

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Pavλίna Horáčková

2013

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO- TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

TESTOVÁNÍ CYTOTOXICITY IN VITRO

Bakalářská práce

AUTOR: Pavlína Horáčková
VEDOUCÍ PRÁCE: RNDr. Karel Královec, Ph.D.

2013

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

IN VITRO CYTOTOXICITY TESTING

Bachelor thesis

AUTHOR: Pavlína Horáčková
SUPERVISOR: RNDr. Karel Královec, Ph.D.

2013

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Akademický rok: **2011/2012**

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Pavlína Horáčková
Osobní číslo: C09346
Studijní program: B3912 Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Zdravotní laborant
Název tématu: Testování cytotoxicity *in vitro*
Zadávající katedra: Katedra biologických a biochemických věd

Zásady pro vypracování:

- 1) Přehled moderních postupů *in vitro* toxikologie se zaměřením na savčí *in vitro* modely využívající buněčné linie.
- 2) Mechanismy buněčného poškození toxikanty.
- 3) Hodnocení cytotoxicity *in vitro*- volba experimentálního modelu, časová a koncentrační závislost cytotoxicity, pozitivní a negativní kontrola.
- 4) Testy cytotoxicity *in vitro* se zaměřením na testy integrity buněčné membrány, funkce mitochondrií, funkce lysozomů, obsahu syntézy nukleových kyselin, obsahu celkových proteinů a exprese specifických proteinů.
- 5) Shrnutí údajů o testování cytotoxicity *in vitro*.

Rozsah grafických prací: dle potřeby

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Karel Královec, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: 13. prosince 2012

Datum odevzdání bakalářské práce: 19. července 2013

L.S.

prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2013

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 ods.1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytována licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 18. července 2013

Pavλίna Horáčková

Poděkování:

Ráda bych zde poděkovala RNDr. Karlu Královcovi, Ph.D. za poskytnutí odborných rad, za čas, velkou trpělivost a pomoc při vedení mé bakalářské práce.

Také děkuji rodině, příteli a blízkým přátelům za podporu, trpělivost a povzbuzování během doby mého studia.

Souhrn:

Tato bakalářská práce je zaměřena na testování cytotoxicity *in vitro*. V práci jsou rozděleny a popsány druhy tkáňových kultur, na kterých se provádějí cytotoxické testy *in vitro*. Jsou zde popsány mechanismy buněčného poškození toxikanty a hodnocení cytotoxicity *in vitro*. Pro toto hodnocení je důležitá volba experimentálního modelu, časová a koncentrační závislost cytotoxicity pozitivní a negativní kontrola.

Ve druhé části je práce zaměřena na ucelený přehled jak tradičních, tak moderních způsobů testování cytotoxicity *in vitro*. Testy jsou rozděleny do jednotlivých slupin dle toho, s jakými buněčnými organelami se reakce uskutečňují.

Klíčová slova:

Akutní toxicita, buněčné kultury, *in vitro* cytotoxické testy.

Summary:

The present bachelor thesis is focused on *in vitro* cytotoxicity testing. Different types of tissue cultures that undergo *in vitro* cytotoxicity testing are divided and described in this thesis. Furthermore the mechanisms of cellular damage by toxicants are described as well as an evaluation of *in vitro* cytotoxicity. The choice of the experimental model, time and concentration dependence of cytotoxicity and positive and negative checking is essential to the evaluation process.

The second part of the thesis offers a coherent overview of both traditional and modern ways of *in vitro* cytotoxicity testing. The tests are divided into groups depending on which cellular organelles participate in reactions.

Keywords:

Acute toxicity, cell cultures , cytotoxicity assays *in vitro*.

Seznam použitých zkratek:

ATP	Adenosintrifosfát
ADP	Adenosindifosfát
BrdU	5'bromo-2'deoxy-uridine neboli bromodeoxyuridine
CI	Buněčný index
CVS	Barvení krystalovou violetí
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ER	Endoplazmatické retikulum
JC-1	5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide
LDH	laktátdehydrogenáza
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MTT	Methyl-thiazolyl- tetrazolium
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NR	Neutrální červeň
Ph	Záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů
R123	Rhodamine 123
RNA	Ribonukleová kyselina
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RTCA	Buněčný analyzátor v reálném čase
SI	Stimulační index
SRB	Sulforhodamin B
TMRE	Tetramethylrhodamineethyl ester
TMRM	Tetramethylrhodaminemethyl ester
UVID	Ultrafialová indukovaná detekce
XTT	2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
WB	Western blot
WTS-1	2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium
WTS-8	2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium)

OBSAH:

1. ÚVOD.....	13
2. AKUTNÍ TOXICITA	14
3. BUNĚČNÉ KULTURY	15
3.1 HISTORIE	15
3.2 PRÁCE S BUNĚČNÝMI KULTURAMI	15
3.3 TYPY BUNĚČNÝCH KULTUR.....	16
4. MECHANISMY PŮSOBNÍ TOXIKANTŮ.....	19
4.1 APOPTÓZA A NEKRÓZA	20
5. HODNOCENÍ CYTOTOXICITY <i>IN VITRO</i>.....	21
6. TESTY CYTOTOXICITY <i>IN VITRO</i>	23
6.1 TESTY INTEGRITY BUNĚČNÉ MEMBRÁNY	26
6.1.1 Trypanová modř.....	26
6.1.2 LDH test.....	27
6.2 TESTY MITOCHONDRIÁLNÍCH FUNKCÍ	28
6.2.1 Stanovení mitochondriálních dehydrogenáz.....	28
6.2.1.1 MTT test	28
6.2.1.2 XTT test	30
6.2.1.3 MTS test.....	31
6.2.1.4 WST-1 test	31
6.2.1.5 WST-8 test	32
6.2.2 Membránový potenciál mitochondrií.....	33
6.2.3 Syntéza ATP	34
6.3 TESTY FUNKCE LYSOZOMŮ	35
6.3.1 Test neutrální červení.....	35
6.4 TESTY OBSAHU CELKOVÝCH PROTEINŮ.....	37
6.4.1 SRB test	37
6.4.2 Stanovení proteinů dle Bradfordové	38
6.5 TESTY EXPRESE SPECIFICKÝCH PROTEINŮ	38
6.5.1 Western blot.....	38
6.6 STANOVENÍ CYTOTOXICITY V REÁLNÉM ČASE	40

6.7	TESTY OBSAHU A SYNTÉZY NUKLEOVÝCH KYSELIN.....	42
6.7.1	BrdU test.....	42
7.	ZÁVĚR	45
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	46

1. ÚVOD

Téma „testování cytotoxicity *in vitro*“ je velice aktuální. *In vitro* metody využívající buněčné kultury se staly nenahraditelným nástrojem nejen v biologickém a lékařském výzkumu, ale využívají se také při výrobě vakcín, očkovacích látek, enzymů, hormonů a dalších proteinů pro léčebné a diagnostické účely. Nezastupitelnou úlohu mají také při testování toxicity látek a léčiv. Neustále se vyvíjející vědní obory provádějí množství výzkumů, při nichž jsou využívány testy cytotoxicity. K testování zkoumaných látek je v současné době využíváno velké množství různých metod. Při tzv. end-point analýzách, tedy všech klasických testech, jako je např. XTT (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide), MTT (methyl-thiazolyl-tetrazolium) je stav buněk znám pouze v momentě vyhodnocování daného experimentu. Dnes však již existují analýzy v reálném čase, díky kterým můžeme monitorovat buňky během celého experimentu.

Cílem této bakalářské práce je tedy podat ucelený přehled literatury zabývající se testováním cytotoxicity *in vitro*. Pozornost je věnována popisu (princip, možnosti praktického využití, finanční, materiální a časová náročnost, výhody, nevýhody) jak tradičních tak moderních způsobů testování cytotoxicity *in vitro*. Práce se zabývá také mechanismy působení toxikantů, principy hodnocení cytotoxicity *in vitro* a buněčnými kulturami využívanými pro *in vitro* studie cytotoxicity.

2. AKUTNÍ TOXICITA

Toxicita neboli jedovatost značí míru vlivu, jakým působí jedovaté látky na živé organismy. Vědecký obor zabývající se těmito vlivy, jejich příčinami a důsledky je všeobecně známý jako toxikologie.

Toxicita může být chronická nebo akutní. Rozdíl mezi akutní a chronickou toxicitou je takový, že všechny chemikálie vyvolají akutní toxicitu v dostatečně vysoké dávce, zatímco všechny chemikálie nevyvolají chronickou toxicitu. Často se jako odkaz na akutní toxicitu cituje fráze: „Všechny věci jsou jedy...jen dávka určuje jed.“ V tomto případě i benigní látky budou vyvolávat akutní toxicitu, pokud budou podávány v dostatečně veliké dávce. Avšak zvyšování dávek chemické látky nezaručuje, že chronické toxicity bude nakonec dosaženo. Ke chronické toxicitě obvykle dochází při dávkách nižších než u těch, které vyvolávají akutní toxicitu.

Účinky akutní toxicity obvykle bývají spojované s úmrtností. Z kvantitativního hlediska jsou tyto efekty měřené. Označují se pak jako smrtelná dávka 50 (LD_{50}), efektivní dávka 50 (ED_{50}), letální koncentrace 50 (LC_{50}) a efektivní koncentrace 50 (EC_{50}). LD_{50} a ED_{50} představují dávku materiálu, která způsobí smrt u 50ti % léčené populace. Obvykle jsou normalizovány na hmotnosti zvířete. EC_{50} nebo LC_{50} představují koncentraci materiálu, které byl organismus vystaven a která způsobila uhynutí u 50ti % z exponované populace. Obvykle jsou normalizovány do prostředí, kterému je organismus vystaven. Tyto kroky akutní toxicity vedou ke zjištění stupně toxicity [1].

3. BUNĚČNÉ KULTURY

Jako buněčné kultury jsou označovány rostlinné, živočišné nebo lidské buňky, které jsou pěstovány mimo tělo v laboratoři. Tato technika pěstování buněk je nazývána technikou *in vitro*.

3.1 HISTORIE

První pokusy na tkáňových kulturách začaly probíhat již na počátku 19. století: roku 1885 Wilhelm Roux dokázal udržet po určitou dobu živé explantované kuřecí embryonální buňky v uměle připraveném teplém a slaném médiu. Nepodařilo se však, aby se buňky množily stejným způsobem jako při metodě *in vivo*. Poté docházelo ke vzniku nových poznatků v tomto odvětví. Ve čtyřicátých letech 20. století byly objeveny první úspěšné pokusy o založení buněčné kultury. V této buněčné kultuře se buňky množily a přežívaly po omezenou, ale delší dobu. Techniky tkáňových kultur se postupně jen zdokonalovaly.

Tkáňové kultury začaly být od osmdesátých let 20. století běžnou součástí výzkumů a sloužily i k výrobě průmyslových protilátek, některých chemikálií a léků. Nepostradatelnou funkci zaujímají tkáňové kultury v molekulární biologii, ve vývoji nových léků apod [2].

3.2 PRÁCE S BUNĚČNÝMI KULTURAMI

Při práci s tkáňovými kulturami je nutné, aby všechny používané chemikálie a pomůcky byly sterilní a aby neobsahovaly některé toxické látky, jejichž i stopové množství by tkáňové kultury mohlo běžně kontaminovat. Dále jsou kromě obvyklého vybavení navíc nutné i speciální pomůcky a přístroje. Tyto techniky patří k těm finančně nákladnějším, a proto jsou připravované ve speciálních laboratořích vyškolenými pracovníky.

Práce s každou buněčnou linií zahrnuje tři fáze:

- 1) izolace buněčného kmene
- 2) udržování buněčné linie a její expanze
- 3) využití namnožených buněk v pokusu

Co se týká vlastností buněčných linií, většina z nich má omezenou životnost, to znamená, že po určité době se přestanou dělit. Pouze některé tkáňové kultury jsou nesmrtelné. Jedná se například o buňky, které byly získány z nádorů. V tomto případě mluvíme o kontinuálních buněčných liniích. I v tomto případě si buňky ponechávají schopnost regulace buněčného dělení. Pokud ji ale ztratí a buňky se začnou dělit nekontrolovatelně, poté mluvíme o transformované buněčné linii. Transformované buněčné linie jsou nádorové a jsou

nesmrtelné. Je u nich možné neomezené pasážování, jelikož u takových buněk nedochází ke stárnutí kultury (ke zkracování telomer).

Pro růst buněčných linií je třeba vhodný povrch či suspenze; kultivační nádoby se speciálními kultivačními médii. Ta obsahují potřebné složky: ionty, zdroje energie, vitamíny, aminokyseliny, růstové faktory a další. Buněčné linie rostou optimálně ve sterilním prostředí, při teplotě 37°C, za zvlhčené atmosféry se zvýšeným množstvím oxidu uhličitého.

Při nasazení buněk, které jsou izolované z pokusného zvířete, vznikají tzv. primokultury. Tyto buňky mohou být izolované jak ze zvířecích, tak lidských orgánů. Následně dochází k množení buněk po vytvoření souvislé jednoduché vrstvy, která se následně uvolní od kultivační nádoby. Vzniklá suspenze se poté naředí a přenesení se do nových sterilních kultivačních nádob. Celý tento postup pojmenováváme jako pasáž a nové kultury se říká subkultura [3].

Primární kultury mají oproti nádorovým buňkám výhodu v tom, že blíže reprezentují fyziologickou situaci *in vivo*, mají specifické funkce, jsou vysoce diferencované a nejsou transformované. Přináší s sebou ale i řadu problémů: při diferenciaci buněk může docházet k postupnému vymizení původního fenotypu; existuje zde interindividuální variabilita; jejich využití musí být bezprostředně po jejich přípravě; zdroj experimentálního materiálu, který je izolován z lidských orgánů, je kvůli etickým normám a odlišné legislativě limitován

Kromě primárních buněčných linií existuje ještě druhá hlavní skupina buněčných kultur pro *in vitro* studie cytotoxicity, a to jsou komerční nádorové linie. Hlavními zdroji linií jsou dvě světové organizace ECACC (European Collection of Cell Cultures) a ATCC (American Tissue and Cultures Collection). Linie dodávané těmito organizacemi mají doporučené kultivační podmínky a definovaný fenotyp [4].

3.3 TYPY BUNĚČNÝCH KULTUR

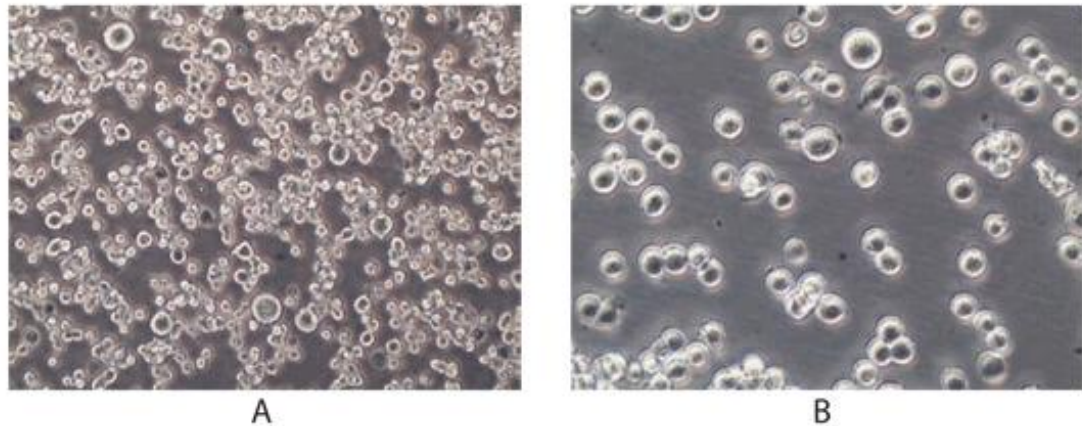
Buněčné systémy využívají pro studie několik druhů experimentálního uspořádání:

Suspenzní buněčné kultury

Z větší části se jedná o krevní buňky, které je možné kultivovat i po delší dobu a u kterých za podmínek v *in vitro* často dochází k reprodukci. Výhodou tohoto systému je zajištění homogenních koncentračních vztahů a možnost dobrého promíchávání. Naopak mezi nevýhody řadíme nutnost separace média od buněk pro další studie [2].

Pro využití buněčných suspenzních kultur je nezbytné udržet vysokou kvalitu kultivovaných buněk. Rozbor obrazu je důležitý pro realizaci jednoduchého, neinvazivního

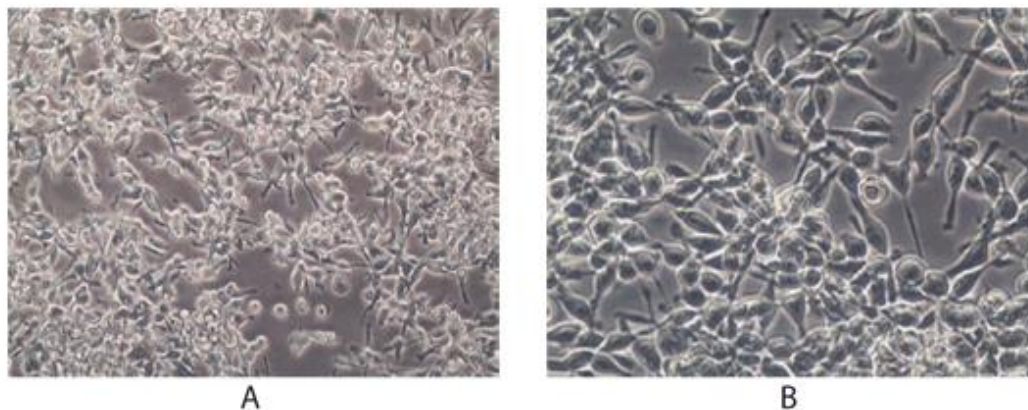
a objektivního hodnocení buněk suspenzní kultury. Mezi faktory hodnocení patří barva, tempo růstu, tvar a velikost [5].



Obr.1:Suspenzní buněčné kultury; A) buňky při zvětšení 10X; B) buňky při zvětšení 20X [6].

Adherentní buněčné kultury

Tento systém patří k nejčastějšímu experimentálnímu uspořádání, co se práce s buněčnými kulturami lidských i živočišných buněk *in vitro* týká. Kultivování buněk probíhá převážně v plastových kultivačních lahvích, deskách či více-jamkových deskách. Je zde nutná fáze přilnutí (adherence), ke které slouží elektrostaticky nabitý plast. U některých typů buněk je třeba fixace na substrát, kterým může být např. elastin, kolagen. Ke kultivaci většiny typů buněk jsou používána komerčně dodávaná speciální kultivační média. Tato média obsahují vhodné kombinace vitamínů, hormonů, nutričních esenciálních substrátů atd. Pro proliferaci a diferenciaci buněk se do médií přidává fetální telecí sérum bohaté na růstové faktory. Přidávají se také acidobazické indikátory pro kontrolu kvality kultivačního média. Buněčné kultury se často kultivují za přítomnosti antibiotik a udržují se ve speciálních inkubátorech, obvykle při teplotě 37 °C v atmosféře 5% CO₂ [7].



Obr. 2: Adherentní buněčné kultury; A) buňky při zvětšení 10X; B) buňky při zvětšení 20X [8].

Imobilizované buňky

Do této skupiny se zahrnují různé typy buněk, které se fixují například do dutých vláken. Je třeba obstarat buňkám jak optimální přísun živin, tak zároveň odvod metabolických zplodin. V této souvislosti hovoříme o tzv. bioreaktoru, jenž zajišťuje tyto schopnosti. Systém je unikátní v tom, že umí simulovat cirkulaci v krevním řečišti či v orgánech. Jeho nevýhodou je značná technická náročnost, kvůli níž systém nelze využívat ve velké míře. Za přídavku antibiotik a za optimálních podmínek lze systém často udržovat funkční po dobu několika dnů. Využívá se fixace izolovaných buněk z orgánů (hepatocyty) a také proliferujících nádorových buněk. Slouží k fixaci izolovaných buněk a k proliferaci nádorových buněk [9].

4. MECHANISMY PŮSOBENÍ TOXIKANTŮ

Pro správnou funkčnost buňky je důležité, aby veškeré životní děje odehrávající se v buňce probíhaly v pořádku. K disfunkci buňky mohou vést škodlivé zásahy jak dědičné, tak i získané.

Cytotoxické chemické látky působí přímo na buněčné složky bez předchozí metabolické přeměny. Tyto látky na buněčné úrovni, které mohou vyvolávat buněčné poškození pomocí různých mechanismů, nazýváme toxikanty. Interakce přímo cytotoxických látek s glutationem (což je tripeptid složený z aminokyselin kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu se nachází v buňkách živočichů, rostlin i bakterií a patří k nejsilnějším antioxidantům; přitom se podílí na metabolismu cizorodých látek, na syntéze nukleových kyselin, na vzniku bílkovin a prostaglandinů, transportu aminokyselin, odstraňování toxinů a karcinogenů, správné funkci imunitního systému, prevenci buněk před oxidačním stresem a při aktivaci řady enzymů v organismu) oslabuje antioxidační obranu buňky.

Buněčné poškození je definováno jako odchýlení se buňky od běžného fyziologického stavu do stavu abnormálního, kdy se většinou jedná o ireversibilní děj (pozn. existují reparační mechanismy). Existují dva druhy buněčného poškození.

U prvního typu dochází k přímé destrukci poškozením buněčných struktur- v buňce poté začíná oxidační poškození lipidů, nukleových kyselin, proteinů- následně se narušuje integrita buněčných membrán či cytoskeletu [10].

Poškození vyvolávají:

- látky reaktivní – chinony (například antrachinon);
- radikálové sloučeniny (peroxydy, hydroperoxydy);
- volné radikály (ROS, RNS);
- elektrofilní sloučeniny;
- alkylační činidla (cis-platina);
- organická rozpouštědla (tetrachlormetan, toluen);
- silné kyseliny (kyselina sírová) a zásady (hydroxid sodný);
- těžké kovy (Pb, Hg) apod.

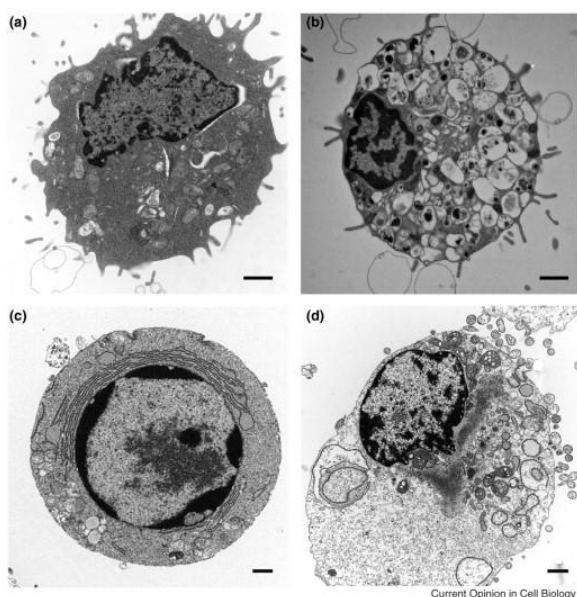
Druhým typem demonstrace toxicity *in vitro* je nedestruktivní interakce se subcelulárními entitami, tj. inhibice enzymů, blokace iontových kanálů, antagonismus receptorů nebo interference s cytoskeletem (phalloidintoxickýchhub) či DNA (chemoterapeutická alkylační činidla). Buňka poté následně například uhynie v důsledku inhibice proteosyntézy, inhibice

replikace DNA, narušení dynamiky mikrotubulů, inhibicí ATP-dependentních iontových pump apod. Jak ve druhém, pak i v prvním případě ve vlastní buněčné toxikologii poté hodnotíme soubor parametrů vypovídajících o toxickém poškození buňky [11].

4.1 APOPTÓZA A NEKRÓZA

Dojde-li k buněčnému poškození, kdy se buňka dostává do abnormálního stavu, může dojít k zániku buňky. Oběť jednotlivých buněk je nutná pro přežití organismu. V normálním případě, když je organismus v pořádku, se jedná o fyziologickou buněčnou smrt, která je nedílnou součástí transformace embryonálních analogů na plně vyvinuté orgány. To má také zásadní význam na regulaci počtu buněk v různých tkáních. Fyziologická buněčná smrt zahrnuje aktivaci vnitřního sebevražedného programu, což má za následek usmrcení buňky. Tento proces se nazývá apoptóza [12].

Naproti tomu existuje patologická buněčná smrt, která není regulována vlastními buněčnými signály a vede k trvalému poškození organismu. Tuto patologickou smrt buněk nazýváme nekrózou a mohou ji vyvolávat různá poškození na buněčné celistvosti (ischémie, popáleniny a toxiny). Nekróza nastane, když poškození nevratně narušuje životně důležitou buněčnou strukturu anebo buněčné organely a nevyvolává apoptózu. Patologická smrt buňky ovšem může vyplývat z apoptózy, například díky vlivům virů či ionizujícího záření [13].



Obr. 3: Ilustrace morfologických změn mezi umírajícími buňkami apoptózou a nekrózou; (a) normální buňka; (b) automatická buňka; (c) apoptická buňka; (d) nekrotická buňka [14].

5. HODNOCENÍ CYTOTOXICITY *IN VITRO*

Tkáňové kultury se využívají pro hodnocení toxicity akutní, ne chronické.

Pro hodnocení *in vitro* cytotoxicity volíme v praxi nejvhodnější experimentální parametr na základě mechanismu buněčného poškození, u kterého nejčastěji hodnotíme:

- 1) integritu buněčných membrán
- 2) funkci mitochondrií- sem zařazujeme například MTT test, XTT test, syntézu ATP, membránový potenciál
- 3) proteosyntézu, obsah celkových proteinů, expresi specifických proteinů a sekreci specifických proteinů
- 4) funkci lysozomů- patří sem barvení neutrální červení
- 5) nukleové kyseliny- jejich obsah a syntézu; stanovuje se zde jak DNA, tak RNA
- 6) specifické funkční parametry

Při hodnocení je velmi důležité zvolit si vhodný experimentální model. Častěji pro možnost zpracování a získání výsledků velkých sérií vzorků se využívá zpracovávání na mnoho-jamkových kultivačních deskách. Jamek mají destičky 96. Hodnotí se tři základní parametry:

Mechanismus účinku

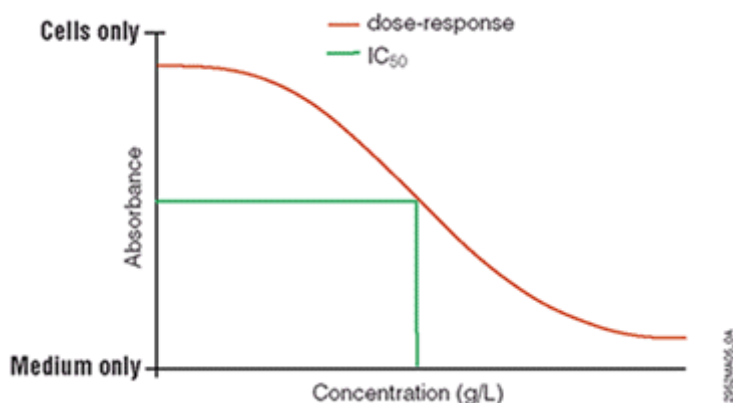
Při hodnocení mechanismu účinku musíme zvolit vhodný modelový toxin. Ten slouží k tzv. pozitivní kontrole. Tento toxin díky svým vlastnostem určuje způsob buněčného poškození. Pro příklad uvedu toxin tetrachlormetan pro oxidační poškození metabolické aktivace; D- galaktosami pro virální poškození; paracetanol pro elektrofilní uspořádání; tert-butylhydroperoxid pro radikálové poškození. Zároveň je důležité zvolit tzv. negativní kontrolu- tj. rozpouštědlo pro eliminaci jeho vlivu na buněčné funkce. To znamená, že tento materiál nevyvolává cytotoxickou reakci. Nejčastěji se volí voda či dimethylsulfid. Méně často pak aceton, etanol.

Časová závislost cytotoxicity

Časovou závislost cytotoxicity volíme buď krátké časové intervaly, což je počítáno od půl hodiny po šest hodin, anebo intervaly delší, které jsou od 24 hodin po 72 hodin. Časová závislost nám jednak vypovídá o mechanismu poškození, o sekundárních dějích vedoucích k poškození a o metabolické aktivaci, která následně vede k cytotoxicitě.

Koncentrační závislost cytotoxicity

Koncentrační závislost cytotoxicity nebo také tzv. dose-response analýza vzniká působením zkoumané látky v koncentrační škále na buňky. Koncentrační škála bývá obvykle velmi široká, proto se volí logaritmické odstupňování koncentrací. V koncentrační závislosti také často mluvíme o tzv. hodnotě IC_{50} , kterou známe také pod pojmem half maximal inhibitory concentration. Tato hodnota vypovídá o toxicitě látek za daných experimentálních podmínek, za daného času a v daném buněčném typu. Jedná se tedy o koncentraci látky, která vyvolá 50% maximální buněčné poškození čili smrt. Čím toxičtější je substance, tím nižší vykazuje hodnotu IC_{50} . Pokud tuto hodnotu převedeme do grafické závislosti, pak nám ji prezentuje hyperbolická křivka. Pokud však využijeme logaritmické vynesení koncentrace, poté dostaneme sigmoidní křivky nejrůznějšího charakteru. IC_{50} se pak vypočte jako inflexní bod na sigmoidě. Při sledování časové závislosti toxicity se hodnoty IC_{50} uvádějí pro daný čas [15, 16].



Obr. 4: Křivka IC_{50} . Červeně označená křivka - dose response značí koncentrační závislost cytotoxicity, zeleně označená IC_{50} značí bod, ve kterém látka vyvolá u organismu 50% poškození. Tento bod se získá jako průměr součtu průměrné absorpce IC_0 (měří se jen médium) a IC_{100} (měří se jen buňky) [17].

6. TESTY CYTOTOXICITY *IN VITRO*

Testování buněčných kultur je vyvíjeno především proto, aby se výzkum nemusel uskutečňovat na lidech či zvířecích organismech. V minulosti bylo testování na živých organismech celkem běžné (např. stanovení letální dávky LD₅₀). Dnes je testování toxicity na buněčných kulturách alternativou, která se snaží přiblížit kvalitám testování na živých tvorech.

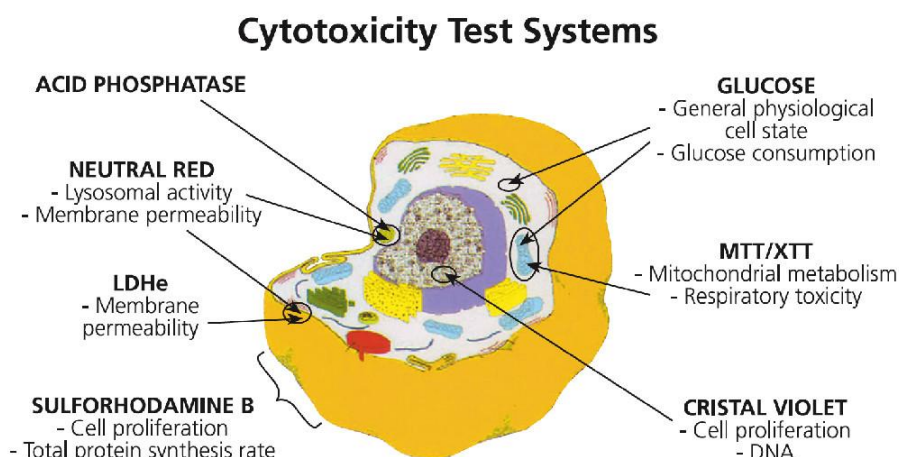
In vitro cytotoxické testy jsou obvykle prováděny na transformovaných, nesmrtelných buněčných liniích a primárních buňkách. Nesmrtelné buněčné linie jsou snadno dostupné a udržovatelné, přestože často vykazují abnormální chování. Primární buňky jsou skutečně považovány za lepší volbu jako modelové systémy pro predikci toxikologického chování, ačkoliv existují v omezeném množství a trpí dávkovými obměnami v důsledku potřeby izolovat je čerstvě pro každou studii.

Prediktivní hodnota cytotoxických *in vitro* testů je založena na myšlence „základní“ cytotoxicity, a to že toxické látky ovlivňují základní funkce buněk, které jsou pro všechny buňky společné. Toxicita tak může být naměřena na základě buněčného poškození. Vývoj cytotoxických testů *in vitro* byl potřebný pro rychlé vyhodnocení potenciální toxicity velkého množství sloučenin, aby zároveň byly omezeny pokusy na zvířatech a aby byly zkoušky pokud možno prováděny s malým množstvím sloučeniny. Důkazy o užitečnosti těchto testů vedlo mnoho farmaceutických firem k prověření složení léků a k odstranění potenciálně toxických látek [18].

Stále se však hledají nové alternativní metody. Za tímto účelem byl nedávno proveden test s lidskými mezenchymálními kmenovými buňkami (hMSCs) *in vivo*, který poprvé ukázal, že MSC izolované z lidské kostní dřevě mohou být s jistotou používány v této oblasti toxikologie. MSC představují dobrý příslib pro rozvoj testů *in vitro* a mohly by nakonec nahradit, zlepšit nebo předstihnout současné prediktivní modely v toxikologii [19].

Rozšířené používání cytotoxických analýz *in vitro* je odůvodněno stupňující se poptávkou po testování bezpečnosti xenobiotik, nových léčiv, potravinových přísad a kosmetiky s hlavním cílem- minimalizovat rizika pro lidské zdraví. Kromě toho jsou cytotoxické testy běžně používány pro vývoj proti-nádorových léků. Postupy testů zahrnují kultivaci buněk, expozici buněk cytotoxickou látkou a následné posouzení poškození buněk pomocí krátkodobých či dlouhodobých testů [21]. Existují tři základní parametry, na kterých je měření založeno. Prvním z nich je měření buněčné aktivity, druhým parametrem je testování membránové integrity. Posledním parametrem je stanovení viability buněk, neboť mrtvé buňky jsou odděleny od buněčné kultury a jsou odplaveny médiem [18].

Výzkum cytotoxických účinků na buněčné linie primárních buněk se v současné době stal již běžnou metodou. Cílem je, aby bylo možno toxické látky snáze identifikovat, aby testy nebyly složité, bylo je možno opakovat a aby nebyly nákladné. Existuje například PAN I cytotoxická soustava od Xenometrix, která umožňuje použít 4 běžně používané cytotoxické testy postupně na jednom mobilním vzorku. Takový postup má řadu výhod. Je 4krát menší spotřeba testující látky, než když se provádí test jednotlivými testy. Dále je zvýšená pravděpodobnost identifikovat toxické sloučeniny a je snížena spotřeba cenných primárních buněk. Právě test PAN I kombinuje testy extracelulární laktát-dehydrogenázy (LDHe) pro měření integrity membrán, dále pak XTT test pro mitochondriální aktivitu, test neutrální červení (NR) pro hodnocení lysozomální činnosti a v poslední řadě také SRB test pro celkový obsah bílkovin. Jinak je ale také běžné vykonávat testy zvlášť. Na následujících stránkách rozebereme vybrané významnější cytotoxické testy, které se v dnešní době běžně používají [21].



Obr. 5: Ideální schéma buněk znázorňující parametry užívané k měření cytotoxicity a jejich odpovídající efekty na buněčné organely. Glucose (glukóza; metabolická aktivita); MTT/ XTT (testy mitochondriálních funkcí); Cristal violet (krystalová violet; test podle obsahu a syntézy NK); Sulforhodamine B (Sulforhodamin B, buněčná proliferace, test pro celkový obsah proteinů); LDH (test integrity buněčné membrány); acid phosphatase (kyselá fosfatáza) [22].

Přestože používání testů zjišťujících cytotoxicitu je značně pohodlné a slouží jako rychlá metoda zkoumající životaschopnost buněk, tak všechny níže zmíněné testy mají své nevýhody a musí být používány s opatrností [23].

Základním požadavek na testy je takový, aby testy byly objektivní, kvantitativní, reprodukovatelné a schopny automatizace. Existuje větší počet testů, které dobře splňují tato kritéria.

Cytotoxické testy se vyhodnocují různými způsoby. Nejčastěji se výsledek testů hodnotí pomocí průtokové cytometrie, kolorimetrie spektrofotometrie, fluorescenční mikroskopie a pomocí luminometru.

Průtoková cytometrie je jednou z moderních laboratorních metod, která v posledních letech dosáhla výrazného technologického rozvoje a představuje dnes zcela běžnou a důležitou součást klinické praxe. Princip spočívá v měření a analýze fyzikálních a chemických vlastností buňky při průchodu laserovým paprskem. Pomocí průtokové cytometrie můžeme vyšetřovat jakékoliv imunofluorescenčně označené buněčné suspenze. Umožňuje diferenciaci populací buněk a zjištění přesných počtů buněk obsažených v suspenzi vzorku na základě jejich různých optických vlastností [24].

Kolorimetrie je optická metoda, která je založená na porovnávání intenzity zbarveného roztoku o neznámé koncentraci s roztokem, jehož koncentrace je stejná, ale známe její hodnotu. Mezi objektivní kolorimetrické kolorimetry Spektrofotometr je technicky složitý a dokonalý přístroj, který stanovuje vlastnosti vzorku na základě pohlcování světla v různých vlnových délkách spektra. Vlnovou délku monochromatického světla lze u přístroje libovolně nastavit anebo lze měřit část absorpčního spektra v určitém úseku vlnových délek [25].

Fluorescence je druh luminescence. Princip luminescence je takový, že samovolné záření látek vzniká jako přebytek záření tělesa nad úroveň jeho tepelného záření v dané spektrální oblasti při dané teplotě. Toto záření trvá i po skončení budícího účinku, jelikož záření doznívá. Pokud po odstranění zdroje ozařování látky vymizí, mluvíme o fluorescenci.

Fluorescenční mikroskopie umožňuje zobrazit určité látky obsažené v buňkách i v minimálním množství. Princip této metody spočívá v tom, že speciální chemické látky= fluorochromy jsou po dopadu světla, které má kratší vlnovou délku, ozářeny světlem s delší vlnovou délkou. Vychází tedy světlo jiného zbarvení [26].

Luminometr tedy detekuje a počítá kvantitu ATP. Princip detekce spočívá v reakci, při níž je vydáváno světlo z luciferinu vyvolané enzymem luciferázou. Luminometr kombinuje fotodetektor s přístrojovým vybavením pro výkon, který se vyjadřuje jako relativní světelné jednotky [27].

6.1 TESTY INTEGRITY BUNĚČNÉ MEMBRÁNY

Buněčná membrána je nezbytná pro život buněk, její narušení znamená odumření buňky. Je tvořená dvojrůstvou fosfolipidů, které jsou protkány proteinovými můstky, které slouží k transportu látek.

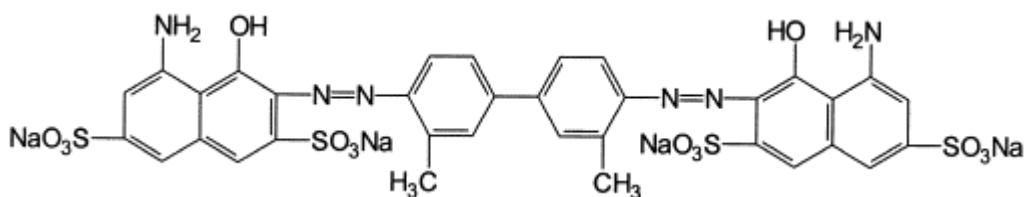
Testy spočívají v porušení membránové integrity, vymezené vycytáváním barviva, pro které je při normální situaci buněčná membrána nepropustná (např. trypanová modř), nebo uvolněním barviva, které je ve viabilních buňkách normálně zadržováno (např. laktát dehydrogenáza).

6.1.1 Trypanová modř

Test trypanovou modří je dalším vhodným ukazatelem pro určení životaschopnosti buněk. Principem této metody je selektivní propustnost plazmatické membrány živé buňky

s tím předpokladem, že má buňka plně zachované membránové i funkční aktivity. Trypanová modř je kyselé azobarvivo, odvozené od toluidinu, které zbarvuje mrtvé buňky modře. Trypanová modř prostupuje pouze do mrtvých buněk s narušenou strukturou plazmatické membrány. Barvivo se poté hromadí na membráně mrtvé či poškozené buňky a tím lze odlišit mrtvé a živé buňky. Živé buňky, které mají intaktní plazmatickou membránu a zůstávají nezbarvené tímto barvivem. Případně jsou obarveny jen lehce. Modré barvivo nikdy neproniká do neporušených, živých buněk [28].

Životnost buněk je klasifikována jako poměr počtu živých buněk proti celkovému počtu buněk, kam zařazujeme živé i mrtvé buňky. Detekce životnosti buněk se vyhodnocuje optickým mikroskopem [28, 29].



Obr. 6: Chemický vzorec trypanové modři [30].

Kromě barviva trypanové modři se při zjišťování integrity buněčné membrány používají i jiná barviva: propidium jodid; ethidium homodimer-1; TOTO-1 a TOPRO-3.

Propidium jodid chemickým vzorcem 3,8-Diamino-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-phenylphenanthridiniumdiiodide je fluorescenční barvivo pro nukleové kyseliny. Obarvuje mrtvé buňky, které se pak hodnotí průtokovou cytometrií. Ethidium homodimer-1 je fluorescenční barvivo červené barvy. Proniká do buněk poškozenou membránou a váže se

do nukleových kyselin. TOTO-1 je další z barev fluorescenčního charakteru. Barvivo TOTO-1 je složené ze dvou molekul thiazolové oranžičky (TO). Barvivo se váže na DNA strukturu. TOPRO-3 je červené barvivo.

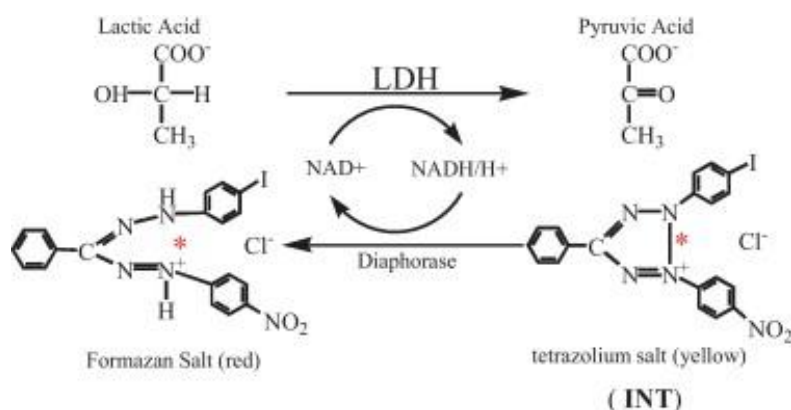
Detekce životnosti buněk se v případě proidium jodidu, ethidium homodimeru-1, TOTO-1 a TOPRO-3 vyhodnocuje fluorescenčním mikroskopem nebo průtokovou cytometrií [31].

6.1.2 LDH test

LDH test je elegantní biochemická metoda, která slouží ke stanovení buněčné cytotoxicity. LDH neboli enzym laktát-dehydrogenáza je rozpustný enzym přítomný v cytosolu většiny eukaryotických buněk savců [32]. Laktát-dehydrogenázový test je založen na měření činnosti právě tohoto enzymu. Laktát-dehydrogenáza je velmi stabilní enzym, který je odolný proti rozkladu proteáz a v dostatečném množství se vyskytuje v cílových buňkách. Takovýchto podobných enzymů není mnoho, nicméně všudypřítomný LDH je mimořádně vhodný pro takovýto postup [33]. Tento enzym je ukazatelem nenávratného poškození buňky, jež odumřela [34]

LDH se uvolňuje do kultivačního média po buněčné smrti v důsledku poškozené plazmatické membrány. Zvýšení LDH aktivity v kultuře supernatantu je úměrná počtu lyzovaných buněk. K měření LDH činnosti slouží cytotoxický LDH testovací kit s přidanou reakční směsí, která obsahuje: laktát, NAD⁺, NADPH oxidázu a INT. LDH katalyzuje redukci NAD⁺ na NADH za přítomnosti L- laktátu, zatímco tvorba NADH může být měřena ve spřažené reakci, ve které tetrazoliová sůl INT je redukována na formazanový produkt. (Obr. 8) Množství vysoce barevného a rozpustného formazanu může být měřeno při hodnotě 490 nm pomocí spektrofotometru. Pro většinu kitů probíhá reakce a čtení výsledků z testovací destičky s 96 jamkami [34,35].

Uvedený test má značné výhody: neexistuje žádný určený čas výdaje na označování buněk. Test je spolehlivý, rychlý a jeho vyhodnocení je jednoduché [33].



Obr. 7: Schéma kvantitativního stanovení LDH. Uvolněný LDH v buněčných supernatantech z poškozených buněk je základem pro stanovení cytotoxicity. Kvantifikován pomocí své katalytické aktivity ve spojení s enzymem diaphorázou [36].

6.2 TESTY MITOCHONDRIÁLNÍCH FUNKCÍ

Mitochondrie představují konstantní organelu všech živočišných buněk. Mitochondrie patří mezi membránové organely. Skládá se ze dvou samostatných biomembrán- vnitřní a vnější, z mezi-membránového prostoru a matrix, což je hustá hmota velice bohatá na proteiny. Hlavní funkcí mitochondrie je tří fázová aerobní respirace (glykolýza, Krebsův cyklus a oxidativní fosforylace), což je sled metabolických reakcí, ve kterém jsou oxidovány organické látky na CO₂ a H₂O, a uvolněná energie je uskladněna jako ATP [28].

Do testů založených na mitochondriální funkci řadíme skupinu testů zaměřených na stanovení mitochondriálních dehydrogenáz. Dále skupinu založených na membránovém potenciálu mitochondrií a také test, který funguje pomocí detekce ATP.

6.2.1 Stanovení aktivity mitochondriálních dehydrogenáz

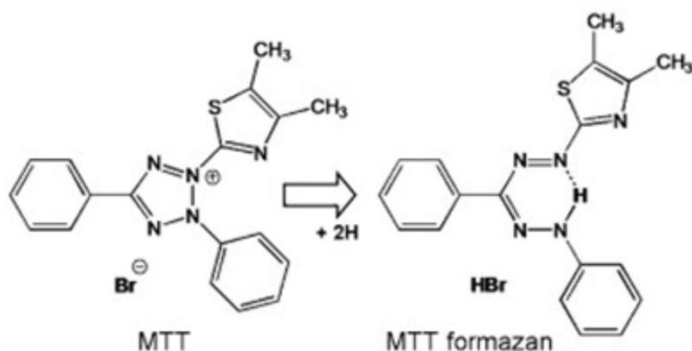
Tyto cytotoxické testy jsou založeny na funkci mitochondriálních dehydrogenáz, které redukují tetrazoliové soli. Mezi testy patří např. MTT-test, XTT-test, MTS-test, WST-1 test a WST-8 test.

6.2.1.1 MTT test

Tento test byl poprvé popsán Mosmannem v roce 1983. Jedná se o kolorimetrický test sloužící k měření aktivity buněčných enzymů. V současné době se kolorimetrické testy provádějí pomocí tetrazoliové soli-thiazolybluetetrazolium bromide, často označovaného jako MTT, jehož chemický vzorec je (3-[4,5- dimethyl-2- thiazolyl]-2,5- diphenyl-2H-tetrazolium bromid), který se široce používá pro hodnocení cytotoxicity, životaschopnosti

buněk, k proliferačním studiím v buněčné biologii a k metabolické analýze normálních a nádorových buněk [37].

MTT tvoří nažloutlý vodný roztok. Barvivo redukuje mitochondriální dehydrogenázy, které ve spojení s endoplazmatickým retikulem, endozomy a plazmatickou membránou, enzymů dýchacího řetězce a chemických látek účastnících se metabolické aktivity buněk, se přeměňuje na ve vodě nerozpustný fialově- modrý formazan. Formazan, který je rozpustný pouze v tucích, může být extrahován pomocí organických rozpouštědel a je vyhodnocován spektrofotometricky. Množství vytvořeného formazanu ukazuje redukční potenciál cytoplasmy a životaschopnost buněk. Od začátku používání metody se za důsledek testu považuje snížení aktivity mitochondriálních dehydrogenáz v živých buňkách a za místo, kde dochází k redukcí a formaci formazanu, jsou považovány mitochondrie. V současnosti se rozšířila myšlenka, že mitochondriální sukcinát dehydrogenázy živých buněk redukující MTT odpovídá množství formazanu, a ten je přímo úměrný počtu živých buněk [38].



Obr. 8: Chemický vzorec MTT a jeho zredukovaný formazanový produkt [39].

Detekce a kvantifikace formazanu se provádí pomocí spektrofotometru- speciální čtečky při 570nm. Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk (čím tmavší barva a tedy vyšší absorbance, tím vyšší procento živých buněk [37].

Výhodné je použít test i pro kolorimetrickou kvantifikaci buněčné proliferace, životaschopnosti a cytotoxicity. Test MTT byl také přizpůsoben ke kvantifikaci cytotoxické aktivity a růstu inhibiční aktivity cytokinů. Zároveň je test jedním z nejrozšířenějších, které se používají pro buněčnou proliferaci. Je jednoduchý, vyhodnocení lze provést i multiskenováním spektrofotometry, pomocí kterých se mohou vyšetřit různé vzorky najednou. Tento test je také velmi přesný a bezpečný a nepoužívají se při něm radioaktivní látky.

Při stanovení cytotoxicity pomocí MTT testu je nutné brát v úvahu existenci některých redukčních činidel a inhibitorů dýchacího řetězce, které mohou způsobit snížení efektu MTT formazanové formace. Bylo také zjištěno, že MTT je výrazně ovlivněn řadou parametrů, jakými jsou pH média, obsah D-glukózy v růstovém médiu a buněčná koncentrace pyridinových nukleotidů [40].

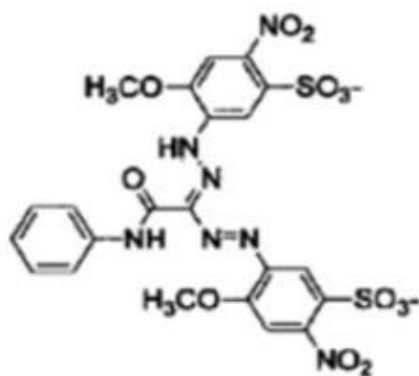
6.2.1.2 XTT test

Tetrazoliová sůl- 2,3-bis[2- methoxy- 4- nitro-5- sulfophenyl]- 2H- tetrazolium-5- carboxanilide je chemický název pro XTT. Jedná se o rozšířená metoda sloužící k měření životaschopnosti buněk a k proliferaci. Buněčná proliferace může být hodnocena v mnoha ohledech. Společně s MTT testem se ho používá jako jednoduchého, rychlého a spolehlivého testu, který je založen na základě tetrazoliových solí.

Životaschopnost a proliferace jsou založeny na kapacitě mitochondriálních dehydrogenáz, které v žijících buňkách redukují XTT na ve vodě rozpustný, oranžově zbarvený formazanový produkt. Množství formazanu se měří pomocí spektrofotometru, který odhaduje relativní životnost buněk. K této přeměně dochází jen v živých buňkách. Vzorek lze kvantifikovat měřením absorbance při vlnové délce 475 nm [41].

Proces redukující tetrazoliovou sůl představuje celý komplex dějů a není dosud kompletně vysvětlen. Redukce těchto barviv závisí na NADH a NADPH koncentracích uvnitř buněk, které se měří pomocí redoxního potenciálu v buňkách. Redoxní potenciál je vyjádření míry schopnosti redoxního systému převést jednoho z reakčních partnerů do oxidovaného stavu. Nicméně tato redukce závisí na meziproduktech elektronových akceptorů, jako je phenazimethylsulfát.

Tetrazoliové produkty jsou rozpustné a téměř netoxické. Test XTT je kolorimetrickou metodou. Test XTT, přestože je prováděn velmi podobným způsobem jako test MTT, má tři hlavní výhody: vyšší citlivost, vyšší dynamický rozsah a menší potřebnou manipulaci. Pozitivním důsledkem je snížené riziko vzniku chyb. Jeho nevýhodou je nemožnost vytvořit standardní kalibrační křivku, protože použité tetrazoliové soli jsou citlivé na velkou škálu různých proměnných [42].



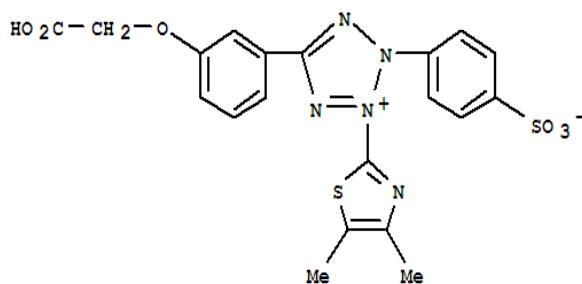
Obr. 9: Chemický vzorec XTT formazanu [43].

6.2.1.3 MTS test

MTS (3-(4,5- dimethylthiazol- 2- yl)-5-(3- carboxymethoxyphenyl)-2-(4- sulfophenyl)-2H- tetrazolium) cytotoxický test je založen na principu redukce tetrazoliové směsi životaschopnými buňkami do intenzivně zbarveného produktu. Za běžných kultivačních podmínek je množství vzniklého barevného formazanu přímo úměrné počtu životaschopných buněk.

Formazanové produkty vzniklé bioredukci MTS jsou přímo rozpustné v kultivačním médiu, a proto je není nutné rozpouštět, což je krok nutný pro MTT test.

Výhodami testu je snadné použití, přesnost a rychlá indikace toxicity [29].

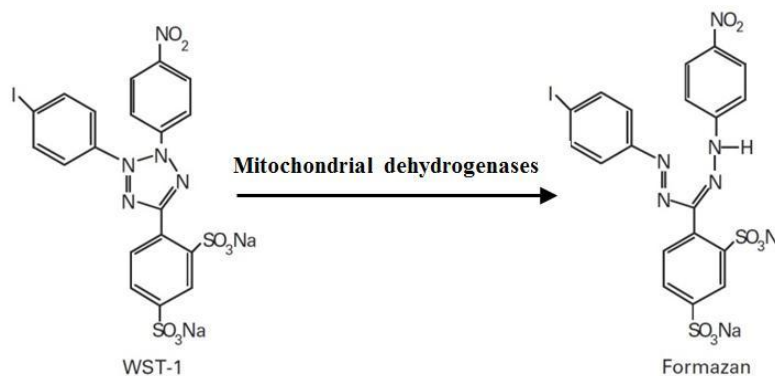


Obr. 10: Struktura MTS [44].

6.2.1.4 WST-1 test

WST-1 (2- (4- iodophenyl)-3-(4- nitrophenyl)-5-(2,4- disulfophenyl)- 2H- tetrazolium) je určen k použití spektrofotometrické kvantifikaci růstu buněk a ke zjišťování jejich životaschopnosti. Jedná se o chemosenzitivní, kolorimetrický test, který je obdobně jako cytotoxické testy MTT, XTT a MTS založený na štěpení tetrazoliové soli pomocí mitochondriálních dehydrogenáz v živých buňkách.

Výhodou testu je, že WST-1 činidlo je rozpustné ve vodě, není třeba provádět speciální krok pro rozpouštění. WST-1 je daleko stabilnější než u testů MTT a XTT. Skladování činidla probíhá při teplotě 2-8°C po dobu několika týdnů, aniž by u něho došlo ke snížení kvality. Nevýhodou může být snad jen to, že oproti XTT testu dochází k pomalejšímu obarvení u buněk [45].

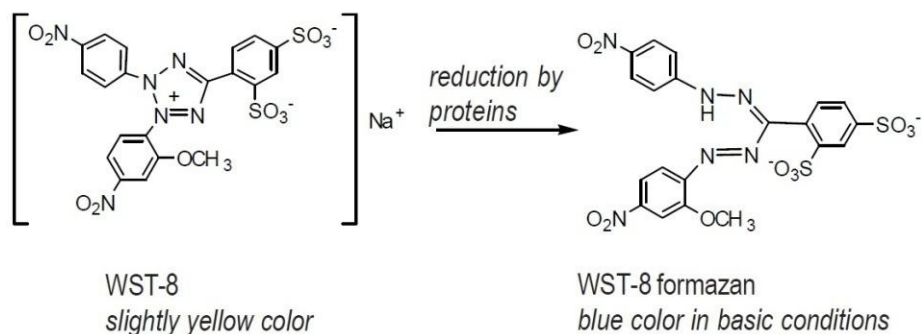


Obr. 11: Struktura WTS-1 a jeho formazanového produktu [46].

6.2.1.5 WST-8 test

Test WST-8 ((2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium) je snadno použitelným nástrojem pro studium indukce a proliferace buněk v *in vitro* modelech. Test je opět založen na extracelulární redukci WST-8 NADH-dehydrogenázou produkovanou mitochondriemi. WST-8 produkty jsou rozpustné, odpadá tedy krok nutný k rozpouštění produktu. Množství formazanového barviva v buňkách vytvořeného pomocí dehydrogenáz je přímo úměrné počtu životaschopných buněk.

WST-8 je stabilnější než jiné tetrazoliové soli, což se hodí při delší inkubační době. Detekce výsledku je také citlivější než u jiných tetrazoliových solí. Kromě toho je tato metoda spolehlivá a snadno použitelná [47].



Obr. 12: Struktura WTS-8 a jeho přeměna na jeho formazanový produkt [48].

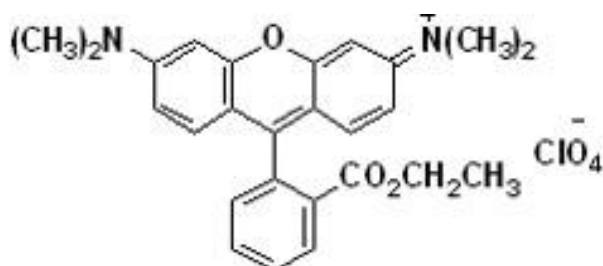
6.2.2 Membránový potenciál mitochondrií

Pouze živá buňka má funkční mitochondrie, které vykazují membránový potenciál. Mitochondriální membrána hraje klíčovou roli v membránovém potenciálu. Vnitřní strana membrány má negativní potenciál, který interferuje s fluorescenční barvou tak, že pouze funkční mitochondrie vykazuje fluorescenci.

Existuje celá škála mitochondriálních aktivit, která je spojená s membránovým potenciálem: syntéza ATP, vápník- příjem a uvolňování, transport enzymových prekurzorů do mitochondrie i syntézu proteinů.

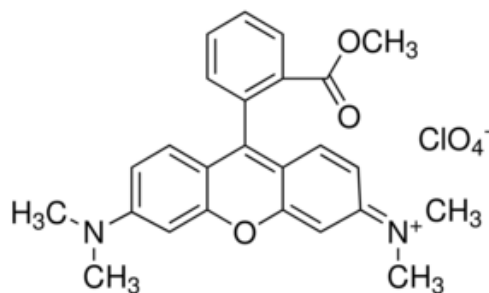
Využívá se celá řada lipofilních barviv, které se hromadí v mitochondriích a jejichž fluorescence je přímo úměrná právě membránovému potenciálu: tetramethylrhodaminemethyl ester (TMRM); tetramethylrhodamineethyl ester (TMRE); rhodamine 123 (6-amino-9-(2-methoxycarbonylphenyl) xanthen-3-yliden); 5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1) a (3,3'-diehexiloxadiazolcarbocyanine iodide [DiOC6(3)].

TMRE je červené barvivo, které se distribuje přes mitochondriální membrány. Není toxické a buňky mohou být kultivovány v přítomnosti nízké koncentrace TMRE.



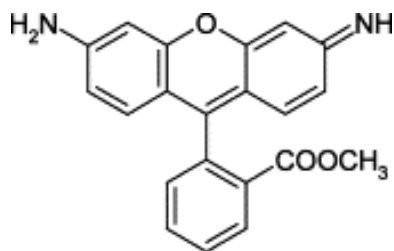
Obr. 13: Struktura TMRE [49].

TMRM podobná molekula jako TMRE. Je to buněčné, kationové, červeno-oranžové fluorescenční barvivo.



Obr. 14: Struktura TMRM [50].

Rhodamine 123 je další barvivo tentokrát zelené barvy. Barvivo slouží k pozorování membránového potenciálu mitochondrií. Barvivo je bez cytotoxických efektů.



Obr. 15: Struktura rhodaminu 123 [51].

JC-1 je metachromatické, lipofilní, kationtové fluorescenční barvivo, které se hromadí ve zdravých mitochondriích a vykazuje červenou barvu.

[DiOC6(3)] je fluorescenční barvivo používané pro detekci změny membránového potenciálu. Je velmi citlivé a je zobrazeno zelenou barvou [52].

Detekce membránového potenciálu probíhá za pomoci fluorescenční mikroskopie nebo průtokové cytometrie.

6.2.3 Syntéza ATP

Test syntézy ATP funguje pomocí detekce adenosintrifosfátu (ATP) a reakce luciferin-luciferázy, která vykazuje značný příslib v *in vitro* cytotoxických testech [53].

ATP je hlavním zdrojem energie pro všechny živé organismy. Bez ohledu na jejich zdroj je veškerá energie, ať už z chemické oxidace nebo vstřebáváním světla, přeměněna živými buňkami na ATP. Tato forma energie je pak základem pro všechny procesy, které ji potřebují, včetně biosyntézy, pohybu a rozmanitých funkcí v živém organismu [54].

Funkce mitochondrií spočívá v přeměně energie ADP na ATP. Celkový výtěžek aerobní respirace je 36 molekul ATP.

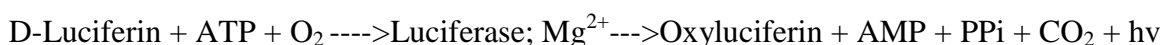
Pokud by mitochondriální funkce přestala, proces oxidativní fosforylace ustane a buňky zemřou.

Proces oxidativní fosforylace užitečný pro posuzování životaschopnosti buněk. ATP koncentrace a ATP/ADP poměr poskytují index, který vyjadřuje energetický stav buňky. Tvorba ATP je řízena gradientem vodíkových iontů rozvinutých přes vnitřní stranu mitochondriální membrány a mitochondriální membránový potenciál je potom dalším kvantitativním znakem sloužícím k posuzování funkce mitochondrií. Pokles zastoupení ATP je známkou toxického poškození buňky. Mitochondrie jsou také částečně zodpovědné

za údržbu redoxního stavu buňky. Testy na zjišťování redoxního stavu jsou často klasifikovány jako testy na mitochondriální funkci [55].

ATP je detekován pomocí metody ATP bioluminiscence pomocí komplexu luciferáza-luciferin. Jedná se o enzym, který je extrahován ze světlušek rodu *Photinusse* substrátem zvaným luciferin.

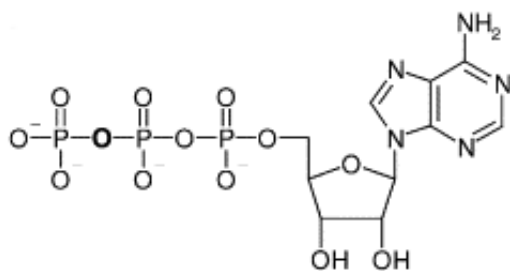
Od roku 1885 byla bioluminiscence předmětem vědeckých výzkumů. Test ATP byl nejprve vyvinut jako test pro zjištění životaschopnost buněk. Až v roce 1947 W.D.McElroy poprvé ukázal a dokázal, že světlo emitované v průběhu reakce je přímo úměrné množství ATP. Tato reakce vypadá následovně:



V přítomnosti kyslíku a hořčnatých iontů je luciferin převeden na oxyluciferin a ATP je převedeno na AMP, což je adenosin monofosfát s uvolněním pyrofosforečnanu a emisí světla v rozsahu vlnových délek 470-700 nm [56].

Tento mikrotitrační ATP test vyžaduje poměrně málo buněk a je proto velmi vhodný pro hodnocení cytotoxicity využívající tkáňové buňky jakož i buněčné linie. U výsledku je počet přímo úměrný obsahu ATP a počtu buněk přes nejméně čtyři měření [53].

Intenzita ATP emitovaného záření je měřena luminometrem, dostupným a spolehlivým přístrojem používaným k měření chemických a bioluminiscenčních reakcí. Oproti ostatním analytickým metodám má řadu výhod - mimořádnou citlivost, široký dynamický rozsah, levnou instrumentaci. Vznik nových luminiscenčních testů činí tuto techniku velmi perspektivní [57].



Obr. 16: Struktura ATP [58].

6.3 TESTY FUNKCE LYSOZOMŮ

6.3.1 Test neutrální červení

Test neutrální červení patří k jedné z nejpoužívanějších metod pro vyhodnocování cytotoxického efektu chemických látek na tkáňových kulturách. Je to dobře známá kvantitativní kolorimetrická metoda [59].

Princip testu je založen na skutečnosti, že pokud jsou buňky v kontaktu s neutrální červení, životaschopné buňky hromadí barvivo ve svých lysosomech a buňky se tedy obarví, zatímco mrtvé buňky nejsou schopné ani akumulovat ani udržet barvivo.

Při testu dochází k tomu, že životaschopná buňka absorbuje slabě kationtové barvivo-neutrální červeně, chemickým názvem (3- Amino- 7-dimethylamino- 2 -methylphenazine hydrochloride), které dále pomocí pasivní difúze proniká přes buněčnou membránu a hromadí se intracelulárně v lysosomech (lyzozomální pH < cytoplazmatické pH), kde se barvivo váže na záporně nabitou lyzozomální matrix. Mrtvé buňky tuto schopnost ztrácejí.

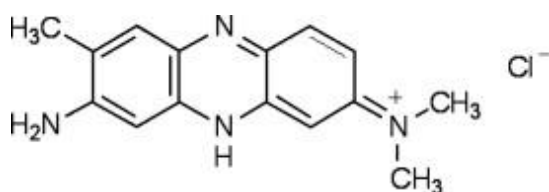
Barvivo může být použito před nebo až po vystavení toxických látek. Výsledkem je intenzita obarvení neutrální červení v buněčné populaci, které je přímo úměrné množství životaschopných buněk v této populaci. Detekce pak probíhá nejčastěji spektrofotometricky anebo i fluorometricky [60].

O toxicitě nám také poskytuje informace tzv. stupeň inhibice růstu související s koncentrací zkoušené sloučeniny. Tento faktor je užitečný pro detekci chemických látek selektivně ovlivňujících lyzozomy, a tak snáze detekuje specifický mechanismus účinku. Každá chemikálie mající lokalizovaný účinek na lyzozomech bude mít za následek uměle vytvořený pokles počtu buněk a jejich životaschopnosti. Například, chlorochin fosfát specificky mění lyzozomální pH, a tím má větší vliv na vychytávání neutrální červeně než většina chemikálií, což vede k nadhodnocení toxické koncentrace.

Jednou z hlavních nevýhod tohoto testu je srážení barviva do viditelných, jemných krystalů vypadajících jako jehlice. Pokud tento jev nastane, je měření nepřesné. Sraženiny jsou vyvolané některými chemikáliemi a lze je v určité fázi postupu vizuálně kontrolovat. Kontrola je tedy velmi důležitá pro bezchybné měření [29].

I při tomto testu mohou vzniknout chyby. Například pokud necháme buňky déle na médiu, může dojít k vyplavování barviva do fixačního roztoku. Dalším zdrojem chyb může být nerovnoměrné odpařování tekutiny v jamkách a v neposlední řadě také možnost neutrální červeně precipitovat při skladování látky.

Jedná se o levnou a jednoduchou metodu, která má široké použití a umožňuje automatizaci [59].



Obr. 17: Chemický vzorec neutrální červeně [61].

6.4 TESTY OBSAHU CELKOVÝCH PROTEINŮ

6.4.1 SRB test

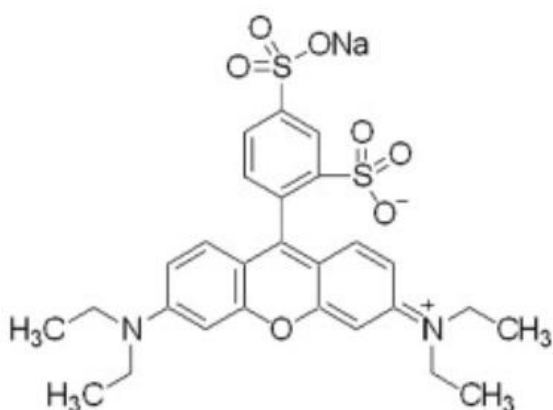
SRB neboli sulforhodamin B je fluorescenční barva, které se také využívá k testování toxických látek. SRB test byl vyvinut Skehanem a jeho kolegy pro měření látek indukujících cytotoxicitu a proliferaci buněk pro širokou škálu screeningových aplikací. V roce 1985 byla testovací metoda prezentována národním institutem rakoviny a v souvislosti s tímto testem byla zmíněna celá řada léků určených k léčbě nádorů [62].

Princip je založen na schopnosti proteinového barviva sulforhodaminu B vázat se elektrostaticky a v závislosti na pH na proteinové aminokyselinové zbytky kyseliny trichloroctové (TCA) fixovaných buněk. V mírně kyselém prostředí se na protein barvivo váže a při mírných základních podmínkách může být z buněk extrahováno a rozpuštěno pro měření [63].

Samotný postup testu není náročný. Provádí se v 96ti jamkové destičce. Buňky s barvivem stačí zafixovat a vysušit a destička je považována za stabilní a může být hodnocena, aniž by se snižovala kvalita a přesnost výsledku testu.

Množství navázaného sulforhodaminu B je úměrné celkovému množství buněčných proteinů, a tudíž i celkovému počtu buněk v kultuře. Růst buněk je určený optickou hustotou. Detekce je spektrofotometrická při vlnové délce 540 nm.

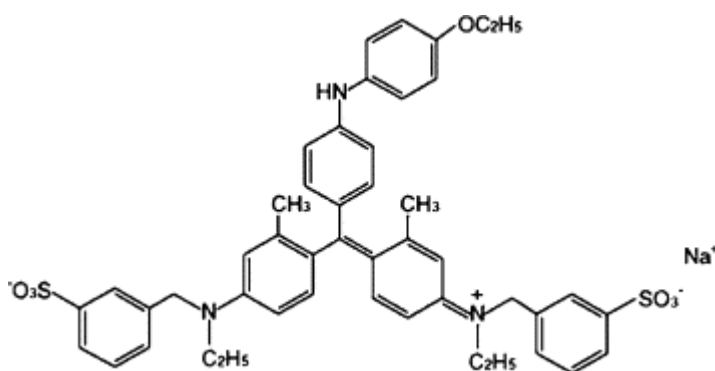
SRB test je vhodný pro velkou škálu screeningu léků. Je rychlý, levný, jednoduchý, poloautomatizovaný. SRB test je nedestruktivní a neomezeně stabilní metodou. I přesto, že vykazuje test SRB obdobné výhody jako test MTT, je tato metoda méně časově náročná a jednodušší. Výsledek měření je stabilní a je méně citlivý na environmentální výkyvy [62].



Obr. 18: Chemická struktura sulforhodaminu B [64].

6.4.2 Stanovení proteinů dle Bradfordové

Jednou z dalších hojně využívaných metod ke zjištění proteinů je metoda dle Marion Bradford, která byla poprvé popsána v roce 1976. Metoda je založena na vazbě barviva Coomassie Brilliant blue G250 na proteinové molekuly v kyselém prostředí. Na nepolární část proteinu se váže trifenylmetanová skupina a na bazické skupiny ve vedlejších řetězcích aminokyselin se váže aminosulfoskupina. Červené barvivo se po reakci s proteinem stane intenzivně modrým. Barevná změna je úměrná množství proteinu a je jí možné měřit spektrometricky při 595 nm. Tato metoda je destruktivní, tzn.:že po jedné analýze je vzorek znovu nepoužitelný. Výhodou je rychlé zpracování testu. Nevýhodou je pak neslučitelnost s povrchově aktivními látkami, které se běžně používají k rozpuštění membránových proteinů [65, 66].



Obr. 19: Chemická struktura Coomassie Brilliant blue [67].

6.5 TESTY EXPRESE SPECIFICKÝCH PROTEINŮ

6.5.1 Western blot

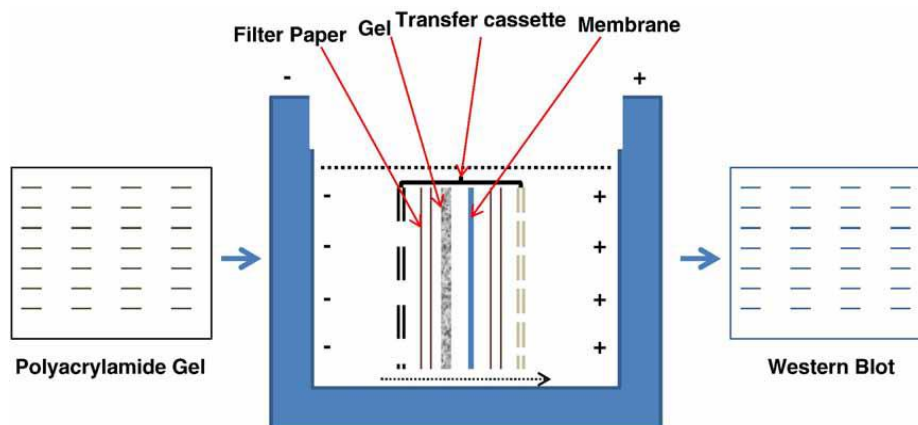
Jednou z hojně používaných technik detekce proteinů je Western blot (WB) analýza. WB, také známý jako protein blot nebo imunoblot, se vyvinul ze Southernblotu (což je technika pro detekci DNA) a z Northernblotu (technika pro detekci RNA). Western blot je základní technika která slouží k imunochemické detekci látek proteinové povahy za použití protilátek. Při Western blotu dochází k přenosu proteinů separovaných pomocí SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného) do absorpční membrány. Jednotlivé proteiny se následně detekují pomocí specifických protilátek, Vizualizace může být pomocí barevné reakce, fluorescence nebo chemiluminiscence. WB je výkonným nástrojem pro detekci a charakterizaci velkého množství proteinů a zejména těch proteinů, které jsou v buňkách exprimovány v malém množství. Záleží na tom, jaký cytotoxický účinek se od dané látky očekává. Nejčastěji látky

zasahují do regulace buněčného cyklu nebo působí genotoxicky. Z těchto důvodů se nejčastěji pomocí techniky WB stanovuje proteiny p53 a γ -H2AX.

P53 je tumor supresorový protein který hraje klíčovou úlohu při regulaci biologické odpovědi na poškození DNA. Jeho název pochází ze skutečnosti, že má molekulovou hmotnost 53 kilodaltonů při analýze metodou SDS-PAGE. Tumor supresorový gen p53 kóduje jaderný fosfoprotein, který je rozhodující pro řízení buněčného cyklu a prevenci nekontrolovatelné proliferace buněk, která může vést k rakovině.

Měření indukce proteinu p53 může být účinným nástrojem pro identifikaci environmentálních genotoxinů [68, 69].

Jako další protein se velmi často stanovuje γ -H2AX. Když dojde k poškození DNA, ať už endogenně (apoptóza, poškození oxidativním stresem) nebo exogenně (chemikálie, radiace), vzniká dvouřetězcové přerušení a poté následuje fosforylace histonu, H2AX. H2AX je varianta rodiny proteinů která je součástí histonu v nukleozómu. Protein je fosforylován kinázami jako je např. ATM a ATM-Rad-3. Tento nově fosforylovaný protein se nazývá γ -H2AX a je klíčovým faktorem v procesu lokalizace poškozené DNA a její následné opravy [70].



Obr. 20: Schéma provedení western blotu [71].

Mezi nevýhody WB patří časová a finanční náročnost a potřeba mít primární protilátku proti danému proteinu. WB metoda nebyla nikdy standardizována a mnoho proměnných musí být stanoveno empiricky pro každou dvojici protein-protilátka. Naopak hlavní výhodou je jednoznačná identifikace proteinu i ve složité směsi proteinů.

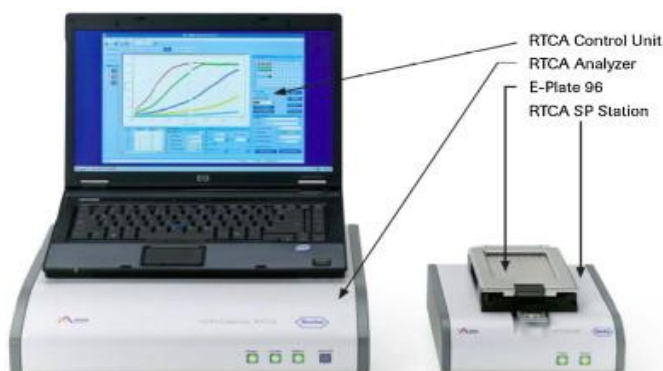
6.6 STANOVENÍ CYTOTOXICITY V REÁLNÉM ČASE

V dnešní době patří testování látek na buněčné úrovni k nutné součásti mnoha vědeckých výzkumů a experimentů. Donedávna ovšem neexistovala metoda, která by sledovala dynamické procesy v buněčné populaci, ke kterým patří např. proliferace, buněčná smrt apod. Průlom v tomto odvětví způsobil objev systému xCELLigence, který je schopen sledovat tyto dynamické procesy v reálném čase, čímž se liší od end-point analýz. U end-point analýz, k nimž patří všechny ostatní testy, je výsledek testu znám pouze v momentě vyhodnocení; průběh se nedá monitorovat. Zatímco u testů v reálném čase jsou buněčné události monitorovány od počátku experimentu až po jeho konec. xCELLigence tak nabízí zcela novou možnost monitorování a analýzy buněk [72].

V současné době existují tři typy systému xCELLigence. Prvním z nich je RTCA (Real Time Cell Analyser) SP (single plate), dalšími jsou RTCA DP (dual plate) a RTCA MP (multi plate). Všechna tři zařízení xCELLigence RTCA (buněčného analyzátoru v reálném čase) se skládají z:

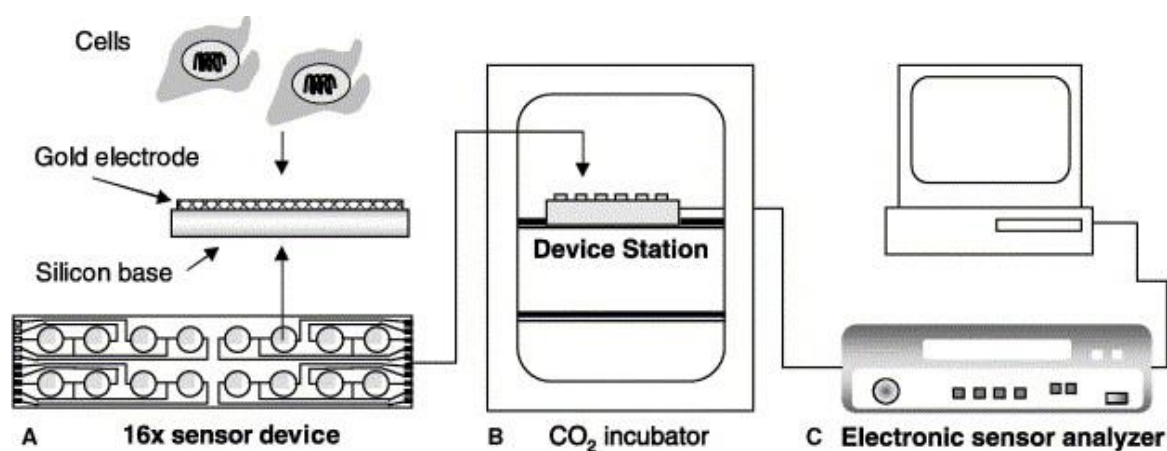
- RTCA analyzátoru
- RTCA stanice
- RTCS řídicí jednotky
- E- destičky/ destiček

Jediným rozdílem mezi výše zmíněnými druhy přístrojů je počet destiček. RTCA SP slouží k monitorování pouze jedné destičky s 96- jamkami. RTCA DP a RTCA MP umí paralelně monitorovat a analyzovat větší počet destiček, a to až tři u RTCA DP a až šest u RTCA MP [73]. RTCA stanice s E-destičkou či destičkami je umístěna uvnitř běžného buněčného kultivačního inkubátoru. RTCA řídicí jednotka a RTCA analyzátor jsou umístěny mimo tento inkubátor.



Obr. 21: RTCA přístroj [74].

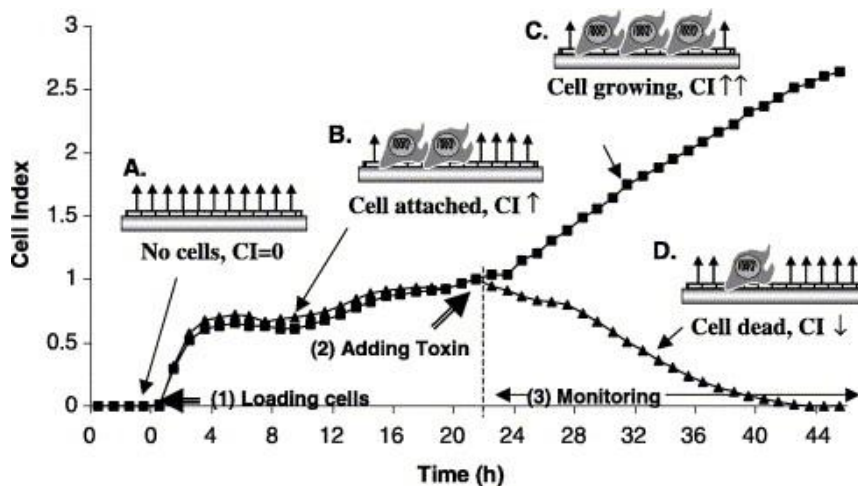
Princip metody je založen na měření impedance. Impedance je odpor pro elektrický střídavý proud dané frekvence. Vkládané slabé elektrické napětí vede ke vzniku elektrického pole mezi elektrodami, které vzájemně působí s iontovým prostředím růstového média, jež je přítomné v jamkách. Měřená impedance je impedancí buněk přisedlých ke dnu jamek. Při metodě jsou tedy použitelné pouze adherentní buňky. Pokud samy buňky adherence nejsou schopny docílit, pak jim lze pomoci stimulací či pokrytím dna jamek pomoci tak, aby byly přichyceny ke dnu. Přilnutí buněk na dno destičky, tedy povrch elektrod, vede k vyšším hodnotám elektrické impedance [73].



Obr. 22: Schéma principu RTCA přístroje [75].

Je však možné, že buňky špatně přilnou ke dnu anebo nejsou přítomny vůbec, pak je hodnota elektrické impedance rovna nule. Naopak čím více buněk je přisedlých na povrchu elektrod, tím vyšší bude mít hodnotu elektrické impedance. Naměřená elektrická impedance je vyjadřována jako CI (cell index, buněčný index) [75]. Buněčný index je odvozený z relativních změn měřené elektrické impedance. Je to bezrozměrná veličina. CI vypovídá o stavu buněk.

Monitorování v reálném čase tedy spočívá v tom, že hodnoty elektrické impedance jsou zobrazovány následně jako CI, jsou měřeny v určitých časových intervalech a tyto hodnoty jsou následně zcela automaticky zanášeny do grafu, který se zobrazí na displeji. Výsledkem jsou křivky, které jsou závislé na čase a buněčném indexu [72].



Obr. 23: Znázornění buněčného indexu v závislosti na buňkách a čase. A) nejsou přítomny buňky, CI=0; B) buňky se přidávají, CI vzrůstá; C) buňky rostou, hodnota CI je v této fázi nejvyšší; D) buňky umírají, CI klesá [75].

Systém xCELLigence lze použít k analýze buněčné proliferace a diferenciaci; viability; buněčné adhezi; buněčné smrti; měření cytotoxických účinků látek na buňky; buněčně zprostředkované cytotoxicitě; aktivaci i funkci buněčných receptorů; i migrace buněk.

Mezi výhody této metody patří to, že je tato metoda neinvazivní, což znamená, že při testování není potřeba žádné značení ani barvení. Monitorování buněčných událostí probíhá v podmínkách nejbližších přirozenému buněčnému prostředí. Účinky na buňky je možno měřit krátkodobě v rámci několika minut, tak i dlouhodobě (několik dní). Je to metoda relativně jednoduchá- výsledky jsou velice spolehlivé a kvalitní a nahrávání dat je zcela automatizováno počítačem, použití softwaru je také velmi snadné [73].

6.7 TESTY OBSAHU A SYNTÉZY NUKLEOVÝCH KYSELIN

6.7.1 BrdU test

Za „zlatý standard“ pro posouzení buněčného růstu byl považován $^3\text{H-TdR}$ neboli ^3H thymidin. Testování touto látkou mělo řadu nevýhod, a proto byly vyvíjeny nové testovací metody. Kromě jiných vznikl i BrdU test, jenž splňuje potřebu pro citlivou, spolehlivou a jednoduchou metodu pro hodnocení kvality a životaschopnosti buněk. Ve srovnání s ostatními testy, které by nahradily „zlatý standard“, je BrdU test tou nejcitlivější a nejreprodukovatelnější metodou, která vykazala nejvyšší stimulační index [76].

Stimulační index (SI) značí poměr v cpm pro stimulované kultury lymfocytů oproti nestimulovaným kulturám lymfocytů. Normální hodnota SI je >5 pro antigen stimulující

a >100 pro mitogen stimulující odpověď. SI v případě BrdU testu je zřetelně nižší, než bylo „u zlatého standardu“ a nachází se v rozmezí 7-8 pro mitogenní odpovědi [77].

BrdU, jinými názvy 5’bromo-2’deoxy-uridine neboli bromodeoxyuridine, je analogem prekurzoru DNA-thymidinu (což je derivát uridinu) a může být specificky začleněn do DNA v buňkách a pokračuje přes S (syntéza DNA) fázi buněčného cyklu. Anti-BrdU specifické protilátky mohou být použity k identifikaci buněk, u kterých probíhá syntéza DNA během expozice BrdU. Počet buněk je stanoven v S fázi buněčného cyklu na základě fluorescenční mikroskopie. Toto fluorescenční barvení s BrdU poskytuje neradioaktivní techniku s vysokým rozlišením pro stanovení počtu jednotlivých buněk [78].

Nedávno byl popsán nový přístup k detekci BrdU v množících se buňkách- tzv. ultrafialová indukovaná detekce (UVID). Vzhledem ke své mírné povaze UVID metoda může být souběžně kombinována s detekcí jiných buněčných markerů, jako jsou antigeny na povrchu buněk a mohou být použity k analyzování buněčného cyklu a distribuci specifických subpopulací v heterogenní buněčné suspenzi. UVID metodika byla vyvinuta za účelem umožnit souběžnou detekci buněčných antigenů a BrdU. Ačkoliv ukázky jeho použití pro fenotypové odlišení heterogenních nádorových buněk byly popsány, užití testů pro studium farmakologických účinků na lidské lymfocyty zatím nebyly hodnoceny [85]. Studie ukazují, že UVID je jednoduchá a životaschopná metoda, která by měla najít široké spektrum užití v imunologických a farmakologických testech [79].

Objevily se studie zabývající se měřením buněčné proliferace ve spojitosti s adenomy, rakovinou tlustého střeva a rozdílným složením přijímané potravy. Základní hypotézou je, že konkrétní složení stravy snižuje nebo zvyšuje míru buněčné proliferace, což následně může snížit nebo zvýšit počet adenomatózních polypů, které jsou považovány za prekurzory pro rakovinu tlustého střeva. Klíčovým aspektem takového studia bylo měření buněčné proliferace právě pomocí BrdU testů [80].

Jelikož BrdU po začlenění do DNA pokračuje do S fáze buněčného cyklu, je možné detekovat tuto látku nejen fluorescenční mikroskopií, ale díky S fázi bývá k detekci používána také průtoková cytometrie [81].

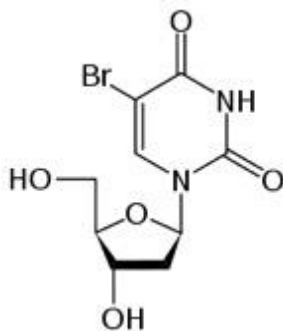
BrdU může být použit jako doplňující nástroj pro hodnocení životaschopnosti embryí- například procento buněk se začleněním BrdU do nově syntetizovaných DNA bylo významně vyšší u koňských embryí než u kozích. Výsledky studie prokázaly, že u koňských embryí BrdU test může být použit [82].

Při tomto testu je třeba brát v úvahu potenciální toxicitu a postranní efekty BrdU. BrdU je totiž toxická a mutagenní látka. A s integrací s halogenovými sloučeninami do DNA se

stabilita DNA výrazně změní, což má za následek zvyšující se riziko změny sesterských chromatid, mutací a rušení DNA zdvojení vlákna v buňkách, které obsahují BrdU [83].

Je rozdíl ve vlivu BrdU *in vitro* a *in vivo*. BrdU *in vitro* zabraňuje diferenciaci embryonálních buněk bez ovlivnění buněčného dělení nebo životaschopnosti buněk a zvyšuje schopnost v kostní dřeni u dospělých k získání mezenchymálních kmenových buněk, které se dále mohou diferenciovat do nervových a sítnicových buněk, což může přivodit značné komplikace v těle organismu jako například nádorové bujení [84].

Je to jednoduchá, citlivá, neradioaktivní, poměrně rychlá a relativně levná metoda pro měření DNA syntézy v kultivovaných buňkách.



Obr. 24: Struktura BrdU [85].

7. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo podat ucelený přehled literatury, která se zabývá testováním cytotoxicity *in vitro*. Záměrem tedy bylo přiblížení druhů a funkcí tkáňových kultur, s nimiž se při testování cytotoxicity pracuje. Práce se zabývá také mechanismy působení toxikantů a popisuje vyhodnocování cytotoxicity *in vitro*.

Stěžejní otázkou práce je popis nejčastěji používaných jednotlivých testů, jak tradičních tak moderních, jimiž je možno zjišťovat cytotoxicitu na tkáňových kulturách. Testy jsou rozděleny do jednotlivých skupin dle toho, s jakými buněčnými organelami se reakce uskutečňují.

Pro hodnocení *in vitro* cytotoxicity se v praxi volí nejvhodnější experimentální parametr na základě mechanismu buněčného poškození, u kterého hodnotíme následující. Pro vyšetření integrity buněčné membrány se používají LDH testy a testy trypanovou modří. Pro zkoumání funkce mitochondrií se využívají MTT testy, XTT testy, MTS testy, WST-1 testy, WST-8 testy, dále testy díky syntéze ATP a testy na membránový potenciál mitochondrií. Pro obsah celkových proteinů se uplatňují SRB testy a metoda dle Bradfordové. Pro zkoumání exprese specifických proteinů aplikujeme Western blot. Pro vyšetření funkce lysozymů se používá barvení neutrální červení. Pro zkoumání nukleových kyselin, jejich obsahu a syntézy se uplatňuje především BrdU test. K modernímu trendu současné doby patří test založený na stanovení cytotoxicity v reálném čase.

Pozornost je také věnována praktickému využití testů s ohledem na finanční, materiální a časovou náročnost, dále na výhody a nevýhody.

Již v současné době je škála testů na zjišťování cytotoxicity na buněčných kulturách mnohem širší a s ohledem na rozvoj vědy lze očekávat, že se jejich počet bude nadále zvyšovat a jejich provedení bude jednodušší.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Ukelis, U., Kramer, P.-J., et al. *Replacement of in vivo acute oral toxicity studies by in vitro cytotoxicity methods: Opportunities, limits and regulatory status*. Elsevier, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 51, 2008, s. 108–118.
- [2] Bhojwani, S.S., Razdan, M. K. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Elsevier, 1996, 767 s.
- [3] Yadav, P. R. *Cell culture*. Discovery publishing house, 2005, 311 s.
- [4] Mather, J.P., Roberts, P.E. *Introduction to cell and tissue culture [electronic source]: theory and techniku*. Springer, 1998, 241 s.
- [5] Aitken-Christie, J., Kozai, T., et al. *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, 1995, 574 s.
- [6] http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/images/ics_organized/References/Cell-Culture-Basics/Data-Image/560.Par.29049.Image.557.230.1.Figure-3-2-gif.gif cit.[2012-06-21].
- [7] Darzynkiewicz, Z., Roederer, M., Tanke, H.J. *Methods in cell biology. Cytometry: New Developments*. Academic Press, 2005, 920 s.
- [8] http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/images/ics_organized/References/Cell-Culture-Basics/Data-Image/560.Par.11209.Image.557.230.1.Figure-3-1-gif.gif cit.[2012-06-21].
- [9] Tampion, J., Tampion, M.D. *Immobilized Cells: principle and applications*. Univerzita Cambridge: Press, 1987, 257 s.
- [10] Markovic, Z., Todorovic-Markovic, B., et al. *The mechanism of cell-damaging active oxygen generation by colloidal fullerenes*. Elsevier, Biomaterials, 28, 2007, s. 5437–5448.

- [11] Frumkin, H. *Environmental Health: From Global to Local*. John Wiley & Sons, 2010, 1200 s.
- [12] Potten, Ch. *Apoptosis: The Life and Death of Cells*. Cambridge University Press, 2004, 202 s.
- [13] Krysko, D.V. Vandenabeele, P. *Phagocytosis of Dying Cells: From Molecular Mechanisms to Human Disease*. Springer, 2009, 447 s.
- [14] Edinger, A.L., Thompson, C.B. *Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy*. Elsevier: Current Opinion in Cell Biology, 16 (6), 2004, s. 663-669.
- [15] Ranter, B.D, Hoffman, A.S, et al. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Academic press, 2012, 1573 s.
- [16] Astashkina, A., Mann, B., Grainger, D.W. *A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity*. Pharmacology & Therapeutics 134, 2012, s. 82–106.
- [17] <http://www.promega.com/~media/images/resources/figures/2900-2999/2952maw4a.gif?la=en> cit.[2012-06-21]
- [18] Stacey, G., Doyle, A., Ferro, M. *Cell culture methods for in vitro Toxicology*. Springer, 2001, 162 s.
- [19] Scanu, M., Mancuso, L., et al. *Evaluation of the use human Mesenchymal Stem Cells for acute toxicity tests; acute toxicity test*. Elsevier, Original Research article Toxicology in Vitro, 25 (8), 2011-12, s. 1989-1995.
- [20] Jankowski, J.A.Z, Polak, J.M. *Clinical Gene Analysis and Manipulation: Tools, Techniques, and Trouble shooting*. Cambridge University Press, 1996, 459 s.
- [21] Ceriotti, L., Ponti, J., et al. *Real-time of cytotoxicity by impedance measurement on a 96-well plate*. Elsevier, Sensors and Actuators B, 123, 2007, s. 769–778.

- [22] http://bioantares.com/uploads/Cyto_test.jpg cit. [2013-06-21].
- [23] Chiba, K., Kawkami, K, Tihyama, K. S. Simultane evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet; staining assay of the same cells. *Toxicology in vitro* 12, 1998, s. 251-258.
- [24] Mahler, H-Ch., Jiskoot, W. *Analysis of Aggregates and Particles in Protein Pharmaceuticals*. John Wiley&Sons, 2001, 384 s.
- [25] Kolářová, H., Stanek, J. *Biofyzika pro studenty zdravotnických oborů*. Grada Publishing a.s., 2006, 230 s.
- [26] Rost, F.W.D. *Fluorescence Microscopy 2*. VB: Cambridge University Press, 1995, 473 s.
- [27] Aehle, W. *Enzymes in Industry*. John Wiley&Sons, 2008, 516 s.
- [28] Celis, J.E. *Cell Biology*. Academic Press, 2005, 2328 s.
- [29] Castell, J.V., Gmez-Lechn, M.J. *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*. Academic Press, 1996, 467 s.
- [30] Wollwmsak, G., Spörl, E., Pham, D-T. *Biomechanical changes in the anterior lens capsule after trypan blue staining*. Elsevier: *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 30 (7), 2004, s. 1526-1530.
- [31] <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Assays-for-Cell-Viability-Proliferation-and-Function/Viability-and-Cytotoxicity-Assay-Reagents.html> cit.[2013-04-25].
- [32] Boas, U., Christensen, J.B. and Heegaard, P.M.H. *Dendrimers in Medicine and Biotechnology: New Molecular Tools*. Royal Society of Chemistry, 2006, 179 s.
- [33] Luttmann, W. *Immunology*. Academic Press, 2006, 243 s.

- [34] Fukkumoto, M., Kujiraoka, T, et al. *Effect of cadmium on gap junctional inter cellular communication in primary cultures of ratrenal proximal tubular cells*. Life Sciences, 69 (3), 2001, s. 247-54.
- [35] Whitford, D. *Proteins: Structure and Function*. John Wiley&Sons, 2005, 542 s.
- [36] Wang, G., Zhang, J. et al. *Understanding and correcting for carbon nanotube interferences with a commercial LDH cytotoxicity assay*. Elsevier: Toxicology, 229 (2-3), 2012, s. 99-111.
- [37] Denziot, F., Lang, R. *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to thetetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability*. Elsevier: Journal of Immunological Methods, 89,1986, s. 271-27.
- [38] Schlerließ, R. *The MTT assay as tool to evaluate and Compaq excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells*. Elsevier: International Journal of Pharmaceutics, 411, 2011, s.98–105.
- [39] Stockert, J.C., Villanueva, A. et al. *MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets*. Elsevier: Acta Histochemica, 114 (8), 2012, s. 785-796.
- [40] Vistica, D., Shekan, P., et al. *Tetrazolium based assay for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production*.Cancer Research, 51, 1991, s. 2515-2520.
- [41] Roehm, N.W., Rodgers, G.H., et al. *An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT*. Elsevier, Journal of Immunological Methods, 142, 1991, s. 257-265.
- [42] Halberstadt, C.R., Emerich, D.V. *Cellular Transplantation: From Laboratory to Clinic*. Academic Press, 2011, 696 s.

[43] Shui, X., Lu, X., et al. *A mammalian two-hybrid system-based assay for small-molecular HIV fusion inhibitors targeting gp41*. Elsevier: Antiviral Research, 90, 2011, s. 54-63.

[44] <http://img1.guidechem.com/chem/e/dict/22/138169-43-4.jpg>cit.[2013-06-28].

[45] Skylar, S-C. *Fabrication of Bioactive Osteogenic Controlled-release Systems, Cellular Platforms, and Cellular Capsules Using Layer-by-layer Nano-assembly*. ProQuest, 2008, 169 s.

[46] <http://www.biovision.com/images/k304.jpg>cit.[2013-06-28].

[47] Diederich, M. *Natural Compounds and Their Role in Apoptotic Cell Signaling Pathways*. John Wiley & Sons, 2009, 400 s.

[48] http://www.dojindo.com/Images/Product%20Photo/PQ02_fig1.jpgcit.[2013-06-28].

[49]http://www.setarehbiotech.com/cw3/assets/product_thumb/6913.jpg cit.[2013-06-28].

[50] <http://www.sigmaaldrich.com/medium/structureimages/60/mfcd00274460.png> cit.[2013-06-28].

[51] Sklenářová, H., Pávek, P., et al. *Determination of rhodamine 123 by sequential injection technique for pharmacokinetic studies in the rat placenta*. Elsevier: Talanta, 58, 2002, s. 1145-1149.

[52] Marriott, G., Parker, I. *Biophotonics- Methods in enzymology*. AcademicPress, 2003, 590 s.

[53] Andreotti P. E., Cree I. A., et al. *Chemosensitivity testing of human tumor using a microplate adenosine triphosphate luminiscence assay: clinical correlation for cis platin resistance of ovarian carcinoma*. Cancer Reseaech, 55 (22), 1995, s. 5276-82.

[54] Prevost, D., Angers, D.A., Nadeau, P. *Determination of ATP in soils by highper formance liquid-chromatography*. Elsevier: Soil Biology and Biochemistry, 23 (12), 1991, s. 1143–1146.

- [55] Bradbury, D.A., Simmons, T.D., et al. *Measurement of the ADP:ATP ratio in human leukaemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis*. Elsevier: Journal of Immunological Methods, 240 (1-2), 2000, s. 79-92.
- [56] Fraga, H. *Fire fly luminescence: a historical perspective and recent developments*. Photochemical Photobiological Sciences, 2, 2008, s. 146-58.
- [57] Rana, S.V. *Biotechniques Theory & Practice*. Rasrogi Publications, 2008, 322 s.
- [58] Krasteva, M., Barth, A. *Structures of the Ca^{2+} -ATPase complexes with ATP, AMPPCP and AMPPNP. An FTIR study*. Elsevier: Biochimica et Biophysica Acta, 1767, 2007, s. 114-123.
- [59] Landis, W.G., Hughes, J.S., Lewis, M.A. *Environmental Toxicology and Risk Assessment*. ASTM International, 1993, 431 s.
- [60] Moon, T.W., Mommsen, T.P. *Environmental Toxicology*. Elsevier, 2005, 560 s.
- [61] Qu, F., Yang, M., et al. *Novel poly (neutral red) nanowires as a sensitive electrochemical biosensing platform for hydrogen peroxide determination*. Elsevier: Electrochemistry Communications, 9 (10), 2007, s. 2596-2600.
- [62] Vichai, V., Kirtikara, K. *Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening*. Nature Protocols, 1(3), 2006, s. 1112-6.
- [63] Blumenthal, R.D. *Chemosensitivity: In Vitro Assays*. Springer, 2005, 231 s.
- [64] Werner, A., Konarev, P.V., et al. *Characterization of a fluorophore binding RNA aptamer by fluorescence correlation spectroscopy and small angle X-ray scattering*. Elsevier: Analytical Biochemistry, 389 (1), 2009, s. 52-62.
- [65] Nielsen, S.S. *Food analysis*. Springer, 2010, 550 s.

- [66] Harris, R., Wiebe, P. et al. *ICES Zooplankton Methology Manual*. Academic Press, 2000, 684 s.
- [67] Rauf, M.A., Ashraf, S., Alhadrami, S.N. *Photolytic oxidation of Coomassie Brilliant Blue with H₂O₂*. Elsevier: Dyes and Pigments, 66, 2005, s. 197-200.
- [68] Yang, J., Dueksen-Hugnes, P. *A new approach to identifying genotoxic carcinogens: p53 induction as an indicator of genotoxic damage*. Carcinogenesis, 19 (6), 1998, s.1117–1125.
- [69] Bhana S., Lloyd, D.R. *The role of p53 in DNA damage-mediated cytotoxicity overrides its ability to regulate nucleotide excision repair in human fibroblasts*. Mutagenesis, 23 (1), 2008, s. 43–50.
- [70] Kuo, L.J., Yang, L-X. γ -H2AX – A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks. *In vivo*, 22, 2008, s. 305-310.
- [71] MacPhee, D.J. *Methodological considerations for improving Western blot analysis*. Elsevier: Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 61 (2), 2010, s. 171-177.
- [72] Penzberg. *The xCELLigence RTCA DP Instrument, Flexible Real-Time Cell Monitoring*. Roche Diagnostics GmbH, [online] [z:http://www.aceabio.com/UserFiles/doc/literature/product_info/RTCA_DP_Brochure_ACE_A_LoRes.pdf](http://www.aceabio.com/UserFiles/doc/literature/product_info/RTCA_DP_Brochure_ACE_A_LoRes.pdf) cit [2013-05-08].
- [73] Vondráčková, L., Horváth. V., Ťurek, D. *O zlatých elektrodách*, Laboraktuel, 2010.
- [74] Zheng, T., Xiao-zhou, K, et al. *Real-time cell analysis – A new method for dynamic, quantitative measurement of infectious viruses and antiserum neutralizing activity*. Elsevier: Journal of Virological Methods, 2013.
- [75] Xing, J.Z., Zhu, L., et al. *Microelectronic cell sensor assay for detection of cytotoxicity and prediction of acute toxicity*. Elsevier: Toxicology in Vitro, 20 (6), 2006, s. 995-1004.

- [76] Schulz, D.G. *Molecular Biology of Membrane Transport Disorders*. Springer, 1996, 681 s.
- [77] Descotes, J. *Immuno toxicology of drugs and Chemical Experimental and Clinical Approach: Principles and Methods of Immunotoxicology*. Elsevier, 2004, 400 s.
- [78] Laerum, O.D. *Flow cytometry in hematology*. Academic Press, 1992, 272 s.
- [79] Darzynkiewitz, Z., Robinson, J.P. *Essential Cytometry Methods*. Academic Press, 2009, počet s. 920.
- [80] Frommel, T.O., Mobarhan, S. et al. *Effect of beta-carotene supplementation on indices of colonic cell proliferation*. Journal of the National Cancer Institute, 87 (23), 1995, s. 1781-7.
- [81] Bartholdi, M., Meyne, J., et al. *Chromosome sorting by flow cytometry*. Elsevier: Methods in Enzymology, 151, 1987, s. 252-267
- [82] Moussa, M., Perreau, C., et al. *Comparison of cell proliferation index in equine and caprine embryos using a modified BrdU incorporation assay*. Theriogenology, 64 (8), 2005, s. 1823-32.
- [83] Miller, M.W., Nowakowski, R.S. *Use of Bromodeoxyuridine- immuno-histo chemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system*. Brain Research, 457 (1), 1988, s. 44-52.
- [84] Taupin, P. *Stem Cells and Regenerative Medicine: Adult Neurogenesis and Neural Stem Cells*. Nova Publishers, 2008, 133.
- [85] <http://sites.lafayette.edu/neur401-sp10/files/2010/04/Image3.jpg>cit.[2013-06-28].