

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Testovanie cytotoxicity na 2D a 3D modeli ľudských pečňových buniek

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Jana Ramos Mandíková, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Simona Hvolková

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného či rovnakého titulu.

.....

Simona Hvolková

PodĎakovanie patrí PharmDr. Jane Ramos Mandíkovej za jej odborné vedenie, ochotu pomôcť a cenné rady, ktoré mi poskytovala pri vypracovávaní diplomovej práce.

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študentka: Simona Hvolková

Školiteľ: PharmDr. Jana Ramos Mandíková, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Testovanie cytotoxicity na 2D a 3D modeli ľudských pečeňových buniek.

Neodmysliteľnou súčasťou vývoja liečiv sú *in vitro* testy, pomocou ktorých môžeme predpovedať toxicitu liečiv. Dnes väčšina testov využíva pre rast buniek jednoduchú 2D štruktúru, no do popredia sa čoraz viac dostáva 3D štruktúra pripomínajúca podmienky *in vivo*. Cieľom práce bolo stanovenie cytotoxicity *in vitro* vybraných xenobiotík s pomocou 2D a 3D bunkového modelu. Predmetom skúmania boli látky zo skupiny antimykotík (amfotericín B, ketokonazol), NSAIDs (diklofenak, ibuprofen), antipyretík (paracetamol, fenacetín), ďalej látky azid sodný, tamoxifén, para-aminosalicylová kyselina, methanol a ethanol. Pre zistenie cytotoxicity bola použitá štandardná kolorimetrická metóda (CellTiter 96[®]) založená na redukčnom stanovovaní metabolicky aktívnych buniek. Na testovanie látok bola vybraná štandardná línia ľudských pečeňových buniek HepG2. Boli kultivované v monovrstve alebo 3D forme pomocou technológie Alvetex[®] Scaffold využívajúca vysoko porézny zosieťovaný polystyrén. Pre posúdenie toxicity testovaných látok bol zvolený parameter inhibičnej koncentrácie IC₅₀ umožňujúci porovnanie cytotoxicity látky v rámci 2D a 3D kultúry a látok medzi sebou. Zo zistených hodnôt IC₅₀ vyplýva, že bunky kultivované v 3D prostredí, ktoré viac napodobňuje *in vivo* podmienky, boli bunky odolnejšie voči vyšším koncentráciám testovanej látky ako v 2D prostredí. Najvyššiu cytotoxicitu na 2D a 3D modeli HepG2 buniek vykazoval amfotericín B, pričom najnižšiu cytotoxicitu vykazoval fenacetín. Cytotoxický účinok fenacetínu bol pomerne nízky, a tak presnú hodnotu IC₅₀ sa nám nepodarilo určiť a pravdepodobne leží mimo rozhrania testovaných koncentrácií. Pomocou CellTiter 96[®] sa nám podarilo získať IC₅₀ pre takmer všetky testované látky, čo nám umožnilo porovnať cytotoxicitu látky medzi 2D a 3D modelmi HepG2 buniek. Na základe údajov zistených *in vitro* môžeme zhrnúť, že 3D model predstavuje vhodnejší nástroj na predikciu toxicity indukovanú liekmi.

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Simona Hvolková

Supervisor: PharmDr. Jana Ramos Mandíková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Cytotoxicity testing on 2D and 3D model of human liver cells.

An inherent part of drug development are *in vitro* assays, which might be helpful in prediction of drug toxicity. Nowadays, the majority of assays use simple 2D structures for cell growth, but 3D structures with similar conditions to *in vivo* are becoming more popular. The goal of the study was to assess the cytotoxicity of selected xenobiotics *in vitro* by both 2D and 3D cell models. The research subjects were drugs from the group of antimycotics (amphotericin B, ketoconazole), NSAIDs (diclofenac, ibuprofen), antipyretics (paracetamol, fenacetine), sodium azide, tamoxifen, para-aminosalicylic acid, methanol and ethanol. For determination of cytotoxicity, the standard colorimetric method (CellTiter 96[®]) based on reductive assessment of metabolic active cells was used. For drug testing it was used human standard line of liver cells HepG2. The cells were cultivated in monolayer or in 3D form with the Alvetex[®] Scaffold technology using high porous networked polystyrene. The parameter of inhibition concentration IC₅₀ was chosen for toxicity assessment of tested drugs and it enabled the comparison of drugs cytotoxicity based on 2D and 3D cultures and between each other. Measured values of IC₅₀ show that cells cultivated in 3D conditions, which are more similar to *in vivo* conditions, were more resistant against higher concentrations of tested drugs compared to 2D conditions. Amphotericin B showed the highest cytotoxicity in both 2D and 3D model HepG2 cells and phenacetine showed the lowest cytotoxicity in the same conditions. The cytotoxicity effect of phenacetine was relatively low, and therefore, the certain value of IC₅₀ was not possible to determine, and it was likely occurring out the interface of tested concentrations. With CellTiter 96[®] assay it was possible to gain IC₅₀ for almost all tested drugs and it enabled us to compare cytotoxicity of substances in 2D and 3D models of HepG2 cells. As a conclusion of the findings of *in vitro* assays the 3D model represents more suitable tool for prediction of drugs induced toxicity.

Obsah

1 Zoznam skratiek.....	8
2 Úvod.....	9
3 Teoretická časť.....	10
3.1 Toxicita a hepatotoxicita liečiv	10
3.2 Testovanie cytotoxicity <i>in vitro</i>	11
3.3 Použitá bunková línia.....	13
3.4 Použité bunkové modely	13
3.4.1 2D bunkový model	14
3.4.2 3D bunkový model.....	14
3.5 Metóda na hodnotenie cytotoxicity <i>in vitro</i>	17
3.6 Testované látky	19
3.6.1 Nesteroidné antiflogistiká (NSAIDs)	19
3.6.2 Antipyretiká.....	21
3.6.3 Antimykotiká.....	22
3.6.4 Antiestrogény	24
3.6.5 Antituberkulotiká.....	24
3.6.6 Methanol a Ethanol.....	25
4 Ciele práce	26
5 Experimentálna časť	27
5.1 Použitý materiál	27
5.1.1 Prístroje a pomôcky	27
5.1.2 Chemikálie.....	28
5.1.3 Bunkový model	28
5.1.4 Testované látky.....	28
5.2 Metódy	29
5.2.1 Príprava fosfátového pufru	29

5.2.2 Bunková kultivácia	30
5.2.3 Zistenie optimálnej koncentrácie dimethylsulfoxidu	31
5.2.4 Linearita bunkovej odpovede	32
5.2.5 Príprava roztokov testovaných látok	32
5.2.6 Príprava doštičky pre 3D experimenty	34
5.2.7 Inkubácia buniek s testovanými látkami a vykonanie testu CellTiter 96®	35
5.2.8 Vyhodnotenie experimentálnych hodnôt.....	35
6 Výsledky	36
6.1 Optimalizácia koncentrácie DMSO	36
6.2 Stanovenie linearity bunkovej odpovede	38
6.3 Stanovenie cytotoxicity pomocou CellTiter 96®	42
7 Diskusia	55
8 Záver	60
9 Použitá literatúra	61

1 Zoznam skratiek

2D	Dvojmerná štruktúra
3D	Trojmerná štruktúra
CellTiter 96 [®]	CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay
DILI	Liekovo navodená hepatotoxicita (Drug-induced liver injury)
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extracelulárny matrix
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
GSH	Glutathion
HepG2	Bunková línia ľudských pečňových buniek
IC ₅₀	Koncentrácia vyjadrujúca redukciu viability buniek na 50 %
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NAD ⁺	Nikotínamidadenínindinukleotid – oxidovaná forma
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid – redukovaná forma
NAPQI	N-acetyl-p-benzochinoniminu
NSAID	Nesteroidné protizápalové lieky
PAS	Kyselina p-aminosalicylová
PBS	Fosfátový pufor
PES	Phenazin ethylsulfát
P450	Cytochróm P450
SD	Smerodajná odchýlka

2 Úvod

Každodenné objavovanie nových chemických látok s farmakologickým potenciálom predstavuje výzvu na vývoj nových metód k štúdiu toxicity liečiv. Cieľom je predpovedať, zistiť a predísť neočakávanej a oneskorenej liekovej toxicite pred pokusmi na zvieratách a predovšetkým pred expozíciou ľuďmi. Testy na toxicitu sú neoddeliteľnou súčasťou vývoja liekov (*Costa et al. 2014*). Pred samotným testovaním je dôležité si určiť vhodný sledovaný parameter a vybrať vhodný experimentálny model.

In vitro modely znamenajú užitočný nástroj na stanovenie toxicity liečiva. Predstavujú niekoľko výhod, ktoré sú zvýraznené ich schopnosťou pripomínať podmienky podobné *in vivo*. Bolo však vyvinuté úsilie o dosiahnutie nových a citlivejších modelov. Ukázalo sa, že 3D model poskytuje medzibunkové interakcie, ktoré chýbajú v bežne používaných 2D kultúrach, a ktoré ovplyvňujú organizáciu a architektúru buniek ako aj penetráciu liečiva, mnohobunkovú rezistenciu, terapeutickú odpoveď alebo hypoxiu (*Celli et al. 2014*).

Táto diplomová práca je zameraná na testovanie cytotoxicity vybraných xenobiotík s potenciálnym hepatotoxickým účinkom. Práca uvádza prehľad a charakteristiku testovaných látok, metodiku, použitý test na určenie cytotoxicity a jeho princíp. Ďalej sumarizuje a porovnáva dosiahnuté výsledky.

Na testovanie cytotoxicity látok bol vybraný bunkový model HepG2, ktorý je vhodný pre štúdium hepatotoxicity. Bunky boli kultivované v 2D a 3D štruktúre. Cytotoxicita látok bola vyjadrená ako IC_{50} , čo je koncentrácia vyjadrujúca redukcii životaschopnosti buniek na 50 % z maximálnej životaschopnosti. Tento parameter nám umožnil kvantitatívne porovnať toxicitu medzi testovanými látkami.

3 Teoretická časť

3.1 Toxicita a hepatotoxicita liečiv

Liekovo navodená toxicita liečiv

Prevažná väčšina liečiv a toxínov vstupuje do organizmu cez gastrointestinálny trakt, v menšej miere sú absorbované cez pľúca, kožu alebo sú do organizmu aplikované parenterálne. Každá telu cudzia látka je eliminovaná buď v nezmenenej forme, alebo je podrobená vplyvu metabolických enzýmov, ktoré túto látku menia na viac hydrofilnú a lepšie eliminovateľnú. V niektorých vzácnejších prípadoch môže dôjsť k neschopnosti látku eliminovať a k rozvoju niektorých toxických reakcií spojených s kumuláciou liečiv alebo k vzniku toxickejších vedľajších metabolitov (*Lee 2003*).

Toxicita liečiv môže byť rozdelená do niekoľkých pomyselných kategórií, ktoré závisia od mechanizmu účinku liečiv, imunitných odpovedí exponovaných jedincov, bioaktivity niektorých metabolitov liečiv a v neposlednom rade od genetických rozdielov spojených s metabolizmom liečiv (*Guengerich 2011*).

Liekovo navodená hepatotoxicita liečiv

Liekovo navodená hepatotoxicita (DILI – Drug-induced liver injury) predstavuje jeden z hlavných klinických problémov súčasnej doby a je možné ju rozdeliť do 3 skupín; hepatocelulárna (zvýšenie alanin transaminázy), cholestatická (zvýšenie alkalín fosfatázy) alebo kombinovaná forma (*Bissell et al. 2001; Hussaini a Farrington 2007*). Táto reakcia je ťažko predikovateľná a dá sa považovať za vzácnu. Incidencia v populácii sa uvádza cca 1:10 000 až 1:100 000 a je závislá na miere toxicity liečiva, a tak isto na citlivosti exponovaných jedincov na podané liečivá a iné telu cudzie látky. Medzi skupiny liečiv s najvýraznejším potenciálom vzniku DILI sú radené NSAID (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs), antibiotiká, a v posledných rokoch taktiež statíny (*Björnsson 2015; Lee 2003*).

Hoci sú liečivá v mnohých prípadoch metabolizované bez výrazného vplyvu na pečevné funkcie, každý rok sú zaznamenávané niektoré závažné alebo fatálne liekové reakcie ovplyvňujúce funkciu pečene. Niektoré látky vplyvom pečevného metabolizmu produkujú vedľajšie metabolity, ktoré môžu spôsobovať toxické reakcie a sú často ovplyvňované dávkou podaného liečiva, prípadne sú bez priamej závislosti na podanej dávke (*Baerg a Kimberg 1970; Mitchell et al. 1973*). Medzi hlavné

mechanizmy vzniku DILI patrí TNF- α aktivovaná apoptóza, inhibícia mitochondriálnych funkcií a vznik nových antigénov. Rizikové faktory vedúce k rozvoju DILI sú vek, pohlavie a genetický polymorfizmus pečeňových enzýmov napr. cytochróm P450 (*Hussaini a Farrington 2007*).

Väčšina idiosynkratických liekových reakcií sa objavuje medzi 5. – 90. dňom užívania, a niektoré latentné formy DILI môžu vzniknúť až po 12 mesiacoch užívania rizikových liečiv. Po vysadení liečiva môže v niektorých prípadoch dôjsť k postupnej reparácii pečeňových enzýmov, napr. u cholestatického pečeňového poškodenia môže náprava trvať až jeden rok, v iných prípadoch môžu byť následky fatálne alebo viesť k transplantácii pečene pacienta (*Abboud a Kaplowitz 2007*).

Za jeden z hlavných problémov DILI sa dá považovať pečeňové zlyhanie s indicenciou 13 – 17 % a mortalitou okolo 80 % (*Bjornsson et al. 2005; O'Grady et al. 1989*). Hlavný znak pečeňového zlyhania je zhoršujúca sa žltacka spojená so zvyšujúcim sa protrombínovým časom a encefalopatiou bez známky chronického pečeňového ochorenia (*O'Grady 1993*).

Príkladom látky s hepatotoickým účinkom môže byť v dnešnej dobe populárny acetaminophenol (paracetamol) vyznačujúci sa antipyretickým a analgetickým účinkom. K pečeňovej toxicite môže dôjsť dvoma spôsobmi, a to buď na základe dlhodobého prekročenia odporúčanej dennej dávky, alebo v spojitosti s liekovými problémami a interakciami liečiv. V obidvoch prípadoch dochádza k enzymatickej indukcii a k vyčerpaniu glutathionu (donoru SH-skupín), ktorý je potrebný k metabolizmu a eliminácii toxického metabolitu N-acetyl-p-benzochinoniminu (NAPQI) (*Seeff et al. 1986*).

3.2 Testovanie cytotoxicity *in vitro*

Prvé modely pre určovanie toxicity liečiv a ich metabolitov boli *in vivo* modely (malé živočíšne druhy napr. myši, potkany, králiky, psy), ktoré môžu byť použité v akútnej alebo chronickej toxicite (*Costa 2014*). Existuje však niekoľko nedostatkov *in vivo* metód. Dôležitým obmedzením je medzidruhovú variabilita medzi zvieratám a človekom (dĺžka života, odlišné fyziologické a biochemické procesy), čo komplikuje extrapoláciu výsledkov na človeka, ktoré sú získané testovaním na zvierati (*Blaauboer 2002; Devlin 2005*).

Dôležitým pilierom pri procese vývoja nových liekov sú *in vitro* testy, založené na bunkách, ktoré poskytujú jednoduchý, rýchly a nákladovo efektívny nástroj. Týmto

sa zabraňuje rozsiahlemu a nákladnému testovaniu na zvieratách (*Edmondson et al. 2014*).

Cytotoxická analýza *in vitro* je rozšírená z dôvodu dopytu pre testovanie bezpečnosti xenobiotík a nových liečiv s cieľom minimalizovať riziká pre zdravie ľudí (*Ceriotti et al. 2007*). Látka je považovaná za cytotoxickú v prípade, že ovplyvňuje rýchlosť replikácie, spôsobuje výrazné zmeny v morfológii alebo vedie k zníženiu celkovej viability. Za zmienku stojí, že jej účinok závisí nielen od expozície zlúčeniny, ale aj od mechanizmu cytotoxicity (*Niles et al. 2009*). Výsledky cytotoxicity sú založené na bunkovej reakcii, ktorá vzniká na základe pôsobenia liekov, látok alebo vplyvom vonkajších podnetov (*Edmondson et al. 2014*).

Voľba vhodného *in vitro* testu

Voľba vhodného testu závisí od informácií, ktoré budú na konci experimentu merané (*Anonym 2015*).

Na testovanie cytotoxicity je dostupných množstvo *in vitro* testov. Všeobecne ich môžeme rozdeliť na tri skupiny. Prvú predstavujú testy životaschopnosti, kde ukazovateľom toxicity látky je počet živých buniek. Ďalej sú to testy cytotoxicity, kde indikátorom toxicity je počet mŕtvych buniek a testy detekujúce apoptózu, ktoré poukazujú na mechanizmus smrti buniek (*Riss a Moravec 2004*).

Postupy testov cytotoxicity zahŕňajú kultiváciu buniek, expozíciu buniek testovanou (cytotoxickou) látkou a následné posúdenie buniek pomocou krátkodobých, či dlhodobých testov (*Ceriotti et al. 2007*). Testy založené na bunkových kultúrach poskytujú možnosť testovania doby expozície liečiva v rôznych koncentráciách (*Costa et al. 2014*).

Viabilita, či toxicita buniek v jednotlivých testoch sa detekuje na základe merania jedného alebo viacerých parametrov cytotoxicity. Patrí medzi ne testovanie membránovej integrity, stanovenie životaschopnosti buniek alebo meranie bunkovej aktivity (*Xu et al. 2004*).

Voľba vhodného *in vitro* modelu

Druh pôvodu a typ buniek použitých v štúdiách cytotoxicity sú určované cieľom plánu alebo cieľom lieku, ktorý je skúmaný (*Anonym 2015*).

In vitro testy na cytotoxicitu sú zvyčajne robené buď na transformovaných, nesmrteľných bunkových líniiach, ktoré sú ľahko dostupné a udržiavateľné aj napriek tomu, že vykazujú abnormálne chovanie, alebo na primárnych bunkách. Primárne kultúry majú takú výhodu, že bližšie reprezentujú fyziologickú situáciu *in vivo* (*Stacey 2001*). Reakcia na testované zlúčeniny môže byť ovplyvnená mnohými faktormi, ako je kultivačné médium, výmena plynov, odparovanie kvapaliny alebo okrajový efekt (*Anonym 2015*).

Testy *in vitro* robené na bunkových modeloch, ktoré predstavujú orgán kritického pôsobenia testovaných látok, podávajú významné informácie o možných mechanizmoch toxického pôsobenia potencionalneho liečiva. Experimenty na bunkovej úrovni nemôžu reprezentovať kompletnú odpoveď celého organizmu, no napriek tomu tvoria nezastupiteľnú súčasť preklinického skúšania (*Giriet al. 2010*).

3.3 Použitá bunková línia

HepG2 bunková línia

V súčasnosti je HepG2 najčastejšie používanou bunkovou líniou na hodnotenie hepatotoxicity. Tieto bunky najlepšie charakterizujú pečeňové bunkové línie. Získavajú sa z tkaniva pečene, ktorá má dobre diferencovaný hepatocelulárny karcinóm. HepG2 bunkami sú vylučované typické plazmatické proteíny pečene (transferín, albumín, plazminogén, fibrinogén alebo α -2-makroglobulín). Podieľajú sa na biotransformácii mnohých xenobiotických zlúčenín (*Gomez-Lechon et al. 2014; LeCluyse et al. 2012*).

3.4 Použité bunkové modely

Testy robené na bunkách sú kľúčovým nástrojom pre hodnotenie potenciálu účinnosti novej zlúčeniny vo vývoji liečiv (*Suparna 2014*).

Bunky prirodzene rastú v extracelulárnom matrici (ECM). Tvorí ho komplexná štruktúra, vďaka ktorej sú bunky schopné navzájom komunikovať prostredníctvom biochemických a mechanických podnetov. Tieto signály ovplyvňujú proliferáciu, diferenciáciu a množstvo ďalších bunkových funkcií (*Suparna 2014*).

3.4.1 2D bunkový model

Tento model je považovaný za zlatý štandard *in vitro* modelu pre hodnotenie metabolizmu a toxicity liečiv (Gomez-Lechon et al. 2014).

Jednoduchá vrstva adherentných buniek rastie na plochom dvojrozmernom (2D) substráte, ktorý ďalej môže byť upravený proteínmi ECM (napr. kolagénom, fibronektínom, lamininom alebo matrigelom). Monovrstva s bunkami umožňuje získavať z média homogénne množstvo živín a rastových faktorov pre rast buniek (Huang et al. 2013). Bunkový skelet je modifikovaný na sploštenú morfológiu a okolité bunky sú spolu v kontakte len po obvode (Justice et al. 2009). V dôsledku tejto zmeny tvaru buniek dochádza k zníženiu polarizácie buniek, zníženiu tvorby žľčových kanálikov a strate dôležitých signálnych dráh, ktoré sú nevyhnutné pre normálnu funkciu hepatocytov (Godoy 2013; Gomez-Lechon et al. 2014).

S 2D bunkovým modelom sa spája množstvo nedostatkov. 2D bunkový model nie je schopný dostatočne napodobniť podmienky *in vivo* a fyziologickú relevanciu/konštrukčné usporiadanie. V dôsledku toho, 2D testy bunkových kultúr niekedy poskytujú zavádzajúce a nepredvídateľné hodnoty pre *in vivo* odpovede. Je očividné, že prevedenie eukaryotických buniek do dvojrozmernej štruktúry neodzrkadľuje podmienky nájdené v natívnom tkanive. Biologické reakcie ako napríklad expresia receptorov, transkripčná expresia, migrácia buniek a apoptóza, sa výrazne líšia od pôvodného orgánu alebo tkaniva, v ktorom vznikajú. Sled týchto reakcií je založený na časovej a priestorovej usporiadanosti (Haycock 2011).

2D bunkový model je pravdepodobne príliš jednoduchý a prehliada parametre, ktoré sú rozhodujúce pri fyziologickej funkcii buniek (Haycock 2011).

3.4.2 3D bunkový model

3D model ponúka mikroštruktúrované trojrozmerné prostredie, v ktorom môžu bunky rásť *in vitro*. Základom metódy je matrica, ktorá slúži pre rast buniek. Pôvod matrice môže byť prírodný (želatína, kolagén, fibrinogén atď.) alebo syntetický (polyméry). Zámerom je čo najviac napodobniť prirodzené usporiadanie, kde hlavným aspektom je porózna štruktúra určená veľkosťou a svojou distribúciou. Pórovitá štruktúra hrá dôležitú úlohu v bunkovej migrácii, adhézii, tvorbe tkanív, mechanickej stabilite a difúzii živín (Luckert et al. 2017; Sobral et al. 2011).

Kultivované bunky v 3D modeli preukazujú znaky, ktoré sú bližšie ku komplexu *in vivo* (Vinci et al. 2012). Rastúce bunky v 3D modeli tvoria na matrici agregáty alebo sféroidy. Tie sú zložené z buniek rôznych fáz (proliferujúcich, apoptických, pokojových, hypoxických a nekrotických). Vrchná vrstva sféroidu/agregátu, ktorá je v priamom kontakte s médiom, je zložená zo životaschopných a množiacich sa buniek. Interakcie medzi bunkami a interakcie bunka-ECM lepšie napodobňujú prostredie, ktoré sa nachádza *in vivo*. Morfológia buniek je podobná prirodzenému tvaru buniek v tele (Edmondson et al. 2014). Kyslík, rastové faktory a živiny z média sú prijímané jadrom bunky v menšej miere. Zostávajú teda v pokojnom alebo hypoxickom stave (Mehta et al. 2012).

Aj napriek tomu, že 3D model predstavuje lepšie podmienky pre *in vitro* kultiváciu v porovnaní s bežným 2D modelom, chýba mu komplexný cievny systém. Ten podporuje tkanivá *in vivo* pre okysličenie, príjem živín a odvoz odpadu. Bunky dôsledkom predstaveného faktu vykonávajú tieto funkcie iba difúziou (Edmondson et al. 2014). Model 3D nielenže ovplyvňuje priestorovú organizáciu povrchových receptorov buniek, ale aj väzby buniek. Uvedené aspekty v 3D modeloch majú vplyv na transdukciu signálu, expresiu génov a bunkové správanie (Shield et al. 2009; Zietarska et al. 2007). Tabuľka 1 uvádza základné rozdiely medzi 2D a 3D modelom.

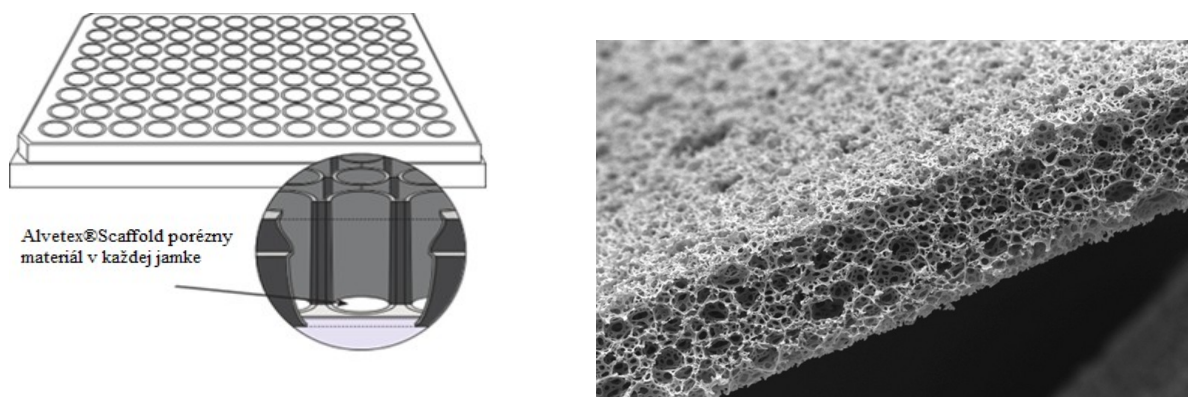
Tab. 1 Základné rozdiely medzi 2D a 3D modelom.

2D model	3D model
Neprirodzený a pretiahnutý tvar bunky	Prirodzenejší tvar bunky
Neprirodzené interakcie medzi bunkami	Prirodzenejšie interakcie medzi bunkami
Bunky tvoria monovrstvu	Bunky tvoria viac vrstiev
Zhoršená expanzia kmeňových buniek	Zlepšená expanzia kmeňových buniek
Odlíšne správanie buniek v porovnaní s <i>in vivo</i> bunkami	Porovnateľné správanie buniek s <i>in vivo</i> bunkami

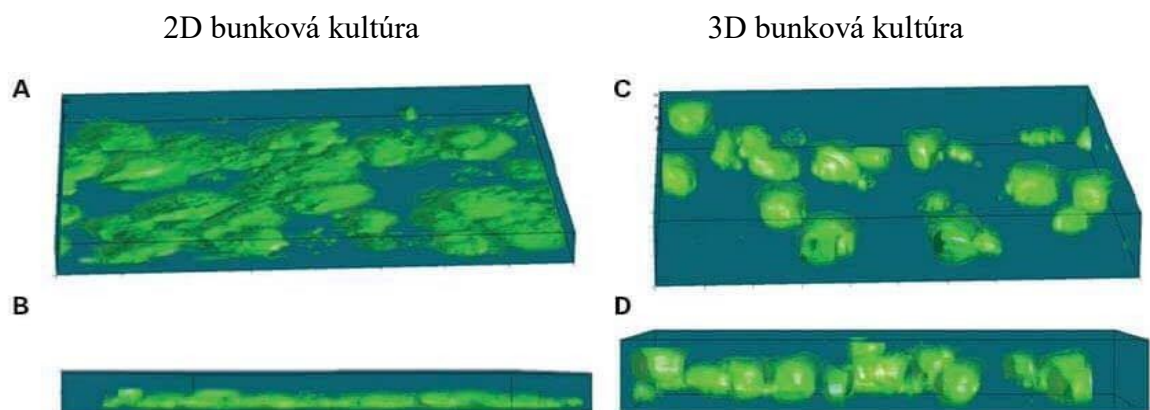
Alvetex[®] Scaffold 96jamková doštička

Na nasledujúce experimenty bola použitá Alvetex[®] Scaffold 96jamková doštička od firmy Reinnervate, UK. Ide o flexibilnú plochu umožňujúcu zlepšenie *in vitro* testov a tkanivových modelov, ktoré napodobňujú lepšiu rast *in vivo* buniek.

Doštička, ktorá je určená na jednoduché a rutinné použitie, je vyrobená z čierneho plastu. Na dne každej jamky sa nachádza Alvetex[®]Scaffold, čo je vysoko porézny a inertný materiál (polystyrén) (Obr. 1) Pozostáva z 200 µm hrubej membrány, ktorá formuje 3D štruktúru. Po aplikácii buniek a ich prilnutí rastú na povrchu alebo v poréznej matrici. Alvetex[®]Scaffold udržuje 3D tvar jednotlivých buniek a zároveň umožňuje, aby bunky ostali pohromade. Následkom toho vzniká štruktúra a interakcie medzi bunkami, ktoré sú vhodné pre normálnu funkciu tkanív (*Reprocell¹, Alvetex 2017, Reprocell², Alvetex 2017*). Obrázok 2 znázorňuje rozdiel v štruktúre buniek v 2D a 3D modeli.



Obr. 1 Alvetex[®]Scaffold 96jamková doštička.



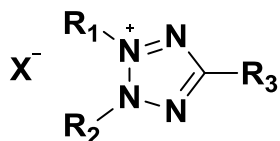
Obr. 1 Porovnanie štruktúry buniek 2D modelu (A, B) a 3D modelu (C, D). A a B znázorňujú rast buniek na bežnom 2D povrchu, kde bunky nadobúdajú typickú sploštenú morfológiu. Bunky horizontálne pokrývajú široký povrch plochy (A) a vertikálne majú redukovanú výšku (B). C a D znázorňujú Alvetex[®]Scaffold ,kde si bunky viac zachovávajú kvádrovitú štruktúru a 3D štruktúru (*Reprocell², Alvetex 2017*).

3.5 Metóda na hodnotenie cytotoxicity *in vitro*

Redukcia tetrazolínových zlúčením

Existujú rôzne metódy, ktoré sa môžu používať na odhadovanie počtu životaschopných buniek (*Riss a Moravec 2004*). Tetrazolínové soli majú široké použitie vďaka svojim chemickým a biologickým vlastnostiam. Tie závisia od pozitívne nabitého kvartérneho tetrazolínového kruhu, ktorý obsahuje štyri atómy dusíka. Hlavná štruktúra má na sebe naviazané tri aromatické skupiny, zvyčajne fenylové (*Berridge et al. 2005*), (Obr. 3).

Vzorec základnej štruktúry tetrazolínovej soli bol vytvorený v ChemBioDraw® Ultra 13.0, 2014 (Obr. 3).



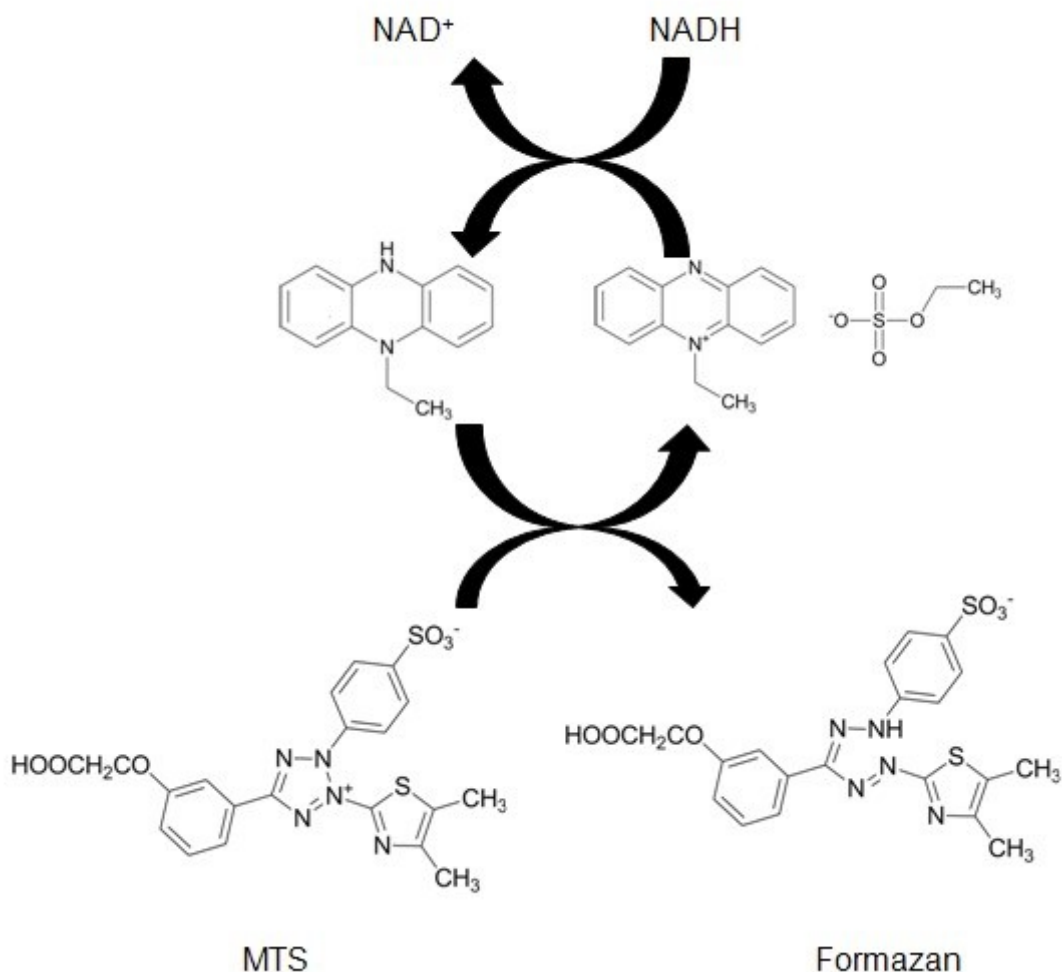
Obr. 3 Základná štruktúra tetrazolínovej soli. X⁻ je anión, R₁ a R₃ sú fenylové skupiny a R₂ je fenylová alebo 2-tiazolylová skupina. Jednotlivé fenyly môžu byť sibistituované.

Redukcia tetrazolínových zlúčenín je ukazovateľom životaschopnosti buniek. Táto reakcia je merítkom určitých aspektov metabolizmu alebo aktivity enzýmov buniek. Usmrtením buniek dochádza k rýchlemu poklesu schopnosti premeny substrátu na produkt (*Riss a Moravec 2004*). Tetrazolínové soli sa v značnej miere používajú v bunkovej proliferácii, enzýmových testoch a v testoch cytotoxicity. V každom z nich sú tieto soli metabolicky redukované na farebné konečné produkty (formazany), narušením tetrazolového kruhu (*Berridge et al. 2005*).

CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (CellTiter 96[®])

Kit CellTiter 96[®] je kolorimetrickou metódou, ktorá sa využíva na stanovenie počtu životaschopných buniek (*Anonym 2015*). Metabolicky aktívne bunky redukujú tetrazolínovú zlúčeninu 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4-

sulfophenyl)-2H tetrazolium (MTS) na farebný formazan (Obr. 4). Tento produkt je priamo rozpustný v použítom bunkovom médiu a maximálnu absorbanciu dosahuje pri 490 nm (Capasso et al. 2003).



Obr. 4 Redukcia tetrazolínovej zlúčeniny MTS na farebný produkt formazan za pomoci buniek, ktoré sú metabolicky aktívne. Phenazin ethylsulfát (PES), ako prechodný akceptor elektrónov, prenáša elektróny z NADH na túto redukciu (Riss 2013).

Vďaka zlepšeniu tetrazolínového činidla nie je nutné rozpúšťať zrazeninu formazanu, čím sa metóda stáva komfortnejšou. Formazan, vďaka svojmu negatívnemu náboju, prispieva k svojej rozpustnosti v bunkovom médiu, a zároveň obmedzuje permeabilitu bunky pre tetrazolínové činidlo (Scudiero et al. 1988). V dôsledku tohto javu sa tetrazolínové činidlo používa v kombinácii s fenazin ethylsulfátom (PES). PES je látka, ktorá má zvýšenú chemickú stabilitu, a tým v kombinácii s MTS zaisťuje stabilný roztok. PES (prechodný akceptor elektrónov) preniká do intracelulárneho priestoru životaschopnej bunky, kde na seba naviaže redukčný ekvivalent

[napr. z molekúl NADH za vzniku NAD⁺ (nikotínamidadenín-dinukleotid – oxidovaná forma)]. Elektróny z cytoplazmy alebo plazmatickej membrány sú po opustení bunky prenášané do kultivačného média, čím uľahčujú redukciu MTS na farebný formazan (*Berridge et al. 2005, Riss 2013 Berridge a Tan 1993; Anonym 2015*).

Vzniknuté množstvo produktu (formazanu) je priamo úmerné počtu životaschopných buniek v bunkovej kultúre (*Anonym 2015*). V prípade, že klesá metabolická aktivita buniek z dôvodu ich poškodenia, znižuje sa schopnosť buniek redukovať MTS, a tým aj tvorba farebného formazanu. Následne sa tento množstevný pokles formazanu prejaví ako znížená hodnota jeho absorbancie, čo zodpovedá poklesu životaschopnosti buniek (*Berridge a Tan 1993; Cory et al. 1991*). Absorbancia formazanu je meraná pri 490 nm (*Chakrabarti et al. 2000*).

Výhodami CellTiter 96[®] je jednoduchosť používania metódy, eliminácia solubilizačných krokov pre rozpustenie formazanu a opakovateľnosť merania. Pri viacnásobnom meraní je potrebné dodržiavať konštantné podmienky (*Anonym 2015, Riss 2013*).

3.6 Testované látky

V nasledujúcich experimentoch boli použité xenobiotiká z rôznych terapeutických skupín. Sú to látky, ktoré sú metabolizované cez pečeň a sú rizikové z hľadiska hepatotoxicity. V terapeutických dávkach však predstavujú bezpečné liečivá.

Štruktúrne vzorce testovaných látok boli vytvorené v programe ChemBioDraw[®] Ultra 13.0, 2014 (Obr. 5 – 15)

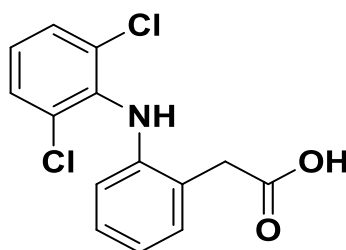
3.6.1 Nesteroidné antiflogistiká (NSAIDs)

NSAIDs sú skupinou látok, ktorá je vo veľkej miere užívaná pre svoj protizápalový, antipyretický a analgetický účinok (*Terzi et al. 2017*). Je známych mnoho prípadov, pri ktorých užívanie NSAIDs spôsobilo vážne poškodenie pečene (*Rubenstein a Laine 2004*). Vzhľadom na široké užívanie týchto liečiv sa kladie veľký význam na skúmanie pečenevého poškodenia súvisiaceho s užívaním NSAIDs (*Agundez et al. 2011*).

Na experimenty boli vybrané dve testované látky z tejto skupiny.

Diklofenak (Obr. 5)

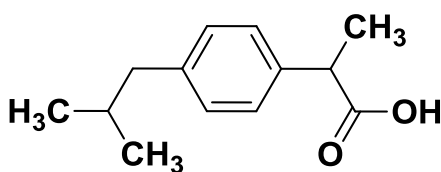
Diklofenak alebo chemicky (2,6-dichlórfenyl)aminobenzénoctová kyselina je široko užívané NSAID pri liečbe reumatických porúch, osteoartritíd a ankylózných spondylitíd. Ďalej sa využíva ako úľavové liečivo pri terapii bolesti. Jeho pečňová toxicita bola preukázaná v niekoľkých štúdiách a prevažná časť bola popísaná ako akútne pečňové poškodenie. Zvyšok prípadov zodpovedal chronickej hepatitíde. Presný mechanizmus pečňovej toxicity nie je známy, ale pravdepodobne dochádza k tvorbe neoantigénu, ktorý pôsobí hepatotoxicky (*Bort et al. 1999, Giri et al. 2010*).



Obr. 5 Diklofenak

Ibuprofen (Obr. 6)

Ibuprofen alebo chemicky 2-(4-isobutylfenyl)propánová kyselina. Primárne je v pečeni metabolizovaný oxidáciou a hlavnými metabolitmi sú 2-hydroxy ibuprofen a 2-karboxy ibuprofen. Tieto metabolity nemajú výraznú farmakologickú aktivitu. Ďalšou hlavnou metabolickou cestou ibuprofenu je konjugácia s kyselinou glukurónovou za vzniku acylglukuronidov (*Al-Nasser 2000*). Castillo et al. (1995) naznačuje, že kovalentná väzba ibuprofén-glukuronid s pazmatickými proteínmi je dôležitou príčinou toxicity.



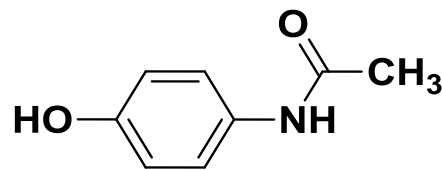
Obr. 6 Ibuprofen

3.6.2 Antipyretiká

Na experimenty boli vybrané dve testované látky z tejto skupiny.

Paracetamol (Obr. 7)

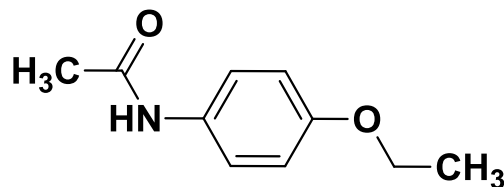
Paracetamol alebo acetaminophen, chemicky N-(4-hydroxyfenyl)acetamid je bežne užívané analgetikum a antipyretikum. V predpísaných dávkach je dobre znášaným liečivom. Predávkovanie je však najčastejšou príčinou liekmi vyvolaného ochorenia pečene a akútneho zlyhania pečene na celom svete. Poškodenie pečene nie je vyvolané samotnou látkou, ale jeho metabolitom (N-acetyl-p-benzochinón), ktorý vzniká v pečeni pomocou CYP enzýmov. Za normálnych okolností sa však tento produkt metabolizmu detoxikuje konjugáciou s glutathionom (GSH) (*Giriet al. 2010; Kalantzi et al. 2006*).



Obr. 7 Paracetamol

Fenacetín (Obr. 8)

Fenacetín nepredstavuje hepatotoxické liečivo pre človeka ani pri väčšom predávkovaní. Celková toxicita fenacetínu predstavuje asi jednu tretinu toxicity paracetamolu a dokonca vážne prípady dokazujú malé alebo žiadne poškodenie pečene (*Zimmerman 1999*).



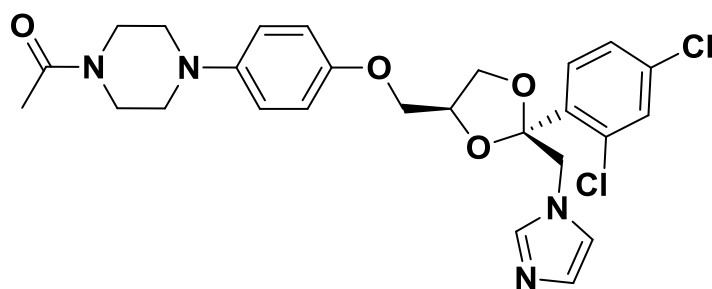
Obr. 8 Fenacetín

3.6.3 Antimykotiká

Na experimenty boli vybrané dve testované látky z tejto skupiny.

Ketokonazol (Obr. 9)

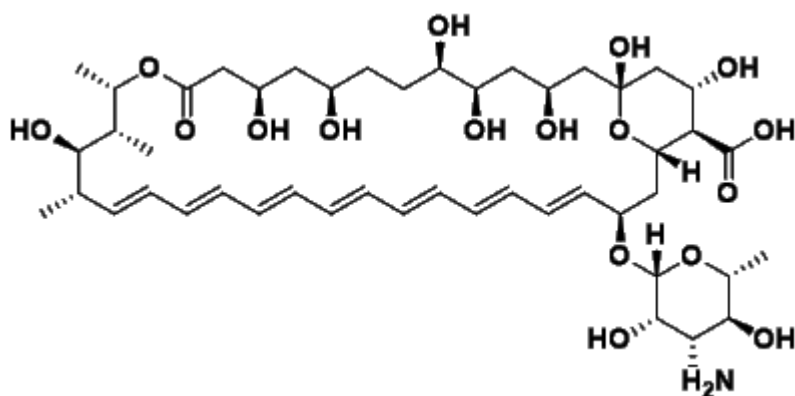
Ketokonazol patrí medzi azolové antimykotiká, ktoré sú najčastejšie užívané na liečenie hubových infekcií (*Haegler et al. 2017*). Ide o heterocyklické syntetické zlúčeniny so širokým antimykotickým spektrom. Inhibujú cytochróm P450 (CYP), čo vedie k nedostatku ergosterolu a ku akumulácii 14 α -metylovaných sterolov v hubových bunkových membránach. Garcia Rodriguez LA et al. (1999) uvádzajú, že cytotoxický účinok ketokonazolu je spojený nielen s materskou zlúčeninou, ale aj s N-deacetyl ketokonazolom hlavného metabolitu.



Obr. 9 Ketokonazol

Amfotericín B (Obr. 10)

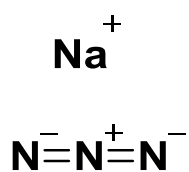
Amfotericín B je polyénové antimykotikum. Jeho intravenózna aplikácia je základom pre terapiu ťažkých a život ohrozujúcich systémových infekcií. Má najširšie antifungálne spektrum zo všetkých dostupných antimykotík. Viaz sa na sterol (ergosterol) hubovej membrány, čím sa v membráne vytvoria póry, čo vedie k strate iónovej rovnováhy a k bunkovej smrti (*Chudzik et al. 2017; Sau et al. 2003*). Na druhej strane jeho vysoká afinita k biologickým membránam môže vyvolať zmeny vo funkciách bunkovej membrány, z čoho plynie orgánová dysfunkcia. Najväčšia distribúcia amfotericínu B je do pečene, kde ovplyvňuje jej funkcie. Predpokladá sa, že interferuje s pečňovým mikrozomálnym oxidázovým systémom, ktorý je zodpovedný za biotransformáciu veľkého spektra rôznych endogénnych a exogénnych látok (*Inselmann et al. 2002*).



Obr. 10 Amfotericín B

Azid sodný (Obr. 11)

Azid sodný má širšie využitie. Okrem použitia v automobilových airbagoch sa využíva ako herbicíd, insekticíd, fungicíd, baktericíd a nematocíd. V klinických laboratóriách sa používa ako konzervačná látka v činidlách. Azid sodný sa do organizmu človeka dostáva cez dýchacie cesty alebo prostredníctvom kože a po absorpcii sa metabolizuje v pečeni. Primárnym účinkom azidu sodného na ľudský organizmus je hypotenzia. Presný mechanizmus toxicity azidu sodného však nie je známy, no niektorí autori tvrdia, že môže byť spojený s tvorbou oxidu dusnatého po konverzii azidu sodného (Chang a Lamm 2003).



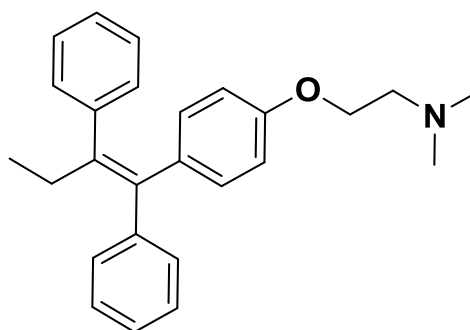
Obr. 11 Azid sodný

3.6.4 Antiestrogény

Na experimenty bola vybraná jedna testovaná látka z tejto skupiny.

Tamoxifén (Obr. 12)

Tamoxifén alebo chemicky dimetylamin je využívaný pri hormonálnej liečbe pre pacientov, ktorí vykazujú estrogen-receptorovo pozitívnu rakovinu prs. Ponúka úľavu pre pacientov s metastatickým ochorením a znižuje riziko recidívy a smrti v dôsledku rakoviny prs (*Ribeiro et al. 2014*). Tamoxifén sa pomocou cytochrómu P450 metabolicky aktivuje na elektrofilné medziprodukty, ktoré oxidujú enzýmy v pečeni, čo vedie k nadprodukcii reaktívnych druhov kyslíka zodpovedných za oxidačné poškodenie pečene (*Jena et al. 2015*).



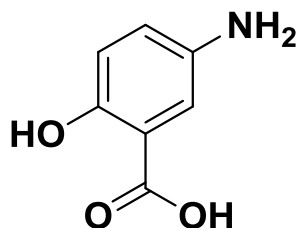
Obr. 12 Tamoxifén

3.6.5 Antituberkulotiká

Na experimenty bola vybraná jedna testovaná látka z tejto skupiny.

Kyselina p-aminosalicylová (PAS) (Obr. 13)

PAS je radená do druhej línie antituberkulotík a je všeobecne považovaná sa bakteriostatické činidlo pre *Mycobacterium tuberculosis*. Kvôli známej hepatotoxicite PAS sa dnes uprednostňujú na liečbu tuberkulózy liečivá s nižším hepatotoxickým potenciálom patriace do prvej línie antituberkulotík (*Minato et al. 2015*)

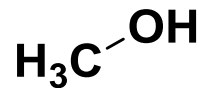


Obr. 13 Kyselina p-aminosalicylová

3.6.6 Methanol a Ethanol

Methanol (Obr. 14)

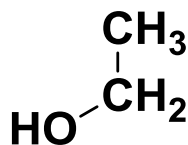
Methanol je spojený s výrazným vplyvom na správnu funkciu pečňových buniek. Pri jeho metabolizácii dochádza ku vzniku formaldehydu a kyseliny mravčej. Tieto látky vykazujú celkovo toxický charakter. Pri intoxikácii metanolom taktiež dochádza k mitochondriálnemu poškodeniu a k tvorbe kyslíkových radikálov, ktoré spoločne so vzniknutými metabolitmi zvyšujú hepatotoxické účinky metanolu (*Becker 1983*).



Obr. 14 Methanol

Ethanol (Obr. 15)

Chronická spotreba ethanolu spôsobuje poškodenie pečene komplexným spôsobom, ktorý zahŕňa oxidačný stres, hypoxiu, zvýšenie regulácie protizápalových cytokínov a defekty v energetickom metabolizme (*Venkatraman et al. 2004*).



Obr. 15 Ethanol

4 Ciele práce

- Cieľom diplomovej práce bolo stanoviť cytotoxicitu *in vitro* 11 vybraných testovaných látok s využitím vhodného bunkového modelu za pomoci kolorimetrickej metódy CellTiter 96[®].
- Kultivovať zvolenú bunkovú líniu ľudských pečeňových HepG2 buniek na 2D a 3D štruktúre.
- Vyhodnotiť získané experimentálne výsledky, porovnať namerané hodnoty jednotlivých látok na 2D a 3D úrovni a látok medzi sebou navzájom a vypracovať diplomovú prácu podľa platných požiadavok.

5 Experimentálna časť

5.1 Použitý materiál

5.1.1 Prístroje a pomôcky

- Laminárny box Micrological safety cabinet TOP – SAVE 1,8 Bio air instruments s.r.l., Taliansko)
- 96 jamková doštička číra (NUNC, dodávateľ Scholler, Praha)
- Alvetex[®] Scaffold 96 jamková doštička čierna pre 3D testovanie (Reinnervate, UK)
- Sterilné, nepyrogenné sklenené pipety 5 ml, 10 ml, 25 ml (TPP, Švajčiarsko)
- Sterilné polypropylenové falkonky 15 ml, 50 ml (TPP, Švajčiarsko)
- Mikroskop OPTIKA, Microscopes, XDS-1 R (OPTIKA Microscopes, Taliansko)
- Inkubátor (Sartorius stedim biotech GmbH, Nemecko)
- Sterilná kultivačná nádoba 75 cm² (TPP, Švajčiarsko)
- Mikroskúmavky Eppendorf (ep T.I.P.S. Standard 2 – 200 µl, 50 – 1000 µl, Nemecko)
- Pasteurove sklenené pipety (Brand GMBH, Nemecko)
- Miešačka Bio Vortex V₁ (Biotech, Česká republika)
- Centrifuga Multi – (Spin MSC – 6000 Biosan, Biotech, Česká republika)
- Analytické váhy (Boeco, Nemecko)
- Ultrazvuková kúpeľ (Ecoson)
- Elektrický vibračný strojček Lab Dancer (IKA – Werke, Nemecko)
- Vodná kúpeľ, TW 12 (Julabo, Nemecko)
- Doštičkový analyzátor TECAN Infinite 200 M (Švajčiarsko)
- Viackanálové pipety Discovery Comfort (HTL, Poľsko)
- Jednokanálové pipety s variabilným objemom Eppendorf Research a Eppendorf Research Plus (Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o.)

- Špičky Eppendorf s variabilným objemom (Hamburg, Nemecko)

5.1.2 Chemikálie

- Kultivačné médium: Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), 500 ml (Sigma Aldrich, USA) s prídavkom 10 % fetálneho bovinného séra (PAA Laboratories, Biotech, Praha), 1 % L-glutaminu (Sigma-Aldrich, USA) a 1 % neesenciálnych aminokyselín (Sigma -Aldrich, USA)
- Fosfátový pufr PBS (Phosphate Buffered Saline, pH = 7,4) (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ - PENTA, Česká Republika)
- Trypsin/EDTA roztok (0.25%, Trypsin/EDTA solution) (Sigma-Aldrich, USA)
- Dimethylsulfoxid (DMSO, for molecular biology, ≥ 99,9 %) (Sigma-Aldrich, USA)
- CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (CellTiter 96®)
- Testované látky amfotericín B, ketokonazol, diklofenak, fenacetín, ibuprofen, paracetamol, para-aminosalicylová kyselina (PAS), azid sodný, tamoxifén, ethanol a methanol (Sigma Aldrich, USA)

5.1.3 Bunkový model

V tejto práci sme použili bunky HepG2 (pasáže 4-17) (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK).

5.1.4 Testované látky

Tabuľka 2. uvádza použité látky pri experimentoch, ich sumárne vzorce a molárne hmotnosti.

Tab. 2 Použité látky pri experimentoch, ich sumárny vzorec a molárna hmotnosť.

Názov látky	Sumárny vzorec	Molárna hmotnosť (g/mol)
Amfotericín B	$C_{47}H_{73}NO_{17}$	924,08
Ketokonazol	$C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$	531,44
Diklofenak	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	318,13
Fenacetín	$C_{10}H_{13}NO_2$	179,22
Ibuprofen	$C_{13}H_{18}O_2$	206,28
Paracetamol	$C_8H_9NO_2$	379,70
Kyselina p-aminosalicylová (PAS)	$C_7H_7NO_3$	153,14
Azid sodný	NaN_3	65,01
Tamoxifén	$C_{26}H_{29}NO$	371,52
Etanol	C_2H_6O	46,07
Metanol	CH_4O	32,04

5.2 Metódy

Nami určené látky boli testované na cytotoxicitu *in vitro* na modeli ľudskej bunkovej línie HepG2. Na testovanie našich 11 látok bol použitý kit CellTiter 96[®].

5.2.1 Príprava fosfátového pufru

V tabuľke 3 sú uvedené použité chemikálie na prípravu fosfátového pufru (PBS), ich množstvo na daný objem (2 litre), ich molárna hmotnosť a ich jednotlivé koncentrácie v pufri. Navážky látok sme doplnili destilovanou vodou do požadovaného objemu. Pomocou NaOH sme upravili pH pufru na 7,4 za použitia pH-metra.

Tab. 3 Príprava fosfátového pufru.

Chemikálie	Navážka (g)	Molárna hmotnosť (g/mol)	Koncentrácia v pufrí (mM)
NaCl	16,01	58,44	136,98
KCl	0,42	77,55	2,71
Na ₂ PO ₄ .12H ₂ O	7,16	358,14	10,00
NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	3,12	156,01	10,00

5.2.2 Bunková kultivácia

Použité HepG2 bunky boli pravidelne kultivované v kultivačnej nádobe v bunkovom médiu Minimum essential medium eagle o definovanom zložení (10 % fetálne bovinné sérum, 1 % aminokyselina L-glutamin, 1 % neesenciálne aminokyseliny). Kultivácia prebiehala v sterilnom inkubátore pri 37 °C v riadenej atmosfére (5 % CO₂ a vysoká relatívna vlhkosť). Tieto podmienky najviac napodobňujú prostredie *in vivo*. Po určitej dobe bunkového rastu a delenia (2 – 3 dni) boli bunky mikroskopicky kontrolované a spasáňované.

Pred samotným pasáňovaním, ktoré prebiehalo v laminárnom boxe, boli nádoby s PBS pufrom, médiom a trypsinom zahriate vo vodnom kúpeli na 37 °C po dobu 30 min. Pred prácou v laminárnom boxe bol všetok materiál ošetrený 70 % etanolom, aby sa zabránilo kontaminácii z nesterilného prostredia.

Z kultivačnej nádoby s HepG2 bunkami bolo opatrne odsaté staré kultivačné médium. K bunkám bolo pomocou pipety pridaných 10 ml PBS, ktorým sme prepláchli bunky od starého kultivačného média. Tento roztok bol opäť odsatý. Pridaním 0,25 % trypsinu/EDTA došlo k uvoľneniu buniek od povrchu kultivačnej nádoby a uvoľneniu medzibunkových spojov. Uvoľneniu buniek sme taktiež napomohli mechanickým poklepaním rukou na kultivačnú nádobu. Vložením nádoby s bunkami HepG2 do inkubátora na 2 min. sme urýchlili uvoľnenie buniek. Po dlhšom pôsobení trypsinu na bunky mohlo dôjsť k ich poškodeniu. Účinok trypsinu sme inaktivovali

pridaním nového kultivačného média. Pravidelným nasávaním pipetou a jej spätným vypúšťaním sa vzniknutá suspenzia dostatočne premiešala.

Časť bunkovej suspenzie z pasáže bola nasadená do novej kultivačnej nádoby s novým médiom a ďalej kultivovaná. Zo zvyšnej časti suspenzie bolo odobraných dvakrát po 10 μl a aplikovaných na Bürkerovu komôrku. Prostredníctvom Bürkerovej komôrky sme určili počet buniek v 1 ml suspenzie. Ďalším krokom bolo nariadenie bunkovej suspenzie pomocou kultivačného média na požadovanú koncentráciu 5×10^4 buniek/200 μl . Po nariadení sme pripravenú suspenziu nasadili pomocou multikanálovej pipety do 96jamkovej doštičky (5×10^4 buniek/jamka). Súčasne bola pripravená kontrolná testovacia doštička, ktorá v každej jamke obsahovala 200 μl kultivačného média bez buniek. Nasledovala inkubácia pri 37 °C v atmosfére sýtenej 5 % CO_2 po dobu 24 hodín. Po tejto inkubácii sme k bunkám pridávali DMSO (kapitola 5.2.3) alebo testované látky (kapitola 5.2.7).

Počas experimentov sme sa snažili vyhnúť rohovému efektu tým, že sme po obvode 96jamkovej doštičky napipetovali samotné médium bez buniek. Rohový efekt sa môže prejaviť rýchlejším vysychaním kultivačného média v okrajových jamkách testovacej doštičky, čím by mohlo dôjsť k skresleniu výsledkov.

5.2.3 Zistenie optimálnej koncentrácie dimethylsulfoxidu

DMSO je jedno z najpoužívanejších organických rozpúšťadiel pre veľké množstvo organického materiálu.

Takmer všetky nami použité látky sú rozpustné v tomto rozpúšťadle okrem azidu sodného, ktorý sme rozpustili v destilovanej vode.

Toxicita dimethylsulfoxidu (DMSO) bola testovaná na bunčnej línii HepG2 buniek. Nariadením DMSO za pomoci kultivačného média bolo získané DMSO v rôznych inhibičných koncentráciách (0,5 % – 10 %). Takto pripravené koncentrácie DMSO boli nasadené do jednotlivých triplikátov jamiek s bunkami. Súčasne boli pripravené kontroly pre 100 % životaschopnosť buniek, tzn. bunky prítomné v 200 μl média v jamke, kontrola pozadia absorbančie DMSO (médium bez buniek s nami zvolenými koncentraciami DMSO) a kontrola pozadia absorbančie média t.j. médium bez buniek a bez DMSO.

Nasledovala inkubácia po dobu 24 h pri 37 °C v atmosfére 5 % CO₂. Po 24 h sme do každej jamky pridali 20 µl činidla – tetrazolinovej soli (MTS). Ďalej došlo ku inkubácii pri 37 °C po dobu 2 h a následne k meraniu absorbancie pri vlnovej dĺžke 490 nm na doštičkovom analyzátore TECAN. Po získaní hodnôt absorbancie sme dopočítali aritmetický priemer, smerodajnú odchýlku (SMODCH) a relatívnu smerodajnú odchýlku (relat.SMODCH). Od hodnôt priemernej absorbancie (bunky v médiu spolu s koncentráciou DMSO) boli odčítané priemerné hodnoty pozadia absorbancie DMSO (médiu bez buniek s DMSO). Následným vynásobením číslom sto a vydelením hodnotou, ktorá bola získaná odčítaním pozadia média od 100 % životaschopnosti buniek sme vypočítali percentuálnu životaschopnosť buniek.

5.2.4 Linearita bunkovej odpovede

Pred experimentmi bolo potrebné zistiť linearitu bunkovej odpovede, ktorá je funkciou hustoty pri sadení buniek. Do triplikátov na 96jamkovej doštičke 2D a 3D modeli, boli nasadené rôzne počty buniek HepG2 (1000 – 150 000 buniek). Po nariadení roztoku s kultivačným médiom bolo s multikanálovou pipetou injikovaných 200 µl do každej jamky. Pre každý časový interval bola nasadená 96jamková doštička 2D i 3D modelu. Zvolené inkubácie boli vykonané v časoch 24 h, 48 h a 72 h. Inkubácia prebiehala pri 37 °C a 5 % CO₂ atmosfére. Po každom dni (24 h) bolo k bunkám pridaných 40 µl MTS činidla a inkubácia prebiehala ďalej určitú dobu (2 h). Po tejto dobe bolo odobratých 100 µl do novej doštičky a odmeraná absorbancia pomocou doštičkového analyzátora TECAN (pri vlnovej dĺžke 490 nm). Po 3 dňoch bola vyhodnotená linearita bunkovej odpovede.

5.2.5 Príprava roztokov testovaných látok

Pre experimenty bolo použitých 11 látok. Osobitne pre každú našu látku bolo zvolené vhodné rozpätie inkubačných koncentrácií (Tab. 5 a Tab.6). Najskôr bola pripravená zásobná koncentrácia skúmaných látok, kde dôležitú úlohu zohrávala ich rozpustnosť v rozpúšťadle. Ako najvhodnejšie rozpúšťadlo pre väčšinu látok sme zvolili DMSO. Azid sodný sme rozpúšťali v destilovanej vode. Z roztokov s najvyššou koncentráciou bola pripravená rada rôznych koncentrácií metódou postupného riedenia (Tab. 4). Vo väčšine prípadov šlo o desať koncentrácií pre každú látku.

Tab. 4 Ilustračná ukážka prípravy série zásobných roztokov (A – J) s rôznymi koncentraciami testovanej látky. V tomto prípade ide o amfotericín B.

Roztok	Zásobná koncentrácia (μM)	Riedenie Objem roztoku (μl)	Riedenie Objem DMSO (μl)
A	2000	0	90
B	1000	45 A	45
C	500	45 B	45
D	250	45 C	45
E	100	36 D	54
F	50	45 E	45
G	25	45 F	45
H	10	36 G	54
I	5	45 H	45
J	1	18 I	72

K výpočtu menej koncentrovaného roztoku z koncentrovanejšieho roztoku bol použitý nasledovný vzorec:

$$\frac{c_B}{c_A} \times V_B = V_A$$

$$V_B - V_A = V_{\text{DMSO}}$$

V_A – objem roztoku A

V_B – celkový objem roztoku

V_{DMSO} – objem použitého DMSO

c_A – koncentrácia roztoku A

c_B – koncentrácia roztoku B

Tab. 5 Rozmedzie inkubačných koncentrácií (μM) testovaných látok použitých pri experimentoch.

Názov látky	Rozmedzie inkubačných koncentrácií (μM)
Amfotericín B	0,01 – 20
Ketokonazol	0,05 – 150
Diklofenak	1 – 1000
Fenacetín	100 – 20 000
Ibuprofen	1 – 1000
Paracetamol	10 – 25 000
Kyselina p-aminosalicylová (PAS)	10 – 15 000
Azid sodný	10 – 6000
Tamoxifén	0,1 – 100

Tab. 6 Rozmedzie inkubačných koncentrácií (%) DMSO a testovaných látok použitých pri experimentoch.

Názov látky	Rozmedzie inkubačných koncentrácií (%)
DMSO	0,5 – 10
Etanol	0,5 – 10
Metanol	0,5 – 10

5.2.6 Príprava doštičky pre 3D experimenty

Príprava doštičky pre experimenty bola vykonaná podľa postupu odporúčaného výrobcem. Doštička 3D bola vybratá v sterilnom prostredí (laminárny box) z jeho pôvodného obalu. Postupne sa do každej jamky na doštičke pridalo 100 μl 70 % ethanolu. Po opatrnom odsatí 70 % ethanolu bolo do jamky pridaných 200 μl kultivačného média. Tento krok by mal nasledovať ihneď, aby bolo znížené riziko vysychania doštičky v dôsledku postupného vyparovania ethanolu. Následne opäť došlo k odsatiu kultivačného média a k pridaniu 100 μl toho istého kultivačného média. Doštička s médiom bola umiestnená do inkubátora v podmienkach 37 °C s 5 % CO_2

atmosférou po dobu 5 min. Následne bola doštička vybratá a médium sa odsalo. Takto pripravená 3D doštička bola nachystaná na sadenie HepG2 buniek.

5.2.7 Inkubácia buniek s testovanými látkami a vykonanie testu CellTiter 96®

Dvadsaťštyri hodín po nasadení buniek bola každá koncentrácia testovanej látky pridaná k nasadeným bunkám. Do kontrolnej a testovacej 2D a 3D doštičky bolo injikovaných 2 μ l z každej koncentrácie do jednotlivých triplikátov. Kontrolná doštička slúžila na kontrolu viacerých parametrov. Šlo o kontrolu interakcie medzi testovanou látkou a činidlom (MTS), a tiež o kontrolu pozadia média. Zároveň bola pripravená kontrola maximálnej životaschopnosti (bunky v kultivačnom médiu), kontrola vplyvu DMSO rozpúšťadla (bunky v kultivačnom médiu s 1 % DMSO) a kontrola 100 % toxicity (bunky v médiu s 10 % DMSO). Po príprave testovacej a kontrolnej doštičky nasledovala inkubácia po dobu 24 h pri 37 °C a 5 % CO₂. Potom bolo do každej jamky pridaných 40 μ l činidla MTS z kitu CellTiter 96 a nasledovala inkubácia po dobu 2 h. Z 3D doštičky bolo odobraných 100 μ l do novej, priehľadnej 2D doštičky. Vzápätí bola odmeraná absorbanca pomocou doštičkového analyzátora TECAN (pri vlnovej dĺžke 490 nm).

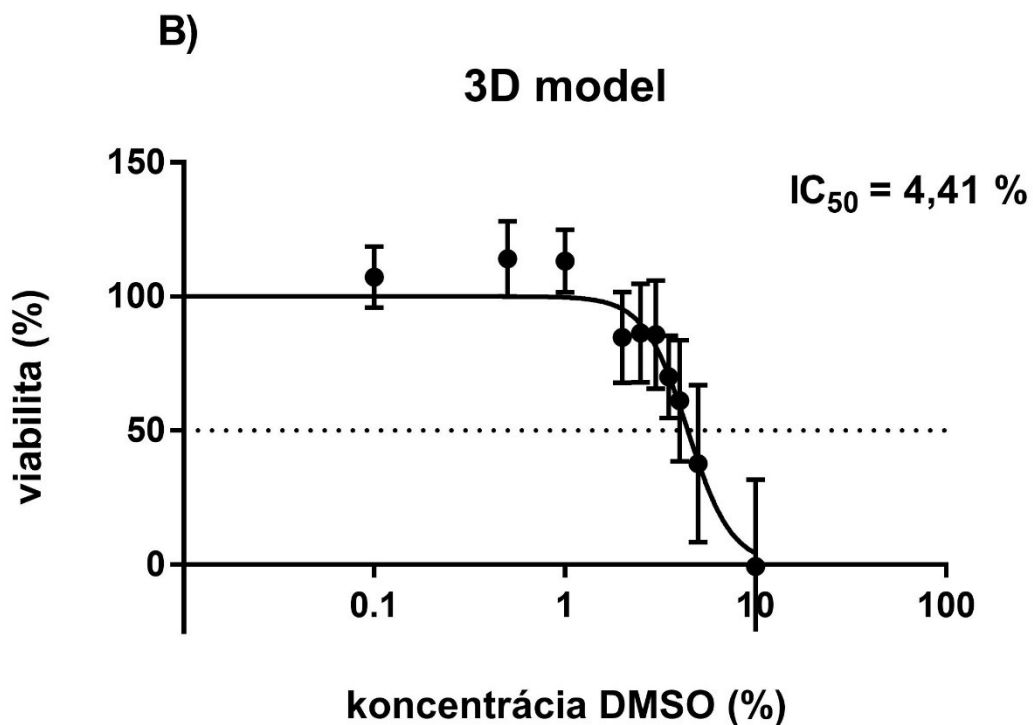
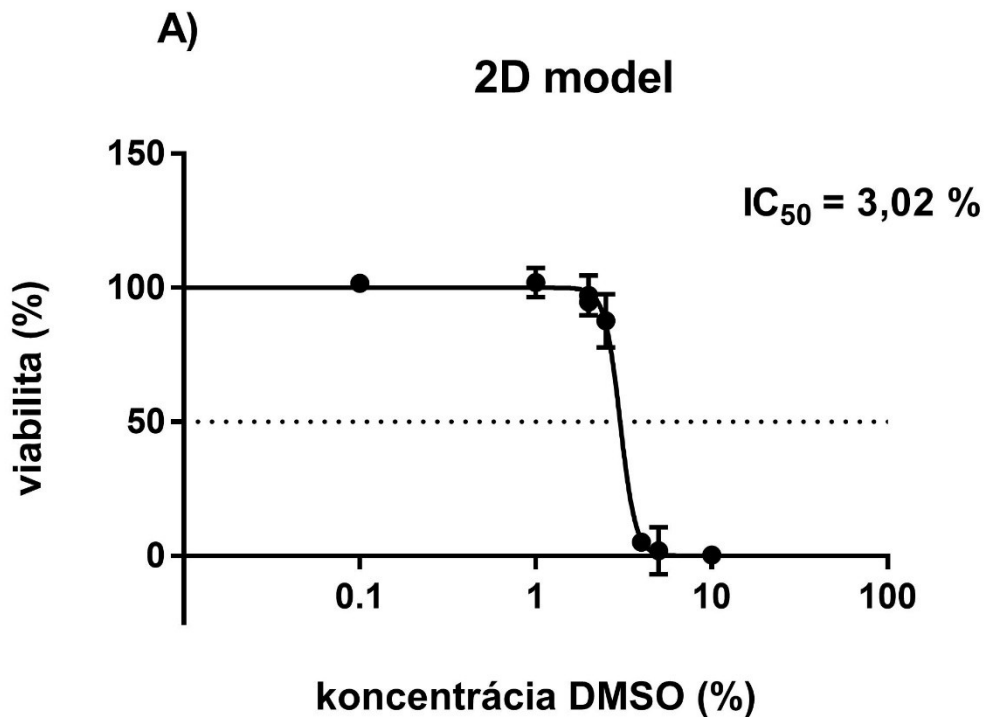
5.2.8 Vyhodnotenie experimentálnych hodnôt

Získané experimentálne hodnoty sme štatisticky spracovali v programe Microsoft Excel 2010 pre 2D model, 3D model a kontrolu. Z údajov absorbanie v triplikátoch sme v rámci jednotlivých koncentrácií vypočítali ich priemer, smerodajnú odchýlku a relatívnu smerodajnú odchýlku vzorcom $[(\text{smerodajná odchýlka} * 100)/\text{priemer}]$. Prostredníctvom programu GraphPad Prism sme vyhodnotili koncentračnú závislosť cytotoxicity. Pomocou hodnôt koncentrácie, percentuálnej životaschopnosti a relatívnej smerodajnej odchýlky bol zostrojený graf závislosti životaschopnosti (os Y) na logaritme koncentrácie (os X). Pomocou modelu nelineárnej regresie sme získali hodnotu IC₅₀. Je to hodnota vyjadrujúca koncentráciu testovanej látky, ktorá spôsobí inhibíciu životaschopnosti na 50 % zo 100 % životaschopnosti. Čím nižšiu hodnotu IC₅₀ má testovaná látka, tým je toxickejšia na bunky.

6 Výsledky

6.1 Optimalizácia koncentrácie DMSO

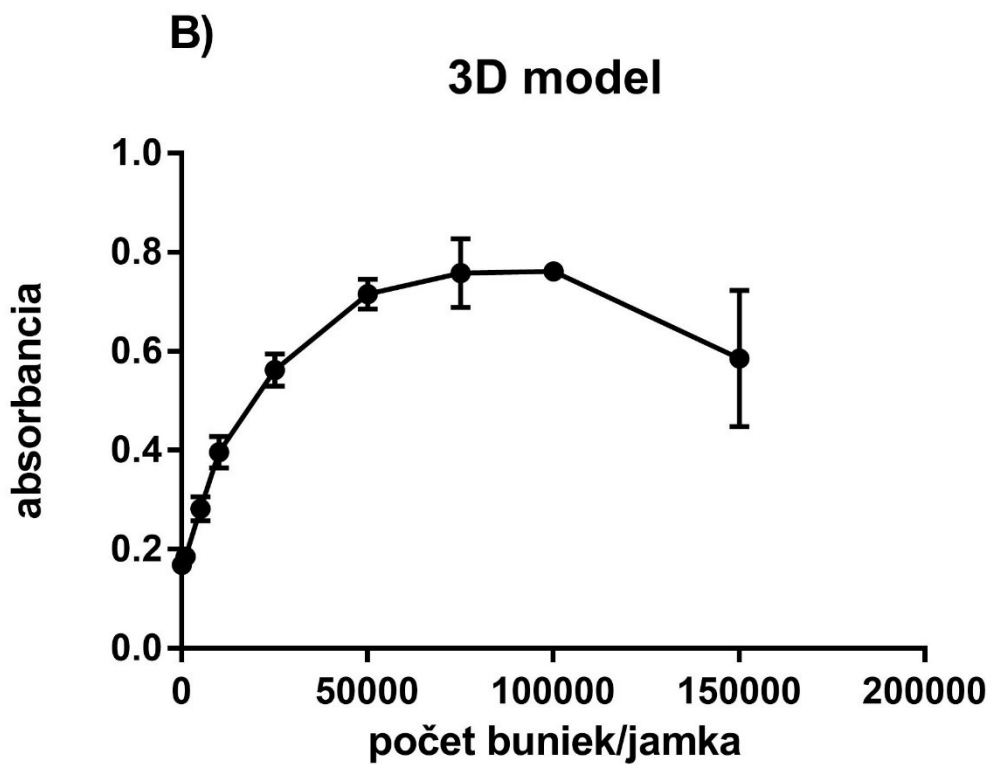
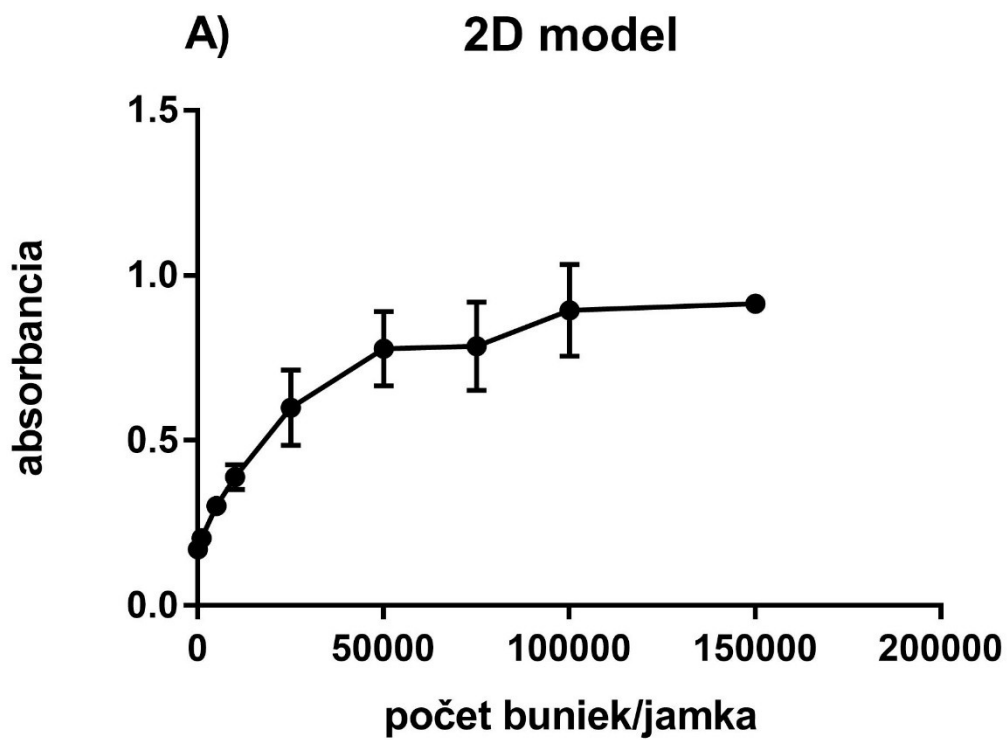
Pred vykonaním experimentov s testovanými látkami bolo nutné stanoviť možné cytotoxické pôsobenie rozpúšťadla DMSO na bunky. Testovalo sa koncentračné rozmedzie DMSO (0,5 % – 10 %) po 24-hodinovej inkubácii s bunkami. Obrázok 16 zobrazuje konkrétne koncentrácie DMSO a ich cytotoxický účinok. So zvyšujúcou sa koncentráciou DMSO bola znižovaná životaschopnosť buniek. V závislosti od týchto výsledkov bola v nasledujúcich experimentoch použitá 1 % koncentrácia DMSO rozpúšťadla.



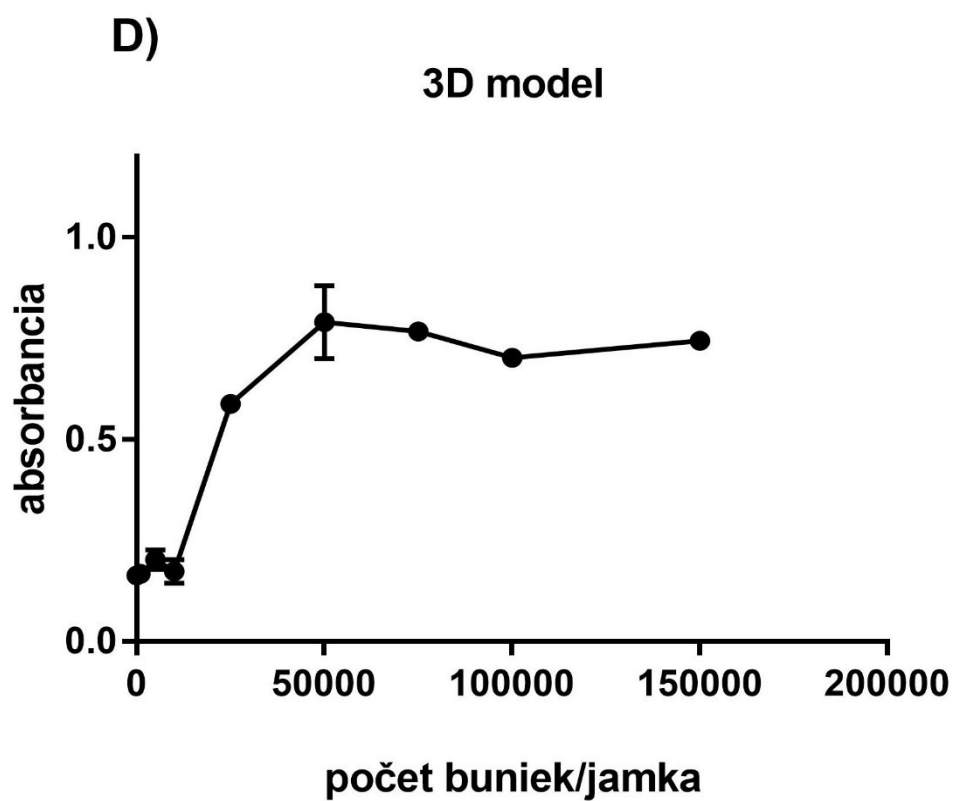
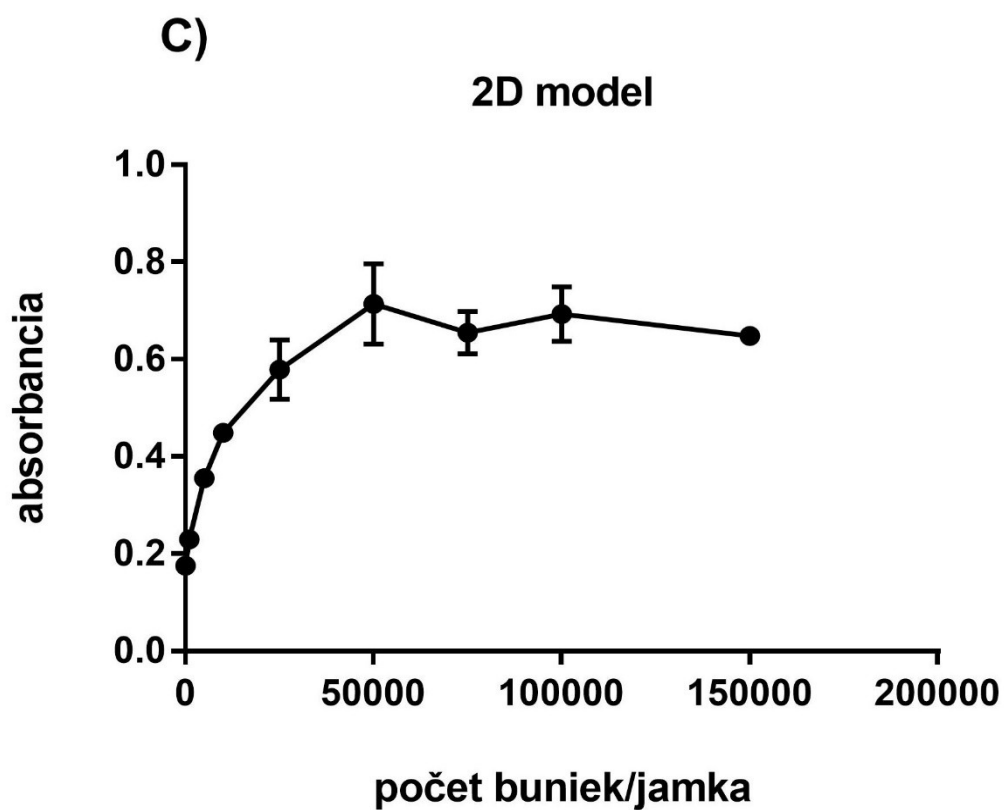
Obr. 16 Cytotoxický účinok DMSO na HepG2 bunky testovaný pomocou metódy CellTiter 96[®]. Bunky i kontroly boli inkubované v 2D (A) a 3D (B) modeli v triplikátoch za požadovaných podmienok (24 hod, 37 °C, 5 % CO₂ atmosféra) a pri zvyšujúcej sa koncentrácii DMSO (0,5 % – 10 %). Hodnoty sú prezentované ako aritmetické priemery ± SD nameraných výsledkov. Z grafu závislosti životaschopnosti (%) na koncentrácii DMSO bola zistená IC_{50} .

6.2 Stanovenie linearity bunkovej odpovede

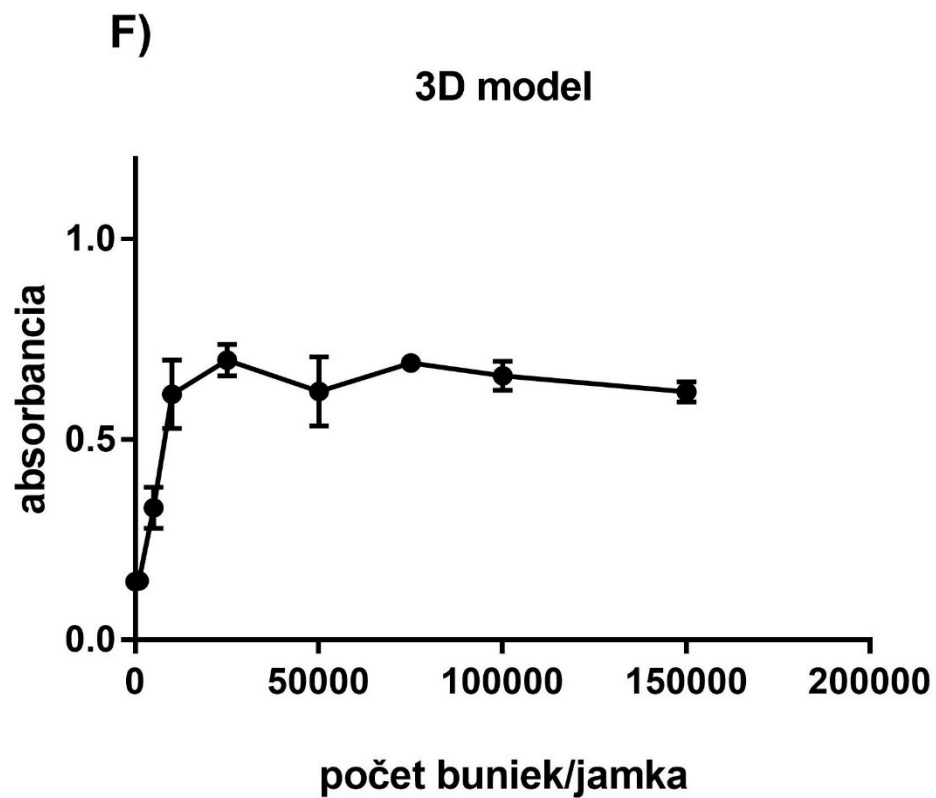
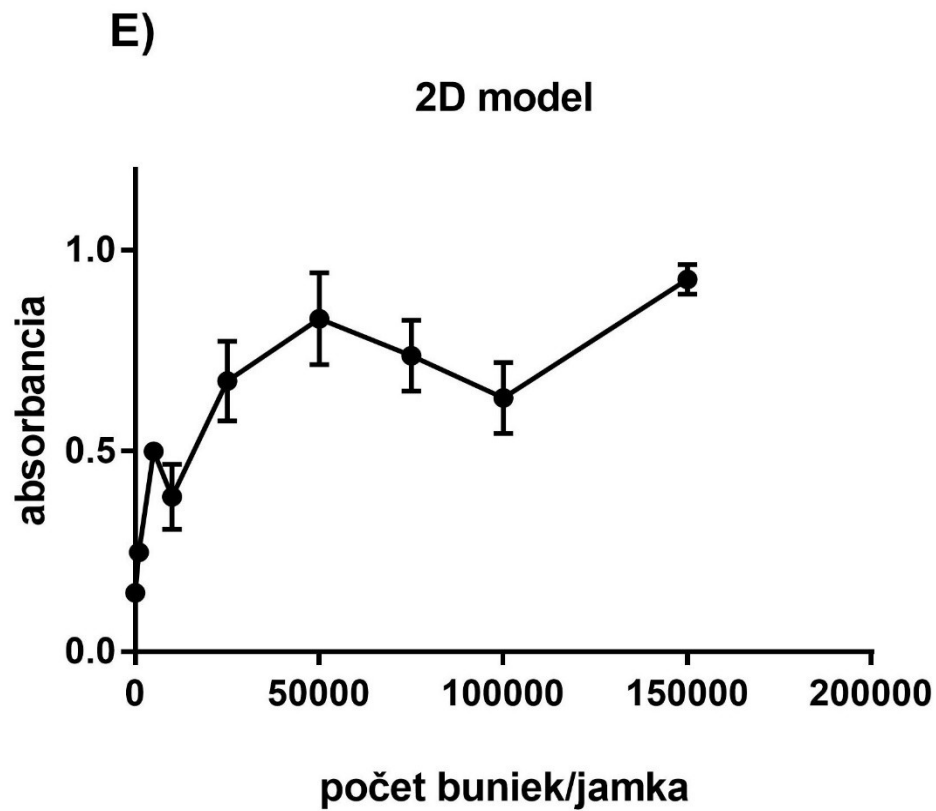
Linearita bunkovej odpovede bola hodnotená pomocou metódy CellTiter 96[®]. Skúmali sme linearitu absorbancie na základe množstva nasadených buniek. Na obrázkoch 17 – 19 je znázornená závislosť absorbancie na zvyšujúcom sa počte buniek hodnotená po časových intervaloch 24 h (Obr. 17), 48 h (Obr. 18) a 72 h (Obr. 19). Z grafov je zrejmé, že najlepšie výsledky boli dosiahnuté u 2D a 3D modeloch po kratšej dobe inkubácie a pri menšom počte nasadených buniek. Po prvom dni inkubácie (Obr. 17 A a 17 B) sa v oboch prípadoch tento vzťah javil ako lineárny pri použití menšieho počtu buniek (asi do 50 000 buniek na jamku). Pre nasledujúce experimenty sme teda zvolili inkubáciu 24 h a 50 000 buniek na jamku.



Obr. 17 Linearita bunkovej odpovede po prvom dni (inkubácia 24 h) stanovená pomocou CellTiter 96[®] na 2D (A) a 3D (B) bunkovom modeli. Bunky boli inkubované v triplicátach. Hodnoty sú prezentované ako aritmetické priemery \pm SD nameraných výsledkov.



Obr. 18 Linearita bunkovej odpovede po druhom dni (inkubácia 48 hod) stanovená pomocou CellTiter 96[®] na 2D (C) a 3D (D) bunkovom modeli. Bunky boli inkubované v triplikátoch. Hodnoty sú prezentované ako aritmetické priemery \pm SD nameraných výsledkov.

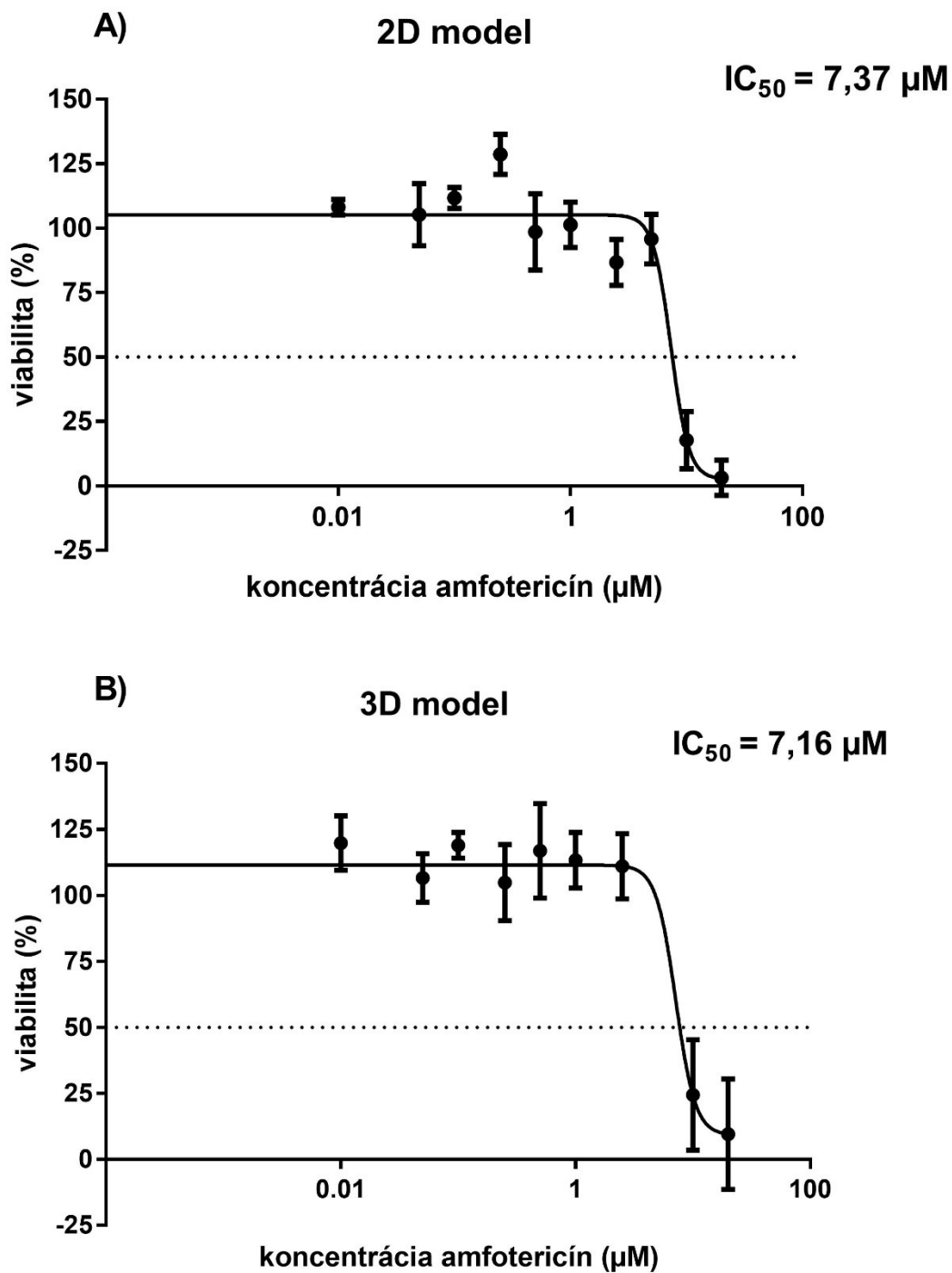


Obr. 19 Linearita bunkovej odpovede po treťom dni (inkubácia 72 h) stanovená pomocou CellTiter 96[®] na 2D (E) a 3D (F) bunkovom modeli. Bunky boli inkubované v triplikátoch. Hodnoty sú prezentované ako aritmetické priemery \pm SD nameraných výsledkov.

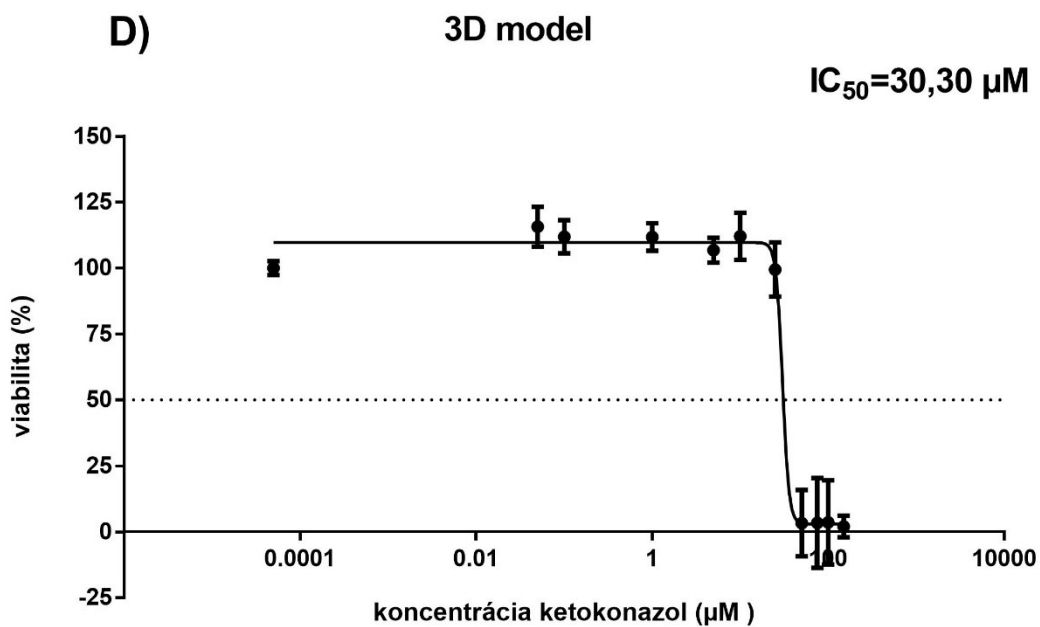
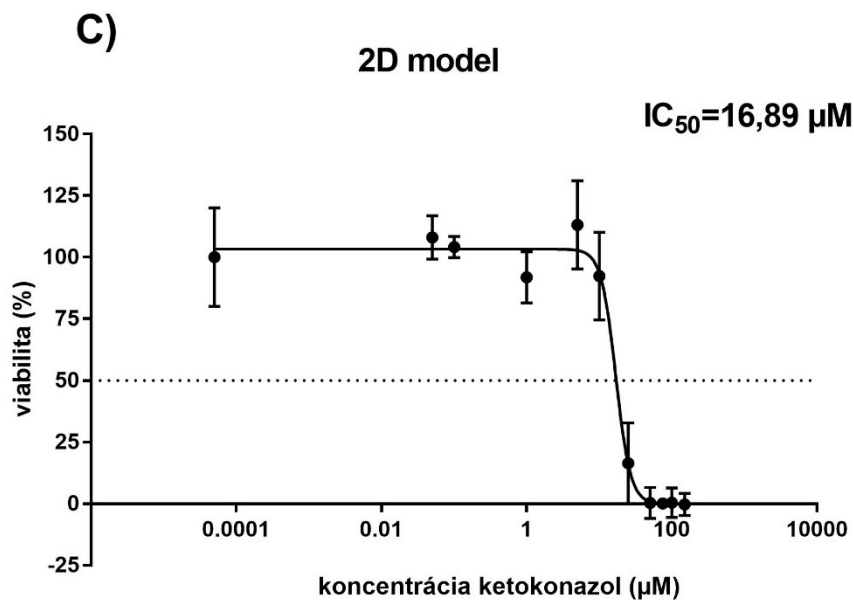
6.3 Stanovenie cytotoxicity pomocou CellTiter 96[®]

Pre zistenie toxikologického parametru IC_{50} sme testovali cytotoxické pôsobenie jednotlivých látok na životaschopnosť HepG2 buniek počas 24-hodinovej inkubácie.

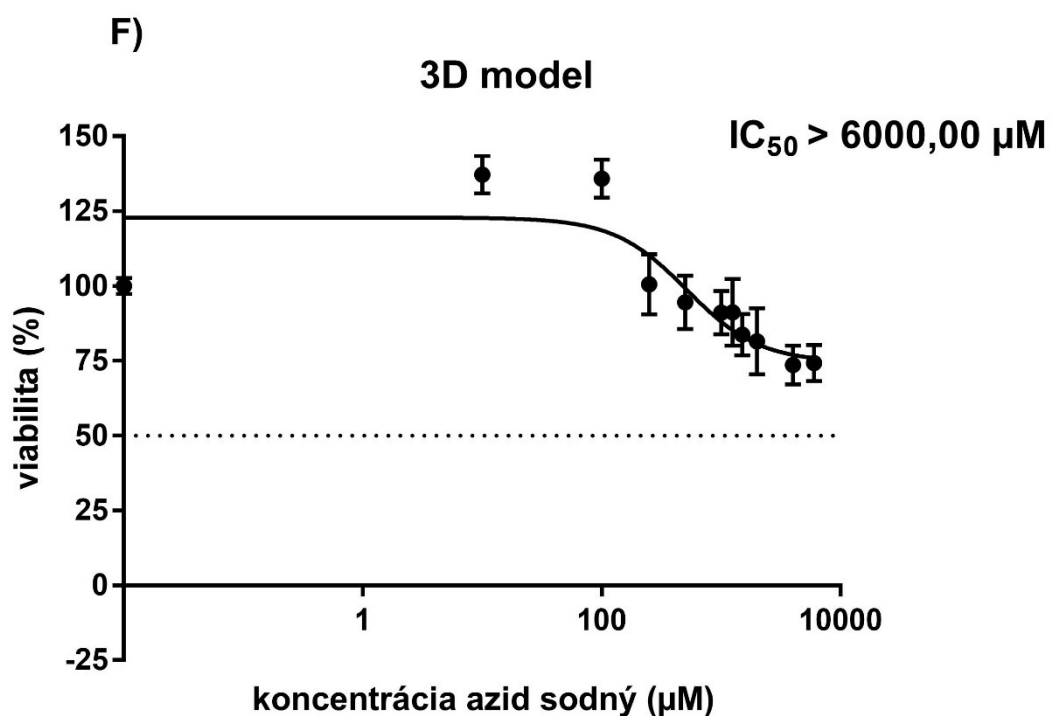
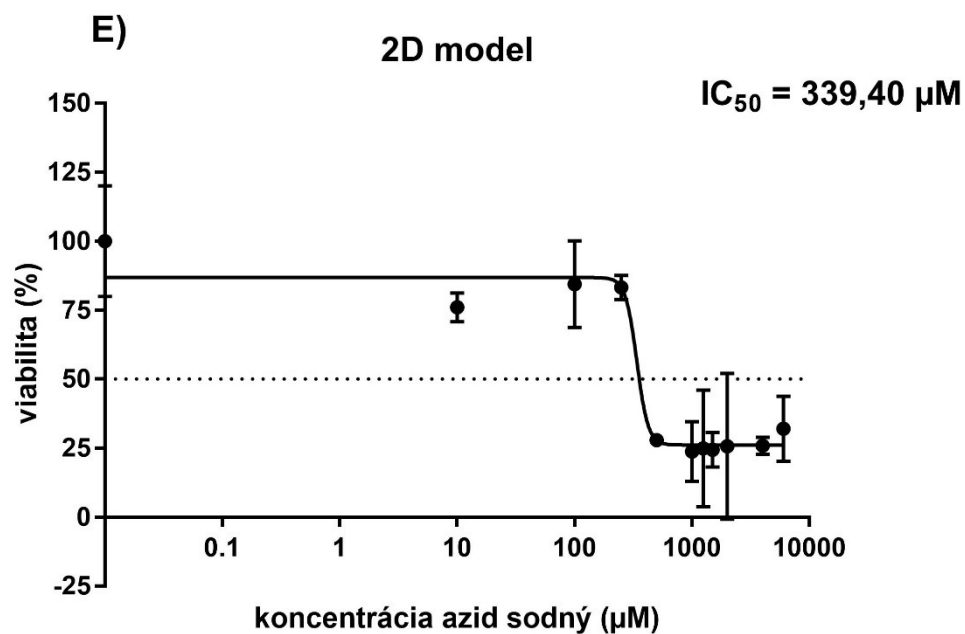
Na nasledujúcich obrázkoch 20 – 30 sú grafy, ktoré znázorňujú závislosť životaschopnosti buniek HepG2 (%) na rastúcej koncentrácii testovaných látok na HepG2 bunky. Koncentrácia xenobiotík (μM alebo mM) je vyjadrená ako logaritmická hodnota.



Obr. 20 Cytotoxický účinok amfotericínu na HepG2 bunky testovaný pomocou CellTiter 96[®] na úrovni 2D (A) a 3D (B) modelu. Bunky i kontroly boli inkubované v triplikátoch pri zvyšujúcej sa koncentrácii amfotericínu. Inkubácia prebiehala 24 hod. pri 37 °C a 5 % CO₂ atmosfére. Hodnoty sú prezentované ako aritmetické priemery \pm SD nameraných výsledkov. Z výsledného grafu bola odčítaná IC_{50} pre amfotericín.

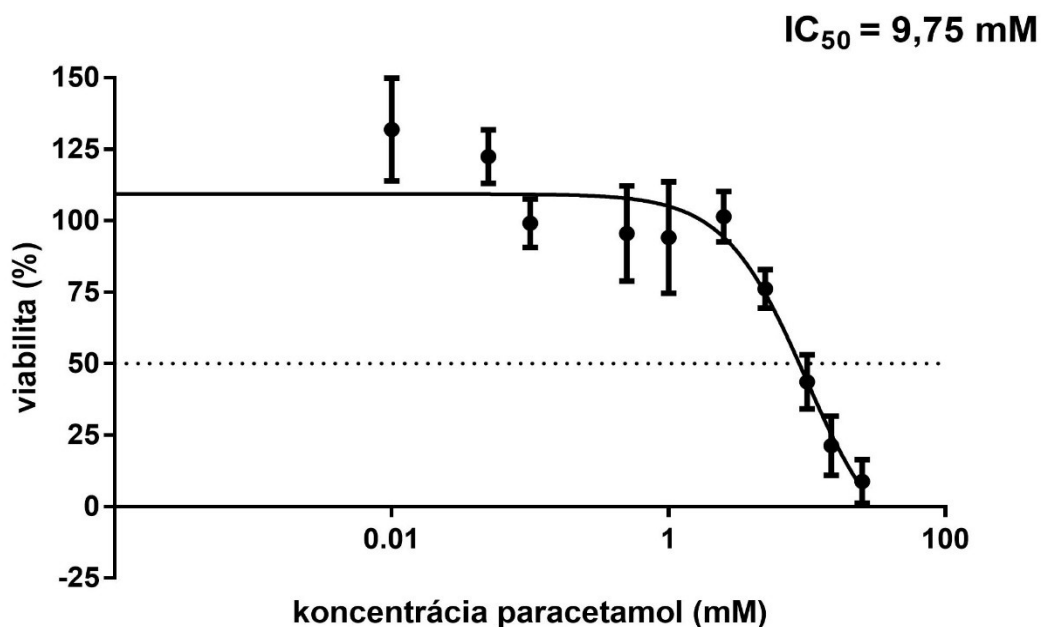


Obr. 21 Cytotoxický účinok ketokonazolu na HepG2 bunky testovaný pomocou CellTiter 96[®] na úrovni 2D (C) a 3D (D) modelu. Bunky i kontroly boli inkubované v triplikátoch pri zvyšujúcej sa koncentrácii ketokonazolu. Inkubácia prebiehala 24 h pri 37 °C a 5 % CO₂ atmosfére. Hodnoty sú prezentované ako aritmetické priemery ± SD nameraných výsledkov. Z výsledného grafu bola odčítaná IC₅₀ pre ketokonazol.

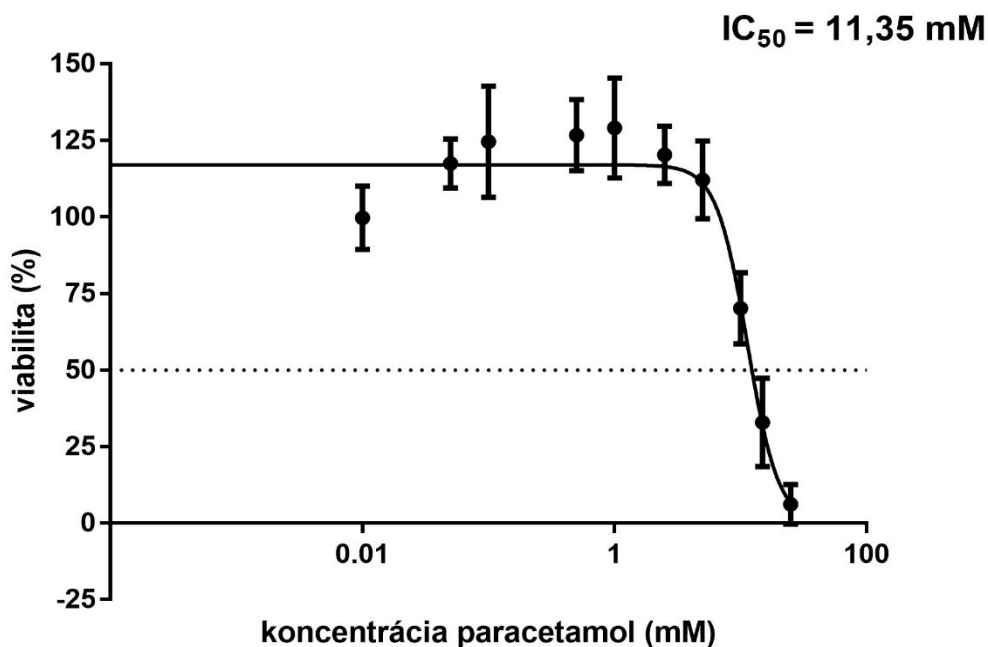


Obr. 22 Cytotoxický účinok azidu sodného na HepG2 bunky testovaný pomocou CellTiter 96® na úrovni 2D (E) a 3D (F) modelu. Bunky i kontroly boli inkubované v triplikátoch pri zvyšujúcej sa koncentrácii azidu sodného. Inkubácia prebiehala 24 h pri 37 °C a 5 % CO₂ atmosfére. Hodnoty sú prezentované ako aritmetické priemery \pm SD nameraných výsledkov. Z výsledného grafu bola odčítaná IC_{50} pre azid sodný.

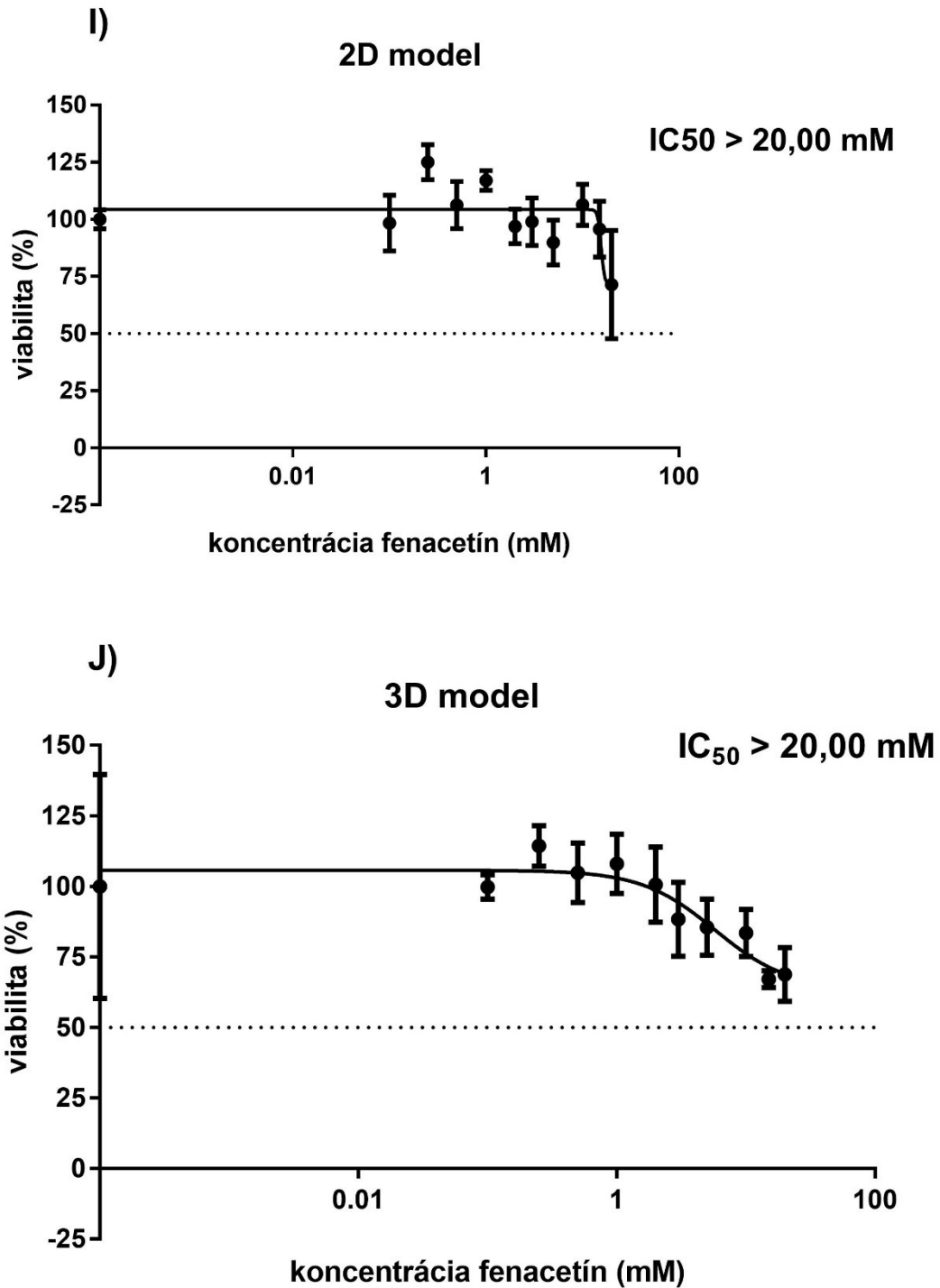
G) 2D model



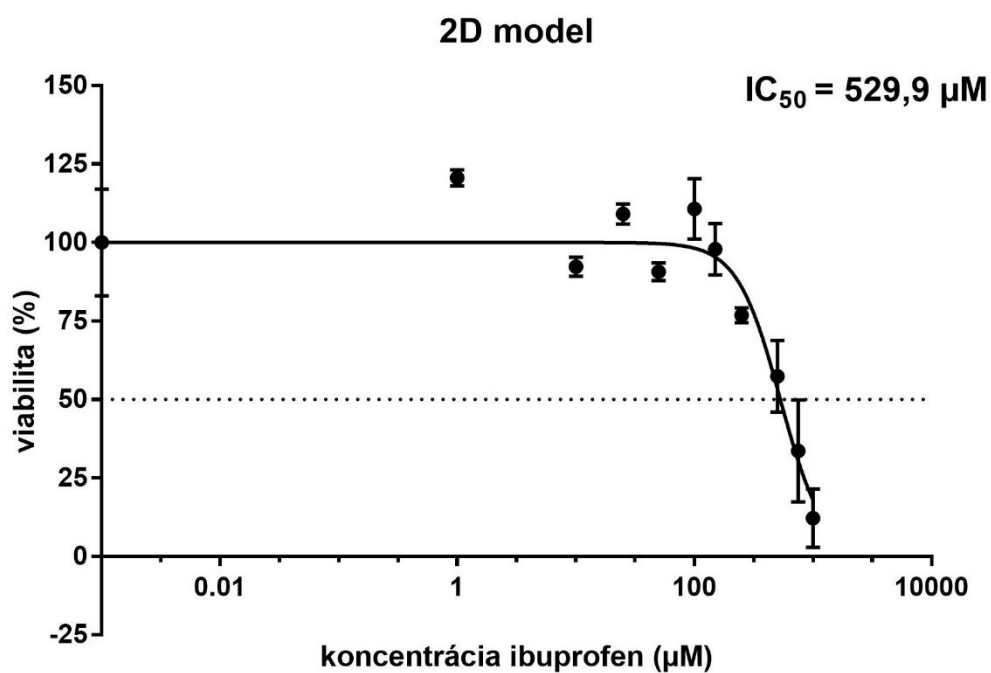
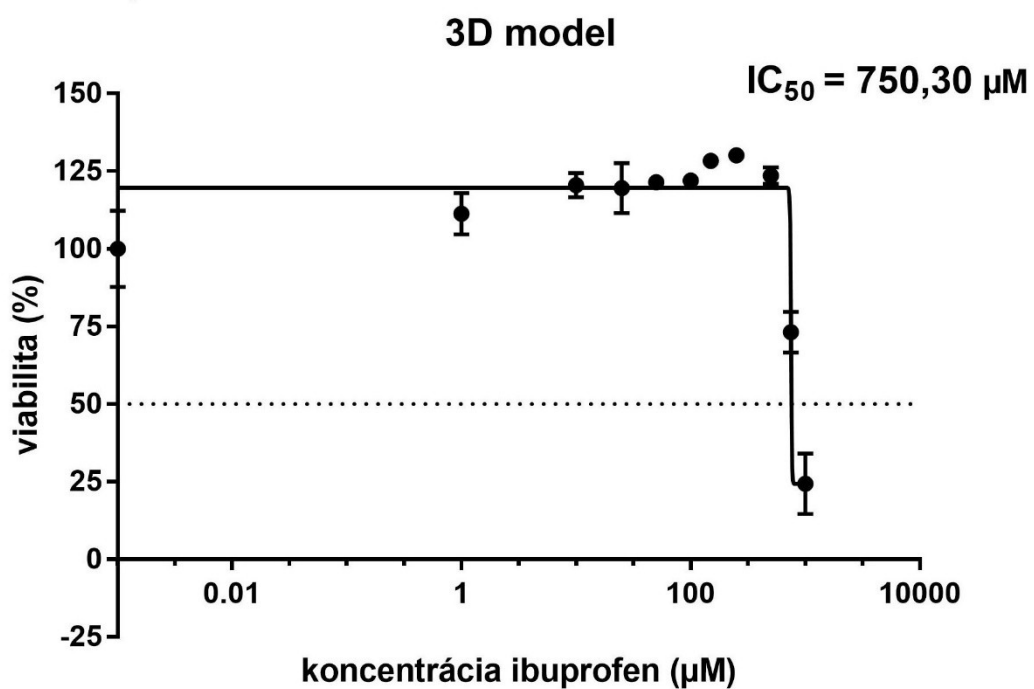
H) 3D model



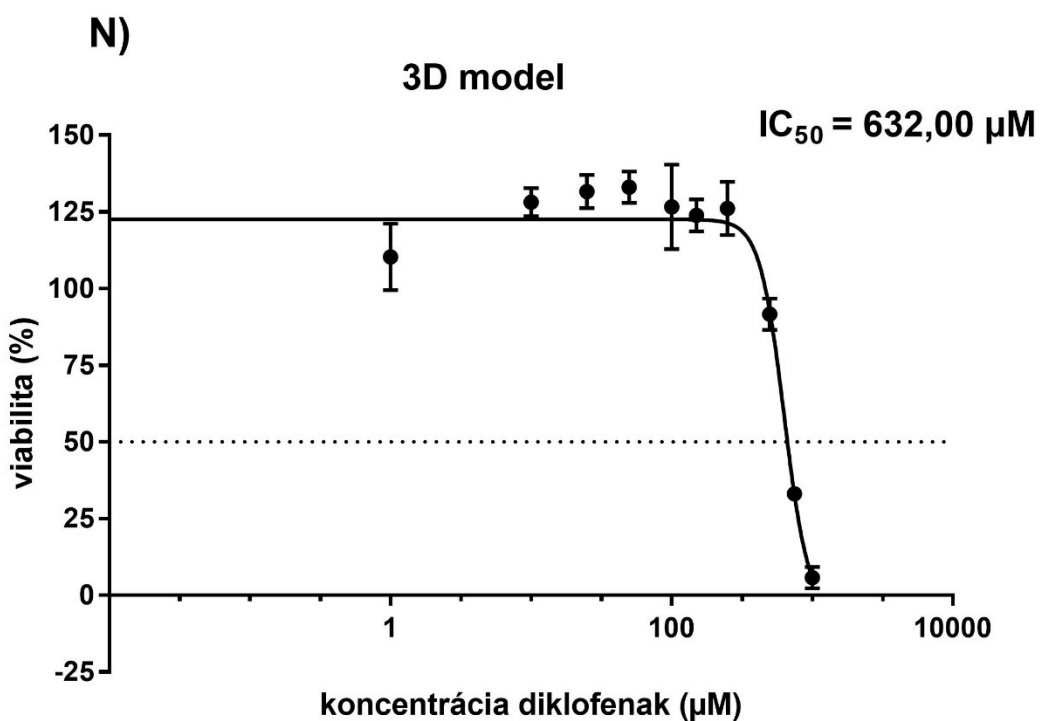
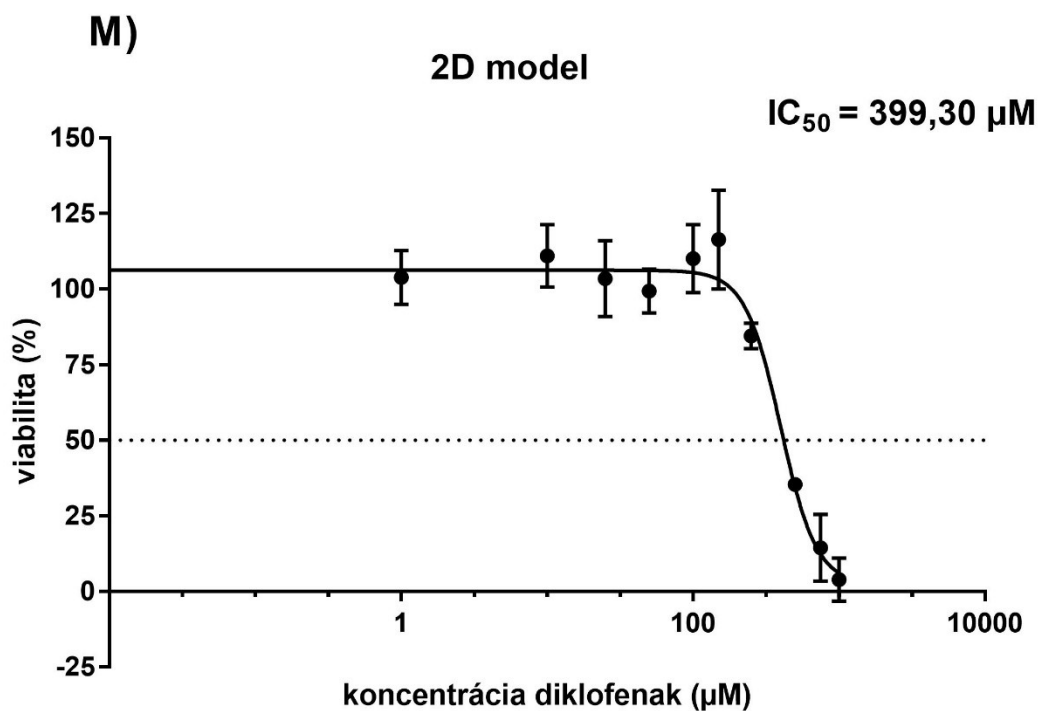
Obr. 23 Cytotoxický účinok paracetamolu na HepG2 bunky testovaný pomocou CellTiter 96® na úrovni 2D (G) a 3D (H) modelu. Bunky i kontroly boli inkubované v triplikátoch pri zvyšujúcej sa koncentrácii paracetamolu. Inkubácia prebiehala 24 h pri 37 °C a 5 % CO₂ atmosfére. Hodnoty sú prezentované ako aritmetické priemery ± SD nameraných výsledkov. Z výsledného grafu bola odčítaná IC₅₀ pre paracetamol.



Obr. 24 Cytotoxický účinok fenacetínu na HepG2 bunky testovaný pomocou CellTiter 96[®] na úrovni 2D (I) a 3D (J) modelu. Bunky i kontroly boli inkubované v triplikátoch pri zvyšujúcej sa koncentrácii fenacetínu. Inkubácia prebiehala 24 h pri 37°C a 5% CO₂ atmosfére. Hodnoty sú prezentované ako aritmetické priemery ± SD nameraných výsledkov. Z výsledného grafu bola odčítaná IC₅₀ pre fenacetín.

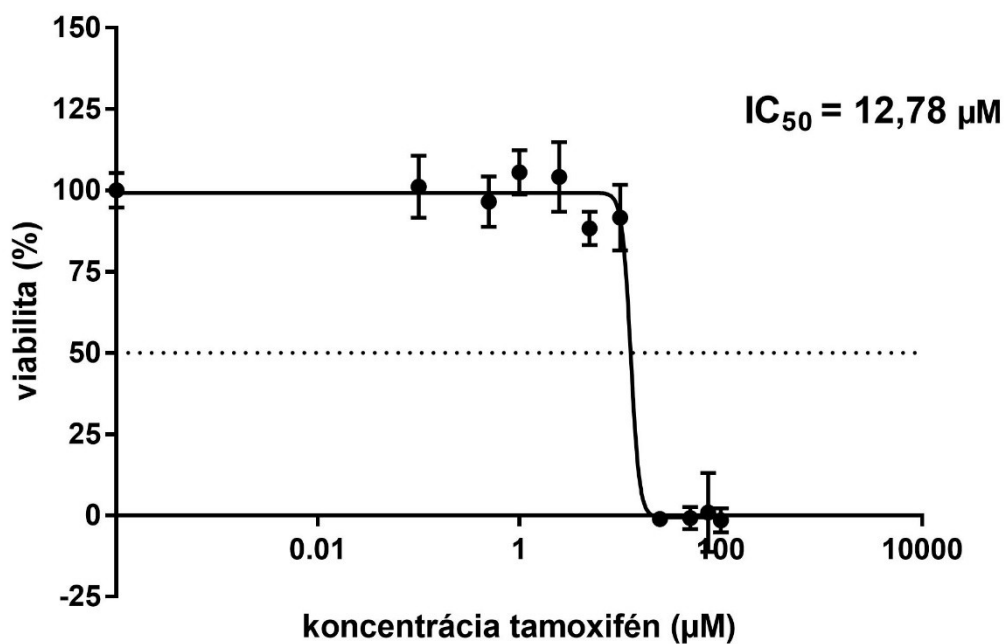
K)**L)**

Obr. 25 Cytotoxický účinok ibuprofenu na HepG2 bunky testovaný pomocou CellTiter 96[®] na úrovni 2D (K) a 3D (L) modelu. Bunky i kontroly boli inkubované v tripplikátoch pri zvyšujúcej sa koncentrácii ibuprofenu. Inkubácia prebiehala 24 h pri 37 °C a 5 % CO₂ atmosfére. Hodnoty sú prezentované ako aritmetické priemery \pm SD nameraných výsledkov. Z výsledného grafu bola odčítaná IC_{50} pre ibuprofen.

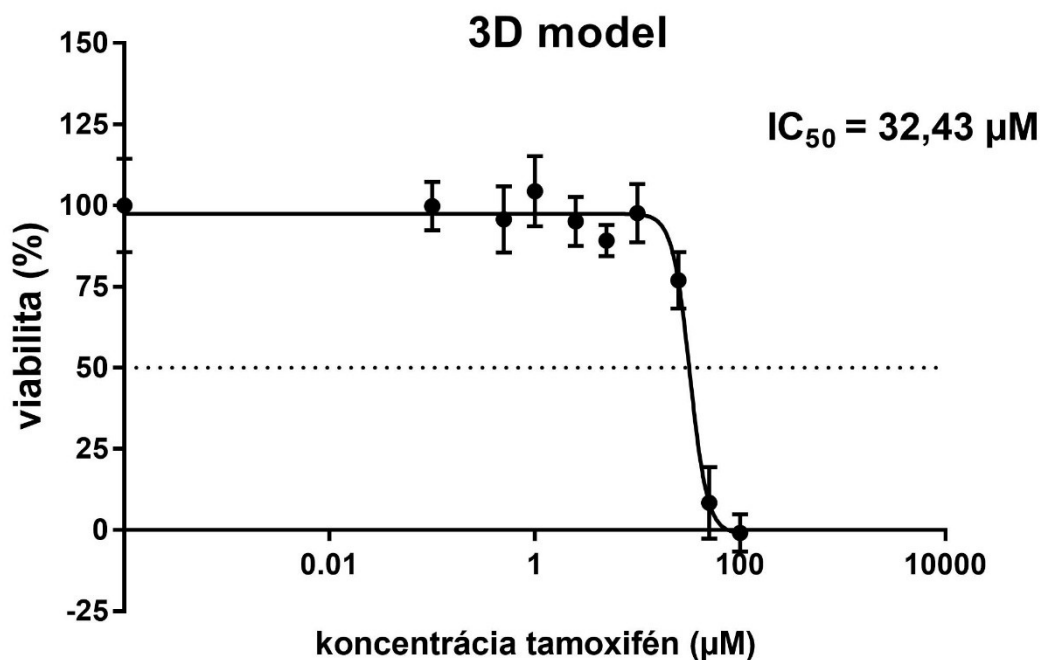


Obr. 26 Cytotoxický účinok diklofenaku na HepG2 bunky testovaný pomocou CellTiter 96[®] na úrovni 2D (M) a 3D (N) modelu. Bunky i kontroly boli inkubované v triplikátoch pri zvyšujúcej sa koncentrácii diklofenaku. Inkubácia prebiehala 24 h pri 37 °C a 5 % CO₂ atmosfére. Hodnoty sú prezentované ako aritmetické priemery \pm SD nameraných výsledkov. Z výsledného grafu bola odčítaná IC_{50} pre diklofenak.

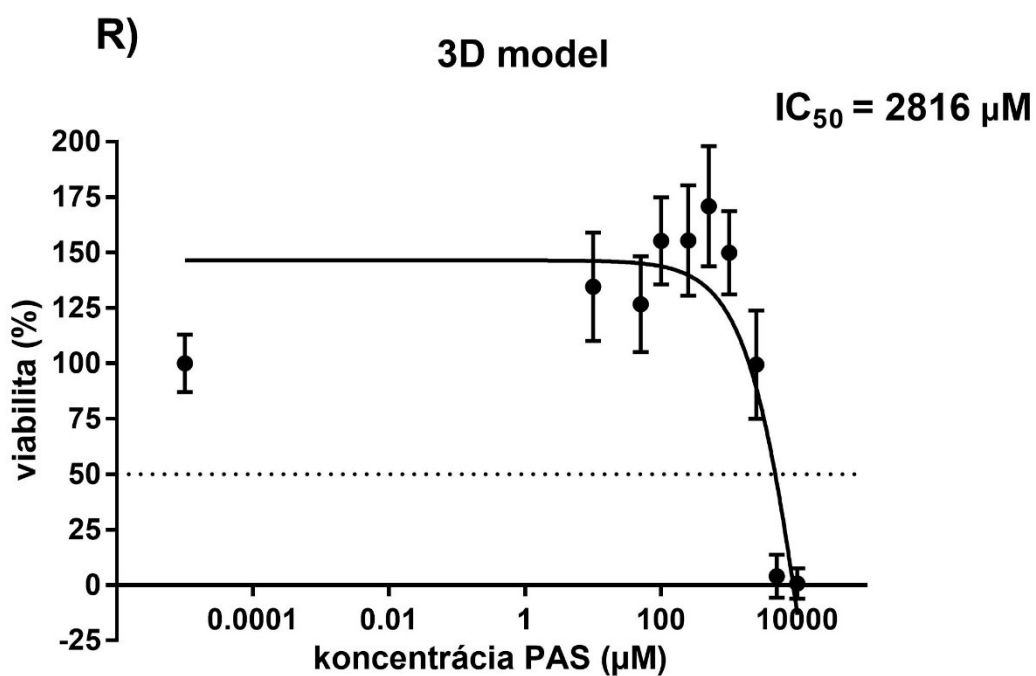
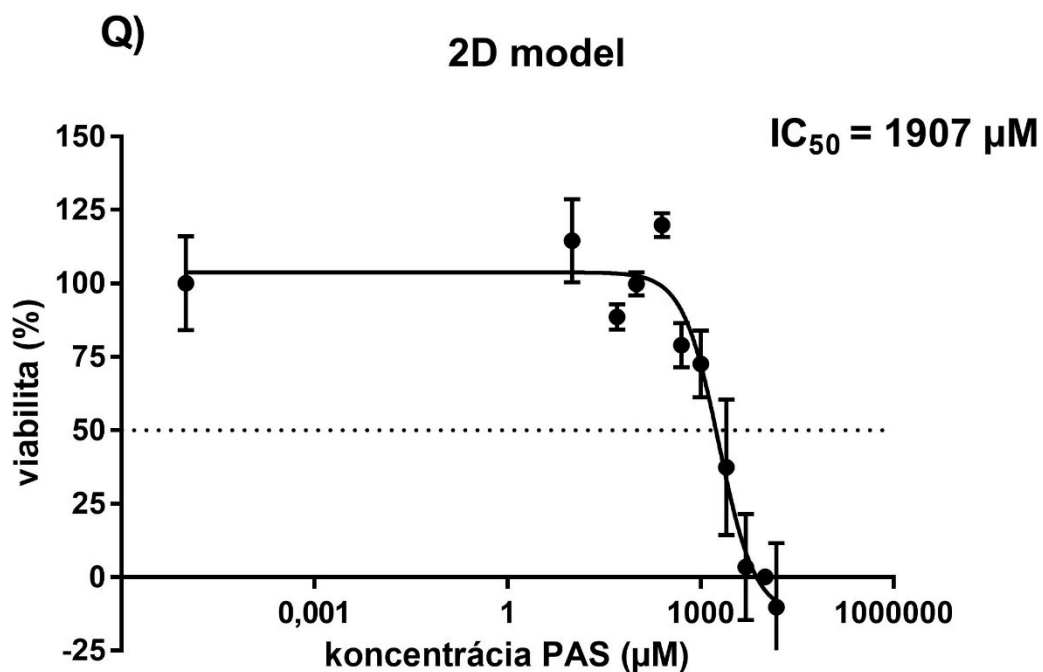
O) 2D model



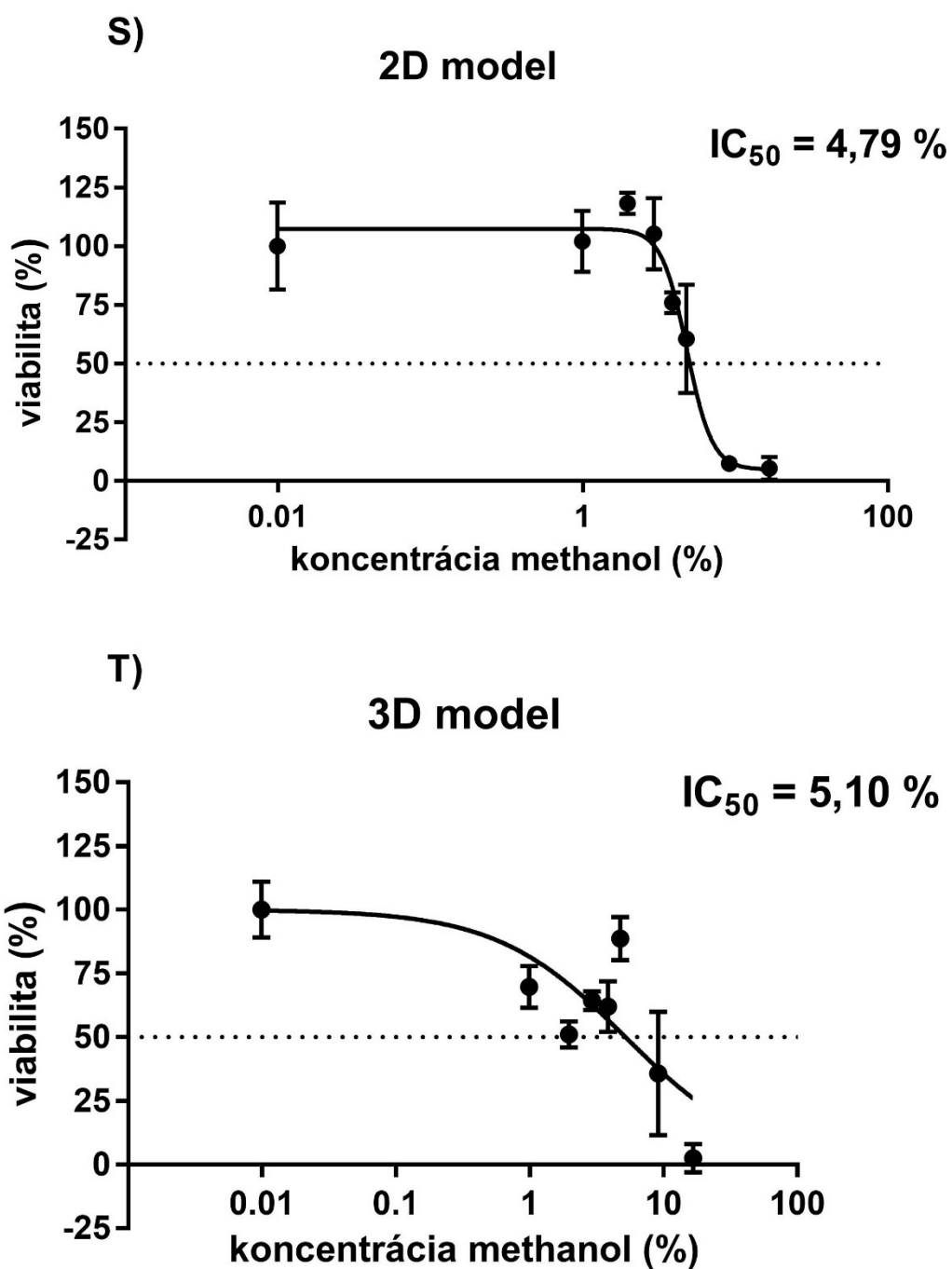
P) 3D model



Obr. 27 Cytotoxický účinok tamoxifénu na HepG2 bunky testovaný pomocou CellTiter 96[®] na úrovni 2D (O) a 3D (P) modelu. Bunky i kontroly boli inkubované v triplikátoch pri zvyšujúcej sa koncentrácii tamoxifénu. Inkubácia prebiehala 24 h pri 37 °C a 5 % CO₂ atmosfére. Hodnoty sú prezentované ako aritmetické priemery ± SD nameraných výsledkov. Z výsledného grafu bola odčítaná IC_{50} pre tamoxifén.



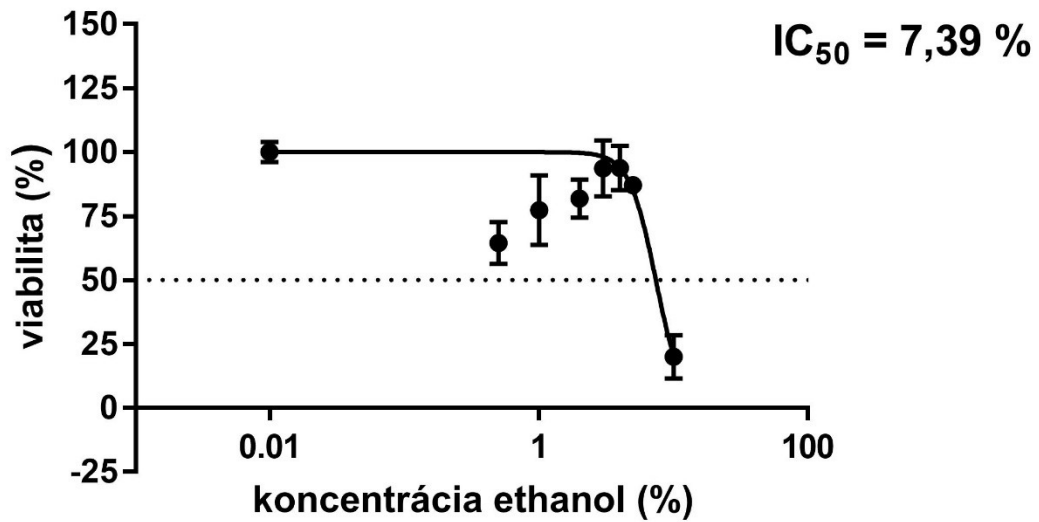
Obr. 28 Cytotoxický účinok PAS na HepG2 bunky testovaný pomocou CellTiter 96® na úrovni 2D (Q) a 3D (R) modelu. Bunky i kontroly boli inkubované v triplikátoch pri zvyšujúcej sa koncentrácii PAS. Inkubácia prebiehala 24 h pri 37 °C a 5 % CO₂ atmosfére. Hodnoty sú prezentované ako aritmetické priemery ± SD nameraných výsledkov. Z výsledného grafu bola odčítaná IC₅₀ pre PAS.



Obr. 29 Cytotoxický účinok methanolu na HepG2 bunky testovaný pomocou CellTiter 96[®] na úrovni 2D (S) a 3D (T) modelu. Bunky i kontroly boli inkubované v triplikátoch pri zvyšujúcej sa koncentrácii methanolu. Inkubácia prebiehala 24 h pri 37 °C a 5 % CO₂ atmosfére. Hodnoty sú prezentované ako aritmetické priemery ± SD nameraných výsledkov. Z výsledného grafu bola odčítaná IC₅₀ pre methanol.

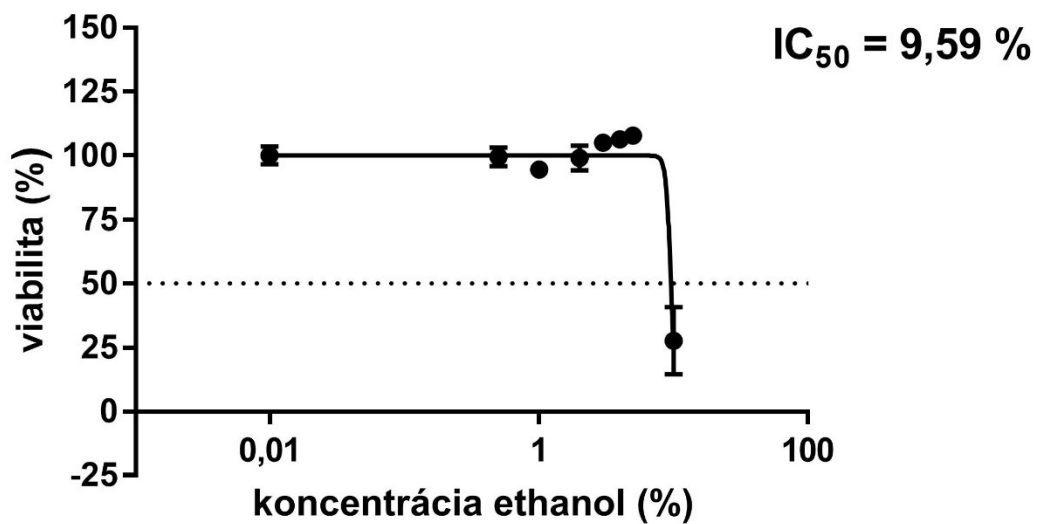
U)

2D model



V)

3D model



Obr. 30 Cytotoxický účinok ethanolu na HepG2 bunky testovaný pomocou CellTiter 96[®] na úrovni 2D (U) a 3D (V) modelu. Bunky i kontroly boli inkubované v triplikátoch pri zvyšujúcej sa koncentrácii ethanolu. Inkubácia prebiehala 24 h pri 37 °C a 5 % CO₂ atmosfére. Hodnoty sú prezentované ako aritmetické priemery ± SD nameraných výsledkov. Z výsledného grafu bola odčítaná IC₅₀ pre ethanol.

Tabuľka 7 a 8 uvádza ešte raz pre prehľadnosť súhrn všetkých zistených hodnôt IC_{50} testovaných látok s použitím 2D a 3D bunkových modelov HepG2.

Tab. 7 Súhrnný prehľad zistených hodnôt IC_{50} testovaných látok s použitím 2D a 3D bunkových modelov HepG2.

Názov látky	IC_{50} (μ M)	IC_{50} (μ M)
	2D model	3D model
Amfotericín	7,37	7,16
Tamoxifén	12,78	32,43
Ketokonazol	16,89	30,30
Azid sodný	323,90	>6000
Diklofenak	399,30	632,00
Ibuprofen	529,9	750,30
Kyselina p-amiosalicylová (PAS)	1907	2816
Paracetamol	9750	10880
Fenacetín	>20000	>20000

Tab. 8 Hodnoty IC_{50} (%) DMSO, methanolu a ethanolu.

Názov látky	IC_{50} (%)	IC_{50} (%)
	2D model	3D model
DMSO	3,02	4,41
Methanol	4,79	5,10
Ethanol	7,39	9,59

7 Diskusia

Hlavným orgánom pre metabolizmus liečiv a xenobiotík je pečeň, čím sa stáva hlavným cieľom pre poškodenie spôsobené liekmi. Na poškodení buniek pečene sa podieľajú niektoré molekulárne mechanizmy vyvolané priamo liečivom alebo jeho metabolitmi, dôsledkom čoho vznikajú akútne a chronické ochorenia pečene (Gomez -Lechon et al. 2014; Luckert et al. 2017).

Hepatotoxicita vyvolaná liečivami predstavuje veľký klinický problém. Predstavuje 50% všetkých prípadov akútneho zlyhania pečene (Dambach 2005).

Pre túto skutočnosť sme si na testovanie cytotoxicity vybrali bunkovú líniu HepG2 z ľudského hepatocelulárneho karcinomu. Táto nádorová línia má mnohé výhody ako schopnosť neobmedzene sa deliť, dostupnosť, ľahká manipulácia a nenáročné podmienky na kultiváciu (Švachová 2015). Vzhľadom na to, že tradičná 2D bunková kultúra má obmedzené schopnosti reprodukovať fyziologické podmienky (napr. vlastnosti buniek alebo chovanie buniek v organizme) sme sa rozhodli pre porovnanie použiť 3D bunkovú kultúru, ktorá viac napodobňuje podmienky *in vivo* (Edmondson et al. 2014). Študované látky tak boli testované na 2D aj na 3D modeli.

Na stanovenie cytotoxicity našich 11 testovaných látok sme použili štandardnú kolorimetrickú metódu CellTiter 96[®], ktorá je založená na redukčnom stanovení metabolicky aktívnych buniek. Dochádza k redukcii tetrazolínového činidla MTS na farebný produkt (formazan), ktorého množstvo je detekované absorbančne a je priamo úmerné životaschopným bunkám. Počas experimentov však môže byť pozadie absorbančie čiastočne ovplyvnené, a to typom použitého bunkového média, pH, typom séra, prípadne dobou vystavenia svetlu. Pri dlhšej expozícii svetla môže byť spontánnosť redukcie tetrazolínovej soli urýchlená (Anonym 2015). Aby sme zamedzili vzniku vysokého pozadia absorbančie, snažili sme sa činidlo vystavovať svetlu v čo najmenšej miere, aby nedochádzalo k zbytočnému ovplyvneniu výsledkov. Podľa výrobcu kitu CellTiter 96[®] odporúčaná doba inkubácie buniek s MTS činidlom je 1 – 4 hodiny (Anonym 2015). Počas prvého experimentu sme bunky spolu s činidlom inkubovali po dobu 4 h. Vzhľadom na evidentné rozdiely v absorbančii už počas 2-hodinovej inkubácie sme sa rozhodli skrátiť inkubačný čas ďalších experimentov. Pred testovaním cytotoxicity jednotlivých látok na 2D a 3D modeli bolo potrebné navoliť vhodný počet buniek na jamku testovacej doštičky. Zisťovali sme taký počet

buniek, aby medzi množstvom buniek v jednej jamke a absorbanciou bola lineárna závislosť. Linearita bunkovej odpovede hodnotená pomocou metódy CellTiter 96[®] sa prejavila asi v počte 50 000 buniek na jamku. Pri vyššom počte buniek na jamku dochádzalo k nelinearite, čo mohlo byť spôsobené prekrytím buniek navzájom alebo zníženým príjmom živín z kultivačného média. Pri experimentoch na 2D a 3D modeli sme teda použili hustotu 50 000 buniek na jamku v 200 µl kultivačného média.

Ako indikátor miery toxicity testovaných látok bol zvolený parameter IC₅₀. Tento parameter predstavuje hodnotu koncentrácie látky, ktorá vyvolá 50 % maximálne bunkové poškodenie, teda smrť. Po odmeraní absorbancie boli za pomoci grafu odčítané IC₅₀ pre každú testovanú látku. S narastajúcou koncentráciou látok sa zvyšovala ich cytotoxicita a znižovala IC₅₀. Prostredníctvom tejto inhibičnej koncentrácie bolo možné porovnať látky medzi sebou na úrovni 2D modelu a 3D modelu a látok navzájom.

Vykonávanie testov cytotoxicity *in vitro* komplikovala zhoršená rozpustnosť testovaných látok vo vode. Pre takmer všetky testované látky (okrem azidu sodného, ktorého rozpustnosť bola lepšia vo vode) sme použili ako rozpúšťadlo zlúčeninu DMSO, ktorá je pre bunky všeobecne toxická. Aby sme zabránili tomuto toxickému pôsobeniu DMSO na bunky, museli sme u vykonávaných experimentov zaistiť, aby koncentrácia DMSO v inkubačnom médiu s požadovanou koncentráciou študovanej látky nepresahovala 1 % (Katrnošková 2017). Naše výsledky cytotoxického pôsobenia DMSO na bunky poukazujú, že koncentrácia 1 % DMSO ovplyvňuje viabilitu buniek len veľmi málo (Obr. 16). Súčasťou každého testu na cytotoxicitu bola preto veľmi dôležitá kontrolná vzorka buniek s 1 % DMSO, ktorá zaisťovala validitu experimentov.

Bunky HepG2 vykazovali cytotoxickú odpoveď na zvyšujúcu sa dávku koncentrácie testovanej látky. Odpovede sa líšili medzi 2D a 3D kultúrami. Všeobecne z našich výsledkov vyplýva, že bunky kultivované v 3D prostredí boli schopné viac tolerovať vyššie koncentrácie testovanej látky. Dôvodom môže byť skutočnosť, že bunky rastúce v 2D prostredí majú abnormálnu štruktúru a zvyčajne sú pod stresom, čím sa stávajú menej tolerantné k traumám. Zatiaľ čo bunky rastúce v 3D prostredí majú štruktúru pripomínajúcu svoje natívne prostredie, a preto sú menej náchylné na tlak prostredia. Dôkazy naznačujú, že úprava podmienok bunkového rastu môžu radikálne ovplyvniť správanie buniek v reakcii na chemické činidlá (Bokhari et al. 2007).

Jednou z testovaných terapeutických skupín boli antimykotiká. Na testovanie cytotoxicity *in vitro* sme si vybrali látky amfotericín B a ketokonazol. Z výsledkov je zrejmé, že vykazovali rádovo vyšší cytotoxický potenciál na 2D a 3D modeli HepG2 buniek v porovnaní s ostatnými testovanými látkami. Z ich chemickej štruktúry (Obr. 9– 10) môžeme vyvodit', že ide o lipofilnejšie látky v porovnaní s ostatnými testovanými látkami, čo im umožňuje jednoduchší prienik do buniek, a tým zvýšenú toxicitu na ich funkcie.

Podľa hodnoty IC_{50} testovaných antimykotík na 2D a 3D kultúre vykazoval vyššiu cytotoxicitu amfotericín B než ketokonazol.

U amfotericínu B sa hodnoty IC_{50} pre 2D model (7,37 μM) a 3D model (7,16 μM) HepG2 buniek výrazne nelíšili. V súlade s našimi výsledkami taktiež mnohé štúdie ukazujú, že bunková viabilita v 3D kultúre počas prvých dní (1 – 5 dní) nie je signifikantne odlišná v porovnaní s 2D kultúrou (*Edmondson et al. 2014*).

Na druhej strane ketokonazol preukázal pôsobením na bunky dvojnásobne vyššie cytotoxické pôsobenie na 2D model ($IC_{50} = 16,89 \mu\text{M}$) v porovnaní s 3D modelom ($IC_{50} = 30,30 \mu\text{M}$). Zvýšenú rezistenciu voči liečivám v 3D kultúre môžeme prisudzovať ich obmedzenej fúzii cez sféroidy a hypoxii, o ktorej sa ukázalo, že vedie k aktivácii génov, ktoré sa podieľajú na prežívaní buniek a k citlivosti na liečivo (*Edmondson et al. 2014*).

Študovaná látka tamoxifén (antiestrogén) sa preukázala ako jedna z najcytotoxickjších spomedzi testovaných látok. Po 24-hodinovej inkubácii rôznych koncentrácií tamoxifénu s HepG bunkami sme zistili hodnotu IC_{50} 12,78 μM pre 2D model a 32,43 μM pre 3D model. Gao et al. (2016) uvádzajú, že aj krátkodobá liečba tamoxifénom môže spôsobovať hepatotoxicitu a zmenu morfológie na mikroskopickej a ultraštruktúrnej úrovni.

V rámci našich testovaných látok sa kyselina para-aminosalicylová javila ako jedna z najmenej cytotoxických látok. V liečbe tuberkulózy sa však používa zriedkavo a prednosť sa dáva novším silnejším látkam, ktoré majú vyššiu aktivitu (*Anonym 2017*).

Ďalšou sledovanou skupinou boli NSAIDs. Z našich zistených hodnôt IC_{50} vyplýva, že vyššiu cytotoxicitu na bunky vykazuje diklofenak (IC_{50} pre 2D model

je 399,30 μM a pre 3D model 632,00 μM) než ibuprofen (IC_{50} pre 2D model je 529,9 μM a pre 3D model 750,30 μM). Jedna zo štúdií, ktorá testovala toxicitu diklofenaku na bunkovej línii HepG2 počas 24-hodinovej inkubácie uvádza $\text{IC}_{50} = 763 \mu\text{M}$ (Bort et al. 1999). Táto hodnota pre 2D model vykazuje vyššiu odolnosť oproti IC_{50} zistenej na našom 2D a 3D modeli. Jedným z dôvodov môže byť, že v tejto štúdii bol použitý odlišný test (MTT test) na zistenie životaschopnosti buniek. Bunky s aktívnym metabolizmom prevádzajú farbivo MTT na produkt, ktorý je nerozpustný vo vode a pred zmeraním absorbancie musí byť rozpustený. Používajú sa na to rozličné metódy (Švachová 2015). V prípade nášho MTS testu nebola potrebná žiadna ďalšia úprava. V dôsledku rôznych podmienok alebo chemických úprav môže dochádzať k značným rozdielom v hodnotách zistených pomocou týchto rozdielnych testov (Wang et al. 2010). Ďalšou z vecí, ktorá môže ovplyvňovať rozdielnosť výsledkov je použitá hustota buniek na jamku. Pri našom testovaní bola použitá nižšia koncentrácia buniek na jamku ako u 2D tak u 3D štruktúry, čo uľahčovalo prienik študovanej látky k bunkám a ich následnú cytotoxicitu.

Zo všetkých testovaných látok sa najmenej toxicky prejavovali látky zo skupiny antipyretík – paracetamol a fenacetín. Fenacetín predstavuje približne jednu tretinu toxicity paracetamolu, čo nám potvrdili aj naše zistené hodnoty IC_{50} . Presnú hodnotu IC_{50} pre fenacetín sa nám však nepodarilo zistiť z dôvodu relatívne nízkej hepatotoxicity.

Naše zistené hodnoty IC_{50} pre paracetamol boli približne rovnaké ako uvádzajú iné štúdie. Pre 2D model bola zistená hodnota IC_{50} 9,75 mM a pre 3D model 10,88 mM. Pre porovnanie uvádzame hodnotu IC_{50} paracetamolu, ktorá bola zistená firmou Reinnervate. Po 24 hod. inkubácii s bunkovou líniovou HepG2 činila IC_{50} pre 2D model 11,9 mM a pre 3D model 15,7 mM (Reprocell³, Alvetex 2017). Z hodnôt vyplýva, že bunky kultivované v 3D štruktúre sú viac odolné voči toxickému pôsobeniu paracetamolu. Čo sa týka paracetamolu inkubačná doba 24 h môže byť príliš krátka na to, aby vyjadřila pečňové poškodenie spôsobené paracetamolom, ktoré vzniká s 2 – 4 dňovým oneskorením (Wang, 2010).

Poslednými testovanými látkami boli methanol a ethanol. Na základe výsledkov vykazoval methanol vyššiu cytotoxicitu než ethanol ako pre 2D, tak pre 3D model. Dôvodom je metabolizácia methanolu, pri ktorej vzniká formaldehyd a kyselina mravčia. Tieto metabolity sa vyznačujú vysokou toxicitou na pečňové bunky.

Vzhľadom na stály rozvoj hepatocytových 3D modelov *in vitro* sa nám nepodarilo nájsť niektoré údaje pre porovnanie našich zistených hodnôt. Všeobecne však môžeme usúdiť, že tento rozvoj prispieva k poskytnutiu presnejších údajov o cytotoxicite látok.

8 Záver

- K testovaniu cytotoxicity *in vitro* vybraných látok bola použitá kolorimetrická metóda CellTiter 96® meriaca metabolickú aktivitu buniek, pomocou ktorej sme úspešne stanovili parameter IC_{50} všetkých 11 testovaných látok.
- Na testovanie látok bola použitá štandardná línia pečeneových HepG2 buniek kultivovaná na monovrstve a 3D štruktúre využívajúca vysoko porézny materiál Alvetex® Scaffold. Stanovené hodnoty IC_{50} pre jednotlivé látky signalizujú vyššiu odolnosť HepG2 buniek v 3D štruktúre v porovnaní s 2D štruktúrou.
- V experimentoch sa nám úspešne podarilo stanoviť cytotoxicitu takmer všetkých látok. U látky fenacetínu (u 2D aj 3D modelu) a látky azidu sodného (u 3D modelu) ide o približnú hodnotu. Pravdepodobne táto hodnota leží mimo testované koncentračné rozmedzie látky.
- Najvyššiu cytotoxicitu na pečeneové bunky mal amfotericín B zo skupiny antimykotík a najmenej cytotoxicky pôsobil fenacetín zo skupiny antipyretík.

9 Použitá literatura

Abboud, G.,Kaplowitz, N. "Drug-induced liver injury", *Drug Saf* 2007, 30: 277-94.

Agundez, J.A., Lucena, M.I., Martinez, C., Andrade, R.J., Blanca, M., Ayuso, P., Garcia-Martin, E. "Assessment of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced hepatotoxicity", *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011,7: 817-28.

Al-Nasser, I.A. "Ibuprofen-induced liver mitochondrial permeability transition", *Toxicol Lett* 2000, 111: 213-8.

Baerg, R.D., Kimberg, D. V. "Centrilobular hepatic necrosis and acute renal failure in "solvent sniffers", *Ann Intern Med* 1970, 73: 713-20.

Becker, C.E. "Methanol poisoning", *J Emerg Med* 1983, 1: 51-8.

Berridge, M.V., Herst, P.M., Tan, A.S. "Tetrazolium dyes as tools in cell biology:new insights into their cellular reduction", *Biotechnol Annu Rev* 2005, 11: 127-52.

Berridge, M.V., Tan, A.S. "Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction", *Arch Biochem Biophys* 1993, 303: 474-82.

Bissell, D.M., Gores, G.J., Laskin, D.L., Hoofnagle, J.H. "Drug-induced liver injury: mechanisms and test systems", *Hepatology* 2001, 33: 1009-13.

Bjornsson, E., Jerlstad, P., Bergqvist, A., Olsson, R. "Fulminant drug-induced hepatic failure leading to death or liver transplantation in Sweden", *Scand J Gastroenterol* 2005, 40: 1095-101.

Björnsson, E.S. "Drug-induced liver injury: an overview over the most critical compounds", *Archives of Toxicology* 2015, 89: 327-34.

Blaauboer, B.J. "The applicability of in vitro-derived data in hazard identification and characterisation of chemicals", *Environmental toxicology and pharmacology* 2002, 11: 213-25.

Bokhari, M., Ross, J.C., Neil, R.C., Stefan, A.P. "Culture of HepG2 liver cells on three dimensional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge", *Journal of Anatomy* 2007, 211: 567-76.

Bort, R., Ponsoda, X., Jover, R., Gomez-Lechon, M.J., Castell, J.V. "Diclofenac toxicity to hepatocytes: a role for drug metabolism in cell toxicity", *J Pharmacol Exp Ther* 1999, 288: 65-72.

Capasso, J.M., Belén R.C., Tomás B., Christopher, J.R., Carlos J. "A colorimetric assay for determination of cell viability in algal cultures", *Biomolecular Engineering* 2003, 20: 133-38.

Castillo, M., Lam, Y.W., Dooley, M.A., Stahl, E., Smith, P.C. "Disposition and covalent binding of ibuprofen and its acyl glucuronide in the elderly", *Clin Pharmacol Ther* 1995, 57: 636-44.

Celli, J.P. et al.. "An imaging-based platform for high-content, quantitative evaluation of therapeutic response in 3D tumour models", *Sci Rep* 2014, 4: 3751.

Cerioti, L. et al. "Real-time assessment of cytotoxicity by impedance measurement on a 96-well plate", *Sensors and Actuators B: Chemical* 2007., 123: 769-78.

Cory, A.H., Owen, T.C., Barltrop, J.A., Cory, J.G. "Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture", *Cancer Commun* 1991, 3: 207-12.

Costa, A., Bruno, S., Vitor, S. "An evaluation of the latest in vitro tools for drug metabolism studies", *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2014, 10: 103-19.

Dambach, D.M., Andrews, B.A., Moulin, F. "New technologies and screening strategies for hepatotoxicity: use of in vitro models", *Toxicol Pathol* 2005, 33: 17-26.

Devlin, R.B., Mark, L.F., Andrew, J.G. "In vitro studies: what is their role in toxicology", *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 2005, 57 Suppl 1: 183-88.

Edmondson, R., Broglie, J.J., Adcock, A.F., Yang, L. "Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors", *Assay and Drug Development Technologies* 2014, 12: 207-18.

Gao, F.F. et al. "Tamoxifen induces hepatotoxicity and changes to hepatocyte morphology at the early stage of endocrinotherapy in mice", *Biomedical Reports* 2016, 4: 102-06.

Garcia, R. LA et al. "A cohort study on the risk of acute liver injury among users of ketoconazole and other antifungal drugs", *Br J Clin Pharmacol* 1999, 48: 847-52.

Giri, S., Nieber, K., Bader, A. "Hepatotoxicity and hepatic metabolism of available drugs: current problems and possible solutions in preclinical stages", *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010, 6: 895-917.

Godoy, P. et al. "Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME", *Arch Toxicol* 2013, 87: 1315-530.

Gomez-Lechon, M. J., Tolosa, L., Conde, I., Donato, M.T. "Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs", *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2014, 10: 1553-68.

Guengerich, F. P. "Mechanisms of Drug Toxicity and Relevance to Pharmaceutical Development", *Drug metabolism and pharmacokinetics* 2011, 26: 3-14.

Haegler, P., Joerin, L., Krahenbuhl, S., Bouitbir, J. "Hepatocellular Toxicity of Imidazole and Triazole Antimycotic Agents", *Toxicol Sci* 2017, 157 (1): 183-195.

Haycock, J.W. "3D cell culture: a review of current approaches and techniques", *Methods Mol Biol* 2011, 695: 1-15.

Huang et al. "Peptide Hydrogelation and Cell Encapsulation for 3D Culture of MCF-7 Breast Cancer Cells", *PLOS ONE* 2013, 8: 59-482.

Hussaini, S.H., Farrington, E.A. "Idiosyncratic drug-induced liver injury: an overview", *Expert Opin Drug Saf* 2007, 6: 673-84.

Chakrabarti, R., Kundu, S., Kumar, S., Chakrabarti, R. "Vitamin A as an enzyme that catalyzes the reduction of MTT to formazan by vitamin C", *J Cell Biochem* 2000, 80: 133-8.

Chang, S., Lamm, S. "Human health effects of sodium azide exposure: a literature review and analysis", *Int J Toxicol* 2003, 22: 175-86.

Chudzik, B., Czernel, G., Miaskowski, A., Gagos, M. "Amphotericin B-copper(II) complex shows improved therapeutic index in vitro", *Eur J Pharm Sci* 2017, 97: 9-21.

Inselmann, G., Inselmann, U., Heidemann, H.T. "Amphotericin B and liver function", *Eur J Intern Med* 2002, 13: 288-92.

Jena, S.K., Suresh, S., Sangamwar, A.T. "Modulation of tamoxifen-induced hepatotoxicity by tamoxifen-phospholipid complex", *J Pharm Pharmacol* 2015, 67: 1198-206.

Justice, B.A., Badr, N.A., Felder, R.A. "3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays", *Drug Discov Today* 2009, 14: 102-7.

Kalantzi, L. et al. "Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: acetaminophen (paracetamol)", *J Pharm Sci* 2006, 95: 4-14.

Katrnášková Simona. Studium cytotoxicity potenciálních antituberkulotik s využitím vybraných metod na jaterní a ledvinné buněčné linní, Rigorózní Práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2017:70.

LeCluyse, E.L., Witek, R.P., Andersen, M.E., Powers, M.J. "Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing", *Crit Rev Toxicol* 2012, 42: 501-48.

Lee, W.M. "Drug-induced hepatotoxicity", *N Engl J Med* 2003, 349: 474-85.

Luckert, C. et al. "Comparative analysis of 3D culture methods on human HepG2 cells", *Arch Toxicol* 2017, 91: 393-406.

Mehta, G., Hsiao, A.Y., Ingram, M., Luker, G.D., Takayama, S. "Opportunities and Challenges for use of Tumor Spheroids as Models to Test Drug Delivery and Efficacy", *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2012, 164: 192-204.

Minato, Y. et al. "Mycobacterium tuberculosis folate metabolism and the mechanistic basis for para-aminosalicylic acid susceptibility and resistance", *Antimicrob Agents Chemother* 2015, 59: 5097-106.

Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Gillette, J.R., Brodie, B.B. "Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione", *J Pharmacol Exp Ther* 1973, 187: 211-7.

Niles, A.L., Moravec, R.A., Riss, T.L.. "In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening", *Curr Chem Genomics* 2009, 3: 33-41.

O'Grady, J.G., Alexander, G.J., Hayllar, K.M., Williams, R.. "Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure", *Gastroenterology* 1989, 97: 439-45.

O'Grady, J.G., Schalm, S.W., Williams, R. "Acute liver failure: redefining the syndromes", *Lancet* 1993, 342: 273-5.

Ribeiro, M.P., Santos, A.E., Custodio, J.B. "Mitochondria: the gateway for tamoxifen-induced liver injury", *Toxicology* 2014, 323: 10-8.

Riss, et al. *Cell Viability Assays, Assay Guidance Manual* (Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences), 2013, 1-33.

Riss, T.L., Moravec, R.A. "Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays", *Assay Drug Dev Technol* 2004, 2: 51-62.

Rubenstein, J.H., Laine, L. "Systematic review: the hepatotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs", *Aliment Pharmacol Ther* 2004, 20: 373-80.

Sau, K., Mambula, S.S., Latz, E., Henneke, P., Golenbock, D.T., Levitz, S.M. "The antifungal drug amphotericin B promotes inflammatory cytokine release by a Toll-like receptor- and CD14-dependent mechanism", *J Biol Chem* 2003, 278: 37561-8.

Scudiero, D.A. et al. "Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines", *Cancer Res* 1988, 48: 4827-33.

Seeff, L.B., Cuccherini, B.A., Zimmerman, H.J., Adler, E., Benjamin S.B. "Acetaminophen hepatotoxicity in alcoholics. A therapeutic misadventure", *Ann Intern Med* 1986, 104: 399-404.

Shield, K., Ackland, M.L., Ahmed, N., Rice, G.E... "Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology", *Gynecol Oncol* 2009, 113: 143-8.

Sobral, J.M., Caridade, S.G., Sousa, R.A., Mano, J.F., . Reis R.L. "Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency", *Acta Biomater* 2011, 7: 1009-18.

Stacey, G. et al. *Cell culture methods for in vivo Toxicology* (Springer) , 2001, 88.

Suparna, S. "Culture and Assay Systems Used for 3D Cell Culture", *Corning* 2014, 1-19.

Švachová Tereza. Sutidium toxického účinku vybraných xenobiotik na buněčné úrovni, Diplomová Práce, Univerzita Karlova Farmaceutická fakulta, Hradec Králové", 2015:62.

Terzi, M. et al. "The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in neurological diseases", *J Chem Neuroanat* 2017, 1-13

Venkatraman, A. et al.. "Modification of the mitochondrial proteome in response to the stress of ethanol-dependent hepatotoxicity", *J Biol Chem* 2004, 279: 22092-101.

Vinci, M. et al. "Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation", *BMC Biology* 2012, 10: 29.

Wang, P., Henning, S.M., Heber, D. "Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols", *PLOS ONE* 2010, 5: 10-202.

Xu, J.J., Diaz, D., O'Brien, P.J. "Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential", *Chem Biol Interact* 2004, 150: 115-28.

Zietarska, M. et al. "Molecular description of a 3D in vitro model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC)", *Mol Carcinog* 2007, 46: 872-85.

Zimmerman, H.J. "*Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and Other Chemicals on the Liver*", 1999, 789.

Internetové zdroje

Anonym (2015). "TECHNICAL BULLETIN: CellTiter 96[®] AQueous, One Solution, Cell Proliferation Assay". Dostupné na URL: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol.pdf>, Prístup: November 2015.

Citácia v texte: (*Anonym 2015*)

Anonym (2017). "OVERVIEW: Antituberculosis Agents, PAS". Dostupné na URL: <https://livertox.nih.gov/AntituberculosisAgents.htm>, Prístup: Apríl 2017.

Citácia v texte: (*Anonym 2017*)

Reprocell¹, Alvetex (2017). "Alvetex 3D Cell Culture Systems". Dostupné na URL: <http://reinnervate.com/alvetex/alvetex-products/alvetex-3d-cell-culture-systems/>, Prístup: Máj 2017.

Citácia v texte: (*Reprocell¹, Alvetex 2017*)

Reprocell², Alvetex (2017). "The Science of Alvetex". Dostupné na URL: <http://reinnervate.com/alvetex/about-alvetex/the-science/>, Prístup: Máj 2017.

Citácia v texte: (*Reprocell², Alvetex 2017*)

Reprocell³, Alvetex (2017). "AN-SC-11 – Toxicity assessment using HepG2 liver cell lines". Dostupné na URL: <http://reinnervate.com/alvetex/alvetex-documentation/application-notes/an-sc-11-toxicity-assessment-using-hepg2-liver-cell-lines/>, Prístup: Máj 2017.

Citácia v texte: (*Reprocell³, Alvetex 2017*)