

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**STANOVENÍ CYTOTOXICITY LÉČIV S VYUŽITÍM RŮZNÝCH
TESTŮ BUNĚČNÉ VIABILITY**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Školitel-konzultant: doc. PharmDr. Ondřej Soukup, Ph.D.

Hradec Králové 2022

Kateřina Kaňková

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.“

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji oběma školitelům za trpělivost, pomoc, rady a připomínky při vypracovávání diplomové práce. Dále děkuji zaměstnancům Centra Biomedicínského Výzkumu (CBV) ve Fakultní Nemocnici v Hradci Králové za zaučení a pomoc při práci na praktické části diplomové práce.

ABSTRAKT V ČESKÉM JAZYCE

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Kateřina Kaňková

Školitel: doc. RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Školitel-konzultant: doc. PharmDr. Ondřej Soukup, Ph.D.

Název diplomové práce: Stanovení cytotoxicity léčiv s využitím různých testů buněčné viability

V současné době metody buněčné viability jsou důležitou součástí preklinických studií. Existuje široké spektrum metod na různé bázi, které lze pro tyto účely použít. Cílem této práce je porovnání některých základních metod, jejich přesnost a selektivitu, výhody a nevýhody aplikace.

Šest různých léčiv bylo proměřováno pěti metodami buněčné viability – kolorimetrické metody (MTT, krystalová violet), fluorimetrické (propidium jodid, calcein-AM) a luminometrické (ATP) na CHO-K1 buněčné linii.

Výstupem všech metod jsou hodnoty IC_{50} pro daná léčiva kvantifikující jejich cytotoxicitu vč. grafického znázornění měření a směrodatné odchylky. Na závěr jsou jednotlivé metody porovnány na základě získané zkušenosti při práci a informací získaných při teoretickém průzkumu literatury.

Mezi nejvhodnější metody lze zařadit MTT a ATP esej. Kvůli problémům při měření (např. nevhodnost použití u adherentních linií) se jako méně vhodná metoda jeví calcein-AM. Jako nejméně vhodné metody se potom jeví krystalová violet a propidium jodid, kde u krystalové violeti mohly odchylky v měření být způsobeny několika promývacími kroky, a signál propidium jodidu je měřitelný pouze u výrazně poškozených buněk.

Závěrem také je, že vzhledem k rozdílům v získaných hodnotách u různých metod je doporučeno použít více než jednu metodu buněčné viability pro studium cytotoxických účinků látek či léčiv.

ABSTRAKT V ANGLICKÉM JAZYCE

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Kateřina Kaňková

Supervisor: doc. RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Supervisor-consultant: doc. PharmDr. Ondřej Soukup, Ph.D.

Title of diploma thesis: Assessment of drug cytotoxicity using various cell viability tests

Nowadays, cell viability assays are an important part of preclinical studies. There is a wide spectrum of different methods that can be used for such purposes. This thesis aims to compare some of the fundamental methods, their accuracy and selectivity, as well as the advantages and drawbacks of their application.

Six different drugs were measured using five different cell viability assays – colorimetric (MTT, crystal violet), fluorimetric (propidium iodide, calcein-AM) and luminometric (ATP) on the CHO-K1 cell line.

The outcomes of all methods are IC_{50} values of used drugs assessing their cytotoxicity, including graphic representations of the measurements and standard deviations. Finally, all the methods are compared based on experience gained during the experiment as well as information gained during the theoretical research.

Among the most suitable methods belong the MTT and ATP assay. Due to some difficulties during the measurement (e.g. unsuitable for use in adherent cell lines) calcein-AM assay appeared to be less convenient. Crystal violet and propidium iodide assays came out as least suitable methods, as in crystal violet several washing steps could cause large deviations, and propidium iodide signal is measurable only in severely damaged cells.

In conclusion, given the differences in obtained results with different methods it is recommended to use more than one cell viability assay to study cytotoxic effects of substances and drugs.

Obsah

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
2. ÚVOD	11
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	12
3.1. BUNĚČNÝ CYKLUS.....	12
3.1.1. M-fáze	12
3.1.2. Interfáze.....	15
3.1.3. Kontrola buněčného cyklu	16
3.2. BUNĚČNÉ KULTURY	20
3.2.1. Typy buněčných linií.....	20
3.2.2. Růst buněčných kultur.....	21
3.3. BUNĚČNÁ SMRT	23
3.3.1. Apoptóza	23
3.3.2. Autofagie	29
3.3.3. Nekróza	30
3.3.4. Další formy buněčné smrti	31
3.4. METODY BUNĚČNÉ VIABILITY	33
3.4.1. Dye-exclusion eseje.....	33
3.4.2. Kolorimetrické metody	33
3.4.3. Fluorometrické eseje	36
3.4.4. Luminometrické eseje	38
3.5. Použitá léčiva.....	40
3.5.1. Nesteroidní antiflogistika	40
3.5.2. Inhibitory acetylcholinesterázy	40
3.5.3. Tricyklická antidepresiva	41
3.5.4. H ₂ antihistaminika.....	41
3.5.5. β-blokátory	42

4.	CÍL PRÁCE.....	43
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	44
5.1.	Použitý materiál.....	44
5.1.1.	Buněčná linie.....	44
5.1.2.	Přístroje a pomůcky.....	44
5.1.3.	Chemikálie	44
5.1.4.	Měřené látky.....	46
5.2.	Pracovní postup	48
5.2.1.	Den první – příprava buněk pro testování	48
5.2.2.	Den druhý – příprava roztoků léčiv.....	49
5.2.2.	Den třetí – měření cytotoxicity léčiv	50
5.1.1.	Zpracování naměřených dat	53
6.	VÝSLEDKY	55
6.1.	MTT esej.....	56
6.2.	Propidium jodidová esej	58
6.3.	Calcein-AM esej.....	61
6.4.	Esej s krystalovou violetí.....	64
6.5.	ATP esej	67
6.5.1.	Testování vhodného poměru ATP činidlo : médium	67
6.5.2.	Výsledky měření ATP eseje	68
6.6.	Souhrnná data všech měření	71
7.	DISKUZE.....	72
8.	ZÁVĚR.....	79
9.	LITERATURA.....	80
10.	PŘÍLOHY.....	87
10.1.	Příloha 1 – CHO buňky protokol	87
10.1.1.	Rozmrazování buněk	87

10.1.2.	Počítání buněk	87
10.1.3.	Pasážování	88
10.2.	Příloha 2 – MTT esej protokol.....	89
10.3.	Příloha 3 – Propidium jodid protokol	90
10.4.	Příloha 4 – Calcein-AM protokol	91
10.5.	Příloha 5 – Krystalová violet' protokol	92
10.6.	Příloha 6 - CellTiter Glo® Assay (ATP esej) protokol	93

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APC/C	Anaphasis Promoting Complex (= anafázi podporující komplex), Cyklosom
BAK	BC1-2 antagonist/ killer 1
BAX	BC1-2 associated X apoptosis regulator
BC1-2	B-cell lymphoma protein 2
BH3	BC1-2 Homology 3
BID/tBID	BH3-interacting domain death agonist (=BH3 interagující agonista domény smrti/ (t – truncated = zkrácený)
CAD	Caspase-activated DNAase (= kaspázou aktivovaná DNAáza)
CDK	Cyclin-dependent kinase (= cyklin-dependentní kináza)
COX	Cyklooxygenase (= cyklooxygenáza)
DD	Death domain (= doména smrti)
DED	Death effector domain (= DED doména, efektorová doména smrti)
DISC	Death inducing signaling complex (= komplex signalizující a indukující apoptózu)
DMSO	Dimethylsulfoxid
E2F	E2 promoting binding factor (=E2 podporující vazebný faktor)
FADD	FAS associated protein with death domain (= protein s doménou smrti spojený s Fas)
HtrA2/Omi	High-temperature requirement serinová proteáza
HTS	High throughput screening (= vysoce výkonný screening)
IAP	Inhibitors of apoptosis proteins (= proteiny inhibující apoptózu)
IC₅₀	50% inhibiční koncentrace
ISA	Intrinsic Sympatomimetic Activity (= vnitřní sympatomimetická aktivita)
MCM	Minichromosome Maintenance Protein Complex (= minichromozomální udržující proteinový komplex)
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane permeabilization (= permeabilizace vnější mitochondriální membrány)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NCCD	Nomenclature Committee on Cell Death (=komise pro nomenklaturu buněčné smrti)
NSAIDs	Non-Steroidal AntiInflammatory Drugs (= nesteroidní protizánětlivá léčiva)

PbS	Phosphate Buffered Saline (= fosfátový pufr)
PI	Propidium Iodide (= propidium jodid)
Rb-protein	Retinoblastomový protein
ROS	Reactive Oxygen Species (= reaktivní formy kyslíku)
SMAC/DIABLO	Second Mitochondrial Activator of Caspases, Direct IAP-binding protein with Low PI (= druhý mitochondriální aktivátor kaspáz, protein přímo se vážající na IAP s nízkým PI)
TCA	Tricyklická antidepresiva
THA	Takrin
TNF(R)	Tumor Necrosis Factor (receptor) (= tumor nekorzující faktor)
TRAIL(R)	TNF-related apoptosis inducing ligand (receptor) (= TNF příbuzný apoptózu indukující ligand)

2. ÚVOD

Preklinické testování léčiv je zásadním krokem ve vývoji nových terapeutických molekul. K preklinickému testování se řadí farmakodynamický screening, farmakokinetické studie a studie akutní nebo chronické toxicity, které probíhají na buněčných kulturách nebo na zvířecích modelech.

Testování cytotoxicity na buněčných kulturách je jedním ze zásadních kroků *in vitro* hodnocení akutní toxicity léčiv. Základním výstupem měření metod je hodnota IC_{50} (50% *inhibiční koncentrace*), která značí koncentraci, která způsobí 50% inhibici růstu buněčné kultury, ať vyvoláním cytostatického, resp. cytotoxického efektu. Získané výsledky lze poté využít k dalšímu testování jako třeba nastavení úvodní dávky pro buněčné linie a jistou vypočítací hodnotu má i pro navazující testování na zvířecích modelech.

Obecně lze říci, že existují různé metody pro studium cytotoxicity, resp. buněčné viability, které se liší např. principem detekce nebo i citlivostí k buněčné smrti. Z hlediska způsobu detekce je lze rozdělit na „dye-exclusion“ eseje (např. trypanová modř), kolorimetrické metody (např. MTT), fluorimetrické metody (např. calcien-AM, propidium jodid) a luminometrické metody (ATP esej). Cílem této práce je porovnat některé z nejužívanějších metod z hlediska jejich využitelnosti, přesnosti a reproductibility.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. BUNĚČNÝ CYKLUS

Při práci s buněčnými kulturami, je nutné zachovat vhodné podmínky pro jejich kultivaci, aby se buňky mohly dělit a růst. Podstatou je, že mateřská buňka zdvojnásobí svůj obsah a během buněčného dělení se rozdělí na dvě dceřiné buňky, které jsou s ní geneticky shodné. Cyklus se poté opakuje a dochází k dalším buněčným dělením.

Buněčný cyklus lze tedy charakterizovat jako sled dějů vedoucí k rozmnožení všech živých buněk. Během tohoto procesu dochází k celé řadě dějů, které mají za důsledek vlastní růst buňky a její dělení. Průběh a délka buněčného cyklu se mohou výrazně lišit u různých typů buněk – např. u bakterií a kvasinek vzniká celý nový organismus.

Buněčný cyklus eukaryotických buněk může být rozdělen do dvou základních fází – interfáze (G_1 , S a G_2 fáze), a metafáze (M-fáze).

3.1.1. M-fáze

M-fáze neboli mitóza je vlastní buněčné dělení, kdy dochází k rozdělení jedné mateřské buňky na dvě dceřiné buňky. M-fázi lze rozdělit na karyokinezi a cytokinezi.

Karyokineze

Karyokineze neboli jaderné dělení je proces, kdy dochází k rozdělení genetického materiálu do dvou dceřiných jader.

Během **profáze** dochází ke třem základním dějům: ke kondenzaci chromatinu za vzniku chromozomů, formaci mitotického vřeténka a rozpadu jaderného obalu ⁽¹⁾. Zásadní roli v kondenzaci hrají dva proteinové komplexy. První je tvořený kondensinem a topoisomerázou II a je přímo zodpovědný za vlastní kondenzaci chromatinu. Druhý je tvořen kohesinem, který udržuje sesterské chromatidy při sobě a umožní tak vznik chromozomu. Rovněž dochází k rozštěpení centrozomů, které se rozchází k opačným pólům buňky. Centrozom zde slouží jako organizátor vlastního svazku mikrotubulů ⁽²⁾. Nejdříve dochází k nukleaci mikrotubulů v okolí centrozomu, což vede ke vzniku struktury ve tvaru hvězdy. Mikrotubuly mají záporný konec, kterým se vážou k centrozomu, a pozitivní konec, na kterém vysokou rychlostí polymerizuje tubulin ⁽¹⁾. Svazky mikrotubulů tak dávají vznik tzv. mitotickému vřeténku. V pozdní profázi dochází také ke vzniku kinetochorů, což jsou proteinové komplexy na chromozomech umožňující vazbu chromozomů na mikrotubuly mitotických vřetének ⁽²⁾.

Aby se mohly mikrotubuly navázat na kinetochory chromatid, musí nejdříve dojít k rozpadu jaderného obalu. Tento rozpad začíná vazbou komplexu cyklin B – CDK1 s jadernou membránou, jadernými póry nebo jadernou laminou. Vzniklé fragmenty jsou ve formě vezikul dispergovány v prostředí buňky nebo přecházejí na endoplazmatické retikulum. Vezikuly poté segregují do dceřiných buněk, kde z nich vznikne zpět jaderný obal ⁽¹⁾.

V okamžiku, kdy se rozpadne jaderný obal na malé membránové váčky, začíná **prometafáze** ⁽²⁾. Během ní dochází k navázání chromozomů na mikrotubuly mitotického vřeténka. Kinetochory jsou umístěny v oblasti centromery na opačných stranách sesterských chromatid, což umožňuje navázání mikrotubulů z obou stran chromozomu.

Následuje **metafáze**, kdy dochází k uspořádání chromozomů do ekvatoriální roviny za vzniku tzv. metafázové destičky. Přesný mechanismus tohoto procesu není známý, ale zvažuje se podíl mikrotubulárních motorových proteinů, narůstání a odbourávání mikrotubulů ⁽²⁾. Rovnováha mezi narůstáním a odbouráváním mikrotubulů je zásadní pro správný průběh nejen metafáze, ale i dalších fází buněčného cyklu. Tato rovnováha může být narušena působením tzv. mitotických jedů, což jsou látky, které zabraňují buď polymeraci nebo depolymeraci mitotického vřeténka. Příkladem takovéto látky je kolchicin, který brání polymeraci mitotického vřeténka vazbou na tubulin. Opačně působí např. paklitaxel, který zabraňuje depolaraci nadměrnou stabilizací mitotického vřeténka ⁽²⁾⁽³⁾.

Buňka dále pokračuje do **anafáze**, kdy dojde k narušení spojení mezi sesterskými chromatidami proteolytickými enzymy, což vede k segregaci neboli pohybu jednotlivých chromatid k opačným pólům buňky. Pohyb k opačným pólům buňky je výsledkem dvou na sobě nezávislých procesů – v anafázi A jsou kinetochorové mikrotubuly zkracovány depolymerací a připojené chromozomy jsou tak od sebe odtahovány, zatímco jako anafáze B je označován pohyb vlastních pólů od sebe ⁽¹⁾⁽²⁾. Výsledkem jsou pak dceřiné chromozomy, které jsou rozdělené do dvou identických sad.

Poslední fází mitózy je **telofáze**, kde se kolem každé nově vzniklé sady chromozomů vytváří nový jaderný obal, což vede ke vzniku dvou dceřiných jader. Po vzniku jaderného obalu dochází k průniku jaderných proteinů do jádra, jádro roste, chromozomy dekondenzují a je obnovena transkripce genů ⁽²⁾. Mitotická vřeténka jsou depolymerovaná zpět na tubulinové monomery, které budou využity na tvorbu cytoskeletu dceřiných buněk ⁽⁴⁾.

Cytokineze

Cytokineze je proces, kdy dochází k rozdělení cytoplazmy a buněčných organel do vzniklých dceřiných buněk. Cytokineze začíná už během anafáze, ale proces je ukončen až po vzniku dceřiných jader. Na počátku dochází k tvorbě kontraktálního prstence, kde mitotické vřeténko určuje rovinu dělení cytoplazmy. Zároveň dochází ke svaštění cytoplazmatické membrány za vzniku dělicí rýhy, která je kolmá k podélné ose mitotického vřeténka. Je tak zajištěno, že dojde k cytokinezi mezi nově vzniklými dceřinými jádry ⁽¹⁾⁽²⁾.

Kontraktální prstenec je tvořen hlavně ze svazků aktinových a myozinových filament. Začíná se tvořit už v anafázi, kdy je připojen k proteinům asociovaným s vnitřní stranou cytoplazmatické membrány ⁽¹⁾. K vlastnímu rozdělení na dvě dceřiné buňky dochází díky pohybu aktinu proti myozinu. Kontraktální prstenec po dokončení cytokineze zmizí.

Mitóza x meióza

Nakonec je nutné podotknout, že mitóza probíhá u diploidních buněk, což jsou buňky mající dvě sady chromozomů. U haploidních buněk, tedy buněk s jednou sadou chromozomů (např. gamety), se proces buněčného dělení označuje jako **meióza**. Podstatou meiózy je vznik čtyř haploidních buněk z jedné diploidní buňky. Hlavním rozdílem oproti mitóze je, že dochází ke dvěma buněčným dělením hned po sobě. Během prvního buněčného dělení se homologní chromozomy k sobě přikládají ještě před vlastní vazbou na mitotické vřeténko. Dochází tak k párování chromozomů a vznikají útvary označované jako bivalenty, které jsou u sebe drženy pomocí synaptonemálního komplexu. Během prvního buněčného dělení tedy dochází k oddělení celých homologních chromozomů do dceřiných buněk, čímž dojde k redukci genetické informace na polovinu. V druhém buněčném dělení dochází u obou buněk již pouze k oddělení sesterských chromatid během anafáze, což vede ke vzniku celkem čtyř dceřiných buněk s již redukovaným počtem chromozomů.

U bivalentů může také docházet ke genetické rekombinaci (označované často jako „crossing-over“) během profáze I. Dochází tak k výměně části chromatid mezi nesesterskými chromatidami. Díky crossing-overu tak dochází ke vzniku jedinců se zcela jedinečnou genetickou informací ⁽²⁾.

Nondisjunkcí se značí abnormálně probíhající meióza, kdy nedochází k oddělení homologů během anafáze. Z toho vyplývá, že některá buňka má chromozom navíc a u jiné buňky chromozom chybí. V případě nondisjunkcí obvykle dochází k zániku embrya, protože numerické aberace jsou obvykle s životem neslučitelné. Některá ale přežívají a u jedinců se

nondisjunkce projeví jako genetické onemocnění (např. Downova choroba – trisomie chromozomu číslo 21 ⁽²⁾).

3.1.2. Interfáze

Po úspěšné mitóze buňka vstupuje do **G₁-fáze**. Během G₁ fáze je buňka aktivní hlavně na biochemické úrovni – dochází k syntéze buněčné hmoty, tvorbě organel, syntéze RNA a proteinů, tedy obecně k buněčnému růstu. Délka G₁-fáze se u různých typů buněk může lišit.

Následuje **S-fáze**, neboli fáze syntetická, kdy dochází k replikaci veškeré jaderné DNA. Na konci S-fáze se v buňce nachází dvojnásobné množství DNA.

Ne všechny buňky prodělávají klasický buněčný cyklus. U některých buněk nemusí dojít k S-fázi, ale místo toho vstupují do tzv. **G₀-fáze**. Tato fáze se označuje za neaktivní nebo klidovou, kdy se buňka dále nemnoží. Příkladem buněk, které se nachází v G₀-fázi trvale jsou nervové nebo svalové buňky. U některých buněk v G₀-fázi může dojít působením vnějších faktorů (tzv. mitogenních) k překlenutí do G₁-fáze a znovuoobnovení aktivního buněčného cyklu ⁽⁴⁾.

Po zmnožení genetické informace v S-fázi buňka vstupuje do **G₂-fáze**, neboli do „přípravné fáze“. Z názvu vyplývá, že se jedná o proces, kdy se buňka připravuje na vlastní buněčné dělení – dochází tedy k postreplikačním opravám, chromatin se váže na histony a dochází k postupné kondenzaci chromozomů ⁽⁴⁾.

3.1.3. Kontrola buněčného cyklu

U všech jednojaderných buněk je nutné, aby buněčné dělení bylo v rovnováze s buněčným růstem, protože pokud by došlo k několika dělení po sobě bez možnosti syntézy potřebných organel, proteinů a cytoplazmy, je možné, že výsledné buňky budou příliš malé, aby přežily. Naopak, pokud by buňky vyrostly příliš před dělením, může dojít k poruše některých buněčných funkcí. Z tohoto důvodu je nutné, aby buněčné procesy byly precizně kontrolovány. V případě ztráty kontrolních mechanismů může dojít k nadměrnému a neorganizovanému množení buněk a rozvoji nádorových onemocnění ⁽⁵⁾.

Kontrola buněčného cyklu probíhá pomocí tzv. **check-point surveillance** mechanismu. Jedná se vlastně o kontrolní body v různých fázích buněčného cyklu, kdy buňka kontroluje, zda všechny procesy probíhají správně, aby nedošlo k předčasnému zahájení nových dějů před ukončením předešlé fáze. Jako kontroloři slouží heterodimerní proteinkinázy, které se skládají ze dvou podjednotek: **cyklinu** (regulační podjednotka, bez enzymatické aktivity) a **cyklin-dependentní kinázy** (= *CDK*, katalytická podjednotka). Tyto kinázy regulují aktivitu velkého množství proteinů podílejících se na replikaci DNA, transkripci, mitóze, a dalších důležitých buněčných procesech. Hlavním mechanismem působení těchto proteinkináz je fosforylace cílových proteinů ve specifických regulačních místech, čímž dojde k jejich aktivaci nebo inhibici ⁽⁵⁾.

Koncentrace cyklínů se mění v závislosti na fázi buněčného cyklu, oproti tomu koncentrace cyklin-dependentních kináz se tolik neliší, ale katalytickou funkci mají pouze po spojení s cyklinem. Z toho vyplývá, že správná regulace množství cyklínů v buňce je zcela zásadní pro správný průběh a načasování jednotlivých fází buněčného cyklu. Hladina určitého cyklinu postupně roste v různých fázích buněčného cyklu, a pak v určité fázi zase prudce klesá, přičemž cyklíny jsou degradovány polyubikvitinací. Navíc se jedna cyklin-dependentní kináza váže pouze s několika málo cykliny, čímž je zachována poměrně vysoká specifita při řízení buněčného cyklu ⁽⁵⁾.

G₁ kontrolní bod

Tento kontrolní bod řídí průchod z G₁ do S-fáze a zabraňuje progresi buněčného cyklu s poškozenou DNA. Navíc reguluje geny podílející se na syntéze proteinů důležitých pro replikaci DNA – jedná se hlavně o enzymy podílející se na syntéze deoxynukleosidtrifosfátů, DNA-polymerázy, a mnoho dalších.

Mezi nejdůležitější proteiny podílející se na regulaci G_1 -kontrolního bodu patří Rb protein, který se váže na E2F, což má za výsledek inhibiční působení na transkripci. Na úrovni tohoto kontrolního bodu fungují dva hlavní kinázové komplexy, CDK4/6-cyklin D a CDK2-cyklin E, které vyvolají fosforylaci Rb proteinu, což vede k jeho odštěpení od E2F. Aby tedy mohlo dojít k přechodu do S-fáze, je nutná fosforylace Rb proteinu zmíněnými CDK-cyklin komplexy. Tato fosforylace vede k disociaci Rb proteinu z Rb/E2F komplexu, což umožní transkripci genů důležitých pro správný průběh replikace DNA a progresi buněčného cyklu – např. cyklin E.

Další progrese je pak spojena s aktivací CDK2/cyklin E komplexu, který je zodpovědný za počátek S-fáze. Pokud buňky přechází do G_0 -fáze, tak je tento komplex inhibovaný pomocí proteinu p27 (inhibitor CDK z Cip/Kip rodiny). Inhibice proteinem p27 ale může být kdykoliv přerušena různými mechanismy ⁽⁶⁾.

U vyšších organismů je buněčný cyklus regulován aktivitou hlavně tohoto kontrolního bodu. Existuje velké množství různých signálů, které mohou vést k zastavení buněčného cyklu nebo vést k aktivaci buněčné smrti. Mezi ně patří např.: přítomnost TGF- β (*transforming growth factor*), poškození DNA, stárnutí buňky nebo nedostatek růstových faktorů, a výsledkem je indukce tzv. inhibitorů cyklin-dependentních kináz, které brání další progresi buněčného cyklu ⁽⁶⁾. U živočichů byly popsány dvě rodiny inhibitorů CDK. INK4 genová rodina, kam řadíme např. p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} a p19^{INK4d}, se váže na CDK4 a CDK6 a tím inhibuje asociaci s cyklinem D a počátek S-fáze. Druhou rodinou inhibitorů CDK je Cip/Kip genová rodina, kam patří p21^{Cip1}, již zmíněný p27^{Kip1} a p57^{Kip2}, která se váže jak na podjednotky cyklinu, tak cyklin-dependentních kináz a může ovlivňovat aktivitu různých komplexů (např. CDK/cyklin D-, E-A- a B-komplexů) ⁽⁷⁾.

S-fázový kontrolní bod

S-fázová CDK je syntetizována již v pozdní G_1 -fázi, ale je ihned inhibována vazbou na inhibitory CDK. Při maximální aktivitě G_1 CDK/cyklin komplexů dochází k fosforylaci této vazby a dojde tak k reaktivaci S-fázových CDK. Náhlý vzrůst aktivních S-fázových CDK/cyklinových komplexů vede k postupné aktivaci replikace ⁽⁵⁾.

Součástí S-fáze jsou rovněž kontrolní body hlídající poškození DNA. Tyto checkpointy se od ostatních mírně liší – v přítomnosti poškození DNA nedochází totiž ke kompletnímu zastavení buněčného cyklu, ale pouze k jeho zpomalení. Podstatou může být např. zabránění zahájení replikace v jejím počátku nebo zpomalení replikační vidličky před místem s poškozenou DNA ⁽⁸⁾.

Kromě zajištění, že všechny děje probíhají správně a nedochází ke vzniku chyb, je nutno také zajistit, aby genom buňky byl replikován pouze jednou za jeden buněčný cyklus. Pro tento děj je zásadní aktivita MCM (*Minichromosome maintenance*) helikázových komplexů, které „dávají povolení“ k počátku replikace. MCM proteiny se mohou do replikačního místa navázat pouze během G₁-fáze, což umožní replikaci DNA po vstupu buňky do S-fáze. Po započetí replikace dochází k odštěpení MCM z replikačního počátku, což pak zabraňuje opakované aktivaci replikace DNA ⁽⁹⁾.

G₂ kontrolní bod

G₂ checkpoint zabraňuje započetí mitózy před dokončením S-fáze, a tak zajišťuje, že buňka s nedokončenou replikací nebo poškozenou DNA nemůže genetickou informaci předat do dceřiných buněk ⁽⁹⁾.

MPF (*Maturation-promoting factor*) je komplex skládající se z CDK1 a cyklinu B. Cyklin B je v savčích buňkách produkován během G₁-fáze, kde už vytváří komplexy s CDK1, ale je udržován v inaktivním stavu vazbou specifických tyrosinkináz, což umožňuje akumulaci inaktivních CDK1/cyklin B komplexů v buňce. Progrese do M-fáze je pak umožněna aktivací tohoto komplexu defosforylací CDK1 pomocí CDC25 fosfatázy. Aktivovaná CDK1 je navíc zodpovědná za degradaci cyklinu B, která následně vede naopak k inaktivaci CDK1. To má za výsledek ukončení mitózy, započetí cytokineze a interfáze ⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾.

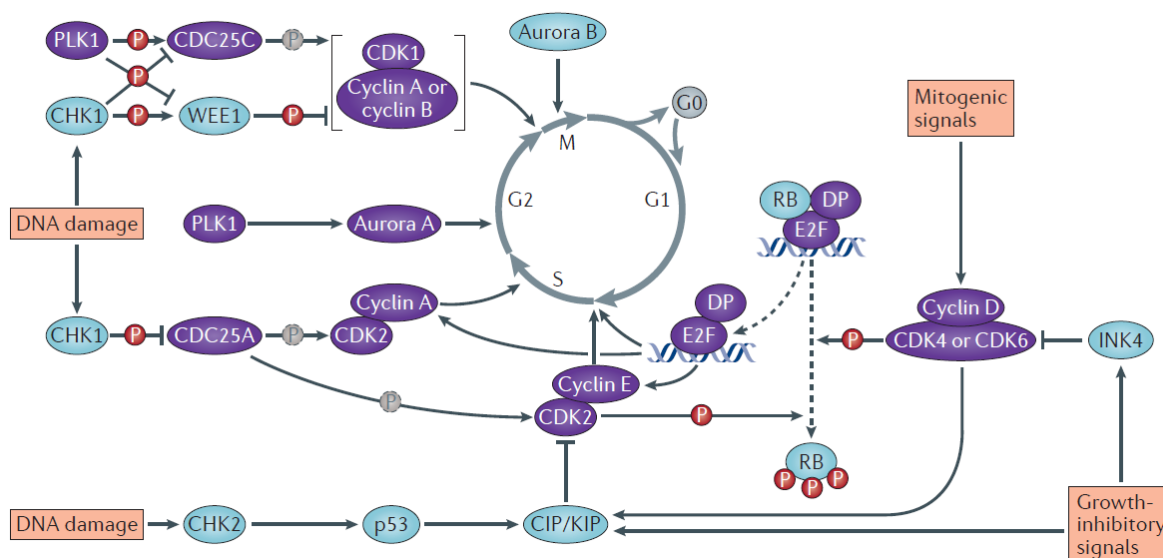
Ubikvitin-protein ligázy

Ubikvitin je protein, který hraje zásadní roli v regulaci četných buněčných funkcí a je součástí ubikvitin proteazomového systému. Váže se na lysinové zbytky různých buněčných proteinů a tím je označuje k degradaci proteazomem. Ubikvitin-protein ligázy jsou tedy enzymy, které umožňují vazbu ubikvitinu k lysinovým zbytkům proteinů ⁽¹¹⁾.

Mezi ubikvitin-protein ligázy patří např. SCF (*Skp, Cullin, F-box containing complex*) a APC/C (*Anaphase-promoting complex*). Tyto komplexy regulují průchod ve třech hlavních bodech buněčného cyklu: z G₁ do S-fáze, z metafáze do anafáze, a z anafáze do telofáze, jak kontrolou správné funkce vlastních kontrolních bodů, tak kontrolou koheze mezi sesterskými chromatidami. Navíc díky tomu, že polyubikvitinace je proces vedoucí k degradaci označeného proteinu (což je ireversibilní proces), probíhá buněčný cyklus jen jedním směrem. Jako příklad jejich funkce se lze podívat na metafázi. Po spojení kinetochorů s mitotickým vřeténkem a vyrovnání chromozomů do ekvatoriální roviny dojde k polyubikvitinaci sekurinu (protein,

který brání degradaci proteinu spojujícího sesterské chromatidy) APC/C ubikvitin-protein ligázou. V důsledku toho dochází k oddělení sesterských chromatid na počátku anafáze. APC/C ubikvitin-protein ligáza po oddělení sesterských chromatid navíc degraduje mitotické cykliny, dochází tak k rychlému poklesu mitotických cyklin-CDK, což umožní nástup telofáze⁽⁵⁾.

Schéma buněčného cyklu a základního působení kontrolních bodů lze vidět na Obrázku 1.



Obrázek 1. Schéma buněčného cyklu a kontrolních bodů.

Mitogenní signály vedou k aktivaci komplexů cyklinu a CDK, což v buňce má za důsledek překlenutí z klidové G_0 zpět do aktivní G_1 a další progresi buněčného cyklu. Tyto komplexy fosforylují několik cílových proteinů – např. Rb protein, jehož hyperfosforylace utlumí jeho inhibiční působení a vede k aktivaci transkripce přes E2F transkripční faktory. V případě buněčného poškození dochází k aktivaci proteinů z rodin INK4 a CIP/KIP, které fungují jako inhibitory růstu a progresu buněčného cyklu.

Na progresi přes S-fázi až do mitózy se podílí další proteiny – PLK-1 nebo Aurora A a B. V případě poškození DNA dojde k zastavení cyklu pomocí CHK2 a p53 v G_1 nebo před CHK1 v S a G_2 -fázi.

Fialové ovály – pozitivní regulátory progresu buněčného cyklu, modré ovály – negativní regulátory progresu buněčného cyklu, P v kroužku značí fosforylaci.

CHK1/CHK2 (Checkpoint kinase), CIP/KIP (CDK interacting kinase/ Kinase inhibitory protein), PLK1 (polo-like kinase-1), CDC25 (cell division cycle 25), CDK (cyclin dependant kinase), INK4 (Inhibitor of cyclin dependant kinase 4), E2F (E2 promoting binding factor), Rb (retinoblastoma protein).

Převzato z: Otto; Sicinski (2017)⁽¹²⁾.

3.2. BUNĚČNÉ KULTURY

Buněčnou kulturu lze definovat jako uměle pěstovanou kulturu z buněk získaných ze zvířecích nebo rostlinných tkání, která slouží k experimentálním, nebo i jiným účelům ⁽¹³⁾. Buněčná linie je potom charakterizována jako linie tvořená pouze jedním typem buněk, která může být pěstována po limitovaný počet pasáží (obvykle se udává 25-30) nebo do nekonečna ⁽¹⁴⁾.

Z morfologického hlediska, lze rozlišovat tzv. adhezivní buňky a suspenzní buňky. Zda bude buněčná linie adhezivní nebo suspenzní záleží na původu buněk. Buňky vycházející z krevní řady nebo leukemické buňky jsou suspenzní a rostou přímo v živném mediu bez uchycení na kultivační láhev – tzn. volně plavou v živném mediu. Naopak buňky izolované z pevných tkání jsou adhezivní a rostou v monovrstvě na dně kultivační láhve. Adhezivní buňky pak lze dle původu dále dělit na endoteliální, epiteliální, neuronální a fibroblasty ⁽¹⁴⁾ ⁽¹⁵⁾. Příklady jednotlivých buněčných linií lze vidět v Tabulce 1.

BUNĚČNÁ LINIE	PŮVOD	TYP BUNĚK
HL60	Bělošská promyeloidní leukemie	Suspenzní – lymfoblast
BAE-1	Bovinní aorta	Adhezivní – endoteliální
HeLa	Lidský cervikální karcinom	Adhezivní – epiteliální
SH-SY5Y	Lidský neuroblastom	Adhezivní – neuronální
CHO	Ovaria čínského křečka	Adhezivní – fibroblast

Tabulka 1. Příklady buněčných linií a jejich původ.

Upraveno a převzato z: Merck ⁽¹⁴⁾.

3.2.1. Typy buněčných linií

Imortalizovaná buněčná linie

Imortalizované buněčné linie mají schopnost se nekonečně dělit. Tento typ buněčných linií je obvykle získán izolací z nádorové tkáně (např. HeLa buňky) nebo modifikován z reálných linií pomocí metod molekulární biologie zajišťující např. regulaci buněčného cyklu, a tedy i nesmrtelnost buněk. Výhodou tedy je, že je (teoreticky) lze používat po nekonečné množství cyklů a obvykle přežívají i horší podmínky. Zároveň jsou homogenní, dobře diferencované a práce s nimi je poměrně jednoduchá a poskytuje reproduktibilní výsledky. Na druhou stranu kvůli tomu, že byly uměle upraveny pro nekonečné dělení, dostatečně nereprezentují reálné

prostředí. Navíc i zde může dojít k dalším změnám v buněčném fenotypu, proto je důležité je pravidelně kontrolovat a vyhnout se používání buněk, které byly již mnohokrát pasážovány. Příkladem imortalizovaných buněčných linií jsou např. HeLa, CHO nebo SH-SY5Y buněčné linie ⁽¹⁴⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾.

Primární buněčná linie

Primární buňky jsou odvozeny přímo z tkáně a jsou pěstovány jako explantáty nebo jako suspenzní linie. Na rozdíl od imortalizovaných linií jsou heterogenní (vyskytuje se zde více typů buněk), nejsou tak dobře diferencované a pomaleji se dělí. Práce s primárními buněčnými liniemi je obvykle náročnější – vyžadující kultivaci bez antibiotik a v *in vitro* podmínkách přežívají pouze omezenou dobu. Na rozdíl od imortalizovaných linií mají primární buňky zachovaný původní fenotyp, avšak pouze po omezenou dobu či omezený počet pasáží. Díky těmto charakteristikám lépe simulují *in vivo* prostředí a jsou pro výzkumné projekty často preferovány ⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾.

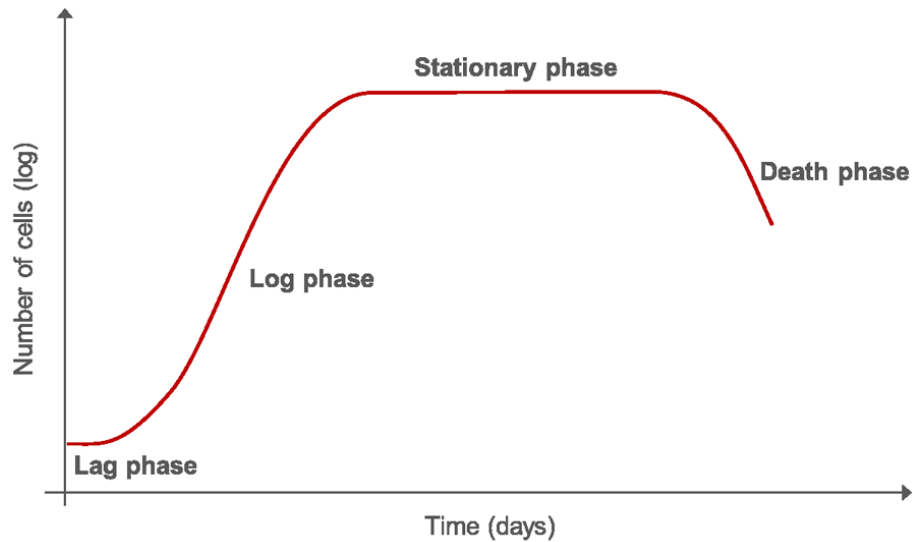
Kmenová buněčná linie

Kmenové buněčné linie jsou ve výzkumu velmi populární, hlavní díky jejich neomezenému růstu a plasticitě. Jedná se o pluripotentní buňky s unikátní schopností sebeobnovy nebo diferenciací v jakýkoliv buněčný typ při kultivaci v přítomnosti vhodných stimulů jako jsou např. hormony nebo růstové faktory ⁽¹⁴⁾⁽¹⁶⁾.

3.2.2. Růst buněčných kultur

Zajištění správného růstu buněk je zcela zásadní pro přesné výsledky při práci s buňkami. Růst buněčných kultur se obvykle dá rozdělit do čtyř základních fází. První fází je tzv. **lag fáze**, která nastává obvykle po rozmrazení buněk, kdy se buňky přizpůsobují prostředí kultivační láhve – u adhesivních buněk dochází k přichycování. V lag fázi se buňky obvykle nedělí, nebo se dělí jen velmi omezeně. Následuje **log fáze**, neboli růstová fáze, kdy dochází k aktivnímu dělení buněk a exponenciálnímu růstu – je tedy nejvhodnější pro experimentální práce. Pro co nejdelší udržení log fáze je nutné buněčné kultury pravidelně pasážovat (obvykle při konfluenci 60-80 %), jinak hrozí jejich přemnožení, což může vyvolávat stres (nedostatek prostoru pro růst, nedostatek živin v médiu, hromadění toxických metabolitů apod.) až buněčnou smrt. Třetí fází je **fáze plateau** (neboli **stacionární fáze**), která nastává poté, co buňky dosáhnou maximální konfluencí. Tato fáze je charakterizována rovnováhou mezi buněčným dělením a

buněčnou smrtí. Postupně dochází ke zpomalování buněčného růstu a buňky jsou obecně nejnáchylnější k poškození. Poslední fází je **buněčná smrt**, která je vždy přirozenou součástí buněčného cyklu. Populace živých buněk postupně klesá ⁽¹⁵⁾ ⁽¹⁸⁾ ⁽¹⁹⁾. Grafické znázornění fází růstu buněčných kultur lze vidět na Obrázku 2.



Obrázek 2. Fáze růstu buněčných kultur.

Lze rozlišit čtyři základní fáze růstu buněčné kultury: lag fázi – počátek růstu, log fáze – exponenciální růst, plateau stacionární fáze – zpomalování nárůstu buněk, a buněčnou smrt.

Převzato z: Straube, Müller; Leica Microsystems (2016) ⁽¹⁹⁾.

3.3. BUNĚČNÁ SMRT

V mnohobuněčných organismech je kladen důraz na udržování homeostázy mezi počtem buněk, které vznikají buněčným dělením, a počtem poškozených nebo nepotřebných buněk, které jsou odstraňovány. Tento neustálý obrat buněk je naprosto zásadní pro správný rozvoj struktur (v lidské anatomii např. pro rozvoj prstů) i fyziologické obměny např. u buněk gastrointestinálního traktu či krevních elementů.

Různé typy buňky umírají mnoha různými cestami a mechanismy, které jsou dnes definovány hlavně na základě morfologických změn, které lze sledovat pod mikroskopem. NCCD (*Nomenclature Committee on Cell Death*) vytvořila kritéria, která umožňují klasifikaci buněčné smrti na základě různých morfologických změn, ke kterým při těchto procesech dochází⁽²⁰⁾. Mezi nejzákladnější typy buněčné smrti patří apoptóza, autofagie a nekróza.

3.3.1. Apoptóza

Apoptóza je proces, kdy buňka přestává růst a rozvíjet se a prochází sledem dějů, které vedou k buněčné smrti, bez vylití buněčného obsahu do okolní tkáně⁽²¹⁾. Jedná se tedy o typ programované buněčné smrti (někdy označované jako buněčná sebevražda) vrcholící aktivací kaspáz, které štěpí buněčné komponenty a připravují tak buňku na pohlcení fagocyty. Jedná se o aktivní proces, který vyžaduje přísun energie ve formě ATP. Dle způsobu aktivace lze rozlišit dvě základní dráhy apoptózy – vnitřní a vnější.

Vnitřní (mitochondriální) apoptická dráha

Dle NCCD se jedná o formu programované buněčné smrti, která vzniká na podkladě změn v mikroprostředí buňky. Tyto změny se pak dle literatury mohou dále rozlišovat dle přítomnosti faktorů na negativní (např. nedostatek růstových faktorů, hormonů, cytokinů) a na pozitivní signály (radiace, hypoxie, hypertermie, virová infekce, volné radikály apod.)⁽²²⁾. Po celou dobu je vnější plazmatická membrána buňky neporušena a je zachována určitá metabolická aktivita buňky. Podstatou vnitřní dráhy je porušení permeability vnější mitochondriální membrány (*MOMP*). Pokud *MOMP* postihne jen limitovaný počet mitochondrií, nedojde až k aktivaci apoptózy, ale jen vyvolá vysokou genovou nestabilitu⁽²³⁾.

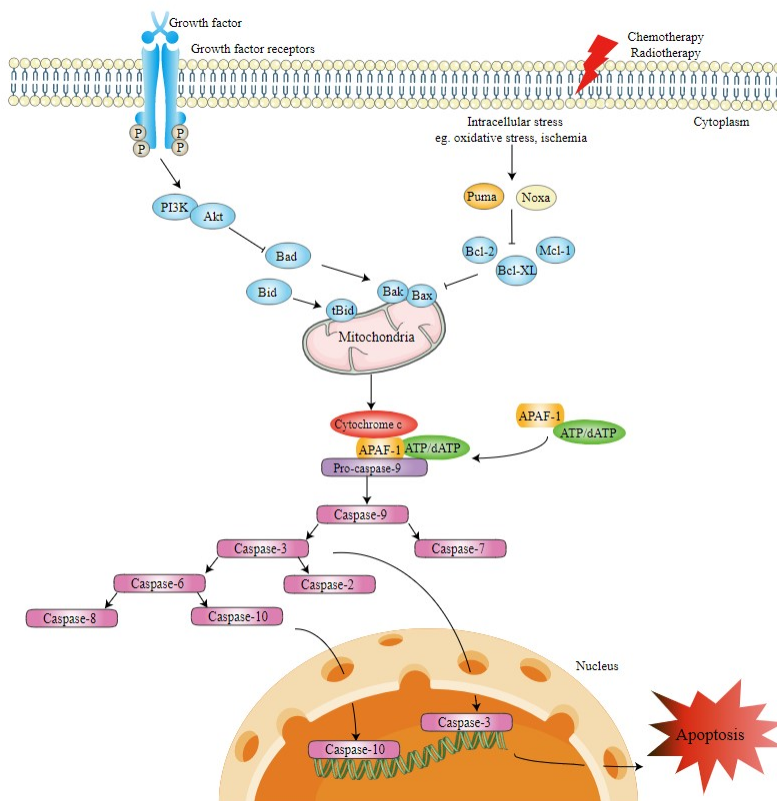
Při přítomnosti buněčného stresu nebo jiných iniciačních signálů dochází k aktivaci proapoptických BH3-only proteinů. BH3-only proteiny lze rozdělit do dvou skupin – aktivátorové (např. PUMA a tBID), které fyzicky interagují s mitochondriálními zásobami BAX a BAK proteinů, což vede k jejich konformačním změnám až do aktivního stavu. Druhou

skupinou jsou senzibilizátorové proteiny, které se váží na antiapoptické proteiny a umožňují tak odblokování aktivátorů.

Jak již bylo naznačeno, uvolněné proapoptické proteiny interagují a aktivují mitochondriální zásoby BAX a BAK proteinů. Jedná se o esenciální proces, který umožní permeabilizaci vnější mitochondriální membrány, která je podstatou vnitřní apoptické dráhy. Za běžných podmínek BAX neustále mění svou polohu mezi vnější mitochondriální membránou a cytoplazmou, kde se nachází vždy ve formě neaktivních monomerů nebo dimerů ⁽²³⁾. Po aktivaci apoptózy je translokace BAX do cytoplazmy přerušena. BAK naproti tomu je pevně zakotven ve vnější mitochondriální membráně. BAX a BAK proteiny mohou být kromě proapoptických BH3-only proteinů aktivovány např. společným působením PIN1 (*Peptidyl-propyl cis/trans isomerase, NIMA-interacting*) a p53 nebo serin/threoninovou kinázou ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*), detergenty, specifickými protilátkami nebo jinými dalšími působky ⁽²³⁾.

Aktivované BAX a BAK společně s dalšími multidoménovými proteiny vytváří kompaktní shluky, což umožní tvorbu póru ve vnější mitochondriální membráně. Velikost pórů v membráně je přímo úměrná množství aktivovaných BAX. Po vytvoření pórů ve vnější mitochondriální membráně dochází k uvolnění apoptogenních faktorů, které se normálně vyskytují v mezimembránovém prostoru mitochondrií. Jedná se o cytochrom-C (molekula zodpovědná za transport elektronů v dýchacím řetězci), SMAC/DIABLO (*Second Mitochondrial Activator of Caspases, Direct IAP-binding protein with Low PI*) a o serinové proteázy HtrA2/Omi (*High temperature requirement serinová proteáza*) ^{(22) (23) (24)}.

Uvolněný cytochrom C se dále váže na monomery APAF-1 a prokaspázu-9, což umožní četné konformační změny a vznik tzv. apoptozomu ⁽²¹⁾. Apoptozom lze definovat jako supramolekulární komplex, který umožňuje aktivaci kaspázy 9. Aktivovaná kaspáza 9 pak dále vede k aktivaci exekučních kaspáz 3 a 7, které jsou zodpovědné za vlastní rozklad savčích buněk. Proapoptická aktivita SMAC/DIABLO a HtrA2/Omi spočívá v interakci s IAP (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*), které inhibují aktivitu kaspáz ^{(21) (23)}. Základní schéma vnitřní apoptické cesty lze vidět na Obrázku 3.



Obrázek 3. Schéma vnitřní apoptické cesty.

K aktivaci vnitřní apoptické cesty dochází v přítomnosti buněčného stresu (např. působení UV nebo chemoterapeutik, ischemie apod.). Základním dějem je permeabilizace vnější mitochondriální membrány, která vede k uvolnění cytochromu c, který v cytoplazmě vytváří komplex s APAF-1 a inaktivní kaspázou 9. Tímto dojde k aktivaci iniciátorové kaspázy 9, která dále aktivuje exekuční kaspázy 3, 6 a 7, které jsou zodpovědné za buněčnou apoptózu.

PI3K (phosphatidylinositol-3-kinases), Akt (RAC-alpha serin/threonine-protein kinase), Bad (BCL2-associated agonist of cell death), Bid (BH3 interacting domain death agonist), tBid (truncated Bid), Bak (BCL-2 antagonist/killer 1), Bax (BCL-2-associated X protein), Bcl-2 (B-cell lymphoma protein 2), Bcl-XL (B-cell Leukemia X Long), Mcl-1 (myeloid cell leukemia 1), PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis), Noxa (NADPH oxidase aktivátor 1), APAF-1 (apoptotic protease activating factor 1), ATP/dATP (adenosintriphosphate/ deoxyadenosintriphosphate).

Převzato z: Creative Diagnostics ⁽²⁵⁾.

Katalytická aktivita kaspáz má za úkol vyvolávat morfologické a biochemické změny vedoucí k zániku buňky. Kaspáza 3 vyvolává fragmentaci DNA a dále je zodpovědná za expozici fosfatidylserinu. Fosfatidylserin je za normálních podmínek lokalizován hlavně na vnitřní straně mitochondriální membrány, což je umožňováno ATP-dependentní flipázovou aktivitou proteinů ATP11A a ATP11C. Oba tyto proteiny obsahují vazebné místo pro kaspázu

3, která způsobí ireversibilní inaktivaci jejich flipázové aktivity, což má za následek kumulaci fosfatidylserinu vně mitochondriální membrány.

Vnitřní apoptická cesta je blokována antiapoptickými faktory z rodiny BCL2 (např. BCL2, MCL1, BCL-XL apod.). Exprese těchto proteinů vede k vazbě na proapoptické proteiny (např. BID a PUMA), což znemožní aktivaci BAX a BAK, zásadních proteinů pro tvorbu póru ve vnější mitochondriální membráně. Antiapoptické proteiny mohou i přímo vyvazovat BAX a BAK⁽²⁴⁾. Farmakologická interakce na této úrovni má velký význam v klinickém onkologickém výzkumu, kde se sleduje vývoj BH3-mimetik jako látek, které cílí na antiapoptické proteiny a zvyšují tak citlivost buněk k apoptóze. V současné době již existuje registrovaný přípravek pod obchodním názvem Venclxyto (venetoklax), který je indikován v kombinované terapii u krevních nádorů⁽²³⁾.

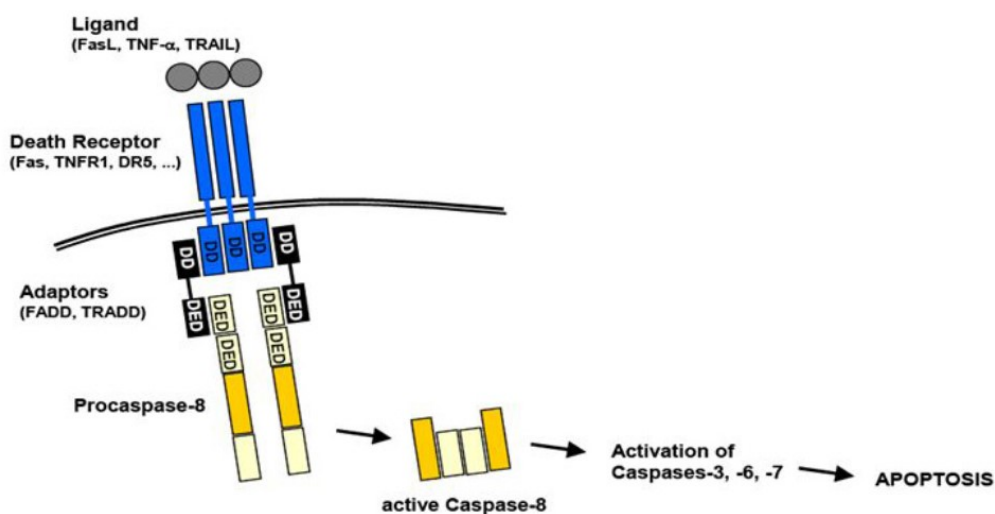
Aktivita exekečních kaspáz je za fyziologických podmínek v buňce negativně regulována proteiny ze skupiny IAP. K IAP se řadí např. XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*), který je přímo navázán na kaspázách a fyzicky blokuje aktivní místo kaspáz. Jinými IAP jsou pak BIRC2 (*Baculoviral IAP repeat containing protein*) a BIRC3, které inhibují apoptickou aktivitu navýšením antiapoptických faktorů, podporou degradace SMAC/DIABLO nebo např. inaktivací kaspáz ubikvitinací⁽²³⁾⁽²⁴⁾.

Vnější (receptorová) apoptická dráha

Vnější apoptickou dráhou je označován proces aktivace apoptózy z vnějšího prostředí, který je umožněn pomocí tzv. receptorů smrti. Mezi tyto receptory patří např. FAS receptor (*TNFR1*), TRAILR1 nebo TRAILR2. Jak již vyplívá z názvu, pro aktivaci apoptózy je nutná vazba příslušného ligandu na receptor, což pak vede k četným intracelulárním dějům vedoucím až k vlastní apoptóze⁽²³⁾.

FASL (ligand FAS receptoru) se naváže na FAS receptor, což vede ke změně konformace, která umožní sestavení multiproteinového komplexu DISC (*Death inducing signaling complex*) na cytoplazmatickém konci receptoru. Zjednodušeně se DISC skládá z FAS receptoru, FADD a prokaspázy 8. FADD (*Fas receptor death domain*) je adaptorový protein, který umožňuje vazbu přes DD (*death domain*) DISCu na DD FAS receptoru. FADD také obsahuje svou vlastní doménu, která umožňuje interakci protein-protein označovanou jako DED (*Death effector domain*). DED je zásadní pro nábor prokaspázy 8 na DISC. Dále se předpokládá, že po vazbě prokaspázy 8 na DED dochází k náboru dalších molekul prokaspázy 8 k DISC, kde zvýšená koncentrace těchto molekul umožní autoprotolýzu a aktivaci kaspázy 8, která dále aktivuje

exekční kaspázy zodpovědné za dokončení apoptózy⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾. Základní schéma vnější apoptické cesty lze vidět na Obrázku 4.



Obrázek 4. Schéma vnější apoptické cesty

Vnější apoptická cesta je aktivována pomocí tzv. receptorů smrti – Fas, DR5, TNFR1, které jsou aktivovány příslušnými ligandy. Po aktivaci dochází k náboru adaptorových proteinů – FADD, TRADD, které za vzniku multidoménového komplexu vedou až k aktivaci kaspázy 8, která je hlavním mediátorem vnější cesty a umožňuje aktivaci exekčních kaspáz (3, 6, 7) a navození apoptózy.

FasL (Fas Ligand), TNF- α (tumor-necrosis factor), TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand), Fas (FAS cell surface death receptor), TNFR1 (Tumor necrosis factor receptor type 1), FADD (FAS associated protein with death domain), TRADD (Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein), DD (Death domain), DED (Death effector domain)

Převzato z: Creative Diagnostics⁽²⁸⁾.

Na základě formace DISC jsou rozlišovány dva základní typy buněk. Buněčný typ I je charakteristický vysokou produkcí kaspázy 8 na DISC, která může vést přímo k aktivaci exekčních kaspáz a nelze je inhibovat ani zvýšenou expresí antiapoptických proteinů. Do této skupiny patří např. lymfocyty a thymocyty. Do buněčného typu II jsou zařazeny např. hepatocyty, nádorové buňky nebo β -buňky pankreatu, kde na DISC je pouze malé množství kaspázy 8, což znamená, že apoptóza je alespoň z části závislá na rozštěpení BH3 domény, za uvolnění BID. Fragmentací dojde ke vzniku tBID, který indukuje proapoptickou funkci mitochondrií přes BAX a BAK proteiny⁽²¹⁾⁽²³⁾⁽²⁶⁾.

Jak již zřejmě vyplývá, vnější cesta může být aktivována i přes jiné ligandy a receptory smrti, avšak přesný mechanismus aktivace není zatím tak detailně popsán jako u FAS. Podstatou je však opět tvorba intracelulárního komplexu, který dále vede k aktivaci četných signálních drah vedoucích až k aktivaci iniciátorových kaspáz. Příkladem mohou být např. receptory pro tumor nekrotizující faktor (*TNFR*)⁽²³⁾⁽²⁹⁾.

Jiným typem receptorové cesty apoptózy, je aktivace pomocí tzv. receptorů závislosti (*DR, dependence receptors*). Jedná se o signál, který vzniká v důsledku absence požadovaného stimulu, tedy nedostatku ligandů. K aktivaci dochází při poklesu určitých ligandů až pod určitou prahovou koncentraci. K těmto receptorům patří např. netrinové receptory nebo neurotrofinové receptory, které jsou zahrnuty i v mnoha patofyziologických procesech⁽²³⁾.

Vnitřní a vnější cesta se schází na úrovni kaspáz.

Iniciátorové kaspázy 8 a 9 vedou k aktivaci exekučních kaspáz 3, 6 a 7, které dále vedou k aktivaci různých enzymů zodpovědných za rozpad buňky do apoptických tělísek.

Mezi nejdůležitější exekuční kaspázy patří kaspáza 3, která aktivuje endonukleázu CAD (*Caspase-activated DNAase*) proteolytickým štěpením vazby mezi CAD a inhibitorem CAD. Uvolněná CAD pak může vést k degradaci chromatinu a jeho kondenzaci. Kaspáza 3 dále indukuje reorganizaci a dezintegraci cytoskeletu buňky⁽²²⁾.

Díky expresi proteinových markerů apoptózy na povrchu buňky před vlastním ukončením apoptózy umožní rychlou fagocytózu apoptických tělísek a zabrání tak poškození okolní tkáně. Jako markery slouží již zmíněný fosfatidylserin, který je za fyziologických podmínek uložen dovnitř do buňky a lze ho právě využít k rozlišení buněčné smrti formou apoptózy a nekrózy⁽²²⁾⁽²³⁾.

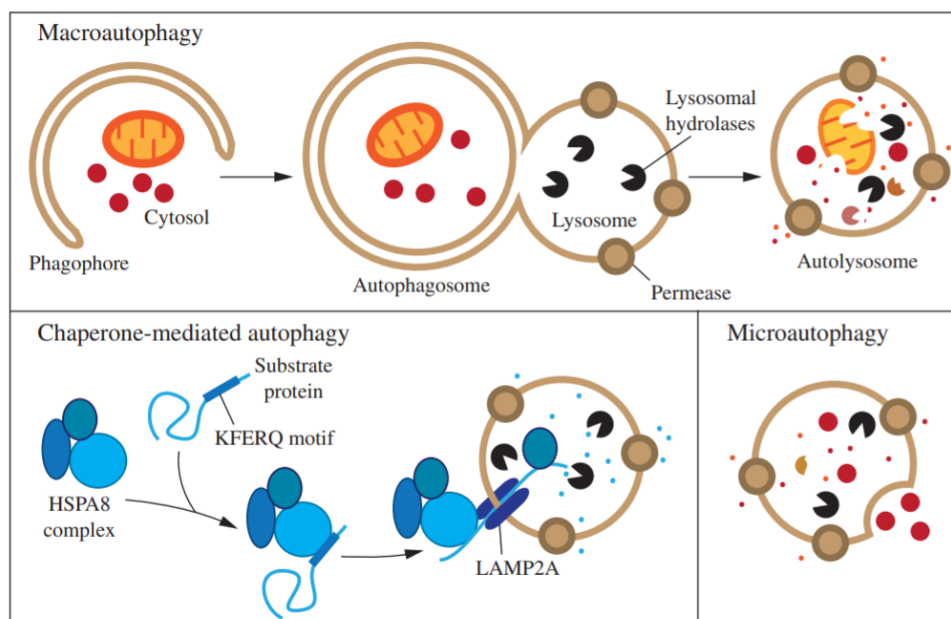
Morfologie apoptózy

Typickými znaky, které lze sledovat pod mikroskopem, je smrštění buněk, zahuštění cytoplazmy a těsné uspořádání buněčných organel. Dalším zásadním morfologickým znakem je pyknóza, kterou lze charakterizovat jako nevratnou kondenzaci chromatinu, a velmi často je považována za základní charakteristiku apoptózy. Dále lze sledovat tzv. blebbing plazmatické membrány, což lze popsat jako vznik nepravidelných výběžků membrány v důsledku narušení funkce cytoskeletu. Po rozpadu jádra (karyorhýze) dochází k fragmentaci buňky do apoptických tělísek, která jsou ohraničena neporušenou plazmatickou membránou. Tělíška jsou dále fagocytována makrofágy a parenchymálními buňkami, které je dále degradují ve

fagolyzozomu. Během apoptózy tak nedochází k ovlivnění okolní tkáně a aktivaci zánětlivého procesu^{(20) (22)}.

3.3.2. Autofagie

Autofagii lze definovat jako vysoce účinný eukaryotický proces buněčné recyklace, jehož hlavní funkcí je poskytnout buňce energii a základní živiny v případě jejich nedostatku^{(30) (31)}. Existují tři základní typy autofagie, dle způsobu přenosu buněčných komponentů do lyzozomů – základní rozdíly lze vidět na Obrázku 5.



Obrázek 5. Rozdílné typy autofagie.

Mikroautofagie je proces, kterým se buněčné komponenty dostávají do lyzozomu invaginací. CMA (Chaperone-mediated autophagy) je specifický typ autofagie, který umožňuje přenos nerozvinutých proteinů přímo přes membránu lyzozomu. Posledním ze základních typů je makroautofagie, která závisí na de novo tvorbě dvoumembranového systému, který umožní přenos buněčných struktur do lyzozomů k degradaci.

HSPA8 (heat shock protein family A member 8), LAMP2A (Lysosomal-Associated Membrane Protein 2A).

Převzato z: Parzych K, Klionsky D (2014)⁽³⁰⁾.

Autofagie a buněčná smrt

Autofagie je mechanismus, kterým buňka je schopna získávat živiny při jejich nedostatku nebo recyklovat poškozené organely. Obvykle se tedy nejedná přímo o typ buněčné smrti, ale mechanismus zásadní pro buněčné přežití. Obvykle se v literatuře hovoří spíše o buněčné smrti spojené s autogafií (než o autofagické buněčné smrti), která je provázena zdlouhavými regresivními změnami v cytosolu, které nakonec vyústí v buněčnou smrt skrze určité biochemické procesy, které prozatím nejsou dostatečně popsány. Dle NCCD se jedná o typ buněčné smrti s autogafií, která je morfologicky charakterizována masivní vakuolizací cytoplazmy a nepřítomností kondenzace chromatinu ⁽²⁰⁾.

3.3.3. Nekróza

Nekrotická buněčná smrt byla dříve považována za nekontrolovaný buněčný proces. Novější důkazy však ale poukazují na to, že i nekróza je určitým způsobem regulovaná. Hlavním znakem (a zároveň i příčinou) nekrotické buněčné smrti je drastická deplece energie ve formě ATP, která může vznikat jako důsledek extrémního fyzikálně-chemického stresu, teploty/ chladu (i například při rozmrazování buněk), v důsledku osmotického šoku, vysoké koncentrace reaktivních forem kyslíku (*ROS*), apod. ^{(20) (21) (32)}.

Jedním z předpokládaných mechanismů po poškození buňky je zvýšení hladiny ROS a kalcia. Vysoké hladiny nitrobuněčného kalcia mají vliv na mitochondriální funkci, jejíž narušení vede k uvolnění ROS. Při dlouhodobě zvýšených hladinách kalcia dojde k narušení integrity mitochondriální membrány, a tak i ztrátě tvorby ATP, což nakonec vyústí v nekrózu. Změny hladin kalcia navíc vedou k aktivaci proteáz v cytosolu. Příkladem jsou např. kalpainy, které jsou aktivované v přítomnosti kalcia a narušují integritu lyzozomální membrány. Narušení lyzozomální membrány vede k uvolnění katepsinu B a L (cysteinové proteázy), které vedou k destabilizaci membránových systémů, což vede mj. k porušení správné funkce mitochondrií, a tak poškození syntézy ATP. Dochází k poškození nejen membránových organel, ale i celistvosti plazmatické membrány, což má za důsledek vylití buněčného obsahu do okolního prostředí a aktivaci imunitní odpovědi ⁽³²⁾. Mimo poškození organel a plazmatické membrány, katepsiny jsou schopné svou endopeptidázovou a exopeptidázovou aktivitou (u katepsinu L omezená) štěpit téměř všechny proteiny, tzn. i receptory, enzymy, biogenní proteiny, a tak narušovat další procesy v buňce ⁽³³⁾.

Z morfologického hlediska je nekróza doprovázena zduřením buňky vedoucí až k prasknutí a vylití obsahu do okolní tkáně. Důsledkem je poškození okolních buněk, které vede k aktivaci imunitního systému a zánětu. Dále lze také sledovat kondenzaci chromatinu ⁽²⁰⁾ ⁽³²⁾.

3.3.4. Další formy buněčné smrti

Dalším zkoumáním mechanismů buněčné smrti bylo zjištěno, že apoptóza, buněčná smrt spojená s autofagií a nekróza nejsou jediné způsoby, kterými buňka zaniká. Lze se setkat s množstvím dalších typů buněčné smrti. Některé mohou být specifické pro konkrétní buněčný typ (např. emperipoléza – smrt zprostředkovaná lyzozomy u živých erytrocytů, lymfocytů a plazmatických buněk) ⁽²³⁾, nebo probíhá pouze za určitých podmínek (např. anoikis). Pro doplnění jsou ve zkratce zmíněny další tři typy buněčné smrti.

Anoikis je typ programované buněčné smrti, někdy také označované jako specifický typ apoptózy, ke kterému dochází po odloučení buňky z extracelulární matrix. Jak již lze z definice odvodit, jedná se o zásadní mechanismus, který zabraňuje růstu a upevnění buněk do nesprávné tkáně, dysplazii a případnému nádorovému bujení. Rezistence k anoikis může být tak brána jako určitá predispozice agresivních metastatických nádorů ⁽³⁴⁾. Zároveň se zřejmě jedná o mechanismus, který je zásadní pro udržení správné polohy buněk ve tkáni ⁽²³⁾.

Za typ buněčné smrti na rozhraní apoptózy a nekrózy lze považovat **nekroptózu**, u které lze sledovat znaky obou procesů. Nekroptóza je nejčastěji spouštěna ligandy TNF receptoru, případně i přes FAS a TRAIL receptory, což je často spojováno s mediátory zánětu a probíhajícím infektem. Mediace přes tyto receptory vede k aktivaci vnější apoptotické cesty až k aktivaci kaspázy 8. Výzkum ukázal, že při náhlé inhibici kaspázy 8, apoptická buňka přechází v nekroptickou, čímž je prokázáno, že jsou děje úzce propojeny. Seběmenší poruchy v regulaci jak samotné nekroptózy, tak i přechodu mezi apoptózou a nekroptózou vedou k rozvoji zánětlivých, autoimunních a degenerativních onemocnění a k poruše detekce tumorů imunitním systémem. Mezi onemocnění, jejichž patologie je zřejmě spojená s poruchami regulace těchto procesů, patří např. amyotrofická laterální skleróza, roztroušená skleróza, Crohnova choroba nebo např. i systémový lupus erytematodes ⁽³⁵⁾. Cílení na mechanismy nekroptózy by tak mohlo mít významný terapeutický efekt ve zmíněných patologiích. Zásadní pro aktivaci nekroptózy je aktivace RIPK1 (*Receptor interacting protein kinase*) nebo RIPK3 kinázy a MLKL (*Mixed lineage kinase domain-like*) pseudokinázy, což bylo potvrzeno působením necrostatinu-1, který inhibuje aktivitu RIPK1 kinázy. Nekroptická buňka se projevuje granulací cytoplazmy,

bobtnáním organel a plazmatické membrány až nakonec dojde k prasknutí buňky a vylití obsahu do okolní tkáně a šíření zánětlivé odpovědi^{(23) (36)}.

Zvláštním typem buněčné smrti je např. **entóza** neboli buněčný kanibalismus. Podstatou buněčné smrti je pozření sousední buňkou při kompetici o přežití. Přesný mechanismus indukce není dosud popsán, ale jednou z příčin je zřejmě nedostatek glukózy. Entóza byla popsána v solidních nádorech odvozených od epitelových buněk (např. u metastatického melanomu nebo u kostních metastáz karcinomu prostaty)^{(23) (37)}.

3.4. METODY BUNĚČNÉ VIABILITY

Testování na buněčných kulturách je jeden ze zásadních kroků v *in vitro* hodnocení vlivu zkoušeného léčiva na buněčnou proliferaci, cytotoxicitu a jiných vlivů na buněčné funkce. Dle působení látky na buňku lze rozlišovat cytostatický (buňky přestávají růst, ale přežívají) a cytotoxický efekt (buňky jsou poškozené a umírají). Metody studia buněčné viability a proliferace se tak používají jako screening účinku léčiva na životnost buňky ⁽³⁸⁾.

Existuje mnoho metod ke studiu buněčné viability a cytotoxicity, které lze při testování použít – obecně se rozlišují na mikroskopické (dye exclusion assays), kolorimetrické metody, fluorimetrické metody a luminometrické metody.

3.4.1. Dye-exclusion eseje

Počet živých buněk v kultuře lze stanovit různými metodami a jednou z nejrychlejších, a také často využívanou, je použití tzv. dye-exclusion esejí. Podstatou je využití barviva, které živé buňky dokážou vyloučit díky poměrně selektivním procesům, které umožňují přestup látek přes plazmatickou membránu do buňky. Mrtvé buňky tuto schopnost postrádají, a proto zůstávají zbarvené ⁽³⁸⁾. Ačkoliv je proces barvení poměrně jednoduchý, jedná se o metodu poměrně pracnou a nevhodnou na testování u většího množství vzorků. Jako příklady využívaných barviv lze uvést – eosin, trypanovou modř, červeň Congo a erythrosin B ⁽³⁹⁾⁽⁴⁰⁾.

3.4.2. Kolorimetrické metody

Principem kolorimetrických metod v měření buněčné viability je většinou hodnocení metabolické aktivity buněk. Vzniklá barevná sloučenina pak přímo koresponduje s metabolickou aktivitou buněk a dá se jednoduše spektrofotometricky změřit. Mezi kolorimetrické metody se řadí několik skupin esejí – např. tetrazoliové redukční eseje, esej s krystalovou violetí, LDH (*laktátdehydrogenáza*) esej, a další ⁽³⁹⁾⁽⁴⁰⁾.

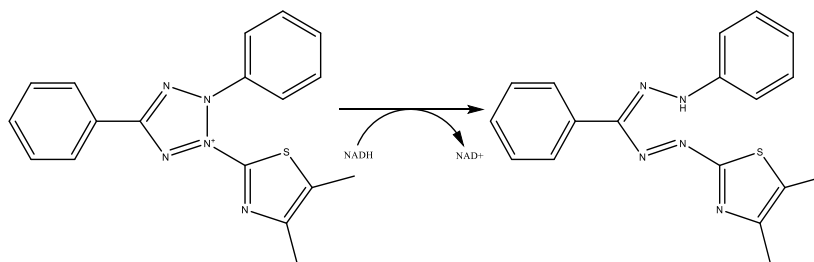
Tetrazoliová redukční esej

Tetrazoliové redukční eseje se řadí k nejčastějším kolorimetrickým metodám, jejichž podstatou je měření metabolické aktivity buněk za vzniku barevného metabolitu (zde se jedná hlavně o formazany). Mezi hlavní tetrazoliové sloučeniny, které se v praxi užívají, patří MTS, XTT, WST-1 a samozřejmě MTT ⁽⁴¹⁾.

MTT, neboli 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid, je jedna z nejčastěji používaných metod vůbec, která se využívá ke stanovení cytotoxicity a viability

buněk. Jedná se dokonce o jednu z prvních metod vyvinutých pro testování na 96 jamkových destičkách vhodnou pro high-throughput screening (HTS) ^{(41) (42) (43)}.

Stanovení spočívá v měření aktivity mitochondriálních enzymů. Podstatou je redukce MTT mitochondriálními NADH dependentními oxidoredukčními enzymy za vzniku formazanu při 37 °C. Intenzita zbarvení přímo odpovídá mitochondriální aktivitě, a tak i životnosti buněk. Mrtvé buňky totiž postrádají schopnost této konverze, což znamená, že k zbarvení zde nedochází ^{(41) (44)}. Mechanismus reakce lze vidět na Obrázku 6.



Obrázek 6. Redukce MTT na formazan.

MTT (vlevo) je metabolizováno pouze živými buňkami v mitochondriích pomocí enzymu redukčních dehydrogenázových enzymů za vzniku nerozpustných krystalů formazanu (vpravo). U mrtvých buněk mitochondriální funkce chybí, a tak nedochází ke vzniku formazanových krystalů.

NADH (nikotinamidadeninukleotid + hydrogen), NAD⁺ (nikotinamidadeninukleotid).

Převzato z: Kamiloglu S a spol ⁽⁴⁰⁾.

Formazan je poměrně špatně rozpustný ve fyziologickém prostředí buněk, což vede k jeho precipitaci, tvorbě krystalů a jejich kumulaci v buňce. Abychom ale dokázali změřit absorbanci, a tak i viabilitu v jamce, je nutné ho nejdříve rozpustit – v praxi se používají hlavně organické sloučeniny např. DMSO (*dimethylsulfoxid*), acidifikovaný isopropanol, dimethylformamid. Acidifikace navíc umožňuje změnu zbarvení fenolové červeni (jedna z komponent média buněk) na žlutou což snižuje interferenci při měření absorbance formazanu ⁽⁴⁴⁾.

Ze zmíněného vyplývá, že výsledná absorbance je závislá na koncentraci použitého MTT, délce inkubace, počtu živých buněk schopných metabolizovat MTT a samozřejmě i na jejich metabolické aktivitě. MTT tedy spíše odráží metabolismus živých buněk než vlastní buněčnou proliferaci.

Při MTT testu je nutné brát v potaz i potenciální interference. Jednou z nich je interference s redukčními činidly jako je glutathion nebo askorbová kyselina, které se podílí na přeměně MTT i neenzymatickou cestou, což může vést k vyššímu signálu pozadí. Toto lze ale eliminovat použitím negativní kontroly obsahující pouze médium bez buněk a/ nebo testované barvivo ⁽⁴⁴⁾.

MTT esej se používá pro stanovení cytotoxického působení různých agens za odlišných podmínek. Pro stanovení hodnot IC_{50} se porovnává látka v různých koncentracích s negativní kontrolou (živé buňky bez cytotoxické látky). Metoda je vhodná i pro *in vitro* testování účinku potencionálních léčiv, sledování rezistence či další klinická testování ⁽³⁸⁾.

Mezi hlavní výhody použití MTT eseje je její jednoduchost, ekonomická nenáročnost a rychlost práce. Zároveň je relativně přesná a výsledky tak lze dobře reprodukovat ⁽⁴²⁾. Hlavní nevýhodou je, že formazanové krystaly a jejich rozpouštění organickými solventy poškozují buňku a nelze po provedení MTT již buněčnou kulturu dál použít k dalším měřením ⁽³⁹⁾. Další nevýhodou je, že MTT esej nedokáže rozlišit cytotoxický a cytostatický efekt molekul na buňku ⁽³⁸⁾.

Vzhledem k tomu, že MTT vede k tvorbě nerozpustných formazanových krystalů, což prodlužuje práci, výzkum vedl k vývoji analog metabolizujících se na rozpustné formazany – např. XTT a MTS. Formazany těchto tetrazoliových solí se rozpouštějí přímo v živném mediu buněk, což zkracuje a zjednodušuje práci s metodou. Vzhledem k hydrofilnějšímu charakteru barviv je ale ztížen průchod přes cytoplazmatickou membránu dovnitř do buňky. Novější generace tetrazoliových barviv (např. WST-1 (*Water soluble tetrazolium salts*)) vede také k tvorbě rozpustných formazanů, které ale vznikají již v extracelulárním prostředí působením elektronového transportu přes plazmatickou membránu proliferujících buněk, což tento nedostatek nahrazuje ⁽⁴⁵⁾.

Esej s krystalovou violetí

Ke kolorimetrickým metodám měření buněčné viability lze zařadit i esej využívající krystalovou violet.

Důležitým poznatkem je, že během buněčné smrti dochází k odlepení adherentních buněk z buněčné kultury, čehož lze využít k nepřímému stanovení buněčné smrti. Podstatou eseje je odstranění odumřelých buněk proplachováním a poté barvení živých buněk přilepených v buněčné kultuře krystalovou violetí. Toto barvivo se váže na buněčnou DNA a proteiny a pozůstalé buňky barví do fialova. Čím je zabarvení intenzivnější, tím více živých buněk lze sledovat. Pro získání výsledné hodnoty IC_{50} se do kultury přidává rozpouštědlo (obvykle methanol) a hodnoty pak lze jednoduše stanovit pomocí spektrometrického měření ⁽⁴⁶⁾.

Stejně jako u tetrazoliových esejí, i krystalová violet je end-point esejí, protože po jejím přidání dochází k usmrcení buněk. Na druhou stranu, jedná se o všestranný způsob pro screening dopadu chemoterapeutik a jiných sloučenin na viabilitu buněk. Díky předpokladu, že

usmrcené buňky ztrácí schopnost adheze a dojde k jejich odstranění, by esej měla teoreticky dokázat rozlišit cytotoxické a cytostatické působení. Je však poměrně pracná, necitlivá k metabolickým změnám uvnitř buňky a proliferaci, proto není vhodná jako metoda volby při měření sloučenin ovlivňující tyto procesy ⁽³⁹⁾.

3.4.3. Fluorometrické eseje

Fluorometrické eseje byly vyvinuty v 90. letech jako citlivější alternativa kolorimetrických a barvicích esejí. Podstatou těchto metod je rozštěpení nefluoreskující sloučeniny enzymy, za vzniku fluoreskujícího metabolitu, který lze identifikovat. Mezi tento typ esejí se řadí např. resazurinová (Alamar blue) esej, calcein-AM nebo esej s propidium jodidem ⁽⁴⁰⁾.

U těchto esejí se obecně setkáváme s problémem, že studovaná látka nebo její metabolity mohou být sami o sobě fluorescentní, čímž interferují s vlastním měřením cytotoxicity. U spektrofotometrické detekce bylo možné případnou interferenci odstranit slepým vzorkem, což u fluorescence není zcela možné.

Propidium jodidová esej

Propidium jodidová (PI) fluorescenční esej byla původně vyvinuta pro *in vitro* charakterizaci růstu tumorových buněčných linií a testování cytotoxicity. V současné době se spíše používá pro identifikaci celistvosti buněčných membrán ⁽⁴⁷⁾.

PI je velmi slabě fluoreskující červenou sloučeninou s excitačním a emisním maximem 493 nm resp. 635 nm. Molekula je polární a velmi dobře rozpustná ve vodě, což výrazně komplikuje její průchod do buněk přes plazmatickou membránu. Aby se molekula dostala do buňky a tam mohla dále působit, je tedy nutné, aby membrána byla narušená. Při poškození molekula barviva pak prochází poškozenou membránou do buňky, kde vytváří interkalační komplexy ve dvoušroubovici DNA, což vede k 20–30násobnému zvýšení fluorescenčního signálu PI. Zároveň dochází k posunutí fluorescenčního excitačního maxima cca o 30–40 nm do červeného spektra a fluorescenčního emisního maxima cca o 15 nm do modrého spektra. Výsledná excitační vlnová délka tak odpovídá cca 535 nm a emisní vlnová délka 620 nm ⁽⁴⁸⁾. Výsledný signál je proporcionální množství nukleových kyselin (DNA i RNA) v buňce ⁽⁴⁹⁾. Na rozdíl od dosud zmíněných metod, výsledný signál označuje množství usmrcených buněk ⁽⁵⁰⁾.

Existuje několik způsobů, jak výsledky kvantifikovat. Jednou z možností je změření fluorescence s PI, poté buňky lyzovat a měřit znovu. Jiným způsobem je použití pozitivní kontroly, tedy látky se známým cytotoxickým efektem a vztahení výsledné fluorescence na tuto

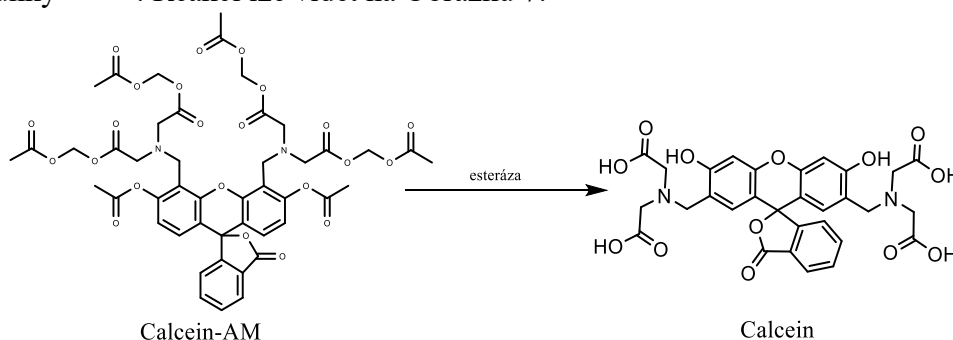
kontrolu. Měření probíhá pomocí fluorimetrů při excitační vlnové délce 535 nm a emisní vlnové délce 620 nm.

Ačkoliv se díky detekci nukleových kyselin, které se uvolňují z buněk při narušené integritě buněčné membrány, jeví jako vhodná metoda pro rozlišování cytotoxického a cytostatického efektu, je nutné uvažovat i možnost, že buňka umírá apoptickou buněčnou smrtí, kde nedochází k narušení plazmatické membrány. Z tohoto důvodu je spíše vhodná jako metoda pro sledování celistvosti plazmatické membrány, tedy stanovení nekrózy. Mezi výhody eseje patří hlavně její rychlost, kdy po aplikaci barviva následuje velmi krátká inkubační doba, po které lze hned měřit signál. Zároveň není nutné provádět žádné proplachovací kroky k ustálení signálu. Zásadní nevýhodou použití metody, je nutnost, aby došlo k lýze buněčné membrány pro získání měřitelného signálu. Kvůli této vlastnosti není považována jako vhodná metoda pro samostatné hodnocení viability buněk, ale velmi výhodně se používá v kombinaci s jinými fluorescenčními metodami (např. Calcein-AM, SYTO-9), které membránou již procházejí.

Calcein-AM esej

Calcein-AM (calcein acetomethoxyester) je nefluoreskující derivát fluoresceinu, který se čteně používá ve studiích lékové rezistence, lékových interakcích, cytotoxických esejích atd. (38).

Calcein-AM je díky esterifikaci velmi hydrofobní sloučenina, která ochotně prochází do buněčného intracelulárního prostředí i přes neporušenou plazmatickou membránu, kde je esterázami metabolizována na hydrofilní calcein (ten již membránou neprochází). Calcein vydává zelený fluorescenční signál, který je detekován fluorimetrem při excitační vlnové délce 485 nm a emisní vlnové délce 530 nm. Vzhledem k tomu, že cytoplazmatické esterázy nemohou být aktivovány v poškozených nebo usmrcených buňkách, fluoreskují pouze živé metabolicky aktivní buňky ⁽⁵¹⁾⁽⁵²⁾. Reakci lze vidět na Obrázku 7.



Obrázek 7. Metabolismus Calcein-AM na fluoreskující metabolit.

Vzhledem k tomu, že pro tvorbu signálu není nutná vazba na nukleové kyseliny (jako tomu bylo u PI), calceinovou esej lze použít k měření metabolické aktivity i u bezjaderných buněk – erytrocytů nebo krevních destiček ⁽⁵³⁾.

Calcein-AM je metoda kvantitativní, jednoduchá a poměrně rychlá při měřeních. Určitou nevýhodou je ale použití adherentních buněčných linií, kdy adherence buněk může blokovat průchod barviva do buněk ve spodních vrstvách a jeho přeměně na fluoreskující metabolit. Výsledky z adherentních buněčných linií tedy nejsou vždy úplně přesné ⁽³⁸⁾. Zároveň byla popsána i určitá interference s esterázami obsaženými v živném médiu některých buněčných linií, proto se doporučuje buňky promývat před aplikací eseje.

3.4.4. Luminometrické eseje

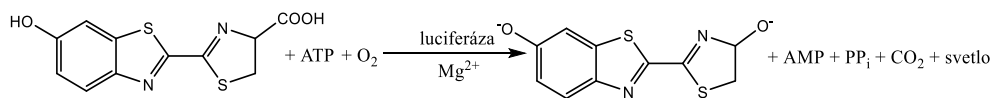
Luminometrické, neboli bioluminiscenční eseje, jsou založeny na korelaci mezi luminiscenčním signálem a buněčnou smrtí nebo proliferací. Obecně se jedná o metody s vysokou citlivostí, selektivitou a obecně nízkou interferencí s testovanými látkami. Na druhou stranu je pro provedení esejí nutné speciální vybavení (luminiscenční destičky, luminometr) a jedná se tak o poměrně finančně náročnou metodu (vysoká cena vybavení i činidel). Mezi tento typ esejí se řadí ATP esej.

ATP esej

Adenosintrifosfát (ATP) je základním nositelem energie v buňce, která se uvolňuje jeho hydrolýzou. Intracelulární obsah ATP je zároveň hlavním indikátorem životnosti buněk, protože při buněčné smrti je jako první zastavena syntéza ATP. Vzhledem k tomu, že hydrolýza ATP nadále pokračuje i po buněčné smrti, dojde dříve nebo později k totální depleci hladin ATP v buňce. Množství živých buněk lze tedy určit pomocí stanovení intracelulárních hladin ATP, ke kterému dojde po lýze buněk činidlem. Luminiscenční signál je úměrný množství ATP, a množství ATP je přímo úměrné množství živých buněk ⁽⁵⁴⁾⁽⁵⁵⁾.

Bioluminiscenční metoda stanovení ATP je ze všech známých metod stanovení ATP (enzymatické metody, radioaktivní, chromatografické, ...) nejcitlivější, nejrychlejší a nejselektivnější ⁽⁵⁴⁾.

Podstatou stanovení je reakce na Obrázku 8.



Obrázek 8. Mechanismus ATP-eseje.

Podstatou stanovení je přeměna molekuly luciferinu (získané ze světlušek) rekombinantní luciferázou za hydrolyzy ATP na oxyluciferin. Během reakce dochází k emisi světla, které je detekováno pomocí luminometru. Množství emitovaného světla je přímo úměrné životnosti buněk.

ATP (adenosintrifosfát), AMP (adenosinmonofosfát), PP_i (anorganický difosfát).

Převzato z: Promega ⁽⁵⁵⁾.

Jedná se o jednu z nejrychleji aplikovatelných metod k měření buněčné viability. Je jednoduchá na použití – nejsou zde žádné promývací kroky ani nutná inkubační doba. K ustálení signálu dochází již po 10 minutách a je stabilní po několik hodin. Zároveň je dobře citlivá, selektivní k ATP a dá se použít i v high-throughput systémech. Metoda sama o sobě nedokáže rozlišit cytostatický a cytotoxický efekt molekul na buňku a nevýhodou je i vysoká cena ^{(38) (56)}.

3.5. Použitá léčiva

Pro úplnost je poslední část teoretického úvodu věnována lékovým skupinám, jejichž zástupci byli použiti pro praktická měření buněčné viability.

3.5.1. Nesteroidní antiflogistika

Nesteroidní antiflogistika (*NSAIDs*, známá také jako antipyretická analgetika) jsou jedny z nejužívanějších léčiv vůbec. Používají se pro symptomatickou úlevu od horečky, lehké bolesti a otoků v chronických kloubních onemocněních (např. osteoartritis), a také jako léčba akutních zánětlivých onemocnění. Svůj význam mají i v terapii postoperačních bolestí, ale i relativně běžné menstruační bolesti⁽⁵⁷⁾.

Základním mechanismem účinku je inhibice enzymu COX (*Cyklooxygenáza*), čímž inhibují přeměnu kyseliny arachidonové v prostaglandiny a tromboxany. Dle selektivity k jednotlivým izoformám COX se rozlišují: COX neselektivní neboli klasická NSAIDs (**ibuprofen**, diklofenak), COX-2 preferenční (nimesulid, meloxikam) a COX-2 selektivní (tzv. koxiby – např. celekoxib)⁽⁵⁷⁾⁽⁵⁸⁾.

Ačkoliv se jedná o relativně bezpečná a velmi často i volně dostupná léčiva, i NSAIDs mají své nežádoucí účinky, na které je třeba myslet. Mezi nejčastější negativní účinky patří gastrointestinální dráždění v důsledku inhibice COX-1, která se podílí na syntéze protektivních prostaglandinů v oblasti žaludku (prostaglandiny snižují sekreci žaludeční šťávy a zvyšují sekreci protektivního hlenu). Tento nežádoucí účinek je méně častý u COX-2 selektivních zástupců. K dalším nežádoucím reakcím patří např. kožní reakce, riziko renálního poškození (hlavně u predisponovaných) a kardiovaskulární komplikace (typicky při delším užívání COX-2 selektivních zástupců)⁽⁵⁷⁾⁽⁵⁹⁾.

3.5.2. Inhibitory acetylcholinesterázy

Hlavním mechanismem působení těchto látek, je inhibice enzymu, který se podílí na degradaci acetylcholinu v synapsi. Výsledkem je tedy zvýšení nabídky acetylcholinu, který dále působí jako agonista na muskarinových a nikotinových receptorech. Mezi základní indikace této skupiny léčiv patří atonie hladkých svalů gastrointestinálního traktu, glaukom, myasthenia gravis a lehká až středně závažná stádia Alzheimerovy choroby⁽⁵⁹⁾.

V roce 1993 FDA schválila použití **takrinu** (*THA*) v terapii Alzheimerovy choroby, ale byl po několika letech stažen z trhu kvůli vysoké hepatotoxicitě. V současné klinické praxi se v této indikaci používá galanthamin, donepezil a rivastigmin⁽⁵⁹⁾.

Nežádoucí působení léčiv z této skupiny obvykle vychází ze zvýšené nabídky acetylcholinu – hypotenze, bronchokonstrikce se zvýšenou bronchiální sekrecí, nauzea, zvracení, křeče v abdominální oblasti, průjmy apod. ⁽⁵⁹⁾.

3.5.3. Tricyklická antidepressiva

Tricyklická antidepressiva (TCA) jsou jedny z nejstarších zástupců v terapii depresivní choroby. Mechanismus působení je založen na inhibici vychytávání (neboli reuptake) serotoninu a noradrenalinu v neurosynapsích, což vede ke zvýšení jejich koncentrací ⁽⁵⁹⁾.

Na rozdíl od SNRI (*Serotonin and Norepinephrine Reuptake Inhibitors*), které mají stejný mechanismus působení, se TCA odlišují širokým spektrem nežádoucích účinků, které vycházejí z neselektivního ovlivňování histaminových H₁, serotoninových 5-HT₂, adrenergických α₁ a muskarinových M receptorů. Mezi tyto nežádoucí účinky patří např. přibírání na váze, sedativní působení, vliv na kognitivní funkce, anticholinergní působení a hypotenze. Kvůli širokému spektru nežádoucích účinků se v současné době v terapii depresivních onemocnění používají spíše omezeně (většinou u těžkých rezistentních depresí nebo psychotických depresí). Kromě depresivních poruch jsou ale účinná např. i v terapii neuropatických bolestí a úzkostných poruch ⁽⁵⁸⁾ ⁽⁵⁹⁾.

Mimo četné nežádoucí účinky, terapeutické využití komplikují i lékové interakce. Zástupci z TCA se metabolizují v játrech na cytochromu CYP2D6, proto jejich hladiny mohou být ovlivněny při kombinaci s léčivými inhibujícími/ indukujícími tuto izoformu. Navíc kvůli neselektivnímu působení na receptorech mohou prohlubovat nežádoucí účinky léčiv s podobným působením – např. zvýšené riziko hypotenzí u pacientů s antihypertenzivou apod ⁽⁵⁹⁾.

Mezi zástupce TCA patří např. amitriptylin, **imipramin**, **desipramin**, dosulepin, maprotilin, klomipramin a další ⁽⁵⁸⁾.

3.5.4. H₂ antihistaminika

Objev a rozvoj H₂ antihistaminik v 70. letech znamenal obrovský pokrok v terapii refluxní choroby a vředové choroby gastroduodena, neboť do té doby byly jedinými možnostmi neutralizace žaludeční šťávy nebo chirurgický zákrok ⁽⁵⁷⁾ ⁽⁵⁹⁾.

Jak již vyplývá z názvu, jedná se o kompetitivní antagonisty na H₂ receptorech, což umožňuje inhibici histaminem a gastrinem stimulované sekrece žaludeční šťávy s minimálním vlivem na bazální sekreci ⁽⁵⁷⁾.

Co se týče nežádoucích účinků, tak jsou u skupiny H₂ antagonistů poměrně vzácné – nejčastěji se lze setkat s průjmami, bolestmi svalů nebo závratěmi. Někteří zástupci (např. **cimetidin**) rovněž dokážou inhibovat některé izoformy cytochromu P450, což může ovlivňovat metabolismus některých konkomitantně podávaných léčiv⁽⁵⁷⁾⁽⁵⁹⁾.

Mezi zástupce skupiny patří např. **cimetidin**, ranitidin nebo famotidin. Vzhledem k jejich nižší účinnosti a riziku escape fenoménu (up-regulace H₂ receptorů vedoucí ke snížení terapeutické odpovědi), jejich použití je v současné době spíše menší a jsou z trhu vytěšňovány léčivy ze skupiny inhibitorů protonové pumpy⁽⁵⁸⁾.

3.5.5. β -blokátory

Betablokátory jsou velmi důležitou skupinou terapeutických molekul, a to hlavně díky jejich účinku v terapii hypertenze, ischemické choroby srdeční, srdečního selhání a některých typů arytmií⁽⁵⁸⁾⁽⁵⁹⁾.

Mechanismem účinku je blokáda β -adrenergických receptorů, která může být neselektivní nebo β_1 selektivní (blokáda β_2 se terapeuticky nevyužívá). Některé β -blokátory mohou mít i tzv. vnitřní sympatomimetickou aktivitu (ISA), což znamená, že i v absenci katecholaminů mohou adrenergické receptory z části aktivovat. Ačkoliv ISA může být kontraproduktivní v některých terapeutických záměrech (parciální aktivace receptoru je nevýhodná např. v případech, kdy je vhodnější udržovat nižší tepovou frekvenci – ischemická choroba srdeční, chronické srdeční selhání, tachyarytmie apod.), u některých pacientů by mohla být výhodná, protože zde nedochází k tak výrazným bradykardiím, bronchokonstrikci a vazokonstrikci⁽⁵⁹⁾.

Nežádoucí účinky vyplývají z mechanismu působení léčiv a umístění β -receptorů. Lze se setkat např. z bradykardií, bronchospasmy (hl. u neselektivní blokády), negativním vlivem na lipidové spektrum a s určitým rizikem rozvoje erektilní dysfunkce⁽⁵⁸⁾.

Základní molekulou je **propranolol** – kompetitivní neselektivní antagonist na β -receptorech, který je určitým prototypem, se kterým jsou srovnávány ostatní zástupci této skupiny léčiv. Je u něj totiž popisována rovnocenná inhibice β_1 i β_2 receptoru. Zástupcem β_1 selektivních blokátorů je např. metoprolol nebo atenolol. Mezi β -blokátory s ISA patří např. bopindolol, který je neselektivní, nebo celiprolol, který je β_1 selektivní⁽⁵⁹⁾.

4. CÍL PRÁCE

Hlavní cíl diplomové práce je porovnání pěti různých metod měření buněčné viability a cytotoxicity léčiv – MTT esej, propidium jodidová esej, calcein-AM esej, esej s krystalovou violetí a ATP esej na setu šesti klinicky užívaných léčiv. Eseje budou porovnávány z hlediska mechanismu působení, citlivosti metody k buněčné smrti, náročnosti práce s metodou, případných interferencí omezující jejich použití, finančních nákladů a případně dalších praktických aspektů. Pro porovnání esejí mezi sebou budou změřeny hodnoty IC_{50} buněčné viability po expozici šesti studovaným léčivům o různé toxicitě – ibuprofen, imipramin, desipramin, cimetidin, propranolol a takrin za využití CHO-K1 buněčné linie.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Použitý materiál

5.1.1. Buněčná linie

- CHO-K1 buněčná linie (Chinese Hamster Ovaries), ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures) (*Porton Down – Wiltshire, Anglie*)

5.1.2. Přístroje a pomůcky

- Laminární box Safeflow 1.2 Bioair, EuroClone (*Pero – Milán, Itálie*)
- Laminární box HFsafe-1200LC, Heal Force (*Shanghai, Čína*)
- CO₂ inkubátor FORMA™ Direct Heat 311, Thermo Scientific (*Waltham, Massachusetts, USA*)
- Mikroskop, inverzní, OPTIKA Microscopes (*Ponteranica, Itálie*)
- Vodní lázeň, PolyScience (*Niles, Illinois, USA*)
- Ultrazvuková lázeň Elmasonic P30H, Elma (*Singen, Německo*)
- Analytická váhy Sartorius CPA225D-0CE, Sartorius Stedim Biotech (*Göttingen, Německo*)
- Třepačka Vortex Mixer Wizard X (micr8titer), Velp Scientifica (*Usmate Velate, Itálie*)
- Elektrický pipetovací nástavec Accu-Jet Pro, BrandTech™ Scientific (*Essex, Connecticut, USA*)
- Centrifuga UNIVERSAL 320 R, Hettich Zentrufigen (*Tuttlingen, Německo*)
- Multidetekční modulární reader SPARK, Tecan (*Männedorf, Švýcarsko*)
- Multidetekční modulární reader Synergy™ HT, BioTek (*Winooski, Vermont, USA*)
- Bürkerova komůrka
- Automatické manuální mikropipety, multikanálové mikropipety Research Plus, Eppendorf (*Hamburg, Německo*)

5.1.3. Chemikálie

- Trypsin-EDTA solution 0,25%, Sigma Aldrich (*Darmstadt, Německo*)
 - o 2,5 g prasečného trypsinu a 0,2 g EDTA, 4Na per liter Hank's Balanced Salt Solution with fenol red
- Kultivační médium pro CHO-K1 buněčnou linii
 - o Nutrient Mixture F-12 Ham, Sigma Aldrich (*Darmstadt, Německo*)
 - o Fetal Bovine Serum (FBS) 10 %, Sigma Aldrich (*Darmstadt, Německo*)
 - o Penicillin – Streptomycin 1 %, Sigma Aldrich (*Darmstadt, Německo*)

- Fosfátový pufr (PbS) – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma Aldrich (*Darmstadt, Německo*)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) for molecular biology, Sigma Aldrich (*Darmstadt, Německo*)
- Methanol 98,5%, VWR Chemicals BDH® (*Wayne, Pennsylvania, USA*)
- Triton® X-100 scintillation grade, Koch-Light Laboratories Ltd (*Haverhill, VB*)
 - Ethoxylated p-tert-octylphenol with an average of 9-10 ethylene oxide units
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) 98%, Sigma Aldrich (*Darmstadt, Německo*)
- Propidium iodide solution, Sigma Aldrich (*Darmstadt, Německo*)
 - 1,0 mg/ml in water, MW = 668,39 g/mol
- Cell-Based Assay Calcein-AM, Cayman Chemical Company (*Ann Arbor, Michigan, USA*)
 - 50 µl 1mM Calcein-am solution in DMSO
- Crystal Violet solution 1%, Sigma Aldrich (*Darmstadt, Německo*)
 - 1% vodný roztok krystalové violeti
- CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Kit, Promega (*Madison, Wisconsin, USA*)
 - CellTiter-Glo Buffer a CellTiter-Glo Substrate (lyophilized)

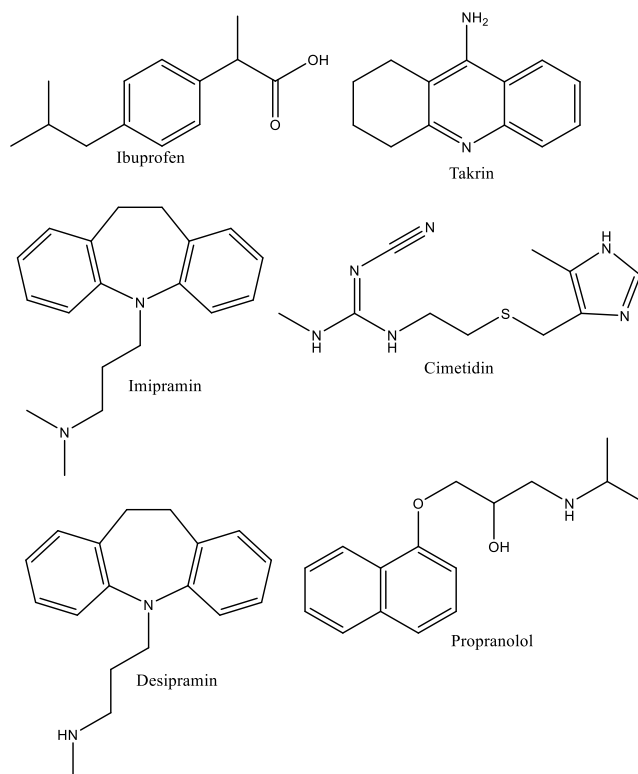
Desinfekce

- Ethanol 70%
 - Na ostříkání pomůcek a rukou před vstupem do laminárního boxu
- Medicarine
 - Na biologický odpad
- Sterilium
 - Na ruce před a po ukončení práce v laboratoři

5.1.4. Měřené látky

- **Ibuprofen** minimum 98% (GC), Sigma Aldrich (*Darmstadt, Německo*)
 - o MW = 206,29 g/mol
- **THA (takrin)**
 - o MW = 234,72 g/mol
- **Imipramine hydrochloride** $\geq 99\%$ (TLC), Sigma Aldrich (*Darmstadt, Německo*)
 - o MW = 316,88 g/mol
- **Cimetidine**, Sigma Aldrich (*Darmstadt, Německo*)
 - o MW = 252,34 g/mol
- **Desipramine hydrochloride** minimum 98% (TLC), Sigma Aldrich (*Darmstadt, Německo*)
 - o MW = 302,9 g/mol
- **(+/-) Propranolol hydrochloride** $\geq 99\%$ (TLC), Sigma Aldrich (*Darmstadt, Německo*)
 - o MW = 295,81 g/mol

Použito bylo šest standardních léčiv s odlišnými fyzikálně-chemickými a farmakologickými vlastnostmi. Použiti byli zástupci z tricyklických antidepresiv (imipramin, desipramin), ibuprofen (NSAIDs), propranolol (neselektivní β -blokátor), takrin (inhibitor AChE) a cimetidin (H_2 antihistaminikum). Vzorce léčiv lze vidět na Obrázku č. 9. Vliv léčiv na buněčnou viabilitu byl stanoven pěti různými metodami.



Obrázek 9. Vzorce měřených látek.

Převzato z: <https://go.drugbank.com/>.

Koncentrace léčiv (ibuprofen 5 mM; takrin 1,2 mM; cimetidin 20 mM; imipramin 500 μ M; desipramin 300 μ M a propranolol 500 μ M) byly prvotně určeny na základě předchozích zkušeností laboratoře. Tyto koncentrace byly následně použity vždy úvodu u každé metody, a pak v závislosti na výsledcích a průběhu metody byly dále upravovány, aby byly získány, co nejpřesnější hodnoty IC_{50} .

5.2. Pracovní postup

5.2.1. Den první – příprava buněk pro testování

První den se shodoval u všech použitých metod. Kultivační láhev se přenesse z inkubátoru do sterilního prostředí laminárního boxu, kde je z kultivační láhve opatrně odsáto staré médium. Láhev se následně propláchne 5 ml fosfátového pufru (PbS), který opláchne buňky od média, které by mohlo následně interferovat s působením trypsinu. Po propláchnutí se aplikuje 1 ml trypsinu, který je opatrně rozprostřen po celém dně láhve, aby došlo k odlepení co největšího množství narostlých buněk. Láhev se poté nechá inkubovat po dobu 5 min při 37 °C, kdy má enzym nejvyšší aktivitu. Po inkubaci se do láhve přidá 5 ml média, kterým se splachuje dno láhve, aby se ze dna odlepilo co nejvíce buněk do výsledné buněčné suspenze, která je dále použita pro nasazení testovacích destiček, ale i pro další kultivaci.

Počet buněk v jamce destičky při nasazování se liší u různých metod měření buněčné viability (uvedeno v příslušném protokolu u každé metody). Výsledné množství buněčné suspenze potřebné pro nasazení destičky se vypočítá dle návodu v Příloze 1. Ze zbylé buněčné suspenze se nechá 0,5–1 ml v láhvi pro další kultivaci. Doplní se kultivačním médiem na 10 ml a láhev se označí číslem pasáže a datem. Zbytek se zlikviduje za pomoci desinfekce. Láhev i nasazená destička se pak nechají inkubovat při 37 °C a 5 % CO₂. Obvykle jsou používány buňky do 30. pasáže, starší buňky poté již hůře rostou, což vede k horší reprodukovatelnosti výsledků. Vždy je vhodné před nasazováním buňky sledovat pod mikroskopem a zhodnotit případné morfologické odlišnosti.

5.2.2 Den druhý – příprava roztoků léčiv

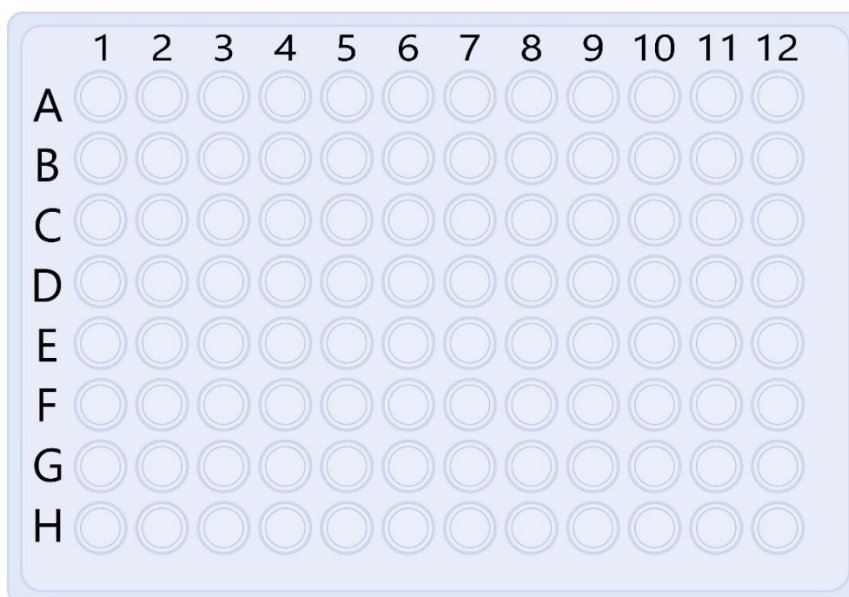
Práce druhý den probíhala stejně u všech použitých metod. Nejdříve se připraví koncentrované zásobní roztoky léčiv rozpuštěné v DMSO, které jsou pak dále ředěny na požadovanou koncentraci kultivačním médiem a aplikovány na destičku. Koncentrace zásobních roztoků v DMSO následující:

- Ibuprofen 1 M
- THA 300 mM
- Imipramin 50 mM
- Cimetidin 3 M
- Desipramin 100 mM
- Propranolol 250 mM

Koncentrace zásobních roztoků, zejména podíl DMSO, byly voleny s určitou rezervou, aby bylo možné případně navýšit nanášené koncentrace léčiv u méně citlivých metod, a výsledné množství DMSO v nanášeném roztoku léčiva a média bylo do 1 %. Vyšší koncentrace DMSO už totiž mohou negativně ovlivňovat permeabilitu buněčné membrány, životnost buněk, a tak zkreslovat výsledky měření.

Do mikrozkušavek bylo napipetováno určité množství připravených zásobních roztoků, které byly doplněny kultivačním médiem do 2 ml na nejvyšší sledovanou koncentraci a poté dále ředěny tzv. „dvojkovým ředěním“ na speciální 96 jamkové hluboké destičce. Dvojkové ředění znamená, že každá následující koncentrace je vždy o polovinu nižší než ta předchozí.

Po naředění léčiv byly do boxu po dni kultivace přeneseny nasazené destičky s buňkami. Z jamek bylo odsáto původní médium a napipetováno 100 μ l připravené směsi média s léčivem, která se vždy nasazovala v tripletech. Poté se destička opět nechá 24 hodin inkubovat. Schéma nasazování destičky lze vidět na Obrázku 10.



Obrázek 10. Schéma nasazování 96 jamkové destičky.

Na jednu destičku byla nasazována tři léčiva vždy v tripletech, tzn. 1-3 odpovídalo jednomu léčivu, 4-6 druhému a 7-9 třetímu. Nejvyšší koncentrace byly nasazovány do řádku A a směrem k H koncentrace klesala díky dvojkovému ředění. Sloupce 10 a 11 sloužily jako kontroly. U většiny metod byla používána pouze negativní kontrola, která byla v obou sloupcích. Při případném použití pozitivní kontroly byl použit sloupec 11 se zachováním negativní kontroly v sloupci 10. Poslední 12. sloupec sloužil jako blank.

Převzato z: Sigma Aldrich Technical Documents ⁽⁶⁰⁾.

Na každé destičce byly vyhrazeny dva sloupce pro kontrolu, které se mohly lišit u různých metod. Jeden sloupec byl vždy tzv. negativní kontrola, kde byly pouze buňky a médium bez testované látky. Negativní kontrola slouží pro zjištění nejvyššího (u PI nejnižšího) signálu tedy maximální životnosti buněk. U některých metod se rovněž používala kontrola pozitivní, kde byl aplikován THA o nejvyšší sledované koncentraci nebo 1% roztok Triton-X100 (cílem bylo zjistit signál, který odpovídá nulové životnosti buněk). Poslední sloupec vždy sloužil jako blank – nebyly v něm nasazeny žádné buňky a obsahoval vždy jen médium. Blank umožňuje zjistit případné interference v pozadí (např. interference některých složek media s metodou apod.).

5.2.2. Den třetí – měření cytotoxicity léčiv

Pro stanovení cytotoxicity použitých léčiv a získání hodnot IC_{50} bylo použito pět různých metod buněčné viability: MTT esej, propidium jodid, Calcein-AM, krystalová violet' a ATP esej (CellTiter Glo). Níže je postup pro jednotlivé eseje.

MTT esej

Při měření MTT byla použita pouze negativní kontrola a blank. Nejvyšší nasazované koncentrace léčiv odpovídají výchozím koncentracím popsaným v bodě 5.1.4.

Po 24 hodinách inkubace je destička přenesena do sterilního prostředí laminárního boxu (před tím je vhodné zkontrolovat pod mikroskopem životnost buněk ve sloupci kontroly a např. ve vysokých koncentracích studované látky). Z destičky je odsáto staré médium a přidáno médium s MTT. V laboratoři byly k dispozici předem připravené alikvoty rozpuštěného MTT v PbS – na jednu destičku byla použita jedna vialka, která byla smísena s 10 ml média. Destičky se pak nechají 3 hodiny inkubovat. Výsledná koncentrace MTT v jamce byla 10 μ M.

Po cca třech hodinách, již v nesterilním prostředí, je odsáto médium s MTT a přidáno 100 μ l DMSO/ jamku a nechá se mírně protřepat. Absorbance byla měřena při dvou vlnových délkách 570 a 650 nm na Synergy HT a změřené absorbance byly navzájem odečteny. Detailní popis použití MTT je shrnut v Příloze 2.

Propidium jodid

Při použití PI byla použita negativní i pozitivní kontrola. Negativní kontrola zde sloužila pro označení maximální životnosti buněk a odpovídajícího nejnižšího signálu. Pozitivní kontrola byla použita s cílem zjištění signálu, který odpovídá nulové životnosti (v případě PI se jedná o nejvyšší signál). Jako pozitivní kontrola byla použita nejvyšší aplikovaná koncentrace THA. Zřejmě kvůli mechanismu působení PI (prochází pouze přes poškozenou membránu a váže se na fragmenty DNA) bylo nutné nasazovat vyšší koncentrace léčiv než u ostatních metod.

Výsledky byly naměřeny za použití následujících koncentrací:

- Ibuprofen 10 mM
- THA 20 mM
- Imipramin 1 mM
- Cimetidin 20 mM
- Desipramin 1,2 mM
- Propranolol 1 mM

Při práci s PI je nutné pracovat v zatemněné místnosti, protože barvivo je fotolabilní.

Třetí den se po 24 hodinách buňky přenesou, po zkontrolování životnosti kontroly, do sterilního prostředí laminárního boxu. Z destičky je opatrně odsáto médium a přidán 2,5 μ M roztok PI v PbS. Nechá se inkubovat asi 5-15 min. Po inkubaci je měřena fluorescence při

excitační vlnové délce 535 nm a emisní vlnové délce 620 nm. Pro detailní popis aplikace metody viz Příloha 3.

Calcein-AM

Při použití této metody byla použita pouze negativní kontrola a blank. Pro měření byly použity výchozí koncentrace z bodu 5.1.4., akorát u propranololu došlo k navýšení na 1,2 mM a u desipraminu na 500 μ M kvůli nejednotným výsledkům. Druhý den, tedy při nasazování roztoků léčiv, nebylo odstraňováno staré médium, tzn., že po druhém dni v destičce bylo celkem 200 μ l směsi. Důvodem je, že calcein-AM je metoda velice citlivá na jakékoliv okolní změny, a odsávání média druhý den, vedlo k opakované nekonzistenci výsledků. Z tohoto důvodu byl vyzkoušen tento postup, který pak byl zachován po dobu celého měření.

Důležitá byla také práce v zatemněném prostředí, protože calcein-AM se může rozkládat na světle.

Třetí den se po 24 hodinách buňky přenesou, po zkontrolování životnosti kontroly, do sterilního prostředí laminárního boxu. Z destičky je odstraněno veškeré médium a je propláchnuta 100 μ l PbS, aby bylo odstraněno přebytečné médium (calcein-AM je totiž štěpen buněčnými esterázami, které jsou obsažené i v živném médiu, a mohlo by tedy jinak dojít k interferenci, vzniku vyššího signálu a ovlivnění výsledných hodnot IC_{50}). Po propláchnutí se aplikuje roztok calcein-AM v PbS a destička se nechá 30 min inkubovat při 37 °C. Nakonec se měří fluorescence při vlnové délce 485 nm a emisní vlnové délce 530 nm. Detailní popis metody lze najít v Příloze 4.

Krystalová violet

Při aplikaci krystalové violeti byla použita pouze negativní kontrola a blank. Nasazovány byly výchozí koncentrace z bodu 5.1.4. Třetí den se pracuje již v nesterilním prostředí.

Po 24 hodinách inkubace je destička, po kontrole životnosti kontroly pod mikroskopem, přenesena na pracovní plochu, kde je z destičky odstraněno staré médium s léčivou. Podle protokolu M. Feoktisové ⁽⁴⁶⁾ je destička dále promyta destilovanou vodou, a obrácena dnem vzhůru na filtrační papír nebo buničinu, aby byla odstraněna přebytečná tekutina, která může obsahovat odlepené mrtvé buňky, které by mohly zvyšovat signál při měření. Navíc voda v okolí buněk vytváří hypotonické prostředí, které při delším působení vede k dalšímu poškození buněk. Po promytí se přidá 50 μ l 0,5% roztoku krystalové violeti a nechá se inkubovat 20 min za pokojové teploty na vortexu. Po inkubaci se destička 4x propláchně

destilovanou vodou a nechá se vysychat za pokojové teploty po dobu alespoň 1–2 hodin. Nakonec se přidá 200 μ l methanolu/jamku, nechá se inkubovat 20 min na vortexu (již s víčkem) a měří se absorbance při vlnové délce 570 nm. Přesný postup lze najít v Příloze 5.

ATP Assay (CellTiter Glo)

Při práci s ATP metodou byla použita pouze negativní kontrola a blank. Nasazovány byly výchozí koncentrace z bodu 5.1.4., akorát ibuprofen byl navýšen na 10 mM, desipramin na 500 μ M a propranolol na 1 mM. Na poslední měření bylo vyzkoušeno i zvýšení koncentrace cimetidinu na 40 mM.

Při práci byla také stanovována nejvhodnější koncentrace ATP činidla pro měření – byly zkoušeny čtyři různé koncentrace, ze kterých nakonec byl vybrán poměr činidlo: médium 1:4, kterým byly získány výsledky. Dále je důležité podotknout, že při práci byla použita speciální bílá luminiscenční destička, se kterou je nutné pracovat po celou dobu měření ve tmě (tzn. celé tři dny), jinak přístroj není schopen luminiscenci měřit pro příliš vysoký signál pozadí.

Po 24 hodinách inkubace a kontrole životnosti pod mikroskopem je destička přenesena do sterilního prostředí laminárního boxu. Do destičky bylo přidáno 100 μ l roztoku ATP činidla bez odstranění roztoků léčiv z druhého dne. S činidlem se nechá destička mírně protřepat, aby došlo k rozprostření, a následně se nechá 10 min stát ve tmě pro stabilizaci signálu. Měří se luminiscence v rozmezí vlnových délek 445–665 nm. Přesný postup práce a nastavování koncentrací činidla je popsán v Příloze 6.

5.1.1. Zpracování naměřených dat

Naměřené hodnoty absorbance, fluorescence a luminiscence byly převedeny do excelu, kde byly dále zpracovávány.

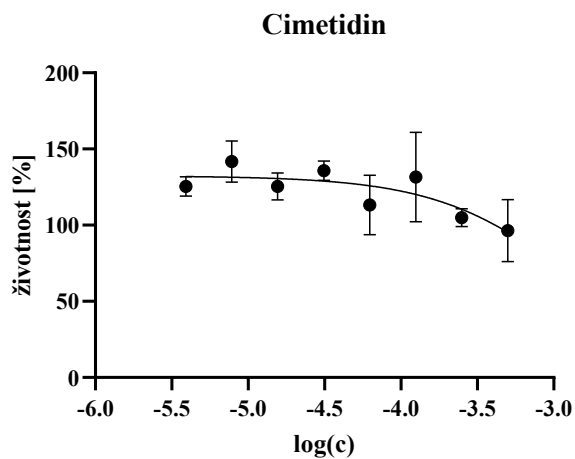
U MTT metody byla naměřená hodnota absorbance v jamce, převedena na procenta. V tripletu, odpovídající jedné koncentraci jednoho léčiva, byl pak vypočítán aritmetický průměr, který byl vydělen průměrným signálem ve sloupcích negativní kontroly a vynásoben 100 na získání % životnosti. Hodnoty byly spolu s koncentrací léčiva v molech a směrodatnou odchylkou přeneseny do programu GraphPad Prism 8, pro vytvoření grafu a vypočítání hodnoty IC_{50} . Princip zpracovávání dat byl shodný i u ATP metody a eseje s krystalovou violetí. U PI byl od naměřených hodnot fluorescence odečten aritmetický průměr negativní kontroly (tedy signál živé kontroly s médiem obsahující příslušné léčivo). Při zpracování Calcein-AM byl od naměřené fluorescence odečten aritmetický průměr blanku s příslušným léčivem, pro částečné

odstranění vlivu prostředí a fluorescence léčiva a podobným způsobem jako u MTT byly hodnoty převedeny na %. U PI jsou u grafického zpracování hodnoty vztahovány na odezvu detektoru, zatímco u calcein-AM eseje, ATP eseje, MTT eseje a eseje s krystalovou violetí jsou hodnoty vztahovány na % životnost.

Po vložení dat do GraphPad Prism 8, je nutné osu x zlogaritmovat přes ikonu „Analyze“ a dále „Transform“, zaškrtnout funkci „ $x=\log(x)$ “. Druhou úpravou je již grafické vyhodnocení, kde se opět přes „Analyze“ zvolí „Nonlinear Regression“ a vybere se funkce „log(inhibitor) vs. response – Variable slope (four parameters) – symmetrical“. Poté program vypracuje grafické zobrazení měření a vypočítá hodnoty IC_{50} , které jsou dále využity k vyhodnocení. V případě, že nebylo dosaženo nízké viability (<20 %), byla ve statistickém programu použita navíc funkce „Constrain (Bottom) = 0“, která ve vyšších koncentracích nulovou viabilitu simuluje a přesněji stanovuje hodnotu IC_{50} . Použití funkce u grafů s nejnižším bodem odpovídající 0-20% životností již pro výsledné hodnoty mělo zanedbatelný význam.

6. VÝSLEDKY

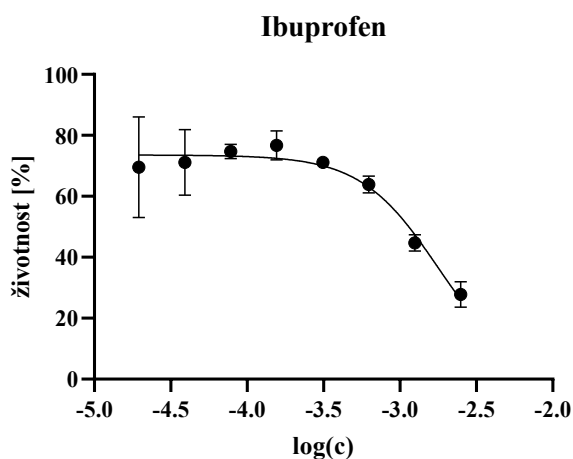
Ve výsledcích lze sledovat krátkou rekapitulaci použití dané metody, graf a z něj získané hodnoty (IC_{50} , SD a SEM zaokrouhleny na dvě platné číslice). Vzhledem k tomu, že měřením standardu cimetidinu nebylo možné získat validní výsledky (tzn. hodnotu IC_{50}) u žádné z metod, je na Obrázku 11. jen názorně ukázán graf běžného měření cimetidinu.



Obrázek 11. Grafické znázornění měření cimetidinu – MTT test.

6.1. MTT esej

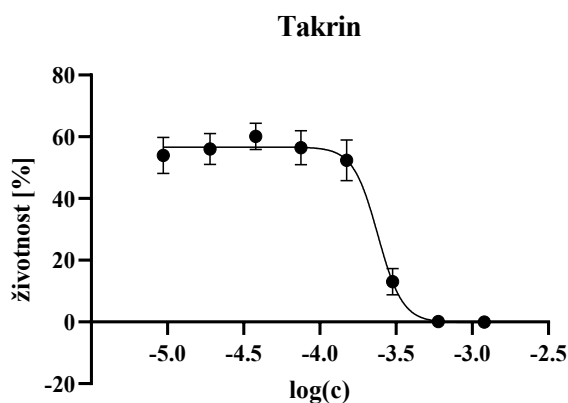
Výsledky měření byly získávány při měření následujících koncentrací: ibuprofen 5 mM; takrin 1,2mM; imipramin 500 μ M; desipramin 300 μ M; cimetidin 20 mM a propranolol 500 μ M. Nasazováno bylo 8000 buněk/ jamku a využívala se pouze negativní kontrola, ke které byla viabilita vztažena. Grafická znázornění měření léčiv a naměřené hodnoty IC_{50} lze vidět na Obrázcích 12–16.



Obrázek 12. MTT esej ibuprofenu.

Průměrná hodnota IC_{50} ibuprofenu získaná ze tří měření – 1,5 mM.

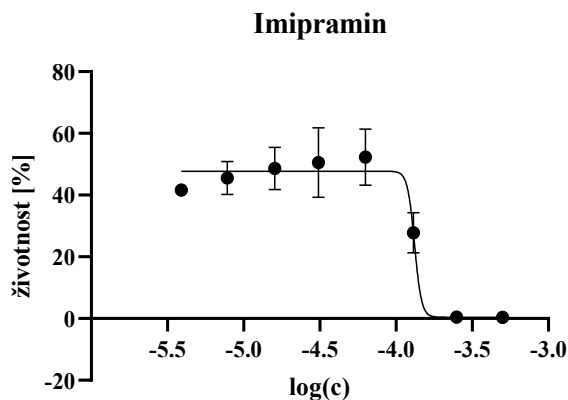
Směrodatná odchylka – 0,28. SEM – 0,16.



Obrázek 13. MTT esej takrinu.

Průměrná hodnota IC_{50} takrinu získaná ze tří měření – 220 μ M.

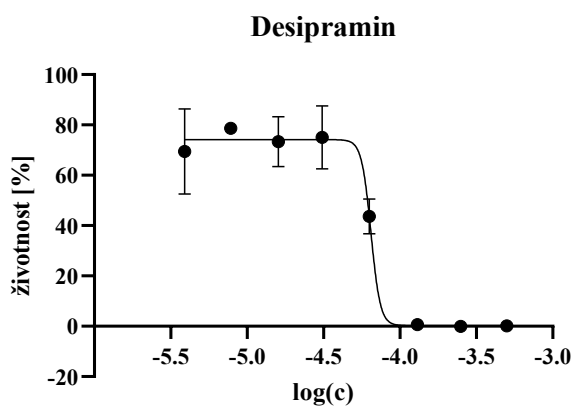
Směrodatná odchylka – 28. SEM – 16.



Obrázek 14. MTT esej imipraminu.

Průměrná hodnota IC_{50} imipraminu získaná ze tří měření – 140 μM .

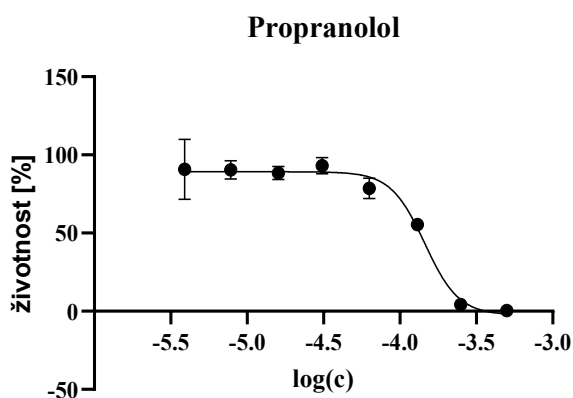
Směrodatná odchylka – 14. SEM – 10.



Obrázek 15. MTT esej desipraminu.

Průměrná hodnota IC_{50} desipraminu získaná ze tří měření – 75 μM .

Směrodatná odchylka – 11. SEM – 6,4.



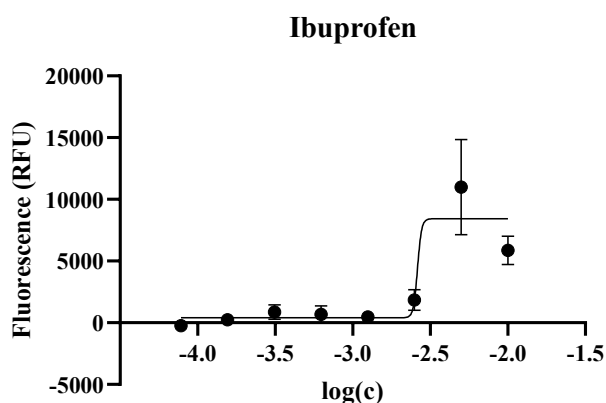
Obrázek 16. MTT esej propranololu.

Průměrná hodnota IC_{50} získaná ze tří měření – 220 μM .

Směrodatná odchylka – 68. SEM – 34.

6.2. Propidium jodidová esej

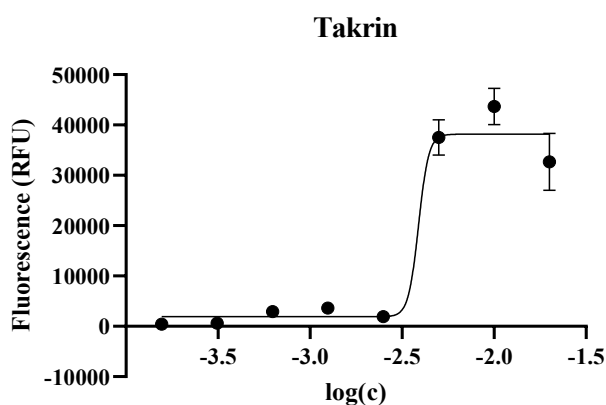
Při použití PI esej bylo nutné navyšovat koncentrace léčiv na: ibuprofen 10 mM; takrin 20 mM; imipramin 1 mM; desipramin 1,2 mM; cimetidin 20 mM a propranolol 1 mM. Nasazováno bylo 8000 buněk/ jamku a při měření byla nasazena negativní kontrola (které se odčítala při výpočtu) i pozitivní kontrola (pro srovnávání maximálního signálu u léčiv). Jako pozitivní kontrola byl nasazován takrin o koncentraci 20 mM, u které se předpokládala nulová viabilita. Grafická znázornění měření léčiv a naměřené hodnoty IC_{50} lze vidět na Obrázcích 17–21. Nejvyšší odezva detektoru odpovídá mrtvé buněčné populaci.



Obrázek 17. Propidium jodidová esej u ibuprofenu.

Průměrná hodnota IC_{50} získaná ze tří měření – 2,7 mM.

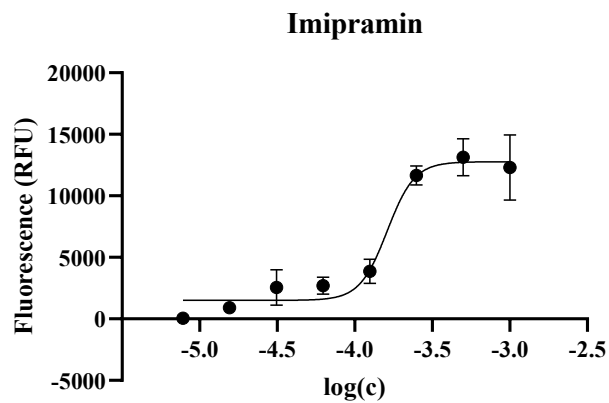
Směrodatná odchylka – 0,13. SEM – 0,076.



Obrázek 18. Propidium jodidová esej u takrinu.

Průměrná hodnota IC_{50} získaná ze tří měření – 4,4 mM.

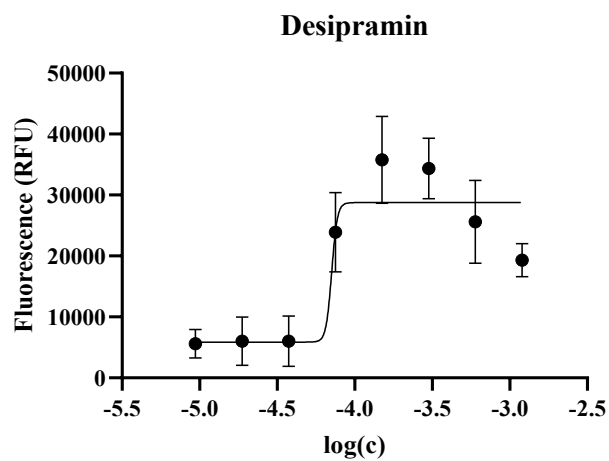
Směrodatná odchylka – 0,47. SEM – 0,27.



Obrázek 19. Propidium jodidová esej u imipraminu.

Průměrná hodnota IC_{50} získaná ze tří měření – 140 μM .

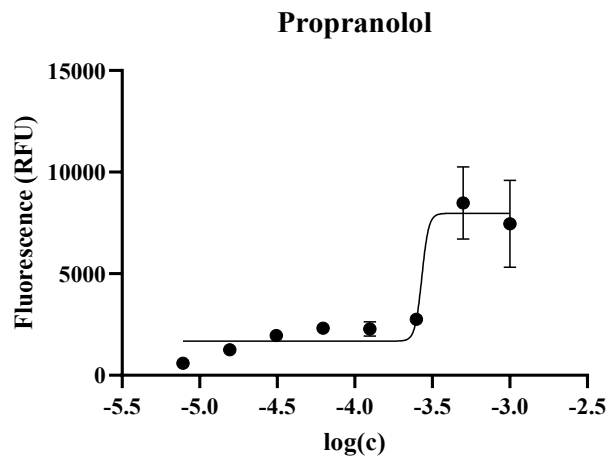
Směrodatná odchylka – 18. SEM – 10.



Obrázek 20. Propidium jodidová esej u desipraminu.

Průměrná hodnota IC_{50} získaná ze tří měření – 59 μM .

Směrodatná odchylka – 18. SEM – 9,1.



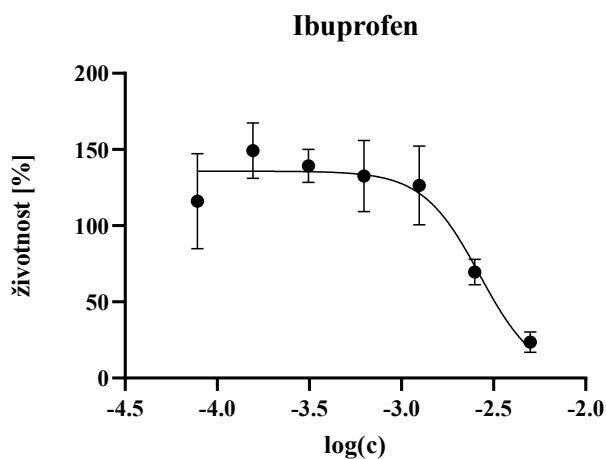
Obrázek 21. Propidium jodidová esej u propranololu.

Průměrná hodnota IC_{50} získaná ze tří měření – 370 μM .

Směrodatná odchylka – 31. SEM – 14.

6.3. Calcein-AM esej

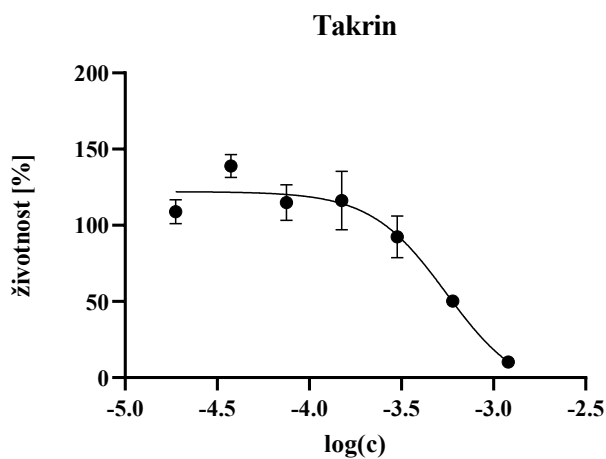
Při použití Calcein-AM byly aplikovány následující koncentrace: ibuprofen 5 mM; takrin 1,2 mM; imipramin 500 μ M; desipramin 500 μ M; cimetidin 20 mM a propranolol 1 mM. Nasazováno bylo 10 000 buněk/ jamku a použita byla pouze negativní kontrola. Grafická znázornění měření léčiv a naměřené hodnoty IC_{50} lze vidět na Obrázcích 22–26.



Obrázek 22. Calcein-AM esej u ibuprofenu.

Průměrná hodnota IC_{50} získaná ze tří měření – 3,3 mM.

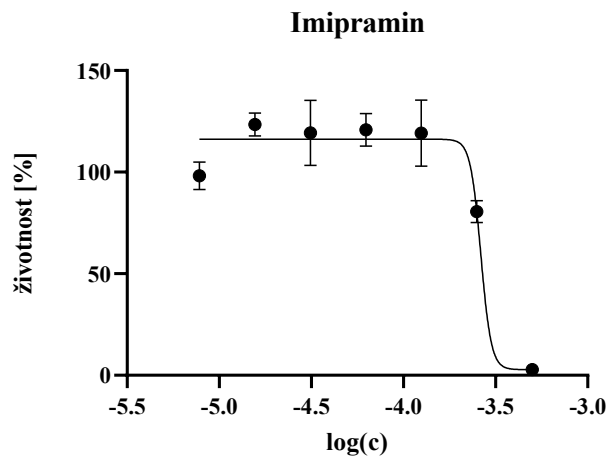
Směrodatná odchylka – 0,61. SEM – 0,35.



Obrázek 23. Calcein-AM esej u takrinu.

Průměrná hodnota IC_{50} získaná ze tří měření – 450 μ M

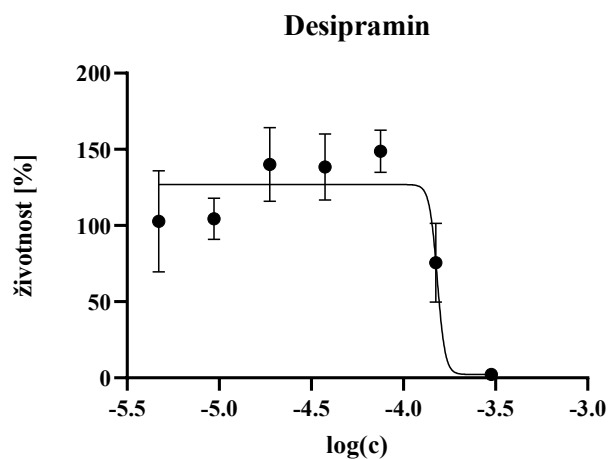
Směrodatná odchylka – 170. SEM – 77.



Obrázek 24. Calcein-AM esej u imipraminu.

Průměrná hodnota IC_{50} získaná ze 3 měření – 320 μM .

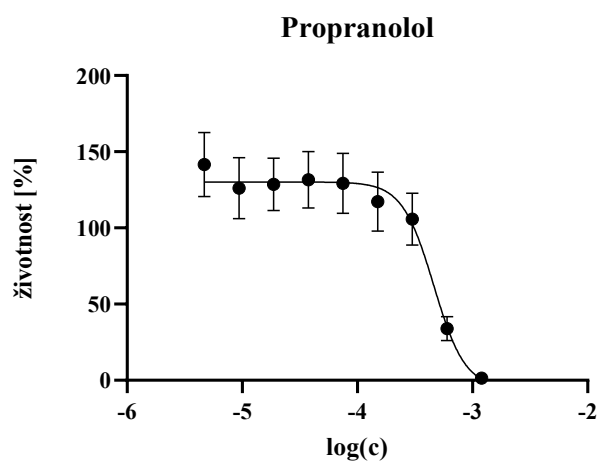
Směrodatná odchylka - 110. SEM – 50.



Obrázek 25. Calcein-AM esej u desipraminu.

Průměrná hodnota IC_{50} získaná ze tří měření – 150 μM .

Směrodatná odchylka – 40. SEM – 23,88.



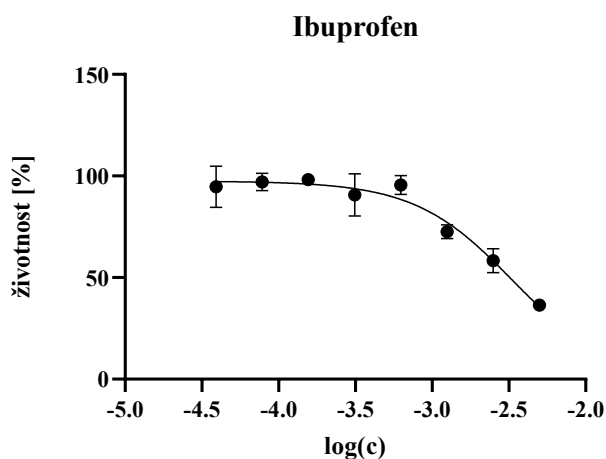
Obrázek 26. Calcein-AM esej u propranololu.

Průměrná hodnota IC_{50} získaní ze tří měření – 360 μM .

Směrodatná odchylka – 170. SEM – 85.

6.4. Esej s krystalovou violetí

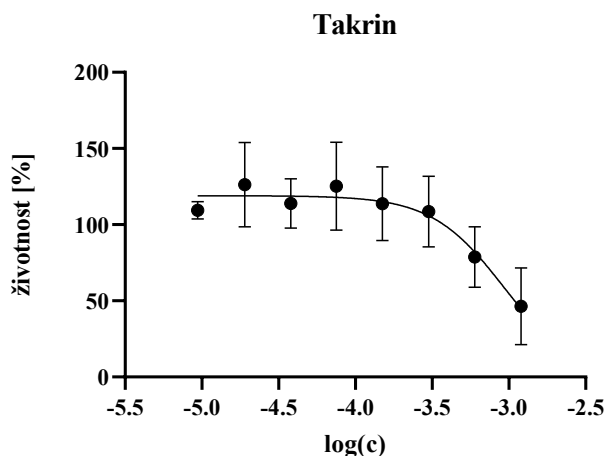
Při práci s krystalovou violetí byly používány výchozí koncentrace, tedy ibuprofen 5 mM; takrin 1,2 mM; imipramin 500 μ M; desipramin 300 μ M; cimetidin 20 mM a propranolol 500 μ M. Nasazováno bylo 8 000 buněk/ jamku a použita byla pouze negativní kontrola, ke které byla viabilita vztažena. Grafická znázornění měření léčiv a naměřené hodnoty IC_{50} lze vidět na Obrázcích 27–31.



Obrázek 27. Esej s krystalovou violetí u ibuprofenu.

Průměrná hodnota IC_{50} získaná ze tří měření – 1,6 mM.

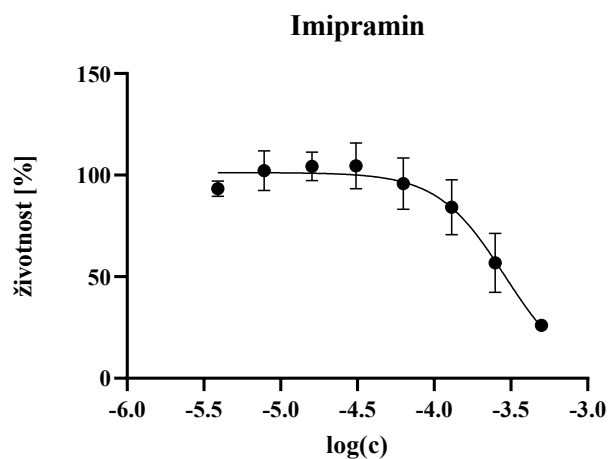
Směrodatná odchylka – 0,56. SEM – 0,33.



Obrázek 28. Esej s krystalovou violetí u takrinu.

Průměrná hodnota IC_{50} získaná ze tří měření – 680 μ M.

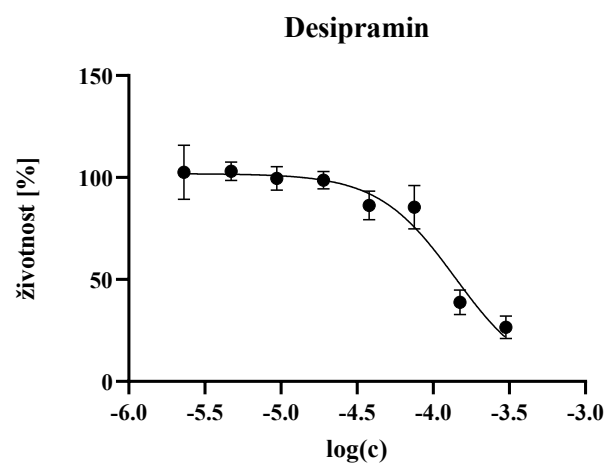
Směrodatná odchylka – 200. SEM – 110.



Obrázek 29. Esej s krystalovou violetí u imipraminu.

Průměrná hodnota IC_{50} získaná ze tří měření – 270 μM .

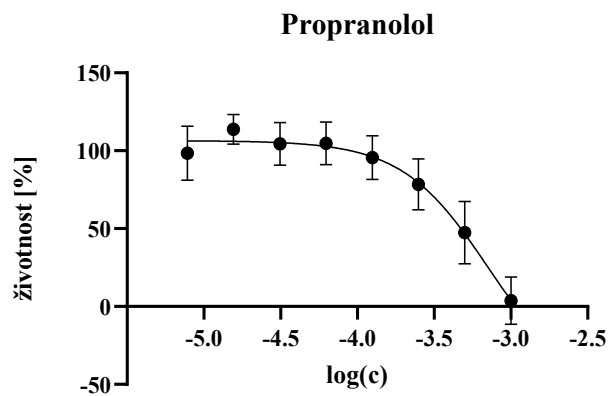
Směrodatná odchylka – 44. SEM – 26.



Obrázek 30. Esej s krystalovou violetí u desipraminu.

Průměrná hodnota IC_{50} získaná ze tří měření – 110 μM .

Směrodatná odchylka – 27. SEM – 15.



Obrázek 31. Esej s krystalovou violetí u propranololu.

Průměrná hodnota IC_{50} získaná ze tří měření – 330 μM .

Směrodatná odchylka – 91. SEM – 52.

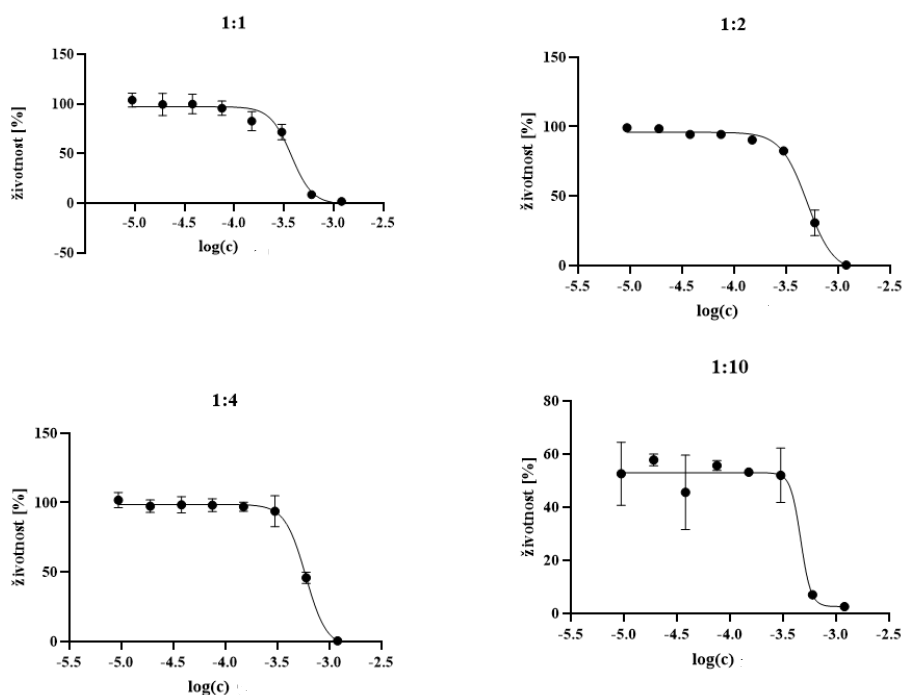
6.5. ATP esej

K získání dat u ATP esej byly použity koncentrace: ibuprofen 10 mM; takrin 1,2 mM; imipramin 500 μ M; desipramin 500 μ M; cimetidin 40 mM a propranolol 1 mM. Pro zajištění přesnějšího signálu byla používána luminiscenční (bílá) destička. Nasazováno bylo 15 000 buněk/ jamku a použita byla pouze negativní kontrola. Zároveň byly testovány různé poměry činidla v mediu – 1:1, 1:2, 1:4 a 1:10, nakonec k získání hodnot IC_{50} byl použit poměr 1:4. Grafická znázornění při volbě koncentrace činidla lze vidět na Obrázku 32. Grafická znázornění měření léčiv a naměřené hodnoty IC_{50} lze vidět na Obrázcích 33–37.

6.5.1. Testování vhodného poměru ATP činidlo : médium

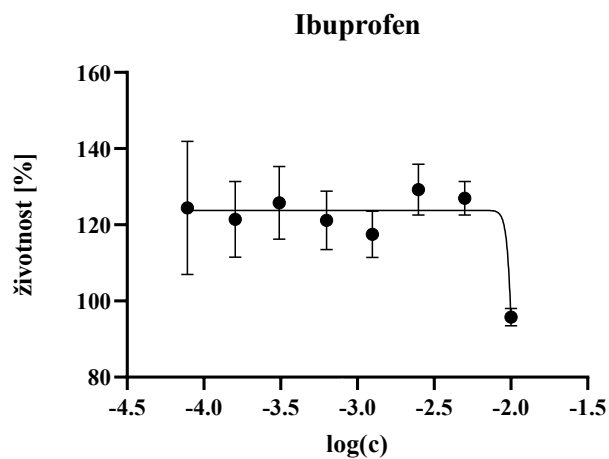
Dle dostupných protokolů, se činidlo obvykle ředí v poměru 1:1. Vzhledem k vysoké ceně, bylo testováno, zda dalším ředěním činidla lze získat dostatečně přesné výsledky. Ředění 1:2 a 1:4 ještě poskytují přesná měření. Vyšší ředění již není doporučováno kvůli riziku vysoké odchylky (Obr. 32).

Pro získání optimálního poměru bylo činidlo ředěno médiem v dříve zmíněných poměrech dle návodu uvedeného v Příloze 6. Vše bylo měřeno při použití takrinu o koncentraci 1,2 mM.



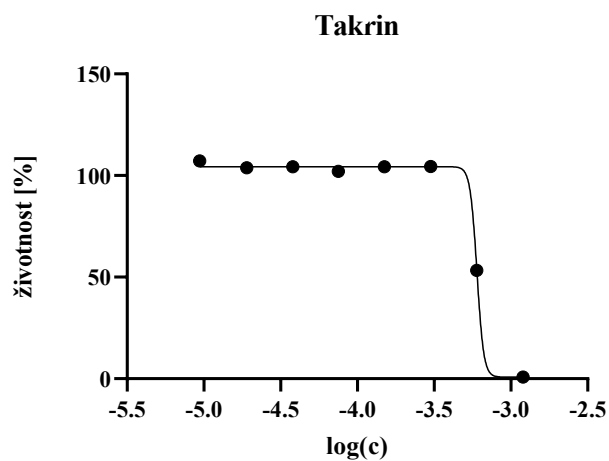
Obrázek 32. Měření IC_{50} ATP esejí o různé koncentraci činidla.

6.5.2. Výsledky měření ATP eseje



Obrázek 33. ATP esej u ibuprofenu.

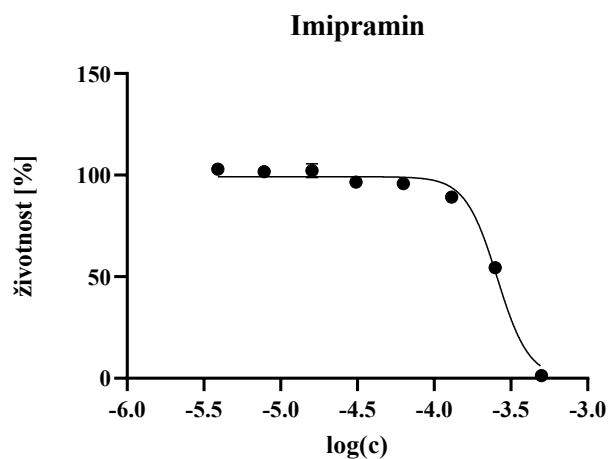
Hodnoty IC_{50} nebylo možné získat kvůli podezření na interferenci léčiva s metodou (viz dále)



Obrázek 34. ATP esej u takrinu.

Průměrná hodnota IC_{50} získaná ze tří měření – 570 μM .

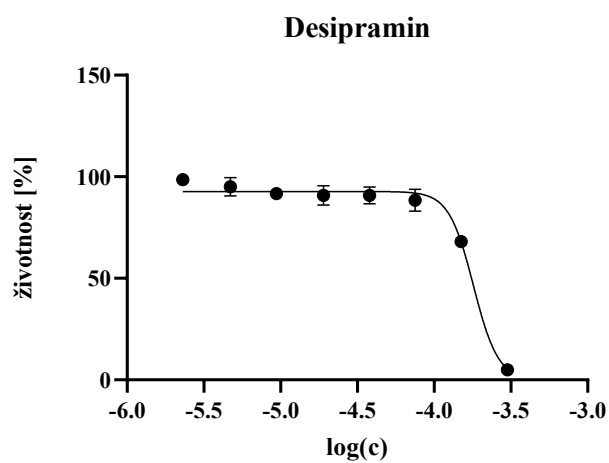
Směrodatná odchylka – 48. SEM – 28.



Obrázek 35. ATP esej u imipraminu.

Průměrná hodnota IC_{50} získaná ze tří měření – 230 μM .

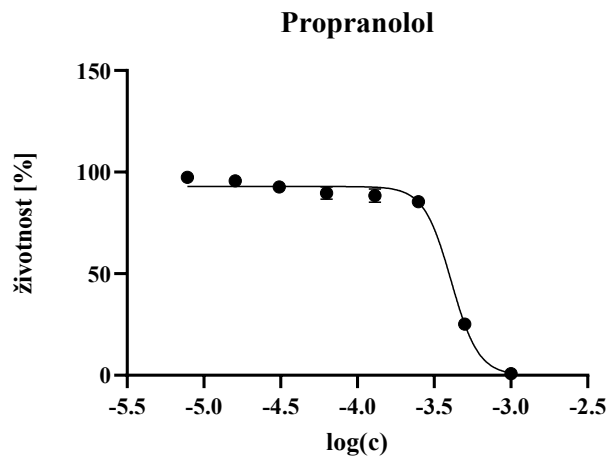
Směrodatná odchylka – 20. SEM – 12.



Obrázek 36. ATP esej u desipraminu.

Průměrná hodnota IC_{50} získaná ze tří měření – 150 μM .

Směrodatná odchylka – 67. SEM – 39.



Obrázek 37. ATP esej u propranololu.

Průměrná hodnota IC_{50} získaná ze tří měření – 370 μM .

Směrodatná odchylka – 37. SEM – 22.

6.6. Souhrnná data všech měření

Pro shrnutí lze v Tabulce 2 nalézt hodnoty IC_{50} společně se směrodatnou odchylkou – vše zaokrouhleno na dvě platné číslice.

Léčiva	MTT	PI	Calcein-AM	Krystalová violet'	ATP esej
Ibuprofen	$IC_{50} = 1,50$ mM	$IC_{50} =$ 2,70 mM	$IC_{50} = 3,3$ mM	$IC_{50} = 1,6$ mM	x
	SD = 0,28	SD = 0,13	SD = 0,61	SD = 0,57	x
Takrin	$IC_{50} = 220$ μ M	$IC_{50} = 4,4$ mM	$IC_{50} = 450$ μ M	$IC_{50} = 680$ μ M	$IC_{50} = 570$ μ M
	SD = 28	SD = 0,47	SD = 170	SD = 200	SD = 48
Imipamin	$IC_{50} = 140$ μ M	$IC_{50} = 140$ μ M	$IC_{50} = 320$ μ M	$IC_{50} = 270$ μ M	$IC_{50} = 230$ μ M
	SD = 14	SD = 18	SD = 110	SD = 44	SD = 20
Desipramin	$IC_{50} = 75$ μ M	$IC_{50} = 59$ μ M	$IC_{50} = 150$ μ M	$IC_{50} = 110$ μ M	$IC_{50} = 150$ μ M
	SD = 11	SD = 18	SD = 40	SD = 27	SD = 67
Propranolol	$IC_{50} = 220$ μ M	$IC_{50} = 370$ μ M	$IC_{50} = 360$ μ M	$IC_{50} = 330$ μ M	$IC_{50} = 370$ μ M
	SD = 68	SD = 31	SD = 170	SD = 91	SD = 37
Cimetidin	x	x	x	x	x

Tabulka 2. Přehled hodnot nasazovaných koncentrací, naměřených průměrných hodnot IC_{50} a směrodatných odchylek.

7. DISKUZE

Jak již bylo zmíněno, existuje veliké množství způsobů měření buněčné viability a cytotoxicity. Každá z nich má určité výhody ale i úskalí, co se týče jejího použití v praxi, které byly již zmíněny v teoretickém úvodu. Na základě informací o jednotlivých metodách a výsledcích z měření, lze hovořit o vhodnosti použití jednotlivých metod.

Propidium jodid jako samostatná esej není postačující k získání konzistentních výsledků. Z mechanismu působení vyplývá, že signál vzniká pouze u usmrčených buněk s porušenou permeabilitou buněčné membrány, přičemž k buněčné smrti doprovázené narušením celistvosti plazmatické membrány nemusí nutně docházet u všech použitých léčiv. K porušení membrány nedochází např. ani při apoptóze ⁽²²⁾. Tento jev je také důvodem, proč byly při měření aplikované koncentrace léčiv mnohonásobně vyšší v porovnání s ostatními metodami – aplikací vyšší koncentrace léčiva bylo zřejmě dosaženo většího strukturálního poškození buňky, které umožnilo průnik PI do intracelulárního prostředí. Důsledkem toho jsou i ve většině případů naměřené vyšší koncentrace IC_{50} . Jako pozitivní kontrola u cytotoxicitních studií bývá často používán detergent Triton-X (o 1% koncentraci), který buňky usmrcuje již při použití velmi malých koncentrací. Zároveň ale také výrazně narušuje buněčnou membránu a její permeabilitu, což by vedlo k výrazně vyššímu signálu v porovnání s použitými léčivy. Jako pozitivní kontrola byl tedy použit takrin o nejvyšší používané koncentraci (20 mM). I tak lze ale pozorovat poměrně variabilní fluorescenční odezvu u různých látek při plně cytotoxickém efektu (např. takrin cca 40 000 RFU, propranolol <10 000 RFU). Z toho důvodu nebyla pozitivní kontrola využita k normalizaci výsledků, tak jako v případě ostatních metod. Právě u takrinu byla opakovaně naměřena hodnota IC_{50} o více než 1 řád vyšší než u ostatních metod, pro což nemáme relativní vysvětlení. Nepřesnost získaných výsledků u PI lze také odůvodnit chybou vnášenou při pipetování. Při odstraňování média před aplikací PI může dojít k odsátí DNA a poškozených buněk, což také může vést k falešně negativním výsledkům, avšak vzhledem k výsledkům u jiných léčiv, nelze předpokládat, že se tyto chyby projeví pouze u takrinu a u jiných léčiv ne.

Pro přesné získávání hodnot IC_{50} není příliš vhodná ani krystalová violet'. Ačkoliv v naší práci hodnoty příliš nevybočovali ze sledovaných trendů, obecně hodnoty mohou být ovlivněny několika kroky proplachování pro odstranění odumřelých buněk a vymytí přebytečného barviva, což lze jasně sledovat i na poměrně vysokých hodnotách SD v Tabulce 2. Proplach zde slouží pro odstranění mrtvé populace buněk, která již není přilepena na dno destičky. Vzhledem k tomu, že k proplachům je ale používána destilovaná voda, která vytváří hypotonické

prostředí, může dojít k poškození a usmrcení doposud živých buněk a zkreslení výsledků. O krystalové violeti lze tedy říct, že se jedná spíše o metodu orientační, stejně jako v případě PI vhodnou spíše pro vizualizační potřeby a není doporučeno ji používat jako výchozí způsob zjišťování hodnot IC_{50} .

MTT esej je v porovnání se zmíněnými mnohem vhodnější metodou pro získávání hodnot IC_{50} . Jedná se o relativně selektivní a citlivou metodu, práce s ní je jednoduchá a výsledky z ní jsou dobře reprodukovatelné. Lze si povšimnout, že získané hodnoty IC_{50} jsou vesměs nejnižší ze všech aplikovaných metod a nejvíce se přibližují hodnotám z literatury (viz Tabulka 3). Navíc je možné ji aplikovat i při HTS nových molekul. Určitou nevýhodou je ale poměrně dlouhá inkubační doba barviva (kolem tří hodin) a nutnost následně rozpouštět vzniklé formazanové krystaly, což již neplatí u novějších forem tohoto činidla jako WST-1⁽⁴⁵⁾. Dále je nutné myslet na možné interference, a to hlavně s redukčními sloučeninami, které vedou k vyšší metabolizaci na formazan, a tak k falešně zvýšenému signálu absorbance a k získání falešných výsledků.

Z hlediska citlivosti k buněčné smrti se jako velmi vhodná metoda jeví i Calcein-AM. Na druhou stranu jeho použití je velice citlivé na podmínky při práci s buněčnou kulturou (např. odsávání starého media nebo promývací kroky), a proto i sebemenší změny v okolním prostředí vedou k velkým výkyvům v měření. Navíc jsme pozorovali, že někdy dochází k nedostatečnému uchycení buněk na dno destičky a odsátí živých buněk druhý den před aplikací léčiva. Vzhledem k tomuto problému, byla metoda adaptována – byl odstraněn krok odsávání média druhý den před aplikací léčiv, který vedl k ustálení výsledků. Určitá chyba však obráceně mohla být do měření vnesena tím, že nedošlo k dostatečnému promytí před aplikací barviva, které může být aktivováno i esterázami obsaženými v živném médiu pro buňky, a tak nižším průniku činidla do buněk. Tento negativní vliv by však měl být odstraněn použitím negativní kontroly a jeho odečtením při zpracování naměřených dat. Navíc dle dostupné literatury, Calcein-AM není vhodnou metodou pro použití u adherentních buněčných linií, kde vrstvení buněk na dně jamky může vést k horšímu průniku calceinu-AM do spodních vrstev, což vede ke vzniku nižšího signálu, a tak i pozorované nižší životnosti buněk než ve skutečnosti⁽³⁸⁾.

Poslední použitou metodou byla ATP esej, u které jsme očekávali vysokou citlivost, přesnost a minimální interference v celého rámci experimentu. Zatímco vysokou přesnost lze názorně potvrdit relativně malými chybovými úsečkami (Obr. 33-36), citlivost úplně potvrdit nelze neboť získané hodnoty IC_{50} byly cca 2x vyšší než u nejcitlivější metody, tedy MTT.

Interference technického charakteru skutečně nebyla pozorována. ATP esej je relativně drahá a pro ušetření nákladů na měření byly testovány různé koncentrace činidla. Měřením bylo zjištěno, že použití poměru ATP činidlo : medium v poměru 1:4 je dostatečné pro získání přesných výsledků, a proto tato koncentrace byla i nadále používána. Metoda je velmi selektivní (díky měření hladin ATP, které velmi dobře korelují s živostí buněk) ⁽⁵⁴⁾ a citlivá, proto je vhodná pro zjišťování buněčné viability. Její použití je možné i v HTS systémech. Určitou nepříjemností při používání metody je práce v zatemněném prostředí kvůli využití luminiscenční destičky. Při delším přetrvání destičky na světle, došlo k jejímu „nasvícení“, a přístroj nebyl schopen takto vysokou luminiscenci změřit. Z tohoto důvodu bylo pro jistotu s destičkou od začátku pracováno za tmy, aby došlo k odstranění případných chyb, které by mohly být do měření vneseny. Během měření ATP metodou však nebylo možné získat validní data pro stanovení hodnoty IC₅₀ pro ibuprofen. Koncentrace ibuprofenu byly navyšovány do maxima 10 mM – další navyšování nebylo možné, kvůli špatné rozpustnosti léčiva v živném médiu buněk. Z literatury bylo zjištěno, že zástupci ze skupiny NSAIDs (ve studii konkrétně zmiňovaný ibuprofen a celecoxib) mohou obnovovat snížené hladiny ATP v buňkách, což by vysvětlovalo naměřený vysoký signál, velké odchylky a nemožnost získání hodnoty IC₅₀ ⁽⁶¹⁾. Jiným důvodem by teoreticky mohla být možná interference ibuprofenu s luciferázou, která byla dokonce i zmíněna ve Figure 1 v práci J. Dilla „A molecular mechanism for ibuprofen-mediated RhoA inhibition in neurons“. Ve zmínce je naznačeno, že ibuprofen může posilovat aktivitu luciferázy v závislosti na dávce v PC12 buňkách ⁽⁶²⁾.

Stručné shrnutí metod, jejich výhod a nevýhod lze sledovat v závěrečné Tabulce 5.

Na základě získaných hodnot IC₅₀ jednotlivými metodami lze srovnat naměřenou toxicitu léčiv s daty v literatuře v Tabulce 3.

Před vlastním zhodnocením je důležité podotknout, že počáteční výsledky (zejména pak u MTT eseje) nedosahují 100% životnosti buněk (což může mít vliv i na naměřené hodnoty IC₅₀). Tento fakt je dán nedostatečnou zkušeností s prací s buněčnými kulturami a nerovnoměrnému růstu negativní kontroly. V průběhu měření ale došlo ke zdokonalování techniky práce a v metodikách se tak ustálila i negativní kontrola, a tak výsledky i grafy již odpovídají předpokládaným výsledkům.

Léčiva	MTT	PI	Calcein-AM	Krystalová violet'	ATP	Literatura
Ibuprofen	1,50 mM	2,70 mM	3,30 mM	1,6 mM	x	0,52 mM ⁽⁶³⁾
Takrin	220 μM	4,4 mM	450 μM	680 μM	570 μM	250 μM (+/-11 μM) ⁽⁶⁴⁾
Imipramin	140 μM	140 μM	320 μM	270 μM	230 μM	54 μM ⁽⁶³⁾
Desipramin	75 μM	59 μM	150 μM	110 μM	150 μM	20 μM ⁽⁶⁵⁾
Propranolol	220 μM	370 μM	360 μM	330 μM	370 μM	120 μM ⁽⁶³⁾
Cimetidin	x	x	x	x	x	x

Tabulka 3. Přehled naměřených hodnot IC_{50} a hodnot dostupných v literatuře zaokrouhlených na 2 platné číslice.

Hodnoty IC_{50} takrinu a desipraminu z literatury byly získány za použití MTT eseje. U ibuprofenu, propranololu a imipraminu nejsou metody přesně definovány (hodnoty byly získány z registru, kde byly zveřejněny hodnoty získané pomocí následujících metod: MIT-24, MTT, MTS a XTTC; neutral red uptake, trypan blue, indikátory diference). Pokud naměřená data byla získána dle požadovaných kritérií registru, byla přijata a nelze již dohledat, kterou z metod byla hodnota získána.

Jako nejméně toxický se jeví cimetidin, u kterého i při koncentracích 20 a 40 mM nebylo možné získat výslednou hodnotu IC_{50} (vyšší koncentrace nebyly testovány kvůli velmi špatně rozpustnosti léčiva v médiu). Navíc dle některé dostupné literatury byla testována cytotoxicita cimetidinu na deseti různých buněčných liniích a na všech byl shledán jako netoxický při koncentracích do 20 mM ⁽⁶⁶⁾.

Jako nejméně toxické z měřitelných léčiv pak vychází ibuprofen (s průměrnou hodnotou IC_{50} ze všech metod 2,3 mM). Dále pak takrin (s průměrnou IC_{50} 1,3 mM); propranolol (s průměrnou IC_{50} 330 μM) a jako nejvíce toxická vyšla tricyklická antidepressiva imipramin (celková průměrná IC_{50} = 220 μM) a desipramin (celková průměrná IC_{50} = 110 μM).

Při porovnání naměřených hodnot a hodnot dostupných v literatuře lze říci, že nejvíce se přiblížily IC_{50} naměřené pomocí MTT eseje. Na druhou stranu je nutné podotknout, že hodnoty z literatury byly měřeny na odlišných buněčných liniích a v některých případech odlišnými metodami, a zřejmě byly využity i specifické metody pro rozlišení cytotoxického a cytostatického efektu, proto by porovnání mělo zůstat spíše orientační. Na základě dat

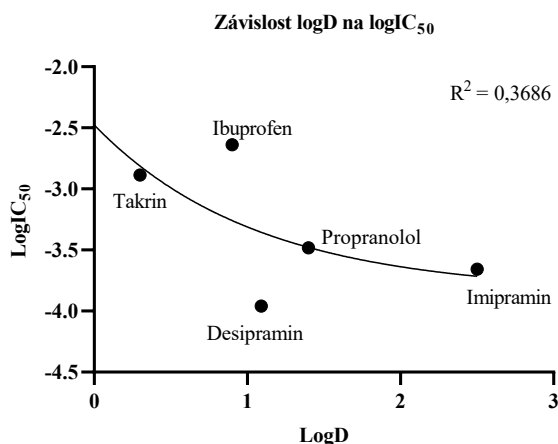
z literatury lze léčiva seřadit od nejnižší po nejvyšší cytotoxicitu seřadit následovně: cimetidin < ibuprofen < takrin < propranolol < imipramin < desipramin. Pořadí se tedy shoduje s provedenými měřeními.

Cytotoxicita léčiv může taky do jisté míry korelovat s jejich lipofilitou. V Tabulce 4 lze sledovat hodnoty logD při pH 7,4 u jednotlivých léčiv. Graf závislosti log D na IC₅₀, lze sledovat na Obrázku 38.

	Ibuprofen	THA	Imipramin	Desipramin	Propranolol	Cimetidin
LogD	0,90 ⁽⁶⁷⁾	0,30 ⁽⁶⁸⁾	2,50 ⁽⁶⁹⁾	1,1 ⁽⁷⁰⁾	1,4 ⁽⁷¹⁾	0,34 ⁽⁷⁰⁾
IC₅₀	2,3 mM	1,3 mM	220 μM	110 μM	330 μM	x

Tabulka 4. Přehled logD (pH 7,4) u léčiv a průměrných hodnot IC₅₀ získaných ze všech měření u léčiv.

Hodnoty logD byly hledány přes databázi SciFinder – vybrána byla vždy střední hodnota z nalezených dat.



Obrázek 38. Graf závislosti logD na logIC₅₀ získaných ze všech měření u léčiv různými metodami.

Na ose x (*logD*) sledujeme lipofilitu léčiv, a obecně lze očekávat, že čím vyšší je hodnota logD, tím je i vyšší toxicita léčiva. Na základě tohoto předpokladu by tak nejtoxičtější léčivem byl imipramin.

Na ose y (*logIC₅₀*) sledujeme log průměrných IC₅₀ získaných měřeními a platí, že čím je hodnota vyšší, tím je léčivo méně toxické. Na základě toho pak vychází jako nejtoxičtější molekula desipramin, demetylovaný derivát imipraminu.

Sice na první pohled lze do jisté míry vidět určitou korelaci mezi hodnotami $\log IC_{50}$ a $\log D$, ale při dalším zkoumání již lze sledovat, že se jedná pouze o hrubý odhad, který nemusí zcela odpovídat reálným měřením.

Z hodnot IC_{50} lze léčiva dle toxicity seřadit následovně: ibuprofen (*nejméně toxický*) < takrin < propranolol < imipramin < desipramin (*nejvíce toxický*).

Při srovnávání toxicity odvozené od $\log D$ je pořadí následovné: takrin (*nejméně toxický*) < ibuprofen < desipramin < propranolol < imipramin (*nejvíce toxický*).

Na základě zmíněných poznatků lze říci, že na toxicitě léčiv se kromě lipofility podílí i další vlivy – např. pK_a ⁽⁷²⁾.

Metoda	Mechanismus	Citlivost	Vyhody	Nevýhody	Náročnost
MTT	Měření metabolické aktivity	++	Jednoduchá Lze použít pro HTS	Poškozuje buňky 3h inkubační doba Interference	Levná Jednoduchá aplikace
PI	Vazba na DNA poškozených buněk	+	Rychlá (15 min inkubace)	Neprochází buněčnou membránou (nevhodné např. pro apoptózu)	Cenově dražší (x MTT) Nevhodná pro samostatné použití
Calcein-AM	Měření metabolické aktivity	++	Rychlá	Použití u adherentních linií – nepřesné Interference s médiem	Drahá Velmi citlivá na změny v prostředí
Kryystalová violeť	Barvení živých buněk přilepených na dno destičky	+	Jednoduchá Všestranná	Praena (proplachovací kroky) Necitlivá k metabolickým změnám	Levná Praena
ATP esej	Měření metabolické aktivity	+++	Rychlá aplikace (bez inkubace) Vhodná k HTS	Speciální pomůcky	Drahá Jednoduchá aplikace Práce ve tmě

Tabulka 5. Shrnutí základních informací použitých metod.

8. ZÁVĚR

Testování cytotoxicity je důležitým krokem ve vývoji nových potenciálních terapeutik. Jak již bylo mnohokrát zmíněno, existuje velké množství metod, které lze pro získání dat použít, a tak je pro měření důležité správně zvolit nejen metody, ale i buněčné kultury.

Na základě zkušenosti s některými metodami lze říct, že jako vhodný postup zjišťování hodnot IC_{50} , se jeví použití kombinace několika metod s různými mechanismy působení. Jako velmi výhodná základní metoda se jeví použití tetrazoliových solí (MTT), která by měla být doplněna v případě potřeby metodou neinterferující a mající jiný mechanismus stanovení buněčné viability (např. ATP esej), případně kombinace PI, která by sloužila jako indikátor celistvosti buněčné membrány, pro rozlišení cytostatického (MTT) a cytotoxického účinku (PI). Konečně, byla sledována korelace cytotoxicity a výše hodnoty $\log D$ při pH 7,4. Na základě pozorování naměřených hodnot IC_{50} a hodnot $\log D$ z literatury lze říci, že se jedná pouze o orientační způsob odhadování toxicity léčiva, který sice nějakou předběžnou míru cytotoxického působení predikuje, nicméně nelze jej využít absolutně s tím, a že na toxicitě léčiva se zřejmě podílí více faktorů než jen lipofilita.

9. LITERATURA

1. de Jesús Rodríguez-Gómez A, Frias-Vázquez S. La mitosis y su regulación. *Acta Pediatrca de Mexico*. 2014;35(1):55-62.
2. Alberts B, Bray D, Johnson A, et al. *Základy Buněčné Biologie - Úvod Do Molekulární Biologie Buňky*. 1st edition. Espero Publishing; 1998.
3. Spilková J. *Farmakognozie*. 1. dotisk 1. vydání. Nakladatelství Karolinum; 2016.
4. OpenStax College. Biology. Published May 13, 2013. Accessed February 16, 2021. <http://cnx.org/content/col11448/latest>
5. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, et al. *Molecular Cell Biology, 6th Edition*. 6th edition. (Ahr K, ed.). W.H. Freeman & Company; 2007.
6. Cell Signaling Technology, Anonymous. G1/S Checkpoint. Accessed March 15, 2021. <https://www.cellsignal.com/pathways/g1-s-checkpoint-pathway>
7. Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Developmental Cell*. 2008;14(2). doi:10.1016/j.devcel.2008.01.013
8. Willis N, Rhind N. Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. *Cell Division*. 2009;4. doi:10.1186/1747-1028-4-13
9. Cooper GM, Hausman RE. *The Cell: A Molecular Approach, Fourth Edition*. 4th Edition. ASM Press; Sinauer Associates, Inc.; 2007.
10. Cell Signaling Technology, Anonymous. G2/M DNA Damage Checkpoint. Accessed August 29, 2021. <https://www.cellsignal.com/pathways/g2m-dna-damage-checkpoint-pathway>
11. Zheng N, Shabek N. Ubiquitin ligases: Structure, function, and regulation. *Annual Review of Biochemistry*. 2017;86. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014922
12. Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2017;17(2). doi:10.1038/nrc.2016.138
13. Anonym, Maxdorf. Velký lékařský slovník. Published 2000. Accessed August 30, 2021. <http://www.lekarske.slovníky.cz/lexikon-pojem/bunecna-kultura>

14. Anonymous, Merck. Cell Types & Culture Characteristics. Accessed August 21, 2021. <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/cell-types-culture>
15. Gibco™ Education. Cell Culture Basics Handbook. Published online 2016. Accessed August 31, 2021. <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1563-PJT1267-COL31122-Gibco-Cell-Culture-Basics-Handbook-Global-FLR.pdf>
16. M. Carter; J. Shieh. *Chapter 13 Cell Culture Techniques.*; 2015.
17. Phelan K, May KM. Mammalian cell tissue culture techniques. *Current Protocols in Pharmacology*. 2016;2016. doi:10.1002/cpph.1
18. Anonymous, Merck. Poor Cell Growth Troubleshooting. Accessed August 31, 2021. <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/poor-cell-growth>
19. Straube T, Müller C. How to do a Proper Cell Culture Quick Check. Published online March 24, 2016. Accessed September 26, 2021. <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/how-to-do-a-proper-cell-culture-quick-check/>
20. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*. 2009;16(1). doi:10.1038/cdd.2008.150
21. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*. 2019;43(6). doi:10.1002/cbin.11137
22. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 2007;35(4). doi:10.1080/01926230701320337
23. Balvan J, Raudenská M, Masařík M. *Buněčná Smrt*. 1. vydání. (Zlatoš M, ed.). Grada Publishing a.s.; 2021.
24. Reed JC, Green DR. *Apoptosis: Physiology and Pathology.*; 2011. doi:10.1017/CBO9780511976094
25. Creative Diagnostics. Intrinsic Apoptosis Pathway. Accessed January 3, 2022. <https://www.creative-diagnostics.com/intrinsic-apoptosis-pathway.htm>

26. Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death and Differentiation*. 2003;10(1). doi:10.1038/sj.cdd.4401186
27. Tummers B, Green DR. Caspase-8: regulating life and death. *Immunological Reviews*. 2017;277(1). doi:10.1111/imr.12541
28. Creative Diagnostics. Extrinsic Apoptosis Pathway. Accessed January 3, 2022. <https://www.creative-diagnostics.com/extrinsic-apoptosis-pathway.htm>
29. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. 2003;114(2). doi:10.1016/S0092-8674(03)00521-X
30. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2014;20(3). doi:10.1089/ars.2013.5371
31. Bento CF, Renna M, Ghislat G, et al. Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annual Review of Biochemistry*. 2016;85. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014556
32. Escobar MaL, Echeverría OM, Vázquez-Nin GH. Necrosis as Programmed Cell Death. In: *Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis*. ; 2015. doi:10.5772/61483
33. Rawlings ND, Salvesen G. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Vol 1-3.; 2013. doi:10.1016/C2009-1-60990-4
34. Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T, Chiarugi P. Anoikis: An emerging hallmark in health and diseases. *Journal of Pathology*. 2012;226(2). doi:10.1002/path.3000
35. Molnár T, Mázló A, Tslaf V, Szöllősi AG, Emri G, Koncz G. Current translational potential and underlying molecular mechanisms of necroptosis. *Cell Death and Disease*. 2019;10(11). doi:10.1038/s41419-019-2094-z
36. Dhuriya YK, Sharma D. Necroptosis: A regulated inflammatory mode of cell death. *Journal of Neuroinflammation*. 2018;15(1). doi:10.1186/s12974-018-1235-0
37. Hamann JC, Surcel A, Chen R, et al. Entosis Is Induced by Glucose Starvation. *Cell Reports*. 2017;20(1). doi:10.1016/j.celrep.2017.06.037

38. Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2016;17(14). doi:10.2174/1389201017666160808160513
39. Aslantürk ÖS. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In: *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*. ; 2018. doi:10.5772/intechopen.71923
40. Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*. 2020;1(3). doi:10.1002/fft2.44
41. Riss. T, L Moravec RichardA, Niles AndrewL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. *Cell Viability Assays*.; 2004.
42. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1-2). doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
43. Bahuguna A, Khan I, Bajpai VK, Kang SC. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 2017;12(2). doi:10.3329/bjp.v12i2.30892
44. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*. 2018;120(3). doi:10.1016/j.acthis.2018.02.005
45. Berridge M v., Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*. 2005;11(SUPPL.). doi:10.1016/S1387-2656(05)11004-7
46. Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2016;2016(4). doi:10.1101/pdb.prot087379
47. Rosenberg M, Azevedo NF, Ivask A. Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. *Scientific Reports*. 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-42906-3

48. Anonymous, ThermoFisher Scientific. Propidium Iodide. Accessed January 24, 2022. <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/propidium-iodide.html>
49. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*. 2006;1(3). doi:10.1038/nprot.2006.238
50. Dengler WA, Schulte J, Berger DP, Mertelsmann R, Fiebig HH. Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. *Anti-Cancer Drugs*. 1995;6(4). doi:10.1097/00001813-199508000-00005
51. Neri S, Mariani E, Meneghetti A, Cattini L, Facchini A. Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: Standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2001;8(6). doi:10.1128/CDLI.8.6.1131-1135.2001
52. Bratosin D, Mitrofan L, Palii C, Estaquier J, Montreuil J. Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry Part A*. 2005;66(1). doi:10.1002/cyto.a.20152
53. Mitchell P. Calcein-AM for Determination of Cell Vitality. Published October 30, 2012. Accessed December 26, 2021. <https://www.nexcelom.com/calcein-am-for-determination-of-cell-vitality/>
54. Lomakina GY, Modestova YA, Ugarova NN. Bioluminescence assay for cell viability. *Biochemistry (Moscow)*. 2015;80(6). doi:10.1134/S0006297915060061
55. Corporation P. CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay. *Technical Manual*. Published online 2015.
56. Sumantran VN. Cellular chemosensitivity assays: An overview. *Methods in Molecular Biology*. 2011;731. doi:10.1007/978-1-61779-80-5_19
57. Rang, H.P. J.M. Ritter, R.J. Flower GH. Rang and Dales pharmacology Eighth edition. In: *Rang and Dales Pharmacology*. ; 2016.
58. Prof. MUDr. Švihovec JDrSc, a kolektiv. *Farmakologie*. 1. vydání. (prof. MUDr. Švihovec JDrSc, prof. MUDr. Bultas JCS, prof. RNDr. Anzenbacher PDrSc, et al., eds.). Grada Publishing a.s.; 2018.

59. LL Brunton, R Hilal-Dandan BK. Goodman & Gilman ' s The Pharmacological Basis of Therapeutics , 12e. In: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.* ; 2011.
60. Anonymous, Merck. Downloadable 96 Well Plate Template. Accessed January 19, 2022. <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-based-assays/96-well-plate-template>
61. de Souza CO, Kurauti MA, de Fatima Silva F, et al. Celecoxib and Ibuprofen Restore the ATP Content and the Gluconeogenesis Activity in the Liver of Walker-256 Tumor-Bearing Rats. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2015;36(4). doi:10.1159/000430326
62. Dill J, Patel AR, Yang XL, Bachoo R, Powell CM, Li S. A molecular mechanism for ibuprofen-mediated RhoA inhibition in neurons. *Journal of Neuroscience.* 2010;30(3). doi:10.1523/JNEUROSCI.5045-09.2010
63. National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). *Report of the International Workshop on In Vitro Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity.*; 2001. Accessed February 27, 2022. https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/finalrpt/finalall0801.pdf
64. Benek O, Soukup O, Pasdiorova M, et al. Design, Synthesis and in vitro Evaluation of Indolotacrine Analogues as Multitarget-Directed Ligands for the Treatment of Alzheimer's Disease. *ChemMedChem.* Published online 2016. doi:10.1002/cmdc.201500383
65. Ma J, Qiu Y, Yang L, et al. Desipramine induces apoptosis in rat glioma cells via endoplasmic reticulum stress-dependent CHOP pathway. *Journal of Neuro-Oncology.* 2011;101(1). doi:10.1007/s11060-010-0237-2
66. Lövborg H, Burman R, Gullbo J. Structure-activity relationship analysis of cytotoxic cyanoguanidines: Selection of CHS 828 as candidate drug. *BMC Research Notes.* 2009;2. doi:10.1186/1756-0500-2-114
67. Zhang K, Chen M, Scriba GKE, Abraham MH, Fahr A, Liu X. Linear free energy relationship analysis of retention factors in cerasome electrokinetic chromatography

- intended for predicting drug skin permeation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;100(8). doi:10.1002/jps.22549
68. Dagenais C, Avdeef A, Tsinman O, Dudley A, Beliveau R. P-glycoprotein deficient mouse in situ blood-brain barrier permeability and its prediction using an in combo PAMPA model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;38(2). doi:10.1016/j.ejps.2009.06.009
69. Gao X, Yu CH, Tam KY, Tsang SC. New magnetic nano-absorbent for the determination of n-octanol/water partition coefficients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005;38(2). doi:10.1016/j.jpba.2004.12.029
70. Alimuddin M, Grant D, Bulloch D, Lee N, Peacock M, Dahl R. Determination of log D via automated microfluidic liquid-liquid extraction. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008;51(16). doi:10.1021/jm8005228
71. Trevaskis NL, Nguyen G, Scanlon MJ, Porter CJH. Fatty acid binding proteins: Potential chaperones of cytosolic drug transport in the enterocyte? *Pharmaceutical Research*. 2011;28(9). doi:10.1007/s11095-011-0446-1
72. Toader D, Wang F, Gingipalli L, et al. Structure-Cytotoxicity Relationships of Analogues of N14-Desacetytubulysin H. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2016;59(23). doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01023

10. PŘÍLOHY

10.1. Příloha 1 – CHO buňky protokol

10.1.1. Rozmrazování buněk

1. Do malé kultivační láhve se připraví 8 ml živného média pro buňky. Do zkumavky se připraví 9 ml média.
2. CHO-K1 buňky se po vytažení z tekutého dusíku nechají pomalu rozmrazit ve vodní lázni.
3. Rozmražená buněčná suspenze se poté v laminárním boxu přenesse do připravené zkumavky s médiem a nechá se zcentrifugovat na 5 min, 3000 otáček při 25 °C.

Aby nedošlo k poškození buněk při zamrazování, je nutné do média přidat vyšší koncentrace DMSO, které je ale pro buňky toxické (v koncentracích nad 1 %). Z tohoto důvodu je nutné smísení s médiem a centrifugace, aby bylo nadbytečné DMSO odstraněno.

4. Po zcentrifugování je ze zkumavky opatrně odsáto a zlikvidováno médium (na dně je vidět mírné zakalení = zcentrifugované buňky).
5. Do zkumavky je na propláchnutí a získání buněk nyní použito médium z kultivační láhve. Zkumavka se nechá několikrát opláchnout a všechno médium s buňkami je přeneseno do kultivační láhve.
6. Buňky se nechají inkubovat při 37 °C.

Buňky je nutné každý den sledovat, zda se přichytí ke dnu láhve a začnou se množit. Po namnožení se přenesou do větších kultivačních lahví, ze kterých jsou pak odebírány k experimentální práci.

10.1.2. Počítání buněk

1. Pipetou se odsaje staré médium z kultivační láhve.
2. Po odstranění média se láhev propláchne cca 5 ml PbS.
3. Přidá se 1 ml trypsinu (poválí se po dně láhve) a nechá se inkubovat při 37 °C cca 5 minut.
4. Poté se přidá 5 ml média. Médium se splachuje po dně láhve, aby se do buněčné suspenze dostalo co nejvíce buněk.
5. Do 5ml mikrozkušavky se napipetuje 1,8 ml média a 0,2 ml buněčné suspenze (pipetou se vše promíchá).

6. Do Bürkerovy komůrky se napipetuje 10 μ l připravené buněčné suspenze (pipetuje se nahoru do horní spáry).
7. Pod mikroskopem se buňky spočítají ve všech 9 čtvercích.
8. Vzorový výpočet pro nasazování destiček:
 - a. Počet buněk ve čtvercích: 50 se vydělí počtem čtverců: 9

$$50 : 9 = 5,55 \times 10^5 \text{ buněk v 1ml (= } 0,555 \times 10^6 \text{ buněk v 1ml)}$$
 - b. požadovaný počet v 1 jamce: 8 000 (= 0,008 ml) se vynásobí počtem jamek: 96

$$0,008 \times 96 = 0,768 \times 10^6 \text{ buněk (= celkový počet buněk)}$$
 - c. Celkový počet buněk: $0,768 \times 10^6$ se vydělí počtem buněk spočítaným v 1. kroku a vynásobí se koeficientem 1,2 (rezerva při pipetování apod.)

$$0,768 \times 10^6 : 0,555 \times 10^6 = 1,384 \quad \times 1,2 = 1,66 \text{ ml buněčné suspenze}$$
 - d. Objem jamky: 100 μ l se vynásobí počtem jamek: 96 a koeficientem 1,2

$$100 \times 96 = 9\,600 \mu\text{l} = 9,6 \text{ ml} \quad \times 1,2 = 11,52 \text{ ml (=celkový objem)}$$
 - e. Od celkového objemu se odečte objem buněčné suspenze

$$11,52 - 1,66 = 9,86 \text{ ml média}$$
9. Dle výpočtu se v rezervoárech připraví výsledná buněčná suspenze, která je pak nanášena na destičku.

10.1.3. Pasážování

1. V původní kultivační láhvi se ponechá kolem 0,5–1 ml buněčné suspenze (zbytek se zlikviduje nebo odebere do další kultivační láhve dle potřeby).
2. Doplní se médiem na 10 ml.
3. Kultivační láhve se nechají inkubovat při 37 °C 5 % CO₂.

10.2. Příloha 2 – MTT esej protokol

Den první

První den se obvyklým způsobem nasadí destička – 96 jamková, 100 µl buněčné suspenze/ jamka, 8 000 buněk/ jamka. Buněčná suspenze se nasazuje do jedenácti sloupců, poslední dvanáctý slouží jako blank (obsahuje pouze živné médium). Nechá se inkubovat 24 hodin při 37 °C.

Den druhý

Druhý den se připraví roztoky testovaných látek o určité koncentraci. Před nasazením je vhodné odsát staré médium z destičky a poté přidat roztoky testovaných látek v médiu.

Testované látky se nasazují vždy v tripletech – na jednu destičku lze tedy nasadit tři léčiva, desátý a jedenáctý sloupec slouží jako negativní kontroly (přidává se pouze živné médium), dvanáctý sloupec jako blank.

Destičky se nechají inkubovat 24 hodin při teplotě 37 °C.

Den třetí

1. Po 24 hodinách se zkontroluje pod mikroskopem životnost kontroly (pro ověření, že měření proběhlo správně) a případně jamky odpovídající nulové životnosti.
2. Odsaje se veškeré médium z destičky.
3. Přidá se 100 µl roztoku MTT a nechá se inkubovat 3 hodiny při 37 °C.

K měření se používá 0,5% roztok MTT v PbS. Připraví se navážením 0,5 g Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT), které se nechá rozpustit ve 100 ml PbS. Po rozpuštění se roztok nechá přefiltrovat a alikvotuje se po 1 ml do mikroskopavek.

V laboratoři jsou předpřipravené 1ml alikvoty s roztokem MTT – na jednu destičku se smíchá 1 alikvota s 10 ml média.

4. Pracuje se již mimo sterilní prostředí. MTT se odsaje z destičky a přidá se 100 µl DMSO/ jamku a nechá se lehce zvortexovat asi 5-10 minut.
5. Měří se absorbance jako rozdíl dvou rozdílných vlnových délek při 570 a 650 nm.

10.3. Příloha 3 – Propidium jodid protokol

Den první

První den se obvyklým způsobem nasadí destička – 96 jamková, 100 μ l buněčné suspenze/ jamka, 8 000 buněk/ jamka. Buněčná suspenze se nasazuje do jedenácti sloupců, poslední dvanáctý slouží jako blank. Nechá se inkubovat 24 hodin při 37 °C.

Den druhý

Druhý den se připraví roztoky testovaných látek o určité koncentraci. Před nasazením je vhodné odsát staré médium z buněk a poté přidat roztoky testovaných látek v médiu.

Testované látky se nasazují vždy v tripletech – na jednu destičku lze nasadit tři léčiva, desátý a jedenáctý sloupec slouží jako pozitivní (přidává se médium s nejvyšší koncentrací THA) a negativní kontroly (přidává se pouze médium), dvanáctý sloupec jako blank

Do blanku bylo aplikováno je médium s nejvyšší aplikovanou koncentrací léčiva pro odstranění vlastní fluorescence molekul.

Destičky se nechají inkubovat 24 hodin při teplotě 37 °C.

Den třetí

Vhodné pracovat v neosvětlené místnosti a laminárním boxu (propidium jodid se může rozkládat na světle).

1. Po 24 hodinách se zkontroluje pod mikroskopem životnost kontroly (pro ověření, že měření proběhlo správně) a případně jamky odpovídající nulové životnosti.
2. Opatrně se odsaje veškeré médium z destičky. Destička se neproplachuje.
3. Přidá se 100 μ l roztoku PI a nechá se inkubovat 5–15 min při 37 °C.

Nasazujeme PI v koncentraci 2,5 μ M, což se připraví přidáním 19,251 μ l PI ze zásobní lahvičky (o koncentraci 1 mg/ml) do 11,5 ml PbS.

4. Na přístroji se měří fluorescence při excitační vlnové délce 535 nm a emisní vlnové délce 620 nm.

10.4. Příloha 4 – Calcein-AM protokol

Den první

První den se obvyklým způsobem nasadí destička – 96 jamková, 100 μ l buněčné suspenze/ jamka, 10 000 buněk/ jamka. Buněčná suspenze se nasazuje do jedenácti sloupců, poslední dvanáctý slouží jako blank. Nechá se inkubovat 24 hodin při 37 °C.

Den druhý

Druhý den se připraví roztoky testovaných látek o určité koncentraci. Před nasazením je vhodné odsát médium z buněk a poté přidat roztok léčiva v médiu, ale vzhledem k tomu, že Calcein-AM je velice citlivá metoda, která reaguje bouřlivě na jakékoliv změny při práci, tak kvůli vyšší přesnosti výsledků se 100 μ l roztoku testované látky v médiu přidávalo ke starému médiu (tzn. v jamce po druhém dni bylo 200 μ l).

Léčiva se nasazují vždy v tripletech – na jednu destičku lze nasadit tři léčiva, desátý a jedenáctý sloupec slouží jako negativní kontroly (přidává se pouze médium), dvanáctý sloupec jako blank.

Do blanku bylo aplikováno je médium s nejvyšší aplikovanou koncentrací léčiva pro odstranění vlastní fluorescence molekul.

Destičky se nechají inkubovat 24 hodin při teplotě 37 °C.

Den třetí

Vhodné pracovat v neosvětlené místnosti a laminárním boxu (Calcein-AM se může rozkládat na světle).

1. Po 24 hodinách se zkontroluje pod mikroskopem životnost kontroly (pro ověření, že měření proběhlo správně) a případně jamky odpovídající nulové životnosti.
2. Odsaje se veškeré médium z destičky.
3. Destičky se nechají propláchnout 100 μ l mírně zahřátého PbS.

PbS je vhodné před aplikací mírně zahřát ve vodní lázni, aby nedošlo k nežádoucímu poškození buněk.

4. Přidá se 90-100 μ l 1mM roztoku Calcein-AM a nechá se inkubovat 30 minut při 37 °C.
Ze zásobní lahvičky se odpipetuje 5,5 μ l do 11 ml PbS na 1 destičku.
5. Na přístroji se měří fluorescence při excitační vlnové délce 485 nm a emisní vlnové délce 530 nm.

10.5. Příloha 5 – Krystalová violet' protokol

Den první

První den se obvyklým způsobem nasadí destička – 96 jamková, 100 µl buněčné suspenze/ jamka, 8 000 buněk/ jamka. Buněčná suspenze se nasazuje do jedenácti sloupců, poslední dvanáctý slouží jako blank. Nechá se inkubovat 24 hodin při 37 °C.

Den druhý

Druhý den se připraví roztoky testovaných látek o určité koncentraci. Před nasazením je vhodné odsát staré médium z buněk a poté přidat roztoky testovaných látek v médiu.

Léčiva se nasazují vždy v tripletech – na jednu destičku lze nasadit tři léčiva, desátý a jedenáctý sloupec slouží jako negativní kontroly (přidává se pouze médium), dvanáctý sloupec jako blank (samotné médium). Destičky se nechají inkubovat 24 hodin při teplotě 37 °C.

Den třetí

Práce s destičkou probíhá již mimo sterilní prostředí laminárního boxu.

1. Po 24 hodinách se zkontroluje pod mikroskopem životnost (pro ověření, že měření proběhlo správně) a případně jamky odpovídající nulové životnosti.
2. Odsaje se veškeré médium z destičky.
3. Destička se dvakrát promyje 100 µl destilované vody. Po promytí se destička obrátí dnem vzhůru na filtrační papír nebo buničinu, aby z ní vytekla přebytečná tekutina.

Voda je multikanálovou pipetou opatrně aplikována do jamek a hned odsáta, aby nedošlo k usmrcení buněk. Promývání zvyšuje senzitivitu měření.

4. Přidá se 50 µl 0,5% roztoku krystalové violeti do každé jamky a nechá se inkubovat 20 min za pokojové teploty na vortexu (cca 20 oscilací/min).

Naředí se 1% zásobní roztok krystalové violeti destilovanou vodou v poměru 1:1. Na jednu destičku to vychází 2 880 µl zásobního roztoku krystalové violeti a stejné množství destilované vody.

5. Destička je poté čtyřikrát propláchnuta destilovanou vodou (je nutné odplavit přebytečné barvivo, které by jinak zvyšovalo signál). Nechá se vyschnout bez víčka za pokojové teploty alespoň 1–2 hodiny.
6. Přidá se 200 µl methanolu/ jamku, nechá se inkubovat 20 min s víčkem v pokojové teplotě na vortexu (cca 20 oscilací/min).
7. Měří se absorbance při vlnové délce 570 nm.

10.6. Příloha 6 - CellTiter Glo® Assay (ATP esej) protokol

Vhodné pracovat v neosvětlené místnosti a laminárním boxu již od prvního dne (luminiscenční destička se jinak může nasvítit a vydávat vlastní signál, který přístroj pak není schopný změřit).

Den první

První den se obvyklým způsobem nasadí luminiscenční destička – 96 jamková, 100 µl buněčné suspenze/ jamka, 15 000 buněk/ jamka. Buněčná suspenze se nasazuje do jedenácti sloupců, poslední dvanáctý slouží jako blank. Nechá se inkubovat 24 hodin při 37 °C.

Den druhý

Druhý den se připraví roztoky testovaných látek o určité koncentraci. Před nasazením se odsaje staré médium z buněk a přidá se roztok léčiva v médiu.

Léčiva se nasazují vždy v tripletech – na jednu destičku lze nasadit tři léčiva, desátý a jedenáctý sloupec slouží jako negativní kontroly (přidává se pouze médium), dvanáctý sloupec jako blank (samotné médium).

Destičky se nechají inkubovat 24 hodin při teplotě 37 °C.

Z mrazáku se vyndá lyofilizované činidlo a pufr, které se za tmy nechají rozmrazit při pokojové teplotě.

Den třetí

1. Po 24 hodinách se zkontroluje pod mikroskopem životnost kontroly (pro ověření, že měření proběhlo správně) a případně jamky odpovídající nulové životnosti.
2. Ke 100 µl média s léčivem z předešlého dne se rovnou se přidává 100 µl činidla – žádné médium se neodstraňuje.
3. Příprava ATP činidla:

ATP činidlo se připraví přidáním 10 ml pufru do lahvičky s lyofilizátem. Při pipetování je nutná opatrnost – pufr hodně pění, tak aby bylo zamezeno zbytečným ztrátám.

Testovány byly různé koncentrace ATP činidla – 1:1, 1:2, 1:4 a 1:10. Nakonec bylo zjištěno, že naředění na 1/4 je dostačující pro získání spolehlivých výsledků.

Množství činidla na jednu destičku:

- *1:1 – do destičky se přidá 100 μ l činidla/ jamka*
 - *1:2 – 4 800 μ l činidla se smísí s 4 800 μ l média, přidá se 100 μ l směsi/ jamka*
 - *1:4 – 2 400 μ l činidla se smísí se 7 200 μ l média, přidá se 100 μ l směsi/ jamka*
 - *1:10 – 480 μ l činidla se smísí s 9 120 μ l média, přidá se 100 μ l směsi/ jamka*
4. Přidá se 100 μ l roztoku ATP činidla a nechá se asi 2 minuty mírně promíchat na vortexu a poté se nechá asi 10 minut stát ve tmě pro stabilizaci signálu.
 5. Na přístroji se měří luminiscence v rozmezí vlnových délek 445–665 nm.