopny vypočítat, jak velký je biologický účinek látek. K tomu využívají právě znalosti chemické struktury, kterou udávají její fyzikálně-chemické vlastnosti, topologické indexy a kvantově-chemické indexy.

Největší problémy stále zůstávají v použitých biologických experimentálních datech. Tomu se snažíme zabránit hlavně dodržemím přesně daných podmínek včetně dob expozice v probíhajících biologických procesech. To platí v případě ustáleného stavu, extratermodynamická pravidla, a to pouze za předpokladu, že biologická účinnost je dána kritickým stupněm, který nám udává účinnost. V takovém případě se rovnovážná konstanta mění v závislosti na změně Gibbsovy energie, která se zde skládá z jednotlivých činitelů podílejících se na biologické aktivitě, a v tom případě také na změnách ve struktuře molekuly, jakými mohou být hydrofobita, polarita nebo stericke vlastnosti [38].

2 Biologická aktivita léčiv

Kvůli potřebě pracovat s intercelulárními a intracelulárními signály pro buněčnou diferenciaci a proliferaci se snažíme inovovat dosud známé metody tak, aby byly nejen co nejpřesnější, ale také korelovaly se studii *in vivo*, což je nezbytné pro jejich přenesení do praxe.

Velmi důležitou úlohu v biologické aktivitě mají především diferenciaci a proliferaci. Ty se odehrávají na úrovni malých molekul a jejich receptorů, které jsou umístěny na jejich povrchu. Můžeme rozlišovat různé typy receptorů, mezi které patří například receptory rozpoznávající steroidní hormony, hormony štítné žlázy, retinoidy, ale také některé vitamíny, které jsou jadernými transkripčními faktory, a podílejí na genové regulaci. Tyto receptory a příbuzné genově podobné rodiny jsou také schopny rozpoznávat některé chemikálie (například dioxiny). Aktivní látky tedy využívají interakce s receptorem a využívají následné aktivace genové regulace. Aktivita je pak dána funkcí látky, ne její strukturou. Pro spuštění účinku je nutné, aby daná látka splňovala požadavek na afinitu a vnitřní aktivitu pro daný receptor, což je znázorněno na obrázku č. 4.

Toto působení látek přes receptory, které je způsobeno chemikáliemi, má význam zejména pro funkční toxikologii. Funkční toxikologii pak určujeme zejména funkci látek a ne jejich strukturu. Kultury obsahující lidské buňky mohou být transportovány pomocí molekulárních struktur obsahující specifický receptor a reportérový gen pro daný receptor. Potom testujeme zejména vazbu chemického ligandu na receptor, jeho obsazení, afinitu, vnitřní aktivitu a genovou aktivaci. Chemický, neznámý biologický nebo

toxikologický účinek zjistíme na základě toho, zda byl spuštěn panel obsahující receptorové buňky. Účinek zkoumané látky je tedy vyvolán receptorem zprostředkovanou genovou aktivací, kterou jsme schopni detekovat a tím zjistíme, zda daná látka je biologicky aktivní, nebo má i jiné účinky (cytotoxicita a další). Na základě známých účinků můžeme pak stanovovat i účinky látek neznámých, které mechanismus účinku mohou mít podobný. Sledujeme pak tedy pro konkrétní skupinu danou receptorovou skupinu, a případný účinek na organismus a jeho odezvu. Například v případě estrogenového receptoru sledujeme poměrně široký panel receptorů, do kterého řadíme estrogenový receptor, progesteronový receptor, androgenní receptor, receptor pro thyroïdní hormon, dioxin receptor nebo excitační aminokyselinové receptory a mnoho dalších.

Pochopení těchto procesů je důležité, protože se s jejich pomocí snažíme mechanismy účinku zobecnit, a to právě na základě toxikologických reakcí a biologické funkce. Chemická látka, která bude podobná, by měla více předvídatelné, srozumitelné toxikologické účinky a to právě v závislosti na době expozice a výšce dávky. Tímto způsobem také stanovujeme profil chemické látky, který je velmi důležitý z hlediska epidemiologie. V podstatě tedy hledáme většinou látky podobné již látkám, které byly objeveny, a víme, jak působí, a jejich modifikací tedy vytvoříme novou modifikovanou formu této látky, a to většinou s lepším účinkem nebo jinými výhodami jako je například zamezení některým nežádoucím účinkům. Jen málo kdy nebo náhodou objevíme zcela novou léčivou látku a podaří se zcela přesně identifikovat její mechanismus účinku, aby bylo jisté, že použití takové látky nebude nebezpečné (látka i přes cílené působení může být pro organismus toxická a tudíž by její budoucí využití bez úpravy stávajících vlastností nebyla možná). U zcela neznámé látky pak musíme mít alespoň předpoklad, v jaké oblasti působí, abychom dále přizpůsobili testy a objasnili její vlastní biologickou aktivitu, další účinky na organismus jako celek [42].



Obrázek 4 Vazebná místa receptoru a vyvolání odpovědi na základě afinity a vnitřní aktivity, Barral, E. 1997

2.1 Testování léčiv

Můžeme jej rozdělit do třech hlavních stádií, mezi které patří základní výzkum, preklinický výzkum a klinický výzkum. Nově je také lze rozdělit na stadia výzkumu *in silico*, *in vitro* a *in vivo*.

2.1.1 *In silico* metody v preklinickém výzkumu

Do prvního stadia patří tedy metody *in silico*. Zde mají hlavní využití metody izolace syntézy nebo „docking“ (spojení). Dále následuje testování takzvaných „leading structure“, neboli vůdčích struktur, které nám odhalují strukturní prototypy s farmakologickým účinkem. Cílem je určit vůdčí molekulu, u které se předpokládá farmakologický účinek a zároveň nízká toxicita. Dále testujeme syntetizované a modifikované látky odvozené od této vůdčí struktury. Dále sledujeme přesný mechanismus účinku a to zejména z hlediska biochemických procesů na buněčné a receptorové úrovni. Dnes se zaměřujeme zejména na studium signálních mechanismů uvnitř buňky a také farmakogenomiku. K tomu se využívá fyzikálně-chemických metod a to k hodnocení interakcí biomakromolekul. Tyto biomakromolekuly přirozeně obsahují ligandy, které jsou stěžejním pro určení účinné molekuly. To vše probíhá počítačovým modelováním. Při stanovení této funkční molekuly přecházíme do dalšího stadia výzkumu, a to preklinického.

Zde se dostáváme k vlastní syntéze účinné látky neboli API (active pharmaceutical ingredient). To nám slouží zejména k úpravě pozdějšího výrobního postupu. Také zde stanovíme rozkladné a metabolické produkty. Následují zátěžové testy API, kdy ji vystavíme stresovým podmínkám a sledujeme její stabilitu a to jak v krátkodobých testech, které zahrnují testování rozpustnosti a jiných fyzikálně-chemických vlastností, tak v dlouhodobých testech. Současně hledáme nejvhodnější lékovou formu pro danou API. To závisí zejména na jejím mechanismu účinku. Poté opakujeme stabilitní zkoušky v tentokrát již v dané lékové formě. Všechny postupy, které využíváme pro testování, musí odpovídat podmínkám správné laboratorní praxe (GLP Good laboratory practice). Výroba pak podléhá správné výrobní praxi (GMP good manufacturing practice). Všechny výsledky se pak zaznamenávají do přesně dané dokumentace nazývané DMF Drug masters file. Ta později slouží jako podklad k registraci léčiva.

2.1.2 *In vitro* stadiu preklinického výzkumu

Zde testujeme zejména na buněčných a orgánových modelech toxicitu potenciálního léčiva, ale také její farmakologické vlastnosti. Přehled parametrů, které hodnotíme, *in vitro* u biologické aktivity se nachází v tabulce č. 3. Také zde ověřujeme mechanismus účinku

a stanovujeme LD₅₀ LC₅₀. Právě tímto krokem se snažíme snížit počet pokusných zvířat, nelze je úplně nahradit, protože jsou pro preklinický výzkum stále nezbytné. Právě proto se *in vitro* testováním zabýváme zejména mírou toxicity, která odráží míru bezpečnosti užití látky. Při testování na zvířatech využíváme faktu, že na organismus působí látka jako na celek a vidíme tak ovlivnění celých orgánových soustav se všemi vazbami v něm jako celku. Netestujeme pouze na zdravých jedincích, také na jedincích s uměle vyvolaným patologickým onemocněním, které simuluje situaci, ve které bude daná látka využívána [40].

Používáme *in vitro* stanovení různých parametrů léčiva, díky kterým můžeme předpovídat například jeho absorpci *in vivo*. Při velmi vhodně stanoveném postupu může pak tato metodika sloužit jako náhrada za klinické studie biologické dostupnosti a to pouze v případě schválení příslušným státním orgánem vynechání zkoušky ekvivalence. Vývoj této metody tedy přispěl hlavně ke kontrole léčiv a k bezpečnosti, díky nalezení metod pro sledování disoluce s vysokou rozlišovací schopností. Při stanovení na základě zjištěných farmakokinetických parametrů lze poté ihned zavést postupy již ve stádiu formulace a tím upravit lékovou formu a také kontrolovat kvalitu. Tato metoda využívá modelování s využitím matematických vztahů mezi parametry *in vivo* a *in vitro* [41]. Parametry *in vitro* tedy získáváme vhodnými disolučními metodami. Mezi hodnoty *in vivo* potom patří hlavně plazmatické koncentrace léčivé látky na čase. Stanovení *in vivo* a *in vitro* poté skládáme do lineárních nebo nelineárních závislostí. *In vitro* stanovení využíváme zejména při hodnocení perorálních přípravků s řízeným uvolňováním, protože zde je absorbance více závislá na jeho uvolnění. Využití má však i u léčiv, které se uvolňují ihned [42].

Tabulka 3 Parametry hodnocené při stanovení biologické aktivity
O'Brien PJ, Haskins JR., 2006

1. Oxidativní fosforylace	
·	inhibice komplexů (komplex I: rotenonem, fenofibrátem, komplex II, IV: kyanidem, komplex V: oligomycinem, deplece koenzymu Q: amitryptilinem)
·	oxidačně – redukční reakce: chinony
·	rozpojovače transportu elektronů při syntéze ATP: protonofrony, tolkaponem, flutamidem, kokainem, furosemidem, mastnými kyselinami
2. β-oxidace mastných kyselin	
·	inhibice: valproátem, tetracykliny, nestereodínými, protizánětlivými léčivy, ženskými, pohlavními hormony, salicyláty
3. Krebsův cyklus	
·	inhibice akonitasy: peroxidem, fluoroacetátem
·	sikcinátdehydrogenasy: metamfetaminem, malonátem
·	α – ketoglutarát dehydrogenasa: salicylovou kyselinou
4. Transport přes mitochondriální membránu	
·	inhibice přenosu adeninových nukleotidů: zivoduniem

5. Propustnost mitochondriálních pórů
· otevření pórů prostřednictvím reaktivního kyslíku, dusíku, žlučových kyselin, lonidamidu a dalších cytostatik (vedoucí ke ztrátě membránového potenciálu a aktivaci apoptózy)
6. Proliferace
· inhibice DNA polymerasy γ prostřednictvím inhibitorů reverzní transkriptasy
· inhibice syntézy proteinů: oxazolidinovými antibiotiky
· mutace mitochondriální DNA: oxidativní poškození etanolem
7. Oxidativní stres
· nedostatek glutationu: paracetamolem
· oxidačně – redukční reakce
· reaktivní metabolity

2.1.3 *In vivo* stádium preklinického výzkumu

Tato studie je bezpochyby velmi důležitá proto, že hlavně když je studovaná látka aktivní a málo toxická *in vitro*, nemusí tomu být stejně ve studiích *in vivo*. Tyto testy nám poskytují ucelený náhled na působení potencionálně účinné látky jako na celek, kde nepozorujeme biologický účinek pouze na buněčné úrovni, ale také na úrovni orgánové soustavy a ovlivnění celkové fyziologie živého organismu [43].

Zde kromě základních farmakokinetických vlastností vyvíjíme také vhodné analytické metody pro stanovení dané látky z biologického materiálu, kterým je plazma nebo moč. To je důležité pro pozdější sledování metabolismu vylučování u lidí. Dále provádíme studie subchronické a chronické toxicity ale také speciální testy na mutagenitu, teratogenitu nebo karcinogenitu.

2.1.3.1 Mutagenita

Nejčastěji určujeme mutagenitu *in vivo* pomocí transgenních myší, protože mají ve svém genomu zabudován bakteriofág λ , který je nositelem takzvaného vedoucího neboli „lead genu“, který je exprimován ve všech buňkách v těle těchto myší a umíme ho uměle aktivovat, čímž způsobíme reakci, kdy dochází ke vzniku nových fágových buněk, z nichž každá nese jeden „lead gen“. Mutagenitu poté sledujeme v externích bakteriálních kulturách, kdy „lead gen“ vneseme do mikroorganismu *Escherichia Coli*, pro kterou je velmi infekční a proto na ní můžeme pozorovat změny jako je lýza nebo vznik různých plaků. Sledujeme tedy aktivitu tohoto genu, protože právě ten je také represorem β -galaktosidasy. β -galaktosidasa je enzym, který dokáže štěpit X-GAL (chromogenní obdoba laktosy) a to za vzniku modrého zbarvení. Tato reakce způsobuje to, že při reakci a vzniku plaku nevzniká plak bezbarvý, ale modrý [44].

Cílem je zjistit možné poškození genetické informace jedinců. Mutagenita způsobuje nejčastěji bodovou mutaci, delecí určité části DNA nebo chromozomu v chromozomální řadě, chromozomální translokace, duplikace, inverze, aberace nebo chromosomové zlomy.

Mnoho z těchto chromozomálních změn způsobují nejčastěji nádorové bujení. Látky mnohdy nejsou mutagenní samy o sobě, ale na mutagenní se mění až v důsledku detoxikačních mechanismů v organismu. Tyto účinky potom sledujeme na mikroorganismech přítomných v těle testovaného zvířete. Tato metoda se nazývá hostitelem z prostředkovaná metoda neboli “host mediated assay“ [45].

Test provedeme tak, že mikroorganismus, který byl dříve vystaven studované látce injekčně aplikujeme zvířeti do dutiny břišní, a po určité době bakterie odebereme zpěta zjišťujeme u nich případné mutace. Vhodnými mikroorganismy pro tyto testy jsou například bakterie z rodu *Salmonella* nebo *Neurospora*. Výsledky poté porovnááme s výsledky *in vitro* [46]. Pro zjištění běžně detekovatelné mutagenity používáme velmi často test dominantní letální mutace (DLM) dominant lethal assay [47]. Sleduje poškození DNA, které vede ke smrti heterozygotního jedince, to způsobují nejčastěji právě chromozomové aberace. Test provádíme podáním subchronické dávky myším samcům, u kterých se následně sleduje spermatogeneze-respektive stav zárodečných buněk, a schopnost rozmnožování a to jejich připuštěním k myším samicím, které látce nebyly vystaveny. Následovně je usmrtíme a počítáme množství žlutých tělísek, protože právě ty jsou odpovědné za výživu zárodka. Spočítáme tedy časně usmrcené zárodky a díky tomu určíme mutační index (MI).

$$MI = \frac{\text{počet časně usmrcených zárodků}}{\text{celkový počet zárodků}} * 100$$

Tímto testem není možno sledovat také bodové mutace, ty sledujeme na rostlinách popřípadě na bakteriích [48].

2.1.3.2 Karcinogenita

Těmito testy srovnáváme četnost vzniku nádorů u zvířat vystavených látce působící karcinogenně. Srovnání vztahujeme na skupinu kontrolních jedinců, kteří této látce nebyli vystaveni. Kontrolní skupina je velmi důležitou součástí hlavně z důvodu zjištění původu karcinogenity, která nemusí být způsobena testovanou látkou, ale vnějšími vlivy z prostředí nebo různými virovými infekcemi, protože toto riziko je největší při testování a myších nebo krysách, které jsou k virovým infekcím velmi náchylné. Nejčastěji zde jako testované subjekty tedy využíváme myši, krysy nebo psy. Je velmi důležité vzhledem k těmto aspektům stanovit správnou délku trvání testu. Ten může trvat od několika měsíců u krys až po několik let u psů, minimální doba trvání je však 90 dnů. Subjekty musí být co nejvíce izolovány

a chráněny před zevními vlivy, které by mohly způsobovat nádorové bujení. Proto jsou velmi často umisťovány do karantén a vyživovány pouze syntetickou stravou. Na konci testu jsou všechny testované objekty usmrceny a jsou patologicky hodnoceny (fyziologické a nádorové změny). Tyto testy trvají velmi dlouho, je potřeba velké množství zvířat a proto zde dáváme přednost testům *in vitro*, mezi které patří například Amesův test [49].

2.1.3.3 Teratogenita

Pokračujeme stanovením vhodné dávky, kterou bychom využívali v praxi. Tu hodnotíme při vztahování dávky na nežádoucí účinky, které rovněž sledujeme. Pro tyto účely musíme využít dva druhy zvířat, z nichž jeden musí být hlodavec (myš domácí, křeček syrský, potkan obecný nebo morče domácí) a jeden nehlodavec (králík domácí, kočka domácí, pes domácí, prase domácí). Z výsledků testů na zvířatech odvodíme maximálně tolerovanou dávku organismem, kterou později budeme podávat v I. fázi klinického zkoušení. Cílem testů preklinického zkoušení jak již bylo zmíněno je zejména stanovení bezpečnosti podání léčiva, jeho maximální dávka, zjištění nežádoucích účinků a zároveň její účinnosti [50]. U těchto studií se musíme řídit etickými standardy zejména v zacházení s laboratorními zvířaty a to v souladu s GLP. Testy lze provádět pouze v akreditovaných, k tomu určených laboratořích [51].

2.1.3.4 Interakce s kůží a okem

Kůže je soubor buněk se stejnou funkcí – jedná se tedy o orgán, který tvoří tělu přirozenou bariéru proti vnějším škodlivým vlivům. Testují se hlavně dermální přípravky pro lokální použití a to zejména proto, že chemické látky obsažené v těchto přípravcích může kůže poškozovat a míra poškození je dána citlivostí daného jedince k látce a také její koncentrací a vlastnostmi [52]. Jako modelové organismy v tomto testu využíváme hlavně bílé králíky (albíny) a bílé myši, kterým na kůži aplikujeme testovanou látku a pozorujeme dermální změny. Doba potřebná pro testování se zde liší a může trvat v řádu dnů až let. Tato doba se odvíjí zejména od velikosti povrchu aplikace na testovaném zvířeti, počtem zvířat ve skupině a pravidelnosti výměny testované látky. Test probíhá tak, že v místě aplikace oholíme srst a poté na ni upevníme sterilní krytí s testovanou látkou. Podle délky testu je můžeme rozdělit na akutní, které trvají dny, středně dlouho trvající (v rámci měsíců) a chronické, které trvají i roky.

Do výsledků se zaznamenává zejména stupeň a druh poškození v místě aplikace. Většinou se jedná o erythemii a edém, v dlouhodobé expozici však můžeme pozorovat i poškození vnitřních orgánů – proto během doby expozice sledujeme celkový stav zvířete

a to ne jen z jeho chování, ale i vnitřní fyziologické změny vnitřních orgánů. Největší pozornost je zde věnována sledování karcinogenních markerů, protože se většina karcinogenních látek vstřebává právě přes kůži. Pro testování vlivu potencionálně toxických látek na kůži je nyní nejvyužívanějším testem Landsteinerův test [44]. Tento test patří mezi ty vůbec nejrychlejší. Probíhá tak, že se testovanému objektu (praseti a jiné) subkutánně aplikuje testovaná látka. Jako všechny i tato metoda má své nevýhody, mezi které patří hlavně to, že touto cestou nejsme schopni zjistit všechny projevy, které by mohly nastat u člověka. Proto tuto metodu doplňujeme o metodu dle Roudabushe [53]. Ta je pozměněna o to, že testovanou látku aplikujeme do uměle vytvořených poranění a to rozpuštěnou v sádle, dioxanu a acetonu a to v poměru 1:2:7. Po uplynutí dvou dnů aplikaci opakujeme, ale tentokrát ve vyšší dávce. Tyto testy mají využití pouze pro primární dermální toxicitu. Pro toxicitu oka se využívá metoda dle Draize [54]. Tento test probíhá tak, že testovanou látku zvířeti (nejčastěji králíkovi) aplikujeme přímo do oka a sledujeme jeho změnu tři dny.

2.1.3.5 Testy odezvy imunitního systému

Hypersenzitivitu i hyposenzitivitu mohou vyvolávat látky zvané hapteny a mohou vést až ke smrti. Proto je nezbytné na zvířatech testovat i změny v imunitním systému tudíž sledujeme i orgány lymfatického systému, mezi které patří thymus, mandle, slezina a s nimi spojené periferní orgány. Sledujeme pak tedy smíšenou odpověď lymfocytů neboli „MixedLymphocyte Response Assay“ [55], a to po podání látky, protože ji využíváme jako hlavní indikátor pro uměle chemicky navozenou imunosupresi. Změnu pak hodnotíme na T - lymfocytech, které izolujeme ze sleziny, a testujeme jejich proliferaci v systému tkáňových kultur, kromě toho zjišťujeme také aktivitu NK buněk neboli „natures killers“. Tyto specifické buňky mají v organismu velmi specifickou úlohu odstraňování poškozených somatických buněk. Jejich poškození pak může zapříčinit nádorové bujení nebo komplikace skrytých infekcí, proto je velmi důležité je stanovit [56].

2.1.4 *In homo* stadium klinického výzkumu

Tento výzkum má stadia, obsahující soubor klinického hodnocení, které na sebe musí navazovat, nebo se alespoň částečně překrývat. Jednotlivé fáze výzkumu jsou:

- I. Fáze – První podání aktivní farmaceutické substance (API) člověku („human pharmacology“)
- II. Fáze- sledované léčebné podání léčiva („Therapeutic exploratory“)
- III. Fáze- léčebné podání léčiva za účelem potvrzení terapeutického účinku („Therapeutic confirmatory“)
- IV. fáze – klinické použití API („Therapeutic use“)

Kvůli využívání lidských jedinců v této části studie je nutná úprava celé klinické studie zákonem č. 378/2007 Sb., o léčivých látkách a případných změnách některých zákonů, a to zejména ve výkladu následujících předpisů. Detailněji jej popisuje vyhláška č. 226/2008 Sb. o správné klinické praxi (GCP). Úřad, který řeší problematiku tohoto odvětví, se nazývá státní útvar pro kontrolu léčiv (SÚKL), který spolupracuje s etickými komisemi.

2.1.4.1 I. Fáze

Zde se poprvé hodnocená API podává pár, maximálně do desítek jedincům. Látku podáváme až na výjimky pouze zdravým jedincům. Výjimkou jsou například onkologicky nemocní pacienti, protože v tomto případě je podání takovéto léčivé látky zdravému jedinci nevhodné. Další jedinci, kterým látka nemůže být podána, jsou takzvané zranitelné osoby, kterými jsou děti, těhotné ženy, osoby nezpůsobilé k právním úkonům nebo ty, které byly této způsobilosti zbaveny. Aplikace léčiva probíhá jednorázově nebo krátkodobě, a to na takzvaných Klinicko-farmakologických jednotkách „Phase I Units“. Zde není hlavním parametrem hodnocení účinnost, ale hlavně bezpečnost, snášenlivost a sledování nežádoucích účinků, které nám indikují vhodnost zvolené dávky. Toho docílíme postupným zvyšováním dávky a sestavením dávkovacího plánu pro další navazující fáze. Cílem je tedy objasnění základních farmakologických a farmakokinetických vlastností, na základě kterých určíme výslednou terapeutickou dávku, ale také určíme, s jakým časovým odstupem je možné látku aplikovat.

2.1.4.2 II. Fáze

K druhé fázi přistupujeme pouze v případě, že je léčivo podle předešlých hodnocení bezpečné. Zde studovanou látku podáváme 10 – 100 jedincům, kteří byli do studie vybráni, jako vhodní kandidáti. Cílem tohoto hodnocení je zejména ověření farmakodynamického účinku na organismus, ale také zjištění dalších farmakokinetických vlastností léčiva a v neposlední řadě také ovlivnění léčiva probíhající nemocí u daného jedince, kterému byla léčivá látka poskytnuta. Souběžně sledujeme hodnoty účinné látky a jejich metabolitů v plazmě.

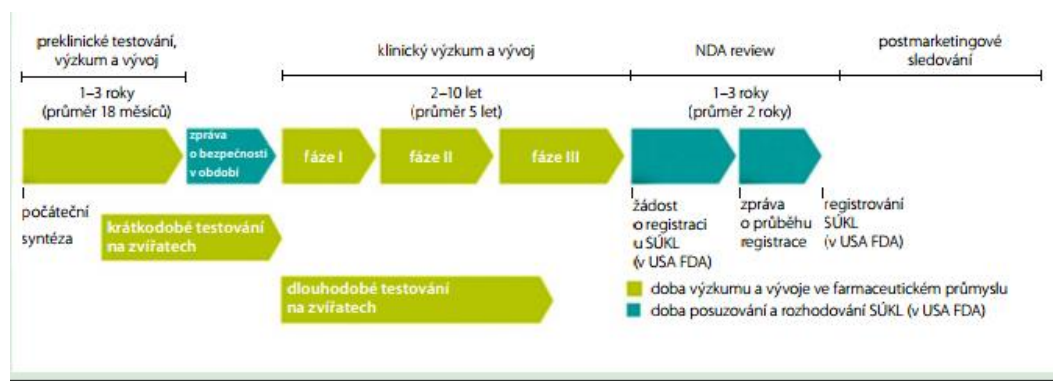
2.1.4.3 III. Fáze

Do této fáze se opět přestupuje jen za předpokladu dobrých výsledků z předešlé studie II. Fáze. Poté postupujeme metodou multicentrické studie, která je schopná prokázat účinnost hodnocené látky na velkém množství lidských jedinců s daným onemocněním. Tyto studie probíhají většinou s kontrolou, což znamená použití srovnávací látky jakou je například

placebo nebo již využívané léčivo pro léčbu dané nemoci. Kontrolou může být i zkoumaná látka v jiné dávce. Pacienti jsou zde také rozřazováni náhodným výběrem. Zároveň jsou zaslepené nebo dvojitě zaslepené, což znamená, že pacient, nebo pacient ani lékař neví, do jaké skupiny byl pacient zařazen. Tato fáze hlavně shromažďuje co nejvíce důležitých podkladů pro to, aby dané testované léčivo mohlo být registrováno. Hodnotí se zde zejména účinnost látky proti dané mu onemocnění, a její úspěšnost v jeho léčbě. V případě, že tato fáze potvrdí vhodnou míru nežádoucích účinků při dané dávce, která je farmakologicky a farmakokineticky účinná můžeme pokračovat registrací léčiva.

2.2 Registrace nového léčiva

Každý léčivý přípravek musí projít registrací. Tento postup je vymezen zákony o léčivech č. 378/2007 Sb. a vyhláškou č. 228/2008 Sb. o registraci léčivých přípravků. Registrace je velmi zdoluhavý proces, který je nezbytný pro zavedení léčiva na trh. Je k němu nutné předložit veškerou dokumentaci z výzkumu a vývoje léčiva, která se začíná tvořit již samotným objevem potencionálně aktivní látky. Tyto dokumenty tedy popisují všechny výsledky všech provedených testů dané látky samotné a později i v lékové formě, a to včetně záznamů z výsledků klinických studií I-III. Zhodnocení této dokumentace je velmi důležité pro prokazatelnost bezpečnosti a účinnosti léčivého přípravku. Podle něj je také tvořen seznam kontraindikací a dávek léčivého přípravku. To jsou vše informace, ze kterých se sestává příbalová informace daného léčiva, která je nezbytnou součástí každého léčivého přípravku, který je na trhu dostupný [57]. Výsledkem takzvané „rozhodnutí o registraci“ po které je možno daný přípravek uvést na trh a běžně jej využívat pro terapeutické účinky. Je možné jej nazvat také „poregistračním klinickým hodnocením“. Sledujeme zde případný výskyt známých i neznámých nežádoucích účinků, které pečlivě dokumentujeme. Mimo to sledujeme také úmrtnost neboli mortalitu pacientů v závislosti na používání toho léčiva [58].



Obrázek 5 Vývoj nového léčiva, Sočková, L., Demlová, R. 2015

2.3 Doplnky stravy

V dnešní době jsou doplňky stravy velmi rozšířenými preparáty pro, které mají sloužit k zlepšení postavy, hubnutí nebo například doplnění chybějících vitamínů, minerálů nebo stopových prvků. V posledních letech nastává velký rozmach obchodu s těmito produkty a to zejména kvůli velké škále reklam, směřovaných právě na užívání těchto látek.

Výroba těchto látek se nyní řídí zákonem o potravinách a jsou zde popsány jako typ potravin, které jsou určené k přímé spotřebě a to v případě, že obsahují velký podíl vitamínů, minerálů nebo i jiných látek, které pro organismus mají nějaký vyživující nebo také fyziologický účinek. Cílem těchto látek je tedy doplnit tělu potřebné látky, které se mu nedostávají v dostatečné míře z běžné stravy a tím zlepšují aktuální fyziologický stav [60].

Jednou z látek, které zcela jistě doplňky stravy nesmí obsahovat, jsou anabolické látky. Podle nového trestního zákoníku z roku 2010 patří jakákoliv manipulace s těmito látkami, jako je přechovávání tak nabízení na trhu a distribuce těchto látek, za jiným účelem než léčebným trestné. V České republice spadají doplňky stravy pod dohled Státní zemědělské a potravinářské inspekce (SZPI). V případě zjištění přítomnosti některých z výše zmíněných látek následuje proces ve spolupráci s Národní protidrogovou centrálou [61].

3 Testování látek s potenciálem k regeneraci tkáně a hojení ran

3.1 Lidská kůže

Kůže je hlavní cílovou tkání pro exogenní škodliviny a chrání nás před různými škodlivými riziky nebo UV zářením. Kůže se skládá z různých vrstev, kterými jsou *stratum corneum* (neživotaschopná), *epidermis* (životaschopná), *dermis* a hlubší podkožní tkáň. Nejvzdálenější epidermis se skládá ze šupinkovatého epitelu, který se skládá hlavně z keratinocytů. Tyto buňky se podílejí na terminální diferenciaci, která ústí až sestavě *stratum corneum*. Tato vrstva se skládá z koordinovaných keratinocytů a je velmi účinnou bariérou velkému množství látek, se kterými přijdeme každý den do styku. Kůže má dvě hlavní funkce a to ochranu před vysušením a ochrana před nebezpečím z životního prostředí jakými nejsou jen chemikálie, ale také bakterie nebo UV záření. Keratinocyty však hrají také velmi důležitou úlohu při imunitní odpovědi epidermis, protože právě ony vyvolávají imunitní odpověď, většinou ve formě zánětlivé reakce [62]. Komunikují s fibroblasty a endotelovými buňkami, ale také s buňkami imunitní odpovědi [63]. Podráždění pokožky se pak projevuje lokálně vzniklá, neimunogenní zánětlivá reakce, která se objeví téměř ihned po kontaktu s danou látkou.

Chemické látky se dosud testují, a dráždivé potenciály jsou stále vyhodnocovány testem na zvířatech. Aplikujeme tedy danou látku, a pozorujeme viditelné změny jako je erytém nebo [64]. Nyní lze však tyto testy nahradit vhodnými testy *in vitro*. Pro tyto testy využíváme zejména organotypových kožních ekvivalentů, protože jsou velmi podobné konstituci lidské kůže. Iritace se velmi špatně hodnotí a to zejména kvůli nejasným mechanismům spuštění buněčné odezvy na podráždění.

3.1.1 Mechanismy vedoucí k podráždění kůže:

Každá chemická látka, která se užívá topicky, je potenciaálně více či méně dráždivá. To je způsobeno hlavně jejím molekulárním složením, konkrétně se tyto molekuly skládají z hydrofilní části a hydrofobní části. Tyto molekuly působí jako emulgátory a jsou schopny snižovat povrchové napětí a tvořit micely a jsou ve většině případů nezbytnou součástí každého topického léčivého přípravku nebo kosmetiky. Mohou také interagovat s lipidy přirozeně se vyskytujícími na kůži, proto využití surfaktantů i emulgátorů může vyvolat podráždění kůže [65].

Všechny xenobiotika, v této formě nejprve způsobují narušení funkce bariéry *stratum corneum* a sekundárně vytváří dráždivý potenciál na buňkách pokožky.

Odumřelé keratinocyty obsahují velké množství keratinu a jsou propojeny těsnými spoji s desmosomy, intercelulární prostor je potom vyplněn takzvaným lipidovým cementem. Ten se skládá z různých lipidů, hlavně ceramidů, ale také z neutrálních látek jako jsou cholesteroly, jejich esterů nebo volných mastných kyselin [66].

Dráždivé látky způsobují hlavně delipidaci a denaturaci kožních bílkovin. To způsobuje změnu ve složení lipidové stěny a narušuje tak funkčnost této ochranné bariéry [69]. Povrchově aktivní látky tedy narušují buněčné membrány kožních buněk, což může vést k uvolnění cytoplasmy [67].

Cytoplasma keratinocytů všech dermálních buněk obsahuje prozánětlivý cytokin interleukin 1- α (IL – 1- α), který indukuje zánětlivou reakci, kdy tento interleukin pak indukuje expresi dalších prozánětlivých cytokinů jako je interleukin 6 (IL-6) nebo interleukin 8 (IL-8) a fosfolipasu A2 (PLA2) [68]. Podráždění membrány však je možné vyvolat například také velkým poškozením keratinocytů, protože ne vždy dochází k vzniku zánětlivé reakce. Jako příklad může být spouštěčem oxidační stres po podráždění [69].

Keratinocyty produkují reaktivní druhy kyslíku (ROS), které způsobují právě oxidační stres. ROS potom fungují jak druzí poslové a reagují na úrovni aktivity fosforylovaných

proteinů a proteinové kinázy [63]. Proto tyto buňky však mohou také způsobit poškození oxidačních nukleových kyselin, proteinů, membránových lipidů

Testovací modely k hodnocení podráždění pokožky *in vitro* využívají k popisu působení chemických látek a jejich mechanismy obecné zásady toxikologie. Tato biologická aktivita závisí na mnoha faktorech, jako je koncentrace chemikálie, doba expozice, specifita exponovaného místa nebo rychlost penetrace a vnitřní toxický potenciál látky. Nejhůře se stanovuje právě míra penetrace a dráždivý potenciál látky. Tyto parametry je stále nutno stanovovat experimentálně.

3.2 Ekvivalent lidské kůže

Jedná se způsob výroby obdoby lidské kůže a to pomocí organotypní ko – kultivace. Je složená z lidských dermálních fibroblastů v matrici obsahující kolagen a je překryta lidskými keratinocyty – ty tvoří vrstvenou epidermis. Tento modelový systém se využívá jako model pro testování dermatotoxicity *in vitro* a studium účinků testovaných látek, které se aplikují topicky na kůži vystavenou vzduchu. Pro hodnocení viability používáme kolorimetrický test MTT a to pro zjištění mitochondriální funkce hodnotíme také na čase a dávce závislé postupné uvolňování prozánětlivých mediátorů jako jsou prostaglandin E2, prostacyklinu nebo (IL-1 α). Tyto organotypové kožní kultury lze využívat jako modelový systém pro studium některých aspektů chemicky indukovaného kožního podráždění. Na základě prováděných studií asi 30 krát propustnější než lidská kůže. Je samozřejmé, že je nutné, aby údaje z uměle vytvořených modelů kůže korelovaly s údaji na kůži lidské. Proto se tyto modely neustále vyvíjejí a upravují tak, aby údaje byly co nejpodobnější a tak byly také spolehlivé [70].

3.3 Tkáňové modely

Využívá se zejména kombinace keratinocytů a fibroblastů za účelem vyhodnotit dráždivé potenciály látek, biologicky aktivních substancí nebo kosmetiky. Keratinocyty hrají velmi důležitou roli při iniciaci a regulaci podráždění pokožky [65]. Epidermální modely kůže jsou velmi rozšířené, a pro testy *in vitro* jsou nezbytné. Při testování se upřednostňují před mnohvrstevných keratinocytových kultur spíše modely simulující kůži a to zejména pro nízkou rozpustnost ve vodě a možnost testovat různé koncentrace látek a sledovat případné vyvolané dráždivé odpovědi v mnohvrstevných keratinocytech. Výsledky z mnohvrstevných buněčných linií je velmi obtížné dát do souvislosti ke studii *in vivo* a je složité je dobře interpretovat. Dva základní druhy rekonstituované kůže jsou epidermální ekvivalenty a plně ekvivalenty kůže s vícevrstevnými lidskými keratinocyty, které jsou pěstované na

fibroblastech. Epidermální ekvivalenty se skládají z vícevrstevných variací lidských keratinocytů a jsou pěstované na různých syntetických matricích. Plné ekvivalenty kůže se naopak pěstují na kolagenových matricích ve vzdušném médiu. Rozhraní keratinocytů obou těchto systémů simuluje organizovaný *stratum corneum*, a tak se podobá funkční bariéře.

Rekonstituované lidské epidermální modely kůže pro testování *in vitro* se velmi rychle rozvíjí a objevuje se stále více distributorů a mezi ty nevyužívanější a nejznámější patří zejména EpiDerm, Episkin, Apligraf a SkinEthic.

Všechny tyto modely se skládají z primárních keratinocytů na matricích obou dermálních složek nebo na nebiologické matrici.

Keratinocyty jsou schopny se plně diferencovat a tvořit tak rekonstituovanou pokožku, není tomu tak ale u jejich izolované formy.

In vitro modely pro studium penetrace do lidské kůže jsou velmi důležité pro veškerý výzkum a vývoj pro farmaceutický i kosmetický průmysl a právě lidská kůže souží jako vůbec nejlepší možný model pro tyto *in vitro* studie. Lidkou kůži však nelze běžně používat pro jakékoliv výzkumy a to zejména kvůli právnímu a etickému hledisku, ale kvůli zvyšující se poptávce právě po těchto modelech jsou dostupné zdroje hlídány a omezeny předpisy. Jsou také stanoveny komerčně dostupné modely kůže [71].

Nejdříve hodnotíme morfologické změny. Ty hodnotíme jak makroskopicky tak mikroskopicky. Nehodnotíme tedy jen vzhled, ale také detaily ultrastruktury modelů.

Velmi důležité je také určit složení kůže a to zejména z hlediska složení lipidických složek. Toto složení určuje nejen propustnost a flexibilitu, ale také propustnost biologicky aktivních látek. Právě proto modely kůže musí odpovídat v co nejvíce bodech kůži skutečné, a tak se co nejvíce přiblížit složení nativní kůže. Toto složení určíme většinou analytickými metodami jako je tenkovrstvá chromatografie (TLC) nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) [72].

Důležité jsou také biochemické markery, které nám přibližují proces diferenciací. Patří zde především bílkoviny, jejich prekurzory a enzymy. V ideálním případě by měly odpovídat těm, které se fyziologicky nacházejí v přirozené tkáni.

3.3.1 Testované parametry:

3.3.1.1 Fototoxická

Látku, o které víme, že je fototoxická aplikujeme na model a ten potom vystavíme UV záření o různých vlnových délkách, a sledujeme vyvolání fototoxické reakce.

3.3.1.2 Dráždivost

Na kožní model aplikujeme látky dráždivého charakteru a sledujeme biochemické a histologické změny modelu. Pro tyto testy se využívá například modelu Epiderm.

3.3.1.3 Údaje o transportu

Tento parametr určuje schopnost absorpce léčivého přípravku kůží. Jeho absorbované množství do modelu se měří v závislosti na čase. Tímto parametrem stanovujeme především funkci bariéry

3.3.1.4 Korozivita

Model vystavíme korozivní látce a data vyhodnocujeme experimentálně.

3.4 Konkrétní typy kožních modelů

3.4.1 SkinEthic

Jedná se o francouzskou firmu, která byla založena v roce 2006 a zabývá se výrobou modely umělé lidské kůže.

Tento model je morfologicky velmi podobný lidské kůži a všem jejím hlavním strukturám, které již byly zmíněny výše [73]. Strukturně obsahuje desmozomy dále keratohyalinové granule, lamelární granule, hemidesmosomy s plaky, komponenty *lamina dense* a kotevní vlákna, tato struktura je však podobnější spíše podkladové membráně. Tyto struktury byly potvrzeny elektronovou mikroskopií [74].

Od pravé tkáně se liší hlavně skutečností, že tento model v celé struktuře obsahuje lipidové kapénky, a jejich největší množství se nacházelo v bazální vrstvě. Byly objeveny také střídavě elektronově husté a řídké lipidové lamelární plochy a to v mezibuněčném prostoru a prostotru stratum corneum

Velmi důležitou součástí je přesné složení lipidů v daném systému. Mezi ty nejdůležitější patří aramidy, ty se čísly dle jejich polarit od čísla 1 výš. Jejich prekurzory jsou gukosylceramidy.

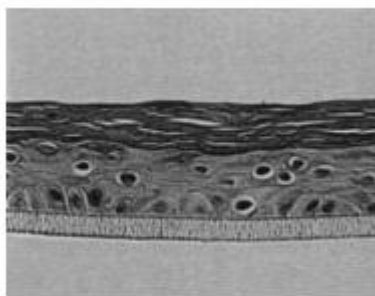
V tomto kožním modelu je vyšší obsah ceramidu 2 oproti skutečné koncentraci v tkáni a aramid 7 naopak chybí [72].

Biochemické markery obsažené v modelu jsou keratin 1, keratin 10, SPRR, SPRR3, loricrin, involucrin a transglutaminasy.

Z toho loricrin v granulované vrstvě a involucrin a transglutaminasy v suprabazálních vrstvách, jako je tomu fyziologicky v lidské kůži. Navíc však tento model obsahuje keratin 6 a antilekoproteinasový kožní derivát (SKALP), které se v ní neobjevují. V tomto modelu se vyskytují kvůli specifickým účinkům. SKALP působí jako epiteliální inhibitor serinové

proteázy v psoriatické epidermis. V lidské kůži se nachází pouze v případě diferenciaci psoriázy, ke které dochází při hojení ran, ale zároveň působí také protizánětlivě. Loricin je na prolin bohatý protein (SPRR) a involucrin je prekurzor pro bílkoviny, ty jsou vsítěny za katalýzy enzymem transglutaminasou, které jsou obdobou etap keratinizace, to napomáhá vytvoření správné a kompletní bariéry [75]. Pro detekci fytotoxicity využívá uvolnění LDH jako markeru pro viabilitu buněk a zvyšuje uvolňování interleukinu 8 a expresi jeho mRNA [76].

Tento model je funkčně velmi podobný lidské kůži a to v mnoha ohledech a testovaných směrech. Jedinou nevýhodou je značně vyšší propustnost a tedy menší bariérová schopnost oproti lidské kůži, tento model je proto nepoužitelný pro testování transportních dat, které nelze přenést na skutečnou lidskou kůži. Ostatní testované parametry však tímto směrem jsou velmi dobře reprodukovatelné.



Obrázek 6 Morfologie modelu SkinEthic, Cohen, C. et. al. 2002

3.4.2 EpiSkin

Tento model se komerčně prodává ve formě 12 jamkových destiček a obsahuje bovinní kolagenové matrice typu I, které představují dermis pokryté tenkým filmem lidského kolagenu. Na tento systém po dvou týdnech umístíme stratifikovanou diferencovanou epidermis [78]. Hlavní využití tohoto modelu je pro testování dráždivých (iritujících) látek. Pro testování penetrace léčiva do kůže je potřeba speciální úpravy a to v podobě kultivace keratinocytů před vlastním přenosem do připraveného kolagenového substrátu [79].

Morfologicky obsahuje všechny hladiny kožních vrstev, liší se pouze model modifikovaný pro testy penetrace léčiva, které obsahují větší počet buněčných vrstev ve srovnání s běžnými fyziologickými preparáty *stratum corneum*. Buňky v tomto modelu zaujímají také jiné uspořádání oproti nativnímu modelu a to zejména v suprabazální oblasti, kde buňky mají spíše tvar kubický a v horních vrstvách jsou naopak spíše ploché.

Složení lipidů v tomto modelu je velmi obdobné jako u lidské kůže, srovnatelné je množství fosfolipidů tak aramidů a glukosfingolipidů. To platí pro základní i upravený model,

až na fosfolipidy, které jsou v upraveném modelu nižší. Avšak chyběl ceramid 7, ceramidy 5 a 6 byly neobvykle nízké a ceramid 2 se vyskytoval v mnohem větším množství. Znatelný rozdíl je také v množství volných mastných kyselin a esterů cholesterolu [74]. Tento model obsahuje velké množství některých tříd lipidů, které je nevysvětlitelné a neví se, zda by to mohlo ovlivnit bariérové vlastnosti toho modelu, protože bariérové vlastnosti jsou přisuzovány spíše celkovému obsahu lipidů než vyššímu obsahu lipidů některých jednotlivých tříd.

Obsaženými biochemickými markery jsou keratin, keratin 10, keratin 6, SKALP, SPRR2, SPRR3, involucrin a transglutaminasy.

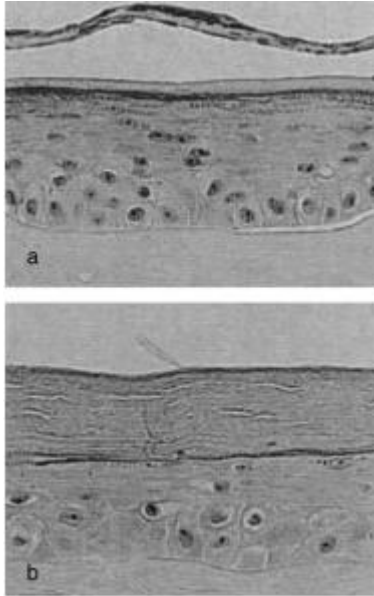
Keratin 1 a 10 jsou obsaženy ve vrstvách *spinosum* a *stratum granulosum*, keratin 6 ve všech vrstvách stejně jako involucrin a transglutamázy. SKALP a SPRR2, SPRR3 také ve *stratum granulosum*. Loricrin se v tomto modelu nevyskytuje

Fototoxické látky je možno identifikovat pomocí detekce uvolněného interleukinu 1 releasu, který se vyskytuje právě při kontaktu modelu s fototoxickou látkou [80].

Jako u předchozího modelu je potřeba testovat také reakci na podráždění a její srovnání s nativní kůží. V těchto testech byl model vystaven různým povrchově aktivním látkám a sledovali jsme jak uvolňování cytokinů tak interleukinů (IL-1 α) popřípadě poškození bariéry, což můžeme sledovat například pomocí fluoresceinu, který je velmi dobrým detektorem pro změny propustnosti. Výsledky těchto testů potvrdily, že tato bariéra je méně citlivá, než nativní bariéra *in vivo*. Další možností testování je vystavení modelu ozonu a sledovat pak tvorbu proteinových karbonylů pomocí ELISA. V tomto testu potom hodnotíme oxidační stres a to za pomoci fluorogenní sondy. Tento test vykazoval srovnatelné výsledky jako při použití lidských keratinocytů.

Viabilita buněk se zde opět posuzuje pomocí LDH testu, MTT testu a sledováním IL-1 α . Životaschopnost buněk byla testována po použití různých kosmetických přípravků a výsledky opět byly srovnatelné s testy *in vivo* [81].

Dále byla testována permeabilita a celková propustnost pro biologicky aktivní látky po aplikaci na tento model. Výsledky se lišili s použitými látkami, nicméně většinou korelovaly s testy *in vivo*. Značnou nevýhodu však představuje poměrně rychlé dosažení transportního maxima proti lidské kůži [82].



Obrázek 7 Morfoloie modelů EpiSkin,
 a) obyčejný, b) modifikovaný pro penetrační testy
 Portes, P. et. al. 2002.

3.4.3 Epiderm

Společnost, která vyrábí tento model, nabízí také modifikaci tohoto modelu a to například s obsahem melanocytů, rekonstruovaný rohový epitel a další.

Tento model je popisován jak modelem normálních lidských epidermálních keratinocytů, které byly kultivovány tak, aby vytvářely vícevrstevný vysoce diferenciovaný model pokožky. Tento model je opět srovnatelný s lidskou epidermis, což je cíl těchto dermálních *in vitro* modelů. Největším rozdílem je pěstování keratinocytů na polykarbonátových filtrech a absence kotvení kůže a epidermis jako je tomu v nativní tkáni.

Tento model má širokou škálu počtu vrstev viabilních buněk, což se odvíjí od typu modelu a vede taky k různým epidermálním tloušťkám a to od 28 až do 100nm. Podkladová membrána se skládá ze hemidesmosomů u většiny modelů.

Buňky mají kulatý až sloupcový tvar a kultury neobsahují lipidové kapénky jako nativní preparát. Obsah lipidů se skoro neliší, ale v každém modelu je variabilní. Počet vrstev i jejich uspořádání je velmi podobný jako v lidské kůži

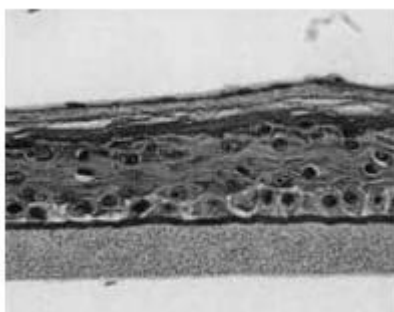
Biochemické markery zde jsou keratin 1, keratin 10, keratin 6, SKALP, SPRR2 dále SPRR3, loricrin, involucrin, transglutaminasa

Z toho keratiny i transglutaminasa a involucrin jsou obsaženy ve všech suprabazálních vrstvách, SKALP v *stratum spinosum*, SPRR2 ve vrstvě *stratum granulosum*, ale není obsažen v modelu pro testování penetrace, loricrin také ve vrstvě *stratum granulosum* [83].

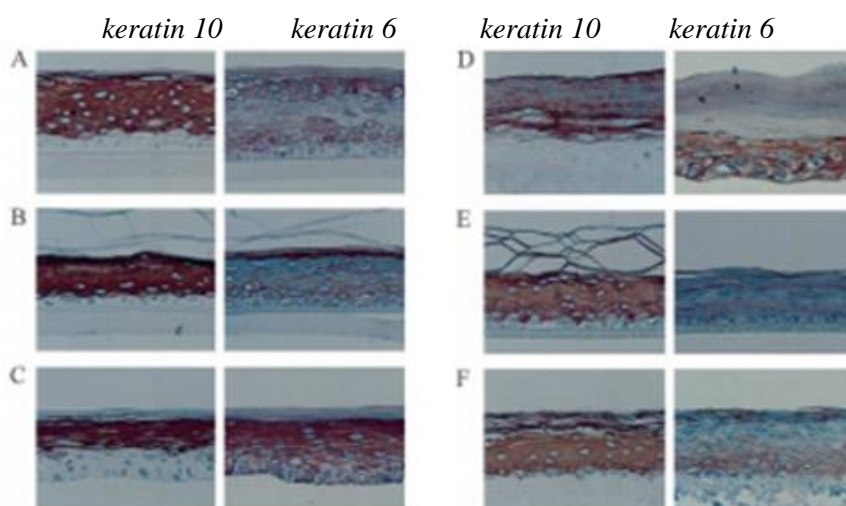
Tento model vykazoval opět velmi dobrou korelaci v porovnání s lidskou kůží. Biologická dostupnost byla také srovnatelná s testy *in vivo*, avšak opět bylo dříve dosaženo transportního maxima [84].

Všechny zmíněné modely kůže jsou velmi blízkou obdobou lidské kůže s odlišnostmi jen v některých aspektech, velmi podobné je také biochemické i morfologické složení. Využití mají nejen při testování toxicity nebo fototoxicity, ale do jisté míry také pro testování transportu léčiv a jejich studie. I když jsou tyto modely ve většině případů propustnější než lidská kůže, což je dáno konzistenčními vlastnostmi tkání, je lidská kůže velmi variabilní a proto se přesto využívají.

Nižší bariérové vlastnosti modelů kůže jsou přisuzovány zejména deskvamaci a nekeratinizovaným mikroskopickým ložiskům [86]. Tento problém lze částečně řešit pomocí využití dermis *in vitro*, čímž zahrneme celkovou tloušťku pokožky [85].



Obrázek 8 Morfologie modelu Epiderm,
Dossou, K.G. et al. 1994



Obrázek 9 Porovnání morfologií používaných tkáňových modelů

Imunohistochemické barvení keratinu 10 a 6 ve svislé poloze se znatelnou expresí keratinu 10 ve všech suprabazálních vrstvách, a) EpiDerm, b) EPI-606A, c) EpiSkin, d) EpiSkin modifikovaný, e) SkinEthic, f) RE-RED, Rouget, r. et al. 1994

4 Testování látek s protizánětlivým účinkem

4.1 Aktivace imunitního systému

Hlavní funkcí imunitního systému je především obrana organismu před cizorodými látkami jako jsou mikroorganismy nebo viry, ale i látky toxické, nebo jiné, které mají nežádoucí negativní účinek na organismus. Mechanismy protilátkou nebo buněčné imunity působí zejména proti látkám chovající se jako antigeny, nebo je nesou na svém povrchu. Podle toho, zda dochází k reakci organismu na konkrétní antigen nebo dochází k nespecifické obraně organismu jí, můžeme rozdělit na specifickou a nespecifickou. Nespecifická imunita je vrozená a patří zde například bariérové mechanismy (kůže) a zahrnuje fagocytární schopnosti leukocytů a monocytů - makrofágového systému. Specifická imunita potom zahrnuje reakci organismu proti konkrétnímu antigenu, se kterým se organismus již v minulosti setkal. Tu zajišťují T a B-lymfocyty, kdy B-lymfocyty tvoří plazmatické buňky, odpovědné za tvorbu protilátek a T-lymfocyty zprostředkovávají buněčnou odpověď. Dochází k ní zejména ve chvíli, kdy je narušeno vnitřní prostředí organismu. Tento stav vede ke kaskádě reakcí, kterou spouští imunitní systém, který následně produkuje cytokiny [87].

4.2 Markery zánětu

Pro určení rozsahu zánětlivé reakce organismu se v klinické praxi používají zejména stanovení IL-6, prokalcitoninu (PCT) a proteiny akutní fáze (APP), mezi které patří například C-reaktivní protein (CRP). Dochází ale také k syntéze mnoha dalších bílkovin, jako jsou sérum protein amyloid A, kyselý alfa glykoprotein, haptoglobin, fibrinogen a mnoho dalších. K jejich syntéze dochází převážně v játrech. Tyto markery se vyznačují hlavně tím, že v prvních dnech akutní fáze zvyšují svou detekovatelnou koncentraci až o 25%, ale v případě například C reaktivního proteinu mnohokrát více [88].

4.2.1 Interleukin 6

Je zejména protizánětlivým cytokinem, který příznivě ovlivňuje organismus a indukuje syntézu proteinů akutní fáze v jaterních buňkách, stimuluje B-lymfocyty a tím také reguluje protilátkovou odpověď.

Jeho zdrojem jsou zejména makrofágy a polymorfonukleární leukocyty, ale také T-lymfocyty. Jeho uplatnění není však pouze při zánětlivých reakcích, ale také v patogenezi nádorových onemocnění například mnohočetného myelomu, nebo některých chronických zánětlivých chorob jako je například revmatoidní artritid. Jen tento interleukin je schopen zobrazit celkový pohled na reakci akutní fáze spolu se změnami jaterních proteinů. Je hlavním regulátorem pro pozitivní i negativní APP, ale i pro syntézu CRP.

4.2.2 Prokalcitonin PCT

Za fyziologických okolností jej produkuje štítná žláza C-buňkami. Vzniká konkrétně proteolýzou příslušného prohormonu. Po tom, co je intracelulárně rozštěpen z něj dále vznikají: kalcitonin, N-terminální fragment prokalcitoninu a C-terminální fragment katakalcinu. Za fyziologických podmínek dochází k úplné přeměně na kalcitonin a nedochází k uvolnění prokalcitoninu [89]. Jeho syntézu stimulují zejména bakteriální endotoxiny, cytokiny, systémové mykotické a jiné infekce. Jeho velký koncentrační vzestup mohou indukovat například IL-6 spolu s TNF- α a tento vzestup lze zaznamenat ještě před vzrůstem hladiny CRP [90].

4.2.3 CRP

Jedná se o protein akutní fáze (APP). Je to vlastně γ -globulin, který je syntetizován v játrech.

Je velmi vhodným indikátorem průběhu zánětlivé reakce v organismu díky jeho dobré sledovatelnosti, ale také díky tomu, že v patologických stavech stoupá až na stonásobky své normální hodnoty v organismu. Rozhodující pro to, jestli bude syntetizován nebo ne, řídí IL-6, který je produkován hepatocyty v játrech [91].

Je jedním z dominantních proteinů akutní fáze a jeho koncentrace se může zvýšit až tisíckrát. Více vzrůstá v případě bakteriálních infekcí, méně potom u mykobakteriálních a parazitárních infekcí. K vzestupu jeho koncentrace dochází v rámci 6-10 hodin, ale maximálně do 48 hodin. Hladina se do fyziologických hodnot vrazí také poměrně rychle a to v rámci zhruba 4 dnů [92].

4.2.4 TNF α (tumor nekrotizující faktor α)

Jeho biologický účinek spořívá zejména v indukci prozánětlivých cytokinů jako jsou IL-1, IL6 a další), ale také aktivuje neutrofilů, eozinofilů a indukuje tvorbu proteinů akutní fáze v játrech a současně stimuluje aktivaci a diferenciaci osteoklastů a snižuje jejich úmrtnost. Kromě toho zvyšuje také permeabilitu endotelu, která je nezbytná pro usnadnění migrace leukocytů. Zvyšuje také expresi adhezivních molekul na endoteliálních buňkách a leukocytech je zodpovědný za uvolnění prokoagulačních látek a potlačuje aktivitu lipoproteinové lipázy a to v adipocytech.

Běžně se mechanismus zánětlivé reakce skládá ze třech fází. Nejprve dochází k akutní cévní odpovědi, která je spojena zejména s vazodilací, zvýšením permeability žilní stěny a neutrofilní infiltrací. Tato fáze trvá pouze 24 hodin. Ve druhé fázi, která trvá několik

dní, dochází k buněčné odpovědi, a infiltraci monocytů a lymfocytů. Poslední fáze zahrnuje chronickou buněčnou odpověď, kdy dochází k destrukci a následné reparaci poškozené tkáně.

U chronických zánětů je právě TNF α faktorem, který způsobuje stálost zánětlivého procesu a tak brání regeneraci a zahojení. Právě z toho důvodu by blokáda tohoto faktoru měla být stěžejním mechanismem pro léčbu zánětlivých stavů.

Mezi jednu z nejvyužívanějších látek pro blokádu TNF- α dnes patří Infliximab, u které sledujeme využití zejména pro Crohnovu nemoc, Revmatoidní artritidu nebo ankylozující spondylartritidu, ale nyní se studuje jeho účinek i na zánět tračnicku [93].

4.2.5 β - glukany

Jedná se konkrétně o polymer β -glukosy s fyziologickým účinkem. Hromadně se označují jako modifikátory biologické odpovědi a podle jejich mechanismu účinku je lze dělit mezi cytokiny, které jsou zprostředkovateli mezi buňkami imunitního systému a imunomodulátory které imunitní systém ovlivňují a to pozitivně nebo negativně. Jejich účinek spočívá zejména ve zvýšení fagocytární a proliferativní aktivity fagocytů. Jejich účinek lze pozorovat také na makrofázích, které jsou součástí nespecifického imunitního systému [94].

4.3 Metody pro stanovení protizánětlivých a protivirových markerů

Pro hodnocení těchto markerů se využívá zejména metody ELISA (enzym-linked immunosorbent assay), PCR a semikvantitativní PCR [95].

4.3.1 ELISA test

Koncentrace cytokinů hodnotíme v médiu odebraném z kultivovaných buněk, které byly ovlivněny testovanou látkou[96].

Princip toho testu spočívá ve schopnosti proteinů vázat se na pevný povrch (polyesterová mikrotitrační destička). To se může dít dvěma způsoby, a to nespecificky adsorpcí na povrch, nebo specificky, kdy se specificky uchytí pomocí další protilátky specifické k danému antigenu, toho využívá „sandwichová“ ELISA. Ve chvíli, kdy je antigen navázán, přidáme sérum nebo supernatant, jehož součástí je specifická protilátka, na kterou se váže antigen. Ten se značí enzymem, kterým může být například křenuvá peroxidasa nebo alkalická fosfatasa a takto značený se váže s protilátkou. Přidáním látky reagující se značícím enzymem dochází k chromogenní reakci, kterou vznikne barevný produkt, a tím vyvoláme detekovatelný signál, který nám umožňuje kvantitativní analýzu protilátky ve vzorku, a to na základě jeho intenzity [97].

„Sandwichová“ ELISA využívá dvou protilátek, kdy jedna se váže na antigen a zároveň na destičku a druhá se váže k antigenu a sekundární protilátce, která je značená enzymem. V případě, že je standartní antigen v dostatečné kvalitě, je tato metoda velmi přesná a rychlá.

Kompetitivní ELISA se využívá jen tehdy, jestliže nejsou k dispozici dvě protilátky, které by se vázaly současně na cílový antigen. Nazývá se kompetitivní právě kvůli průběhu testu, protože vložená protilátka se naváže na destičku a po přidání antigenu dochází k soutěžení (kompetici) o vazebné místo mezi protilátkou, která se nachází volně v roztoku, a tou, která je již navázaná na destičce. Platí zde, opak, než je tomu u sandwichové ELISY, protože zde platí nepřímá úměra při vyhodnocování signálu, a tudíž s rostoucí koncentrací antigenu ve vzorku se snižuje intenzita detekovaného signálu barevného produktu z chromogenní reakce [98, 99, 100].

4.3.2 PCR

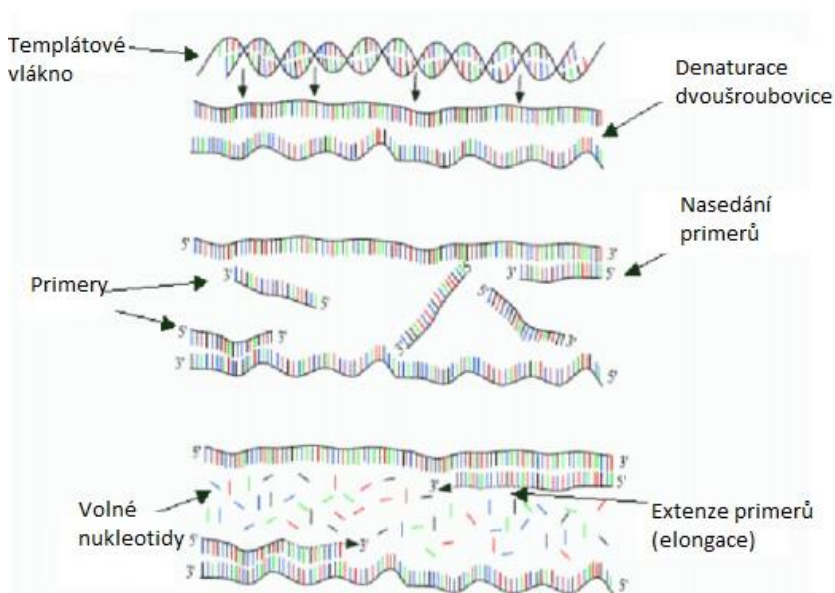
Principem je amplifikace specifické sekvence DNA, která je komplementární k hybridizační sondě. V testovaném úseku DNA nesmí docházet k bodovým mutacím.

Testovanou DNA je třeba nejdříve tepelně denaturovat a to při teplotě 90°C. Při této teplotě dochází k rozvolňování vodíkových můstků, které spojují purinové a pyrimidinové báze, které jsou komplementární k nukleotidům a dělí tak jednotlivé řetězce DNA. Tímto docílíme jednořetězcové DNA, která v další fázi vytváří matrix pro syntézu nového komplementárního řetězce. To se děje enzymatickým procesem, který je zahájen nasednutím „primeru“, (oligonuklotidů) a od jejich 3' konce začíná syntéza nového řetězce, a k jeho nasednutí dochází v místě komplementární sekvence matricového řetězce. To probíhá při teplotě 60°C. Jednotlivé nukleotidy se potom řadí do řetězce dle komplementarity bazí. Polymerasa zde zajišťuje propojení cukrů fosfodiesterickou vazbou do hlavního řetězce. Pro polymeraci řetězce je však optimální teplota 72°C a výsledkem je nově vytvořený úsek dvouřetězcové DNA. Dále následuje druhý cyklus, který opět začíná denurací tentokrát již zdvojeného řetězce DNA, kde opět nasedají od 3' konce a vzniknou tak nové 4 molekuly řetězce DNA. Z toho vyplývá, že každým dalším cyklem (cyklů může být až 40) dochází ke zdvojnásobení stávajících dvouřetězcových DNA [101].

Určujeme zde empiricky amplifikační profil PCR, který kromě počtu cyklů zahrnuje také teplotní a časové údaje o průběhu jednotlivých fází cyklů, ale také údaje o teplotních změnách v jednotlivých cyklech a další [102].

Dalším typem je Nested PCR, což je modifikací stávající metody PCR. Rozdíl je v amplifikaci, která zde má dvě fáze, v první díky jedné dvojici primerů dosáhneme delší sekvence nukleové kyseliny, které jsou přeneseny k vnitřně specifickému úseku dvouřetězcové DNA, a poté již následuje druhá fáze, kdy amplifikujeme krátkou vnitřní sekvenci. Produkt poté detekujeme pomocí gelové elektroforézy, tato metoda je vysoce specifická a má velkou výtěžnost [103].

Tato metoda se velmi využívá i pro testování přítomnosti virů, a tak je nezbytnou součástí sledování látek s protivirovým efektem, kdy sledujeme jeho přítomnost [104].



Obrázek 10 Reakce PCR, Zorníková, G., 2012

5 Testování cytostatik

Regulaci buněčného cyklu ovlivňují zejména speciální proteinové komplexy, které obsahují dvě základní podjednotky, kterými jsou (cykliny cyklin-dependentní kinasy). Tyto sloučeniny také zodpovídají za organizovaný přechod buněčného bujení z první do druhé fáze. Obecně somatické buňky absolvují postupně čtyři fáze, které jsou nutné pro jejich reprodukci: syntéza DNA, G1 fáze, buněčné dělení a G2 fáze. G1 a G2 fáze jsou různě dlouhé fáze, které probíhají mezi syntézou DNA a buněčným dělením. Právě v G1 se aktivně uplatňují cykliny D, které tvoří funkční komplexy s CDK4 a CDK6, ale také cykliny C, které interagují s CDK8 nebo cyklin E spolu s CDK2. Tyto proteiny se uplatňují zejména na fosforylaci dalších proteinů, bez kterých by nedocházelo ke G2 fázi, ale také tvoří stavební proteiny, ze kterých se skládá mitotický aparát. Pro regulaci těchto proteinů využíváme takzvané CDK inhibitory, které inhibují cyklinové komplexy a zastavují buněčný cyklus v G1

nebo G2 fázi. Tyto inhibitory se však podílejí také na diferenciaci, stárnutí buňky, ale i na její apoptóze. K jejich inhibici lze využít například syntetické inhibitory CDK.

Protinádorové látky mohou inhibovat nádorové linie mnoha způsoby. Nejčastěji je to právě inhibice různých cyklín dependentních kinas. Stěžním je také inhibice cAMP, cGMP nebo protein kinasy a tak ovlivňuje buněčný cyklus dané nádorové linie, nebo způsobuje řízenou buněčnou smrt. Cílem je snížit CDK4 aktivitu, inhibovat CDK7 a CDK9, což jsou kinasy aktivující RNA syntézu.

Účinnost protinádorových léčiv stanovujeme buď na speciálních nádorových liniích vyizolovaných například z myší, nebo také na izolovaných buňkách konkrétního pacienta.

Sledujeme zejména cytotoxicitu těchto léčiv, pomocí cytotoxických testů jako je MTT test [105].

6 Závěr

Metody pro stanovení cytotoxicity *in vitro* jsou velmi důležité pro výzkum léčiv a jsou zásadní i pro jejich vývoj. Léčiva nesmí být pro organismus toxická, a tyto testy jsou hlavním parametrem, který určuje, zda je možné danou novou látku uvést na trh a bezpečně ji používat.

Využíváme zde různých metod stanovující toxicitu *in vitro*, která poukazuje na cytotoxicitu testované látky. Pro tyto testy jsou velmi důležité modely složené z buněčných linií, které se mohou skládat z lidských nebo zvířecích buněk. V dnešní době je však možné testovat i na konkrétní kultuře ze specifických buněk, které byly izolovány od pacienta, nebo se může jednat o buňky určitého typu (například hepatocyty). Této možnosti využíváme zejména při testování cytostatik, kde je třeba velmi individuální přístup a stanovení účinné léčby, právě pro daného pacienta s určitým typem nádorových buněk.

Rozšiřuje se také využívání buněčných kultur simulující lidskou kůži, které využíváme zejména pro testování látek působících přes kůži, mezi které patří dermatologická léčiva nebo kosmetické přípravky. Těmito testy lze stanovit i jiné parametry, jako je například penetrace. Tou lze stanovit schopnost látky vstřebávat se přes kůži, což je pro její působení nezbytné. Dalšími parametry může být například korozivita nebo dráždivost. Bez těchto modelů by se dnes neobešel ani kosmetický průmysl, který je hojně využívá pro testování přípravků před uvedením na trh, a to zejména díky rychlosti provedení, ale také šetrnosti ke zvířatům. Tyto modely mají za úkol co nejvíce napodobit lidskou kůži a všechny vrstvy, ze kterých se fyziologicky skládá.

Mimo jiné se také v dnešní době rozvíjí poměrně nové odvětví testování, kterým je počítačové modelování. Tyto testy se nazývají *in silico* a využívají schopnosti počítačové simulace působení látky na systém. Tento systém pracuje zejména s parametry, které jsou o dané látce již známé, a využívá je pro předpoklad působení látky. I tato metoda může využít některých výsledků stanovených pomocí testů *in vitro*.

Dále se zabývá hodnocením pro a protizánětlivých markerů (cytokinů). Ty lze detekovat různými metodami. Velmi často využívanou je právě zmiňovaná ELISA, kterou můžeme rozlišit na dva základní typy, a to podle způsobu jejího provedení. Volba mezi nimi závisí hlavně na dostupnosti testovaných protilátek. Důležitá je ale také metoda PCR, která je využívána pro detekci virů.

7 SEZNAMCITACÍ

1. **KNEJZLÍK, Z., RUML, T.** Nepříznivý vliv xenobiotik na lidský organismus a metody jeho testování. *Chemické Listy*. 1999, 93, s. 608-609.
2. **EISENBRAND, G., POOL-ZOBEL, B., BAKER, V., BALLS, M., BLAUBOER, B. J., BOOBISA, A., CARERE, A., KEVEKORDES, S., LHUGENOT, J. C., PIETERS, R., KLINER, J.** Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology*. 2002, 40, s. 190-193.
3. **KUBINCOVÁ, P., NOVÁK, J., SOVADINOVÁ, I.** Nový přístup při stanovení akutní systémové toxicity. *Chemické listy*. 2016, 110, s. 110-118.
4. **WATANNABE, M.** Required effort to evolve. Toxicity testing using in vitro methods. *AATEX*. 1995, 3, s. 81-84.
5. **BHANUSHALI, M., BAGALE V., SHIRODE A., JOSHI Y., 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, 1(1), s. 15-3.
6. **WHITEHEAD, A., STALLARD, N.** Opportunities for reduction in acute toxicity testing via improved design. *Alternatives to laboratory animals*. 2004, 32(2), s. 73-80.
7. **GENNARI, A., VAN DEN BERGHE, C., CASATI, S., CASTELL, J., CLEMEDSON, C., COECKE, S., COLOMBO, A., CURREN, R., DAL NEGRO, G., GOLDBERG, A., GOSMORE, C., HARTUNG, T., LANGEZAAL, I., LESSIGIARSKA, I., MAAS, W., MANGELSDORF, I., PARCHMENT, R., PRIETO, P., SINTES, J. R., RYAN, M., SCHMUCK, G., STITZEL, K., STOKES, W., VERICAT, J. A., GRIBALDO, L.** Strategies to replace in vivo acute systemic toxicity testing. *Alternatives to laboratory animals*. 2004, 32, s. 437-459.
8. **ALLEN, D. G., WATERS, M. D.** Reducing, Refining and Replacing the Use of Animals in Toxicity Testing. North Carolina, USA: The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2014. ISBN 978-1-84973-652-7.
9. **KADNÁROVÁ, H., LETAŠIOVÁ, S.** Alternative methods in toxicology. *Interdisciplinar Toxicology*. 2011, 4, s. 107.
10. **KUČERA, O., LOTKOVÁ, H., KŘIVÁKOVÁ, P., ROUŠAR, T., ČERVINKOVÁ, Z.** Model system for study of toxic Indry of hepatocytes in vitro. *Československá fyziologie*. 2006, 55, s. 103-110.

11. **BASKETTER, D., CLEWELL, H., KIMBER, I., ROSSI, A., BLAAUBOER, B., BURRIER, R., DANESHIAN, M., ESKES, C., GOLDBERG, A., HASIWA, N., HOFFMANN, S., JAWORSKA, J., KNUDSEN, T. B., LANDSIEDEL, R., LEIST, M., LOCKE, P., MAXWELL, G., MCKIM, J., MCVEY, E., OUÉDRAOGO, G., PATLEWICZ, G., PELKONEN, O., ROGGEN, E., ROVIDA, C., RUHDEL, I., SCHWARZ, M., SCHEPKY, A., SCHOETERS, G.** A roadmap for the development of alternative (non-animal) methods for systemic toxicity testing. *T4 reports*. 2012, 29(3), s. 91.
12. **RÁDL, S.** Jak se rodí lék aneb vybrané aspekty výzkumu a vývoje chemických léčiv. *Chemické Listy*. 2004, 98, s. 1073 – 1084.
13. **NIIMI, A. J.** Review of Biochemical Methods and Other Indicators to Assess Gisth Health in Aquatic Ecosystems Containing toxic Chemicals. *Journal of Great Lakes Research*. 1990, 16, s. 528-529.
14. **SPATZENEGGER, M., JAEGER, W.** Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *Drug metabolism reviews*. 1995, 27, s. 396-397.
15. **ELING, T. E., THOMPSON, D. C., FOUREMAN, G. L., CURTIS, J. F., HUGHES, M. F.** Prostaglandin H synthetase and xenobiotic oxidation. *Annual Review of pharmacology and toxicology*. 1990, 30, s. 1-45
16. **GUENGERICH, F. P., SHIMADA, T., HIROSHI, Y., MAYUMI, M., YILHARU, I., TOSHIFUMI, S., KAZUHIDE, I.** Role of different forms of cytochrome P450 in the activation of the promutagen 6-aminochrysene to genotoxic metabolites in human liver microsomes. *Carcinogenesis, Integrative cancer research*. 1993, 14, s. 1271-1278
17. **WILLAMS, P. A., COSME, J., WARD, A., AMGOVE, H. C., VINKOVIC, D. M., CHOTI, H.** Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature*. 2003, 424, s. 464-468.
18. **ANZENBACHER, P., ANZEBACHOVÁ, E.** Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell molecular life science*. 2001, 58, s. 737-747.
19. **O'BRIEN PJ, HASKINS JR.** In vitro cytotoxicity assessment. *Methods of Molecular Biology*. 2006, 356, s. 417-423.
20. **FOTAKIS, G., TIMBRELL, J. A.** In vitro cytotoxicity assay: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters*. 2006, 160(2), s.171–177.

21. **WEIJIA LI JING ZHOU YUYIN XU.** Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical device. *Biomedical reports*. 2015, 3, s. 617-620.
22. **VALÉRIAN, B., MOUSTAPHA, O., NGUYEN, A. T., STÉVINGNY, C., DUEZ, P.** Methods Applied to the in vitro primary toxicology testing of natural products: state of the art, strengths and limits. *Planta Med.* 2014, 80(14), s. 1210–1226.
23. **MESHULAM, T., LEVITZ, S.M., CHRISTIN, L., DIAMOND, R. D.** A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)- tetrazolium-5-carboxanil ide (XTT). *Oxford journals*. 1995, 172(4), s. 1153–1156.
24. **SALGADO, A. J., GOMES, M. E., CHOU, A., COUTINHO, O. P., REIS, R. L., HUTMACHER, D. W.** Preliminary study on the adhesion and proliferation of human osteoblasts on starch-based scaffolds *Materials. Science and Engineering*. 2002, 20, s. 27 – 33.
25. **NGAMWONGSATIT, P., PADMAPRIYA, P. B., PANBANGRED, W., BHUNIA, A. K.** 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*. 2008, 73(3), s. 211-215.
26. **MAHTO, S. K., CHANDRA, P., RHEE, S. W.** In vitro Models, Endpoints and Assessment Methods for the Measurement of Cytotoxicity. *Toxicology and environmental health sciences*. 2010, 2(2), s. 87-93.
27. **PAPAZISIS, K. T., GEROMICHALOS, G. D., DIMITRIADIS, K. A., KORTSARIS, A. H.** Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *Journal of Immunological Methods*. 1997, 208(2), s. 151–158.
28. **GUILHERMINO, R. S., SOUSA, L., SOARES, J. P.** Novel bioassay based on acetylcholinesterase and lactate dehydrogenase activities to evaluate the toxicity of chemicals to soil isopods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1999, 44(3), s. 287-293.
29. **VASSAULT, A. (Ed.)** *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press. 1983, 208, s. 118-126.
30. **POKORNÁ, A., TICHÝ, M., NERUDOVA, J., TUMOVÁ J., HANZLÍKOVÁ, I.** Stanovení toxicity binárních směsí pomocí hepatocytů z potkana. *Chemické listy*. 2009, 103, s. 575-580.

31. **DRIESSCHE, F., RIGOLE. P., BRACKMAN, G., COENYE, T.** Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms Laboratory of Pharmaceutical Microbiology. *Journal of Microbiological Methods*. 2014, 98, s. 31-34.
32. **NIIMI, A. J.** Rewiew of Biochemical Mehods and Other Indicators to Assess Gisth Healthth in Aquatic Ecosystems Containing toxic Chemicals. *Journal of Great Lakes Research*. 1990, 16, s. 528-529.
33. **GRIBALDO, L., GENNARI, A., BLACKBURN, K., CLEMEDSON, C., DEQUERCY, A., MENEQUZ, A., PFALLER, W., RUHDE, L. I.** The past, present and future of chemical risk assessment. *Alternatives to laboratory animals*. 2005, 33(1), s. 27-35.
34. **TICHÝ, M.** Experimental toxicology in silico. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc*. 2005, 149(2), s. 217-219.
35. **TICHÝ, M., BOŘEK-DOHALSK, V., RUCKI, M., REITMAJER, J., FELTL, L.** Risk assessment of mixtures: possibility of prediction of interaction between chemicals. *International archives of occupational and environmental health*. 2002, 75, s. 133-136.
36. **TICHÝ, M., RUCKI, M.** Validation of QSAR models for legislative purposes. *Interdisciplinary toxikology*. 2009, 2(3), s. 184-186.
37. **HANSCH, C., FUJITA, T, Maloney, P. P., Muir, R. M.** Correlation of Biological Activity of Phenoxyacetic Acids with Hammett Substituent Constants and Partition Coefficients. *Nature*. 1962, 194(4824), s. 178-180.
38. **MCLACHLAN, J. A.** A New Approach to Detect Biologically Active Xenobiotics. *Functional Toxicology*. 1993, 101(5), s. 386-387.
39. **BARRAL, E.** Cent ans de recherche pharmaceutique dans le groupe Rhône-Poulenc. *Revue d'histoire de la pharmacie*. 1997, 45(314), s. 171-178.
40. **VETCHÝ, D., KOPECKÁ, M., VETCHÁ, M., FRANC, A.** Modely in vitro – in vivo ve vývoji léčiv. *Chemické listy*. 2014, 108, s. 32-39.
41. **POLLI, J. E., CRISON, J. R., AMIDON, G. L.** Novel approach to the analysis of in vitro–in vivo relationships. *Journal of pharmaceutical science*. 1996, 85(7), s. 753-760.
42. **GRIBALDO, L., GENNARI, A., BLACKBURN, K., CLEMEDSON, C., DEGUERCY, A., MENEGUZ, A., RUHDEL, I.** Acute toxicity. *Alternatives to laboratory animals*. 2005, 33, s. 27-34.
43. **VAN BOEKEL, M. A., GOEPTAR, A. R., ALINK, G. M.** Antimutagenic activity of casein against

- MNNG in the E. Coli DNA repair host-mediated assay. *Cancer Letters*. 1998. 114(1-2), s. 85-87.
44. **VOGEL, E. W., BARBIN, A., NIVARD, M. J. M., STACK, H. F., WATERS, M. D., LOHMAN, P. H. M.** Heritable and cancer risk of exposures to anticancer drugs: inter-species comparisons of covalent deoxyribonucleic acid-binding agents. *Mutation research*. 1998, 400(1), s. 509-540.
 45. **ADLER, I., FILSER, J., GONDA, H., SCHRIEVER-SCHWEMMER, H.** Dose response study for 1,3-butadiene-induced dominant lethal mutations and heritable translocations in germ cells of male mice. *Mutation research*. 1998, 397(1), s. 85-92.
 46. **MAJER, B. J., GRUMMT, T., UHL, M., KNASMULLER, S.** Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment. *Clean soil air water*. 2005, 33(1), s. 44-45.
 47. **YAMADAV, M., ESPINOSA, A., JAVIER, J., WATANABE, M.** Targeted disruption of the gene encoding the classical nitroreductase enzyme in *Salmonella typhimurium* Ames test strains TA1535 and TA1538. *Mutation Research*. 1997, 375(1), s. 9-17.
 48. **MANGIPUDY, R., BURKHARDT, J., KADAMBI, VJ.** Use of animals for toxicology testing is necessary to ensure patient safety in pharmaceutical development. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2014, 70(2), s. 439-441.
 49. **LEONARDI, N. A., SPYCHER, B. D., STRIPPOLI, M. P. F., FREY, U., SILVERMAN, M., KUEHNI, C. E.** Validation of the Asthma Predictive Index and comparison with simpler clinical prediction rules. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2011, 127(6), s. 1466-1472.
 50. **MOMMA, J., KITAJIMA, S., INOUE, T.** The guinea-pig skin sensitization test revisited: an evaluation formula to predict possible sensitization levels for eight chemicals used in household products. *Toxicology*. 1998, 126(1), s. 75-82.
 51. **ROUDABUSH, R. L., TERHAAR, C. J., FASSETT, D. W., DZIUBA, S. P.** Comparative acute effects of some chemicals on the skin of rabbits and guinea pigs. *Toxicology and applied pharmacology*. 1965, 7(4), s. 559-565.
 52. **GETTINGS, S. D., LORDO, R. A., FEDER, P. I., HINTZE, K. L.** A Comparison of Low Volume, Draize and In Vitro Eye Irritation Test Data. II. Oil/Water Emulsions. *Food and Chemical Toxicology*. 1998, 36(1), s. 47-59.
 53. **HAN, S. B., KIM, H. M., KIM, Y. H., LEE, C. W., JANG, E. S., SON, K. H., KIM, S. U., KIM, Y. K.:** *INT. J.* T-cell specific immunosuppression by prodigiosin isolated from *Serratia*

- marcescens, *Immunopharmacol. International Journal of Immunopharmacology*. 1998, 20(1), s. 1-13.
54. **FORMAN, S., KÁŠ, J., FINI, F., STEINBERG, M., RUML, T.** The effect of different solvents on the TP/ADP content and growth properties of HeLa Cells. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 1999, 13(1), s. 11-15.
55. **DEMLOVÁ, R., ŘÍHOVÁ, B., GRYSOVÁ, Z.** Klinické hodnocení a registrace léčivých přípravků, farmakovigilance a stanovování cen a úhrad léčiv. *Životní cyklus léčiv*. 2014, Med Muni, s. 25.
56. **SÚKL PHV-3 verze 4 - Neintervenci peregistrační studie bezpečnosti humánních léčivých přípravků**, Tento pokyn nahrazuje pokyn PHV-3 verze 3 s platností od 11. 1. 2016. [online] [vid. 2017-04-20]. Dostupné na: <http://www.sukl.cz/leciva/phv-3-verze-4>
57. **SOUČKOVÁ, L., KOSTKOVÁ, H., DEMLOVÁ, R.** Jak se vyvíjí nový lék. *Sociální farmacie-praktické lékařství*. 2015, 11(4), s. 144–147.
58. **ROGERS, J. V., GUNASEKAR, P.G., GARRETT, C.M., KABBUR, M.B., MCDUGAL, J.N.** Detection of oxidative species and lowmolecular-weight DNA in skin following dermal exposure with JP-8 jet fuel. *Journal of Applied Toxicology*. 2001, 21(6), s. 521–525.
59. **MARTELLO, S., FELLI, M., CHIAROTTI, M.** Survey of nutritional supplements for selected illegal anabolic steroids and ephedrine using LC-MS/MS and GC-MS methods, respectively. *Food Additives and Contaminants*. 2007, 24(3), s. 258–265.
60. **STEINHOFF, M., BRZOSKA, T., LUGER, T. A.,** Keratinocytes in epidermal immune responses. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2001, 1(5), s. 469–476.
61. **SANCHEZ, L., MITJANS, M., INFANTE, M. R., VINARDELL, M. P.** Determination of interleukin-1 α in human NCTC 2544 keratinocyte cells as a predictor of skin irritation from lysine-based surfactants. *Toxicology letters*. 2006, 167(1), 40-46.
62. **EDÉMDRAIZE, J. H., WOODARD, G., CALVERY, H. O.** Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Pharmacology journalal.* 1944, 82(3), s. 377–390
63. **EFFENDY, I., MAIBACH, H. I.** Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis*. 1995, 33(4), s. 217–225.
64. **RAWLINGS, A. V., SCOTT, I. R., HARDING, C. R., BOWSER, P. A.** Stratum corneum moisturization at the molecular level. *Journal of investigative dermatology*. 1999, 103(5), s. 731-740.

65. **Ponec, M.** In vitro cultured human skin cells as alternatives to animals for skin irritancy screening. *International journal of cosmetic science*. 1992, 14(6), s. 245-264.
66. **OSBORNE, R., PERKINS, M. A.** An approach for development of alternative test methods based on mechanisms of skin irritation. *Food and Chemical Toxicology*. 1994, 32(2), s. 133–142.
67. **ROGUET, R., COHEN, C., DOSSOU, K. G., ROUGIER, A.** Episkin, a reconstituted human epidermis for assessing in vitro the irritancy of topically applied compounds. *Toxicology in vitro*. 1994, 8(2), s. 283-291.
68. **BOELSMA, E., GIBBS, G., FALLER, C., PONEC, M.,** Characterization and Comparison of Reconstructed Skin Models: Morphological and Immunohistochemical Evaluation *Acta Derm Venereol. Investigative reports*. 2000, 80(2), s. 82-88
69. **VAN DE SANDT, J. J. M., VAN BURGSTEDEN, J. A., CAGE, S., CARMICHAEL, P. L., DICK, I., KENYON, S., MONTOMOLI, L.** In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2004, 39(3), s. 271-281.
70. **PONEC, M., BOELSMA, E., GIBBS, S., & MOMMAAS, M.** Characterization of reconstructed skin models. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2002, 15(1), s. 4-17.
71. **PONEC, M., WEERHEIM, A., KEMPENAAR, J., MULDER, A., GOORIS, G. S., BOUWSTRA, J., MOMMAAS, A. M.** The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamin C. *Journal of investigative dermatology*. 1997, 109(3), s. 348-355.
72. **ROSDY, M., PISANI, A., & ORTONNE, J. P.** Production of basement membrane components by a reconstructed epidermis cultured in the absence of serum and dermal factors. *British Journal of Dermatology*. 1993, 129(3), s. 227-234.
73. **LEE, S. C., LEE, J. B., KOOK, J. P., SEO, J. J., KIM, Y. P., NAM, K. I., PARK, S. S.** Expression of differentiation markers during fetal skin development in humans: immunohistochemical studies on the precursor proteins forming the cornified cell envelope. *Journal of investigative dermatology*. 1999, 112(6), s. 882-886.
74. **MEDINA, J., ELSAESSER, C., PICARLES, V., GRENET, O., KOLOPP, M., CHIBOUT, S. D., DE BRUGEROLLE DE FRAISSINETTE, A.** Assessment of the phototoxic potential of compounds and finished topical products using a human reconstructed epidermis. *In Vitro and Molecular Toxicology. A Journal of Basic and Applied Research*. 2001, 14(3), s. 157-168.

75. **NETZLAFF, F., LEHR, C. M., WERTZ, P. W., SCHAEFER, U. F.** The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005, 60(2), s. 167-178.
76. **TINOIS, E., TIOLLIER, J., GAUCHERAND, M., DUMAS, H., TARDY, M., THIVOLET, J.** In vitro and post-transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. *Experimental Cell Research*. 1991, 193(2), s. 310-319.
77. **PORTES, P., GRANDIDIER, M. H., COHEN, C., ROGUET, R.** Refinement of the Episkin® protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. *Toxicology in vitro*. 2002, 16(6), s. 765-770.
78. **PORTES, P., PYGMALION, M. J., POPOVIC, E., COTTIN, M., MARIANI, M.** Use of human reconstituted epidermis Episkin® for assessment of weak phototoxic potential of chemical compounds. *Photodermatology, photoimmunology and photomedicine*. 2012, 18(2), s. 96-102.
79. **PORTES, P., GRANDIDIER, M. H., COHEN, C., ROGUET, R.** Refinement of the Episkin® protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. *Toxicology in vitro*. 2002, 16(6), s. 765-770.
80. **DREHER, F., FOUCHARD, F. E. D. E. R., PATOUILLET, C., ANDRIAN, M. E. L., SIMONNET, J. T., BENECH-KIEFFER, F.** Comparison of cutaneous bioavailability of cosmetic preparations containing caffeine or α -tocopherol applied on human skin models or human skin ex vivo at finite doses. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2002, 15(1), s. 40-58.
81. **CANNON, C. L., NEAL, P. J., SOUTHEE, J. A., KUBILUS, J., KLAUSNER, M.** New epidermal model for dermal irritancy testing. *Toxicology in Vitro*. 1994, 8(4), s. 889-891.
82. **FENTEM, J. H., BRIGGS, D., CHESNÉ, C., ELLIOTT, G. R., HARBELL, J. W., HEYLINGS, J. R., BOTHAM, P. A.** A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in vitro*. 2001, 15(1), s. 57-93.
83. **BOELSMA, E., GIBBS, S., FALLER, C., PONEC, M.** Characterization and comparison of reconstructed skin models: morphological and immunohistochemical evaluation. *DERMATOVENEREOLOGICA-STOCKHOLM*. 2000, 80(2), s. 82-88.
84. **NAKAMURA, M., RIKIMARU, T., YANO, T., MOORE, K. G., PULA, P. J., SCHOFIELD, B. H., DANNENBERG, A. M.** Full-Thickness Human Skin Explants for

- Testing the Toxicity of Topically Applied Chemicals. *Journal of investigative dermatology*. 1990, 95(3), s. 325-332.
85. **PETROVÁ, P., ŠVÁBOVÁ, M.** IL-6, PCT, CRP-Pomocné markery v diagnostice septických stavů. *Labor Aktuell*. 2009, 1(10), s. 10-13.
 86. **ROGUET, R., COHEN, C., DOSSOU, K. G., ROUGIER, A.** Episkin, a reconstituted human epidermis for assessing in vitro the irritancy of topically applied compounds. *Toxicology in vitro*. 1994, 8(2), s. 283-291.
 87. **KOHOUT, P.** Možnosti ovlivnění imunitního systému nutraceutiky. *Klinická farmakologi*. 2010, 24(1), s. 47-50.
 88. **DUCLOS, T. W.** Function of C-reactive protein. *Annals of Medicine*. 2000, 4, s. 274-278.
 89. **MARUNA, P.** Procalcitonin. *Triton Praha*. 2003, 140 s. 108-113.
 90. **MARUNA, P., GÜRLICH, R., ČERMÁK, J., MAŠEK, Z.** Procalcitonin as new infection parameter of postoperative sepsis. The comparison with 7 proinflammatory cytokines and their soluble receptors. *Clinical Intensive Care*. 1997, 8, s.12.
 91. **GIRNDT, M., KÖHLER, H., SCHIEDHELM-WEICK, E., SCHLAAK, J. F., ZUM BÜSCHENFELDE, K. H. M., FLEISCHER, B.** Production of interleukin-6, tumor necrosis factor α and interleukin-10 in vitro correlates with the clinical immune defect in chronic hemodialysis patients. *Kidney international*. 1995, 47(2), s. 559-565.
 92. **KOENIG, W.** C-reactive protein and cardiovascular risk: Has the time come for screening the general population? *Clinical Chemistry*. 2001, 47(1), s. 9-10.
 93. **POUR, L., ŠVÁCHOVÁ, H., SLANÝ, M., HÁJEK, R.** Metody používané v hodnocení angiogeneze a jejich význam u mnohočetného myelomu.(METHODS USED FOR EVALUATION OF ANGIOGENESIS AND THEIR SIGNIFICANCY FOR MULTIPLE MYELOMA). *KLINICKÁ ONKOLOGIE*. 2008, 21(1), s. 267.
 94. **NOVÁK, M.** B-glukany, historie a současnost. *Chemické lity*. 2007, 101, s. 872-880.
 95. **FERAY, C., SAMUEL, D., THIERS, V., GIGOU, M., PICHON, F., BISMUTH, A., BRÉCHOT, C.** Reinfection of liver graft by hepatitis C virus after liver transplantation. *Journal of Clinical Investigation*. 1992, 89(4), s. 1361.
 96. **OMOE, K., ISHIKAWA, M., SHIMODA, Y., HU, D. L., UEDA, S., SHINAGAWA, K.** *International journal of food microbiology*. 2002, 40, s. 857.
 97. **SAKAI, F., IHARA, H., AOYAMA, K., IGARASHI, H., YANAHIRA, S., OHKUBO, T., ASAO, T., KOZAKI, S.** *Journal of food protection*. 2008, 71, s. 1885.

98. **ZORNÍKOVÁ, G.** Využití polymerázové řetězové reakce (PCR) pro detekci probiotických mikroorganismů [online]. Brno: Mendelova univerzita v Brně, aktualizováno 2012 [vid. 2017-05-16]. Dostupné z www: <http://www.chempoint.cz/data/imgs/010651.gif>
99. **ŠTÁSTKOVÁ, Z., KARPÍŠKOVÁ, R., BORKOVCOVÁ, I.** Možnosti detekce stafylokokových enterotoxinů. Chemické listy. 2012, 106, s. 745-749.
100. **ŠVÁCHOVÁ, L., SLANÝ H., HÁJEK, R.** Metody používané v hodnocení angiogeneze a jejich význam u mnohočetného myelomu (methods used for evaluation of angiogenesis and their significancy for multiple myeloma pour). Klinická onkologie. 2008, 21(1), s. 266-269.
101. **YOURNO, J.** A method for nested PCR with single closed reaction tubes. PCR Methods Applications, 1992, 2, s. 60-65.
102. **MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., EHRLICH, H.** Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Symposia in Quantitative Biology. 1996, 51, s. 263-273.
103. **PAVLÍK, E.** Molekulární biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku - část 2. Labor aktuell. 1999, 1(99), s. 23- 26.
104. **STÝSKALOVÁ, L., CWIERTKA, K., NOSKOVÁ, V., JANOŠŤÁKOVÁ, A., RADOVÁ, L., MIHÁL, V., HAJDÚCH, M.** Klinická farmakologie a farmacie cytotoxická aktivita boheminu in vitro ytotoxická aktivita boheminu in vitro na primárních nádorových buňkách a primárních nádorových buňkách. Klinická farmacie a farmakologie. 2006, 20, s. 197-201.
105. **STÝSKALOVÁ, L., CWIERTKA, K., NOSKOVÁ, V., JANOŠŤÁKOVÁ, A., RADOVÁ, L., MIHÁL, V., HAJDÚCH, M.** Klinická farmakologie a farmacie cytotoxická aktivita boheminu in vitro ytotoxická aktivita boheminu in vitro na primárních nádorových buňkách a primárních nádorových buňkách. Klinická farmacie a farmakologie. 2006, 20, s. 197-201.