

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2009

Hana Rajhelová

**UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD**

**OPTIMALIZACE PODMÍNEK KULTIVACE
POTKANÍCH HEPATOCYTŮ *IN VITRO***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**AUTOR PRÁCE: Bc. Hana Rajhelová
VEDOUCÍ PRÁCE: Mgr. Tomáš Roušar, Ph.D.**

2009

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

**OPTIMIZATION OF THE RAT
HEPATOCTES CULTIVATION *IN VITRO***

THESIS

**AUTHOR: Bc. Hana Rajhelová
SUPERVISER: Mgr. Tomáš Roušar, Ph.D.**

2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 7.5.2009

Hana Rajhelová

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Hana RAJHELOVÁ

Studijní program: N3912 Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Analýza biologických materiálů

Název tématu: Optimalizace podmínek kultivace potkaních hepatocytů in vitro

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1.) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na podrobný popis možných podmínek kultivace potkaních hepatocytů a také na přehled metod popisujících viabilitu buněk in vivo a in vitro. Ke zpracování využijte elektronické databáze (ScienceDirect, NCBI, HighWire).
- 2.) S využitím získaných poznatků zaveďte a optimalizujte metodiku pro stanovení aktivity laktátdehydrogenasy u buněk kultivovaných na vícejamkových destičkách. Pro zhodnocení viability buněk využijte také WST-1 testu, popř. dalších metod (detekce indukce apoptózy, aj.)
- 3.) Pomocí výše zmíněných stanovení popište vliv různých kultivačních podmínek (objem kultivačního média, denzita buněk, doba seedingu a doba kultivace) na viabilitu buněk, a to u intaktních buněk a popř. u buněk inkubovaných s modelovou hepatotoxickou látkou (např. tBHP, thioacetamid, acetaminofen).
- 4.) Proveďte statistické zpracování získaných dat a stanovte optimální podmínky pro kultivaci buněk.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

podle pokynu vedoucího diplomové práce

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Tomáš Roušar

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce:

MUDr. Otto Kučera, Ph.D.


Lékařská fakulta UK Hradec Králové

Datum zadání diplomové práce:

1. října 2008

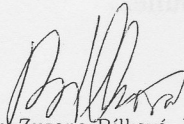
Termín odevzdání diplomové práce:

7. května 2009


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.


doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2009

Velmi ráda bych na tomto místě poděkovala vedoucímu mé práce Mgr. Tomášovi Roušarovi, Ph.D. a odbornému konzultantovi MUDr. Ottovi Kučerovi, Ph.D. za vedení, rady, připomínky a odborné konzultace při zpracování této diplomové práce.

Také chci poděkovat celé rodině a přátelům za trpělivost a podporu během tvorby této práce i během celého studia.

Souhrn

Buněčné kultury izolovaných hepatocytů patří v dnešní době mezi nejpoužívanější biologické modely *in vitro*. Jsou používány při studiu buněčných mechanismů specifických pro jaterní buňky, studiu jaterních onemocnění, hepatotoxicity a metabolismu.

Cílem práce bylo nejprve provést optimalizaci metod pro zjištění viability buněk kultivovaných na vícejamkových destičkách: stanovení aktivity laktátdehydrogenázy (LDH) a testu WST-1. Dalším cílem bylo pomocí těchto optimalizovaných metod popsat vliv změny kultivačních podmínek (denzita buněk, objem kultivačního média, doba seedingu) na viabilitu buněk, a to u intaktních buněk a u buněk inkubovaných s modelovou hepatotoxickou látkou – tBHP.

Ze získaných dat byly určeny optimální podmínky stanovení WST-1 (37 °C; 1 hod.) a LDH (37 °C; 30 000 bb/j). Za těchto podmínek byl nejprve sledován vliv objemu kultivačního média na viabilitu buněk testem WST-1. Ze získaných hodnot bylo zjištěno, že objem média statisticky významně ovlivňuje viabilitu buněk - s rostoucím objemem se viabilita zvyšuje. Dále byl sledován vliv doby seedingu na viabilitu hepatocytů pomocí testu WST-1. Z výsledků vyplývá, že s rostoucí dobou seedingu se viabilita hepatocytů výrazně zvyšuje.

U hepatocytů, které byly inkubovány s tBHP, byl vliv objemu média na viabilitu nejprve testován pomocí WST-1. Viabilita hepatocytů se snižovala s rostoucí koncentrací tBHP, rozdíl ve viabilitě mezi buňkami inkubovanými v 100 a 150 μ l (média a tBHP) ale nebyl statisticky významný. Působení tBHP bylo sledováno také pomocí stanovení intra- a extracelulární aktivity LDH, popř. LDH-leakage. U extracelulární aktivity LDH a LDH-L byla prokázána toxicita tBHP vyšší u buněk inkubovaných ve 100 μ l v porovnání s buňkami inkubovanými ve 150 μ l. U intracelulární aktivity LDH nebyl ve viabilitě buněk nalezen žádný rozdíl.

Klíčová slova: kultivované hepatocyty, kultivace a viabilita buněk, tBHP.

Summary

Hepatocyte cultures are the most used biological models *in vitro* currently. The cultures have been used to study of cell mechanisms which are specific for hepatocytes, as well as to study of liver diseases, hepatotoxicity and metabolism.

The first aim of the thesis was to optimize the methods estimating the viability of cultured cells – lactate dehydrogenase assay (LDH) and WST-1 test. Further aim was to describe an influence of various cultivation conditions (cell density, cultivation medium volume, and seeding time) on the cell viability, both in intact cells and in tBHP treated cells. (tBHP was used as a hepatotoxin.)

We determined the optimal conditions of WST-1 assay (37 °C; 1 h) and LDH assay (37 °C; 30 000 cells/well). These assays were used to the estimation of the influence of cultivation medium volume on the cell viability. We found that the volume of the medium influenced the viability significantly, i.e. the enhanced medium volume caused increase of the viability. As well, we tested the influence of the seeding time on the hepatocyte viability using WST-1 test. The results showed that the extended time of seeding caused greater cell viability.

In tBHP treated rat hepatocytes, we assessed the influence of medium volume and time of seeding as well. We found that the viability was decreasing regarding the increasing tBHP concentration. However, the difference between the viability of the cells incubated in 100 and 150 µl was insignificant. The tBHP treatment was characterized using intra- and extracellular LDH activity assay and LDH-leakage too. As results from extracellular LDH activity and LDH-L, greater toxicity was proved in cells treated in the volume of 100 µl compared to the cells treated in 150 µl. On the other hand, no difference was found in intracellular LDH activities.

Keywords: hepatocytes in culture, cell cultivation, cell viability, tBHP.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	11
1. ÚVOD	13
2. TEORETICKÁ ČÁST	14
2.1 JÁTRA	14
2.1.1 Anatomie jater	14
2.1.2 Histologie jater	15
2.1.2.1 Typy jaterních buněk	15
2.1.2.2 Funkční a morfologické členění jater	17
2.1.3 Fyziologie jater	18
2.1.3.1 Metabolizmus proteinů	18
2.1.3.2 Metabolizmus sacharidů	19
2.1.3.3 Metabolizmus lipidů	19
2.1.3.4 Detoxikační funkce	19
2.2 BUNĚČNÉ SYSTÉMY HEPATOCYTŮ <i>IN VITRO</i>	20
2.2.1 Systémy hepatocytů <i>in vitro</i>	20
2.2.1.1 Model perfundovaných jater	20
2.2.1.2 Jaterní řezy	20
2.2.1.3 Buněčné suspenze hepatocytů	21
2.2.1.4 Hepatocytární primokultury	21
2.2.1.5 Subcelulární frakce	22
2.2.2 Metody izolace hepatocytů	23
2.2.2.1 „One-step“ metoda	23
2.2.2.2 „Two-step“ metoda	23
2.3 HODNOCENÍ VIABILITY HEPATOCYTŮ <i>IN VITRO</i>	24
2.3.1 Hodnocení morfologie hepatocytů	24
2.3.2 Testy viability založené na schopnosti buněk vylučovat barvivo	25
2.3.2.1 Trypanová modř	25
2.3.2.2 Propidium jodid	26
2.3.3 Detekce funkčního stavu metabolismu hepatocytů	27
2.3.4 Stanovení extracelulární aktivity intracelulárních enzymů	29

2.3.4.1	Aminotransferázy	29
2.3.4.2	Laktátdehydrogenáza	30
2.3.4.3	Další enzymy	31
2.3.5	Metody pro posouzení diferenciacce hepatocytů	31
2.3.5.1	Syntéza močoviny	32
2.3.5.2	Syntéza albuminu	32
2.4	HEPATOTOXICKÉ LÁTKY – terciární butylhydroperoxid	32

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST **35**

3.1	SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ	35
3.2	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	35
3.3	PŘÍSTROJE A LABORATORNÍ POMŮCKY	36
3.4	IZOLACE HEPATOCYTŮ	37
3.4.1	Pokusná zvířata	37
3.4.2	Izolace hepatocytů	37
3.5	STANOVENÍ VIABILITY POMOCÍ BARVENÍ TRYPANOVOU MODŘÍ	38
3.6	POČÍTÁNÍ DENZITY BUNĚK	38
3.7	KULTIVACE HEPATOCYTŮ <i>IN VITRO</i>	39
3.7.1	Vliv objemu kultivačního média na viabilitu buněk	39
3.7.2	Vliv doby seadingu na viabilitu buněk	40
3.8	STANOVENÍ AKTIVITY LAKTÁTDEHYDROGENÁZY	40
3.8.1	Příprava vzorku	40
3.8.2	Postup stanovení LDH	40
3.8.3	Testování linearity stanovení LDH	41
3.8.4	Optimalizace teploty při stanovení LDH	41
3.9	STANOVENÍ WST-1	42
3.9.1	Postup stanovení WST-1	42
3.9.2	Optimalizace doby inkubace buněk s WST-1	42
3.10	TOXICKÉ POŠKOZENÍ HEPATOCYTŮ – tBHP	42
3.11	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ	43

4. VÝSLEDKY	44
4.1 STANOVENÍ AKTIVITY LAKTÁTDEHYDROGENÁZY	44
4.1.1 Testování linearity stanovení LDH	44
4.1.2 Optimalizace teploty detekce	45
4.2 WST-1 TEST – OPTIMALIZACE DOBY INKUBACE BUNĚK S WST-1 REAGENTEM	47
4.3 VLIV OBJEMU KULTIVAČNÍHO MÉDIA NA VIABILITU BUNĚK	48
4.4 VLIV DOBY SEADINGU NA VIABILITU BUNĚK	49
4.5 TOXICKÉ POŠKOZENÍ HEPATOCYTŮ – tBHP	50
4.5.1 Vliv objemu média na viabilitu buněk při inkubaci s tBHP	50
4.5.2 Vliv doby seadingu na viabilitu buněk inkubovaných s tBHP	54
5. DISKUZE A ZÁVĚR	55
6. SEZNAM LITERATURY	59

Seznam použitých zkratek

ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
Asp	aspartát
AST	aspartátaminotransferáza
ATP	adenozintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGTA	etylenglykoltetraoctová kyselina
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
Glu	glutamát
GPx	glutathionperoxidáza
GR	glutathionreduktáza
GSH	glutathion
GSSG	glutathiondisulfid
HDL	lipoproteiny o vysoké denzitě (high density lipoproteins)
K-H roztok	Krebs-Henseleitův roztok
LDH	laktátdehydrogenáza
LDH-L	LDH leakage
LDL	lipoproteiny o nízké denzitě (low density lipoproteins)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitroimidazoliumbromid
NADP ⁺	oxidovaná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
NADPH+H ⁺	redukováná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
NK buňky	přírození zabíječi (natural killers)
PLA ₂	fosfolipáza A ₂
PM	Petriho miska
ROS	reaktivní sloučeniny kyslíku
SDH	sorbitoldehydrogenáza
SH skupiny	thiolové skupiny
tBHP	terciální butylhydroperoxid
TNF	tumor nekrotizující faktor
Val	valin
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě (very low density lipoproteins)

96-WP	96-jamková mikrotitrační destička
WST-1	4-[3-(4-iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonát
XTT	2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl]-2H-tetrazolium-5-karboxanilid

1. Úvod

Játra jsou hlavním biotransformačním orgánem těla. Významně se podílejí na metabolismu většiny endogenních i exogenních látek a mezi jejich hlavní funkce patří také udržení stálého vnitřního prostředí organismu. Tyto funkce jsou zajišťovány hepatocyty, jejich kultivace je tedy velice vhodná při testování *in vitro*. Kultury hepatocytů jsou používány pro studium účinků řady cytotoxických a genotoxických sloučenin, pro popis toxického poškození a mechanismu jeho vzniku, i pro studium účinku hepatoprotektivních sloučenin.

Kvůli velkému množství látek, jejichž účinky jsou pomocí primárních kultur hepatocytů *in vitro* studovány, je velice důležité, aby byly nalezeny optimální parametry pro izolaci potkaních hepatocytů, jejich následnou kultivaci, a také pro hodnocení jejich viability. Testování těchto parametrů bylo i cílem této práce.

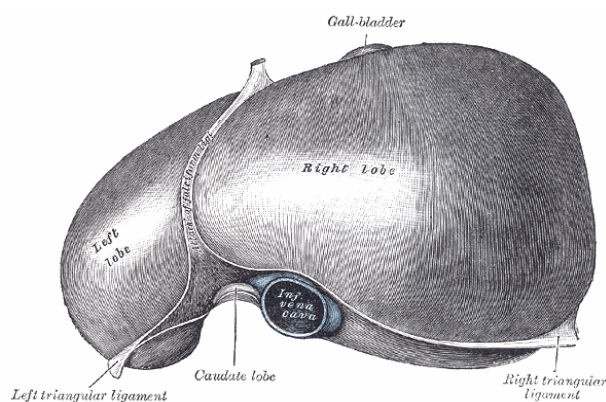
2. Teoretická část

2.1 Játra

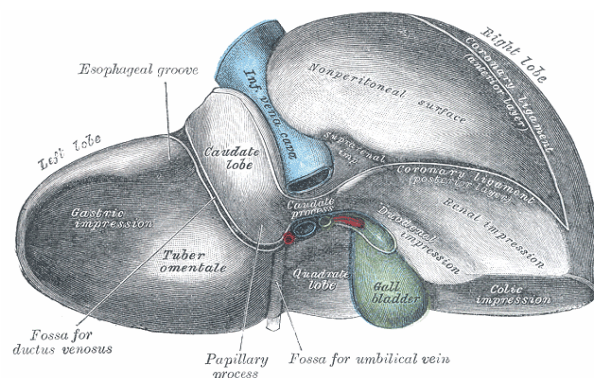
Játra jsou centrálním metabolickým orgánem celého organismu. Účastní se metabolismu základních živin: sacharidů, lipidů a proteinů, mají centrální úlohu v biotransformačních a detoxikačních procesech organismu. Jsou významným depotem řady látek a mnoho látek syntetizují.

2.1.1 Anatomie jater

Játra jsou největší žlázou v těle, váží průměrně 1,5 kg. Leží pod bránicí na pravé straně dutiny břišní a mají zhruba klínovitý tvar. Jsou kryta tenkým vazivovým pouzdem *capsula Glissoni*, zesíleným v oblasti hilu, kudy vstupují *vena portae*, *arteria hepatica* a vystupují *ductus hepaticus dexter et sinister* a lymfatické cévy. Játra se dělí na dva laloky, větší pravý a menší levý. Laloky jsou na brániční ploše odděleny peritoneální řasou *ligamentum falciforme hepatis* (obr. 1), na viscerální straně, kde naléhají orgány dutiny břišní, je to *ligamentum teres hepatis*. *Ligamentum teres hepatis* spolu s lůžkem žlučníku vymezují *lobus quadratus*, který spolu s *lobus caudatus* vytváří střední úsek jater, jenž cévním zásobením náleží k levému jaternímu laloku. Mezi *lobus quadratus* a *lobus caudatus* prochází široký vstup do jater, tzv. *porta hepatis*¹ (obr. 2).



Obr. 1: Anatomie brániční plochy lidských jater.²



Obr. 2: Anatomie viscerální plochy lidských jater.³

2.1.2 Histologie jater

Játra jsou složena z jednovrstevných buněčných plátů a trámců hlavních jaterních buněk - hepatocytů, které probíhají a ohýbají se ve všech směrech a vzájemným prostupem vytvářejí nepravidelnou síť s lakunami. Jednovrstevné trámce jsou z funkčního hlediska velice výhodné, protože kontaktní plocha buněk s proudem krve je maximální.¹

2.1.2.1 Typy jaterních buněk

Hepatocyty

Jaterní buňky jsou polygonálního tvaru a měří asi 20-30 μm . Tvoří 60-70 % buněčné hmoty jater a 80 % objemu jaterního parenchymu. Obsahují jedno až dvě jádra s jedním nebo dvěma jadérky. V cytoplazmě se nachází velké množství hladkého i drsného endoplazmatického retikula, mnoho mitochondrií, lysozomy, peroxizomy, četné jsou i Golgiho komplexy. Velké množství organel odpovídá vysoké metabolické aktivitě hepatocytů. Povrch každé buňky je ve styku se stěnou sinusoid prostřednictvím tzv. Disseho prostoru a se sousedícími hepatocyty. V místě styku hepatocytů začíná žlučový kanálek.⁴ Významnou vlastností hepatocytů je neobyčejná schopnost regenerace po ztrátě tkáně chirurgickým výkonem nebo po působení toxických látek. Jaterní buňky se dělí mitózou dokud hmota tkáně nedosáhne své původní velikosti.¹ Po resekci 50-60 % jaterní tkáně dorostou do předoperační velikosti během několika měsíců. Mechanismus není přesně znám, ale hlavní roli hrají především humorální faktory.⁵

Endotelové buňky

Tvoří okolo 3 % objemu jater. Stěna jaterních sinusoidů je jimi tvořena z 90 %. Endotelové buňky jsou tenké a jejich stěna je tvořena řadou výběžků a fenestrací, buňky ale nepřisedají na bazální membránu. Jsou od přilehlých hepatocytů odděleny subendotelovou štěrbinou, Disseho prostorem, proto krevní plazma prochází bez zábran endotelovou stěnou a dostává se do kontaktu s povrchem krevního pólu hepatocytů. Prostřednictvím receptorů jsou schopny vázat glykoproteiny a LDL apolipoproteiny, zároveň dokáží endocytózou přijímat kolagen a proteoglykany a tím přispívat k odbourávání vazivové tkáně.⁵

Kupfferovy buňky

Jsou to tkáňové makrofágy, zakotvené ve stěně sinusoidů, především v místech jejich křížení a vysílají výběžky do kapilárního lumen. Tvoří asi 2 % objemu jater. Mezi jejich funkce patří likvidace přestárých erytrocytů, bakterií i jiného materiálu fagocytózou a sekrece proteinů, které mají vztah k imunitním dějům. Podílí se také na produkci bilirubinu a retikulárních fibril.⁶

Itovy buňky

Buňky hvězdčovitého tvaru, které tvoří asi 1,5 % objemu jater.⁵ Vyskytují se v perisinusoidálním prostoru mezi stěnou sinusoidy a jaterní buňkou v Disseho prostoru. Obsahují tukové kapénky, ve kterých se ukládá vitamin A ve formě esterů retinolu, proto jsou také někdy nazývány „fat storing cells“.⁶

Tzv. pitt cells

Jsou to jaterní NK buňky (natural killer cells). Obsahují jádro neurosekrečního typu a tyčinkovitá granula.

Cholangiocyty

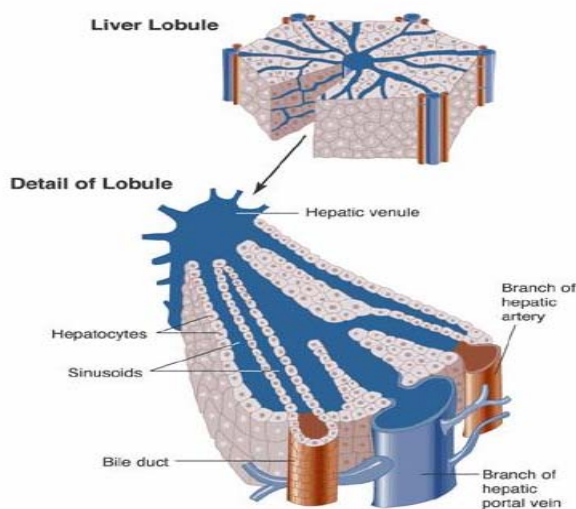
Epitelové buňky žlučových vývodů. V místě styku dvou hepatocytů vzniká intercelulární žlučový kanálek ohraničený pouze plazmatickou membránou hepatocytů. Spojením několika žlučových kanálků vznikají intralobulární žlučovody (Heringovy kanálky). Ty jsou vystlány buňkami kubického epitelu, cholangiocyty, které mají světlou cytoplazmu a obsahují malé množství organel.

Intralobulární vývody ústí do interlobulárních žlučvodů v portálních prostorech, které jsou vystlány kubickým až cylindrickým epitelem se zřetelnou vazivovou pochvou. Postupně se spojují v *ductus hepaticus dexter et sinister* a opouštějí játra.⁴

2.1.2.2 Funkční a morfologické členění jater

Jaterní lalůček - morfologická představa

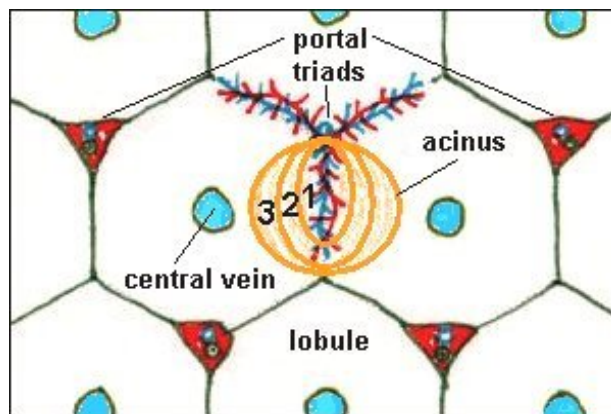
Základní morfologickou jednotkou jater je lalůček centrální žíly (*lobulus venae centralis*), který je asi 2 mm velký a má podobu šestibokého hranolu tvořeného hvězdicovitými pláty jaterních buněk uspořádaných kolem centrální žíly procházející středem lalůčku. Každý plát je tvořen dvěma vrstvami hepatocytů, mezi nimiž jsou žlučové kanálky. V prostorech mezi pláty probíhají jaterní sinusoidy⁴ (obr. 3).



Obr. 3: Schematické znázornění lalůčku centrální žíly⁷

Jaterní acinus - funkční představa

Jaterní acinus je mikroskopický útvar jaterní tkáně nepravidelného tvaru a velikosti, který se rozkládá mezi dvěma nebo více centrálními žilami, které se nacházejí na periferii acinu. Je uspořádán kolem osy tvořené portobiliární triádou, která se skládá z terminální jaterní arterioly, terminální portální venuly, žlučovodu, lymfatických cév a nervu.⁸



Obr. 4: Schema primárního jaterního acinu.⁹

Primární acinus je složen ze 3 zón odpovídajících nabídce krve. Hepatocyty nejbliže arterioly jsou nejlépe zásobeny kyslíkem a živinami a tvoří nejméně aktivní a nejrezistentnější část acinu (zóna 1). Vzdálenější zóny jsou méně vyživovány, proto jsou méně odolné (zóna 2). Zóna v blízkosti venuly je zásobována nejhůře a případné toxické změny jsou i proto nejvíce zjevné právě zde (zóna 3) (obr. 4).¹

2.1.3 Fyziologie jater

2.1.3.1 Metabolismus proteinů

Játra jsou důležitým místem proteosyntézy, je zde tvořena většina bílkovin plazmy – albumin, ceruloplazmin, α_1 -antitrypsin, fibrinogen, hemokoagulační faktory, apoproteiny a další. Syntéza je řízena nabídkou aminokyselin, energetických zdrojů i hormonálně. Játra se také podílí na syntéze řady neesenciálních aminokyselin.

Hepatocyty vychytávají z přiváděné plazmy proteiny a degradují je. Uvolněné aminokyseliny jsou poté dále využívány. Při degradaci aminokyselin

vzniká amoniak, který je pro organismus toxický. Definitivní detoxikace probíhá v ornitinovém cyklu v játrech, kde je amoniak konvertován na močovinu, která je netoxická a díky rozpustnosti ve vodě vyloučitelná ledvinami.

2.1.3.2 Metabolizmus sacharidů

Játra zajišťují v organismu stálou glykémii. Sacharidy jsou do jater přiváděny portální krví, v buňkách fosforylovány a dále zpracovávány. Při nadbytku je glukóza střídána ve formě glykogenu. Při jejím nedostatku je buď uvolňována z glykogenu procesem zvaným glykogenolýza, nebo je tvořena z necukerných složek (např. laktát, pyruvát, glycerol, aminokyseliny) glukoneogenezí.

2.1.3.3 Metabolizmus lipidů

Tuky se do jater dostávají portálním oběhem v chylomikronových částicích. Jaterní buňky produkují různé lipoproteiny, VLDL, které jsou v plazmě přeměněny na LDL a transportují lipidy do tkání a HDL, díky kterým je z tkání do jater přenášen cholesterol. Část cholesterolu je v játrech degradována za vzniku primárních žlučových kyselin, ty jsou dále konjugovány s taurinem a glycinem. V játrech dále probíhá syntéza, beta-oxidace a peroxidace mastných kyselin, syntéza triacylglycerolů, cholesterolu a fosfolipidů a tvorba ketolátek.

2.1.3.4 Detoxikační funkce

Hydrofobní molekuly, které nemohou být vyloučeny močí, jsou v játrech oxidovány cytochromem p450 a konjugovány s hydrofilními látkami, jako je kyselina glukuronová či kyselina sírová. Vzniklé molekuly jsou pak vyloučeny do žluče nebo zpět do krve.¹⁰

2.2 Buněčné systémy hepatocytů *in vitro*

Buněčné systémy dnes patří mezi nejpoužívanější biologické modely ve výzkumu. S rostoucím počtem testovaných látek a etickou otázkou testování na modelech *in vivo* jsou stále častěji používány modely *in vitro*, především izolované hepatocyty. V porovnání s jinými pokusnými přístupy mají mnoho výhod. Pokus probíhá na jediném, dobře charakterizovaném buněčném typu a výsledky nejsou ovlivněny interakcemi s jinými buněčnými populacemi. Bez nesnáží lze provádět na systémech *in vitro* pokusy, které vedou k jejich zničení, což v případě pokusu *in vivo* přináší etické problémy. Jsou zde i značné nevýhody. Kultivované buňky jsou pěstovány za nefyziologických podmínek v umělém kultivačním médiu, jehož složení úplně neodpovídá prostředí v organismu. Buňky také postrádají přítomnost jiných buněčných typů, se kterými hepatocyty *in vivo* komunikují a jsou ovlivňovány jejich produkty. Modely *in vitro* mohou, ale nemusí, dobře odrážet poměry za podmínek *in vivo*, proto jimi nemohou být modely *in vivo* zcela nahrazeny.¹¹

2.2.1 Systémy hepatocytů *in vitro*

Mezi nejdůležitější systémy pro testování toxicity a metabolických aktivit *in vitro* patří izolovaná perfundovaná játra, jaterní řezy, suspenze a primární kultury izolovaných hepatocytů a subcelulární frakce.

2.2.1.1 Model perfundovaných jater

Tento model je nejbližší podmínkám *in vivo*. Zachovává architekturu jater s mezibuněčnými kontakty a současně tvorbu a vylučování žluče, kterou lze snadno sbírat a analyzovat. Je používán především pro studium toxických a lékových poškození na úrovni jater bez ovlivnění jinými systémy. Nevýhodami jsou obtížná manipulace, zachování funkční aktivity pouze několik hodin a nemožnost testovat více toxinů nebo jejich koncentrací současně.¹²

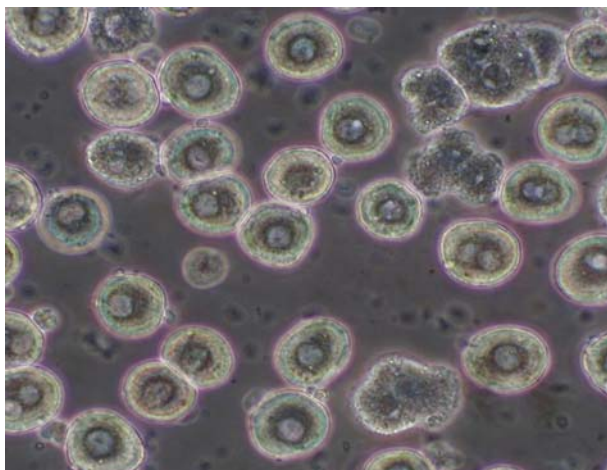
2.2.1.2 Jaterní řezy

Jaterní řezy jsou nejčastěji používány ke studiu metabolismu přírodních i syntetických látek. Řezy mají zachovanou architekturu, mezibuněčné interakce

a jaterní buněčné typy se zachovanou strukturální a funkční různorodostí jsou zastoupeny podobně jako *in vivo*.¹³ Jsou připravovány pomocí mikrotomu a jejich tloušťka se pohybuje mezi 200 až 250 μm , což je vhodné pro dostatečnou difúzi kyslíku a živin k buňkám a metabolitů do média. Metabolická aktivita bývá zachována po 3 až 5 dnů.¹⁴

2.2.1.3 Buněčné suspenze hepatocytů

Suspenze izolovaných hepatocytů jsou důležitými buněčnými modely pro studium metabolických a toxických efektů nových látek. Buněčná suspenze hepatocytů si zachovává svou metabolickou aktivitu 4 až 6 hodin po izolaci.¹³ Hepatocyty v suspenzi nevytvářejí mezibuněčné kontakty a zachovávají si kulovitý tvar (obr. 5). Výhodou, narozdíl od předešlých modelů, je možnost testovat více koncentrací toxinu nebo více druhů toxinů během jednoho pokusu.¹²



Obr. 5: Mikrofotografie hepatocytů v suspenzi (fázový kontrast, 200x).

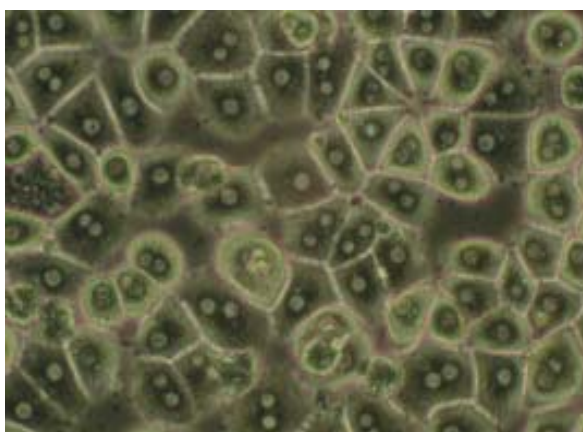
2.2.1.4 Hepatocytární primokultury

Nejběžněji používaným systémem pro studium hepatotoxicity *in vitro* jsou buněčné kultury hepatocytů. Zdrojem hepatocytů mohou být různé druhy laboratorních zvířat (prasata, myši nebo ryby), nejčastěji je ale za tímto účelem využíván potkan. Hlavní nevýhodou primárních kultur hepatocytů je poměrně rychlá ztráta aktivity biotransformačních enzymů, která se projeví snížením funkčních charakteristik. Nezbytnou podmínkou pro udržení hepatocytů v diferencovaném stavu je zachování mezibuněčných interakcí. Co nejbližší

napodobení podmínek *in vivo* zpomaluje proces dediferenciace. Stav kultury hepatocytů také ovlivňuje kultivační médium a jeho složky, kontakt s extracelulární matrix a popřípadě kokultivace s jinými typy buněk.¹²

Hepatocyty jsou nejčastěji *in vitro* kultivovány ve formě monolayeru (jedna vrstva buněk), kde jsou hepatocyty přichyceny na plastový povrch kultivační nádoby potažené extracelulární matrix, nejčastěji kolagenem typu I. Při této metodě kultivace se obnovuje polygonální tvar hepatocytů (obr. 6). Poklesu aktivity biotransformačních enzymů, která je pravděpodobně také způsobena nedostatečnými interakcemi hepatocytů s jinými buňkami a extracelulární matrix, lze zabránit kokultivací s jinými typy buněk, nebo přidávkem některých substrátů do kultivačního média (např. dimethylsulfoxid).

Primární kultury hepatocytů jsou užívány k toxikologickým, metabolickým a farmakokinetickým studiím. Jsou vhodné také pro studium exprese genů, dělení a růstu buněk *in vitro*.¹²



Obr. 6: Mikrofotografie hepatocytů v primární kultuře za 2 hodiny po nasazení na kolagenovanou Petriho misku (fázový kontrast, 200x).

2.2.1.5 Subcelulární frakce

Subcelulární frakce zahrnují mikrozomy, izolované mitochondrie a jádra, cytosolární frakce a izolované proteiny. Přípravují se metodami založenými na rozdílech v hustotě (např. centrifugace v hustotním gradientu). Případně lze uchovávat ve zmraženém stavu.¹² Mikrozomální frakce hepatocytů obsahují části endoplazmatického retikula a jsou bohaté na cytochrom P450. Je vhodné jimi testovat první a druhou fázi biotransformačního postupu. Izolované

mitochondrie jsou používány hlavně pro testování vlivu xenobiotik na aktivitu enzymů respiračního řetězce, včetně tvorby ATP.¹³

2.2.2 Metody izolace hepatocytů

Prvním předpokladem pro široké využití buněčných systémů hepatocytů *in vitro* bylo zavedení metody pro izolaci neporušených hepatocytů s vysokými výtěžky. V roce 1969 Berry a Friend uvedli do praxe techniku kolagenázové perfúze jater, která značně zvýšila výtěžek neporušených hepatocytů.

Metody využívající kolagenázovou perfúzi staví proti sobě dva protichůdné požadavky. Buňky musí být vystaveny velice nízké koncentraci vápenatých iontů, které umožňují rozrušení jaterních desmozomů. Pro aktivitu kolagenázy je ale nutná přítomnost vápenatých iontů. Tento konflikt byl vyřešen sestrojením dvou odlišných metod nazývaných „one-step“ a „two-step“ metoda.¹⁵

2.2.2.1 „One-step“ metoda

Metoda vychází z metody Berry a Friend (1969) a byla v roce 1974 dále modifikována. Metoda vychází z poznatku, že koncentrace vápenatých iontů potřebných pro správnou aktivitu surová kolagenázy izolované z bakterií *Clostridium histolyticum* je podstatně nižší než koncentrace, která je potřebná pro udržení integrity desmozomálních spojů. V jednom kroku tedy dojde k rozrušení desmozomálních spojů mezi buňkami sníženou koncentrací vápenatých iontů, která je ale dostatečná pro aktivitu kolagenázy. Přítomnost kolagenázy je potřebná pro rozrušení extracelulární matrix. Při použití čištěné kolagenázy je dosahováno nižších výtěžků i nižší viability získaných buněk.¹⁵

2.2.2.2 „Two-step“ metoda

Tato metoda byla zavedena Seglenem v roce 1976.¹⁶ Základním rozdílem oproti „one-step“ metodě izolace hepatocytů je to, že játra jsou nejprve proplachována médiem, které neobsahuje vápenaté ionty a to po dobu minimálně 10-ti minut. Tento krok je označován jako pre-perfúze a dochází během něj k ireverzibilnímu rozrušení desmozomálních spojů mezi buňkami. V druhém kroku je do perfuzátu přidána kolagenáza a vápenaté ionty, které

jsou potřebné pro aktivitu kolagenázy. Two-step metoda je v dnešní době používána častěji. Oproti „one-step“ metodě je její průběh asi o 5 minut delší.

Obě metody vykonané správným způsobem jsou prakticky stejně výtěžné a viabilita buněk je v obou případech srovnatelná.¹⁵

2.3 Hodnocení viability hepatocytů *in vitro*

Viabilita, nebo-li „životaschopnost“, patří k základním sledovaným parametrům při práci s buňkami. Při přípravě a kultivaci buněk pro různé účely je důležité spolehlivě rozlišit živé a mrtvé buňky v kultuře.

Existuje mnoho metod, které je možno pro stanovení viability využít. Pro první posouzení se používá pozorování morfologických znaků světelným, či elektronovým mikroskopem. Další metody vychází z předpokladu plně zachované membránové a funkční integrity živé buňky. Viabilita buněk je posuzována po působení barviv, nejčastěji trypanové modři nebo fluorescenčního propidium iodidu.

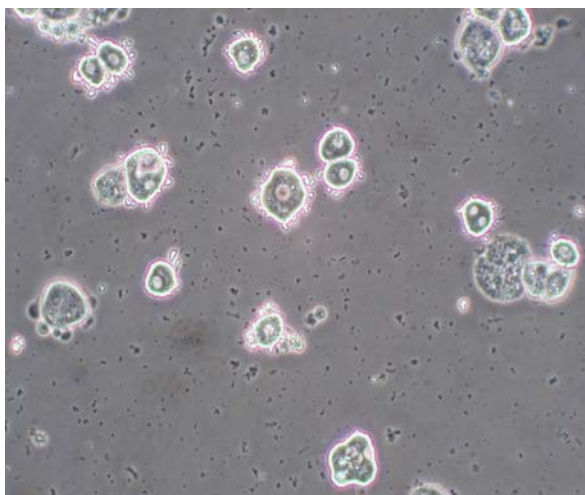
Detekce funkčního metabolismu buněk je dalším možným přístupem při zjišťování životaschopnosti buněk. U tohoto typu testů živá buňka s fungujícím enzymatickým vybavením přeměňuje podanou látku na produkt, který je potom detekován.

Poslední možností je stanovení aktivity cytoplazmatických enzymů uniklých do kultivačního média z poškozených buněk následkem porušení cytoplazmatické membrány.

2.3.1 Hodnocení morfologie hepatocytů

Pro první posouzení stavu izolovaných hepatocytů je používáno světelné mikroskopie s fázovým kontrastem. Čerstvě izolované hepatocyty jsou oválné buňky (během izolace ztrácejí polygonální vzhled), které se většinou nacházejí samostatně, protože dochází k rozrušení mezibuněčných spojů. Neporušené buňky vykazují vysoký kontrast oproti okolnímu médiu, mají jasně zřetelnou jadernou membránu, nízký stupeň granulace cytoplazmy a ostře viditelné jádro s jadérky. Na povrchu cytoplazmatické membrány lze často pozorovat výběžky,

tzv. „blebs“ (obr. 7), které neobsahují žádné organely a jsou důsledkem poškození během izolace (např. mechanickými vlivy). Pokud probíhá další kultivace za vhodných podmínek, „blebs“ po krátkém čase vymizí a cytoplazmatická membrána se stabilizuje.¹⁵



Obr. 7: Bleby na povrchu hepatocytů (fázový kontrast, 200x).

2.3.2 Testy viability založené na schopnosti buněk vylučovat barvivo

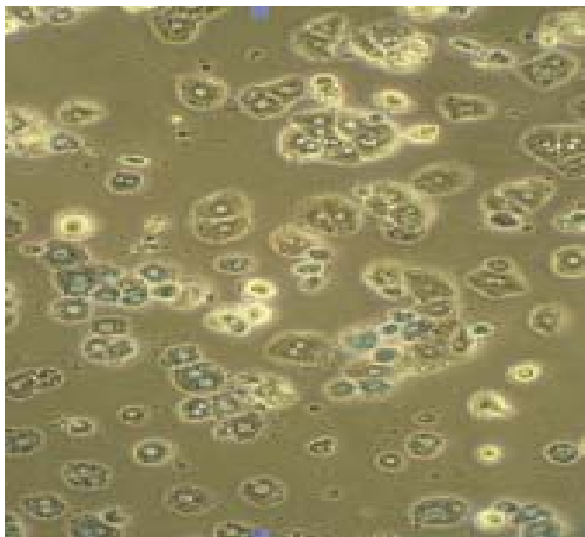
Živé a mrtvé buňky je možno rozlišit barvením. U buněk s narušenou plazmatickou membránou dochází k hromadění barviva a tím k obarvení buňky, nepoškozené živé buňky zůstávají neobarvené. Nejčastěji používanými metodami jsou barvení trypanovou modří a barvení fluoreskujícím propidium jodidem.

2.3.2.1 Trypanová modř

Pro stanovení aktuální viability buněk ve vzorku je velmi často používaná metoda využívající trypanovou modř (sodná sůl toluidin-diazo-diamino-naftol-disulfonové kyseliny). Tato metoda byla vyvinuta pro použití v oblasti klinické hematologie a v roce 1950 byla adaptována pro studium buněčných kultur.

Test vylučování trypanové modři je používán pro určení porušení strukturální integrity buněčné membrány. Barvivo nemůže vstoupit do buněk s neporušenou buněčnou membránou (živých buněk), proto tyto buňky zůstávají neobarvené. Pro prostup barvy musí být buněčná membrána již značně poškozená (mrtvé buňky), makromolekuly barviva těmito mezerami

prochází a buňku obarví modře (obr. 8). S trypanovou modří je možno detekovat asi jen 60 % mrtvých buněk, protože pro detekci musí být buňky barvivem silně prostoupeny.¹⁷



Obr. 8: Suspenze hepatocytů - barvení trypanovou modří, 200x.

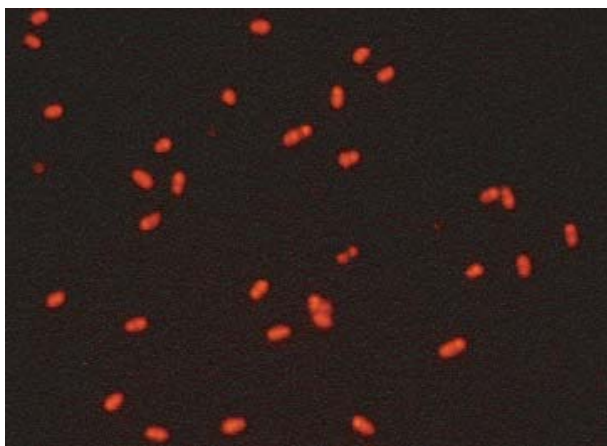
Mezi nevýhody této metody patří hodnocení statisticky malého počtu buněk (hodnotí se např. zastoupení živých a mrtvých buněk v deseti zorných polích). Trypanová modř má navíc silné cytotoxické účinky na buňky, hodnocení musí být ukončeno do 5 minut od přidání chemikálie, jinak začínají barvivo vychytávat i dosud živé buňky.¹⁸

Metoda barvení buněk trypanovou modří, při které je pro hodnocení výsledku použit světelný mikroskop, je jednoduchá a rychlá. Existuje také spojení této metody s průtokovou cytometrií, jež nahrazuje mikroskop a která dává přesnější výsledky a odstraňuje subjektivitu hodnocení.¹⁹

2.3.2.2 Propidium jodid

Propidium jodid je interkalární fluorescenční barvivo, které se používá k označení nukleové kyseliny. Vmezeřuje se mezi nukleotidové báze, ale nepreferuje žádné sekvence. Jedna molekula barviva se váže ke 4-5-ti párům bazí. Barvivo neprochází neporušenými membránami živých buněk. Pokud mají buňky cytoplazmatickou membránu porušenu, barvivo volně proudí do buněk. Díky vysoké afinitě k nukleovým kyselinám se po vazbě na ně jeho

fluorescence zvýší asi 40x a fluorescenční excitační maximum se posouvá o 30-40 nm do červené oblasti. Toho se využívá právě ke značení mrtvých buněk, kde barvivo vniklé do buňky po excitaci zářením při vlnové délce 535 nm emitují intenzivně červené záření při vlnové délce 617 nm (obr. 9).²⁰



Obr. 9: Buňky barvené propidium iodidem, fluorescenční snímek, 200x.²¹

Metoda je nejčastěji využívána ve spojení s fluorescenční mikroskopií, konfokální laserovou mikroskopií, průtokovou cytometrií a fluorimetrií.²²

2.3.3 Detekce funkčního stavu metabolismu hepatocytů

Detekce funkčního stavu metabolismu hepatocytů je monitorována testy založenými na redukci tetrazoliových solí. V současné době je popsáno několik postupů užívajících pro měření buněčné proliferace a viability tetrazoliových solí, např. MTT, WST-1 nebo XTT. Tetrazoliové soli přidané do buněčné suspenze jsou buněčnými enzymy redukovány na formazan, který je detekován.²³

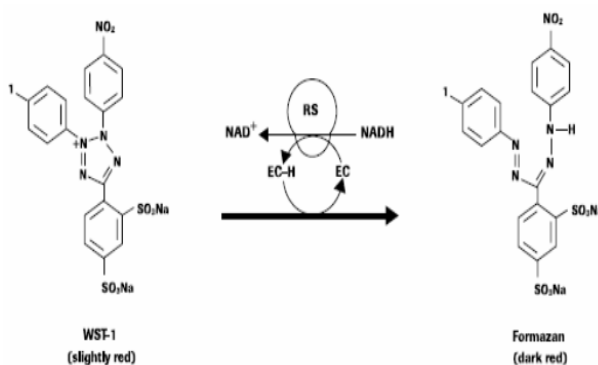
Nejčastěji jsou k detekci funkčního stavu metabolismu hepatocytů používána tato činidla MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid), XTT (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl]-2H-tetrazolium-5-karboxanilid) a WST-1 (4-[3-(4-iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonát). Tyto soli jsou po přidání do suspenze hepatocytů přeměněny na formazan pomocí buněčných enzymů. Intenzita přeměny tetrazoliových solí na formazan je úměrná aktivitě mitochondriálních a cytoplazmatických dehydrogenáz v buňkách. Barvivo jsou schopny přeměňovat

pouze živé, metabolicky aktivní buňky. Spektrofotometricky detekovaná absorbance jednotlivých vzorků je úměrná metabolické aktivitě buněk.

Jako první byla popsána metoda s MTT. MTT je štěpen díky aktivitě mitochondrií v buňkách na ve vodě nerozpustné modré hvězdčité krystaly formazanu, který je nutno následně rozpustit. K tomu se nejčastěji používá isopropanol a detekce se odehrává při 570 nm.²⁴

XTT poprvé popsal P. A. Scudiero v roce 1988.²⁵ Oproti MTT vzniká v tomto případě štěpením tetrazoliové soli rozpustný formazan oranžového zbarvení, jehož intenzitu lze bez dalších úprav proměřovat.²⁶

Test s WST-1 (obr. 10) má oproti dříve používaným MTT, XTT několik výhod. WST-1 se štěpí na ve vodě rozpustný oranžový formazan a tím odpadá rozpouštěcí krok. Na rozdíl od MTT a XTT je WST-1 více stabilní a může být několik týdnů uložen při teplotě 2-8 °C bez významné degradace. WST-1 má navíc širší rozsah linearitu a dává výraznější barevnou reakci než XTT.²⁷



Obr. 10: Štěpení tetrazoliové soli WST-1 (4-[3-(4-iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonát) na formazan. (EC - elektrony vázající reagent, RS - mitochondriální sukcinil-tetrazolium-sukcinátový systém).²⁸

Výhodou technik založených na redukcí tetrazoliových solí je to, že nevyžadují žádné promývání nebo sběr buněk a kompletní stanovení od počáteční mikrokultury až po analýzu dat probíhá v jedné destičce. Stanovení je velmi citlivé, proto může být prováděno v 96 jamkových mikrodestičkách s relativně malým počtem buněk.

2.3.4 Stanovení extracelulární aktivity intracelulárních enzymů

Ztráta schopnosti udržovat potenciál na membránách hepatocytů vede ke zvýšení permeability buněčné membrány, což se projeví únikem cytozolových substancí do média. V médiu pak nacházíme zvýšenou aktivitu cytoplazmatických enzymů. Naproti tomu enzymy vázané v buněčných organelách (zejména mitochondriích) se do média dostávají až při nekróze hepatocytu. Tyto metody jsou tedy založeny na stanovení aktivity enzymů uniklých z poškozených buněk do kultivačního média.

Enzymem, který je v kultivačním médiu nejčastěji stanovován, je laktátdehydrogenáza. Aminotransferázy, sorbitoldehydrogenáza a alkalická fosfatáza jsou stanovovány spíše jen okrajově, jejich význam narůstá u *in vivo* pokusů.

2.3.4.1 Aminotransferázy

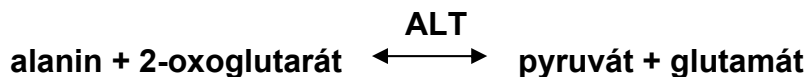
Tyto emzomy katalyzují přenos aminoskupiny z aminokyseliny na ketokyselinu a naopak. Mají význam nejen pro tvorbu aminokyselin z jejich ketoanalog, ale i pro katabolizmus dusíku, protože přenosem aminokyseliny na kyselinu 2-oxoglutarovou vzniká kyselina glutamová, která může být přímo deaminována.

AST (aspartátaminotransferáza) patří mezi enzymy, stanovované při tzv. jaterních testech. Katalyzuje reverzibilní přenos aminoskupiny mezi L-aspartátem a 2-oxoglutarátem.



V buňce se vyskytují dva izoenzymy - cytoplazmatický, kterého je v buňce asi 35 %, se vyplavuje do media již při zvýšení permeability buněčné membrány, zatímco mitochondriální izoenzym, který převažuje, je uvolňován až při těžkém poškození buňky.

ALT (alaninaminotransferáza) je převážně cytoplazmatický enzym katalyzující přenos aminoskupiny z L-alaninu na 2-oxoglutarát za vzniku pyruvátu a L-glutamátu.



Reakce je volně reverzibilní, uplatňuje se při syntéze, odbourávání i přeměně aminokyselin. Ve velmi malém množství se *ALT* vyskytuje i v mitochondriích. Ke zvýšení aktivity *ALT* v séru dochází již při zvýšení permeability membrány, zvláště pak při těžším poškození buněk, které enzym ve své cytoplazmě obsahují. Vyskytuje se v játrech, ledvinách, srdci, kosterním svalu a erytrocytech. Největší aktivitu má v hepatocytech.²⁹

2.3.4.2 Laktátdehydrogenáza

LDH (laktátdehydrogenáza) je buněčný enzym, vyskytující se v cytoplazmě všech buněk. Katalyzuje reverzibilní oxidaci L-laktátu na pyruvát, jako kofaktor využívá NAD^+ .



Stejně tak se podílí na přeměně pyruvátu na laktát v posledním kroku anaerobní glykolýzy. Vyskytuje se jako tetramer tvořený jedním nebo dvěma typy podjednotek. Kombinace podjednotek H (heart) a M (muscle) má za následek existenci pěti tetramerních izoenzymů. Vzhledem ke své funkci je laktátdehydrogenáza přítomna ve všech buňkách těla. V jednotlivých tkáních se liší poměrem izoenzymů. Izoenzym LD_1 (H_4) převažuje v myokardu, erytrocytech a ledvinách, nejvíce LD_5 (M_4) je v játrech a některých typech vláken kosterního svalu. Izoenzymy LD_3 a LD_4 se vyskytují v monocytech. Neporušená cytoplazmatická membrána je pro laktátdehydrogenázu nepropustná, pokud dojde k jejímu porušení a změně propustnosti, *LDH* uniká do kultivačního média, kde je možné ji detekovat.

V dnešní době je možno stanovovat extracelulární i celkovou aktivitu *LDH*. Intracelulární *LDH* je možno stanovovat až po lyzi buněk, která může být provedena sonikací, nebo smícháním buněk s ledovou deionizovanou vodou a

následným zamražením při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Extracelulární LDH, což je LDH, která unikla porušenou cytoplazmatickou membránou, je stanovována v kultivačním médiu odebraném jako supernatant nad buňkami. LDH leakage (LDH-L) je stanovena jako podíl extracelulární a celkové aktivity LDH.³⁰

Aktivita laktátdehydrogenázy je stanovována dvěma různými metodami. První je reakce vzniklého laktátu nebo pyruvátu s indikátorovým barvivem (např. s dinitrofenylhydrazinem). Dnes se častěji využívá oxidoredukční přeměny laktátu na pyruvát, koncentrace vzniklého NADH se stanovuje spektrofotometricky při 340 nm. Stejně tak lze spektrofotometricky sledovat úbytek NADH za současného vzniku laktátu.³¹

2.3.4.3 Další enzymy

SDH (sorbitoldehydrogenáza) je cytoplazmatický enzym obsažený hlavně v játrech, v malé koncentraci také v prostatě a ledvinách. Katalyzuje reverzibilní oxidačně-redukční reakci mezi fruktózou a sorbitolem.



Sorbitoldehydrogenáza je z buněk uvolněna při poškození buněčné membrány. Stanovení se provádí spektrofotometricky, při 340 nm je detekován úbytek NADH jako změna absorbance.³²

ALP (alkalická fosfatáza) je enzym katalyzující hydrolýzu různých monoesterů kyseliny fosforečné v alkalickém prostředí. Rozlišují se tři izoenzymy ALP, lišící se primární strukturou: placentární, střevní a izoenzym obsažený v kostech, játrech a ledvinách. Tento třetí izoenzym se podle své orgánové lokalizace poněkud liší v důsledku posttranslační modifikace nestejným obsahem sacharidů, takže je možné izoformy rozlišit.³³

2.3.5 Metody pro posouzení diferenciacce hepatocytů

Hepatocyty jsou jediné buňky v organismu, které syntetizují albumin a močovinu. Jejich produkce do kultivačního média svědčí o funkčním stavu a zachování diferenciacce hepatocytů.

2.3.5.1 Syntéza močoviny

Syntéza močoviny probíhá v hepatocytech za účasti enzymů ornitinového cyklu z CO_2 a NH_3 , který je pro organismus toxický a je tímto způsobem detoxikován. Močovina je rozpustná ve vodě a snadno difunduje membránami, proto koncentrace močoviny v médiu svědčí o funkční aktivitě hepatocytů.

Močovinu v médiu je možno stanovit přímou kolorimetrickou reakcí, kdy dochází ke kondenzaci diacetylu s močovinou za vzniku chromogenu diazinu a následuje spektrofotometrická detekce chromogenu při 540 nm. Častěji používanou metodou je stanovení založené na enzymové reakci. Dochází k hydrolytickému štěpení močoviny pomocí enzymu ureázy na oxid uhličitý a amoniak, který je poté detekován různými metodami.³⁴

2.3.5.2 Syntéza albuminu

Důležitou funkcí hepatocytů je syntéza a sekrece plazmatických proteinů včetně albuminu. Albumin je tvořen výhradně v játrech, a proto je jeho stanovení známkou syntetických funkcí hepatocytu a zároveň je ukazatelem toho, zda hepatocyty zůstávají v plně diferencovaném stavu.

Produkce albuminu se užívá jako ukazatel biosyntetických funkcí v nutričních a biochemických studiích, protože je známkou syntézy bílkovin ovlivněné substrátovou dostupností, hormony a cytokiny.³⁵

Ke stanovení albuminu v médiu je dnes nejčastěji využívána imunoenzymatická nekompetitivní sendvičová metoda ELISA, která je velmi citlivá a specifická.³⁶

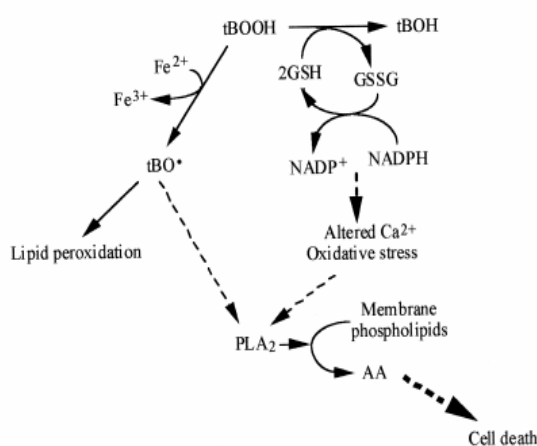
2.4 Hepatotoxické látky – terciární butylhydroperoxid

Primární kultury hepatocytů *in vitro* jsou často využívány ke studiu toxicity hepatotoxických látek, jako je thioacetamid, acetaminofen nebo terciární butylhydroperoxid (tBHP). V této práci byl jako modelový hepatotoxin používán tBHP, proto byl dále podrobně popisován pouze jeho mechanismus účinku.

t-BHP je hepatotoxin, který je často používán pro studium mechanismu buněčných změn způsobených účinkem volných radikálů u různých typů buněk, např. hepatocytů, mozkových buněk, nebo buněk renálních tubulů. Je schopen

procházet buněčnými membránami a při použití nízkých dávek tBHP indukovat buněčnou smrt cestou apoptózy nebo nekrózy u dávek vysokých.³⁷

t-BHP působí oxidační poškození buněk dvěma mechanismy. První mechanismus je závislý na metabolismu železa. Tzv. Fentonova reakce hraje klíčovou roli ve vzniku volných radikálů, jež způsobují oxidační poškození DNA a peroxidaci lipidů. Podstatou druhého mechanismu je deplece redukované formy glutathionu, která nepřímo vede ke zlomům vláken DNA.³⁸



Obr. 11: Mechanismus oxidačního stresu indukovaného tBHP. (tBOOH - terciární butylhydroperoxid, tBOH - terciární butanol, GSH glutathion, GSSG - glutathiondisulfid, PLA₂ - fosfolipáza A₂, AA - arachidonová kyselina).³⁹

t-BHP indukuje vznik volných radikálů (obr. 11). V buňkách je tBHP detoxikován glutathionperoxidázou (GPx) na glutathion disulfid (GSSG) a terciární butanol. Regenerace GSSG na glutathion (GSH) probíhá pomocí NADPH za katalýzy glutathionreduktázy (GR).

Pokud dojde k redukci zásob GSH, glutathion nedokáže veškerý tBHP metabolizovat a jeho nadbytek vede ke vzniku tert-butoxylových a tert-butylperoxylových radikálů. Tyto volné radikály způsobují oxidační poškození biomolekul: peroxidaci lipidů, dysfunkci mitochondrií, poškození proteinů a DNA, což vede k buněčné smrti.⁴⁰

Oxidace hlavně polynenasycených mastných kyselin – lipoperoxidace, je velmi destruktivní proces, který přímo poškozuje fosfolipidy membrán, které obsahují vysoký podíl nenasycených mastných kyselin a vznikající velmi reaktivní sekundární metabolity narušují strukturu dalších biomolekul. Toxické

jsou především některé aldehydy (malondialdehyd, 4-hydroxynonenal), které se navazují na proteiny, dochází ke změně fluidity membrán a postupně až k lýze buněk.

Poškození DNA reaktivními sloučeninami kyslíku (ROS) způsobuje změny ve struktuře DNA, porušením deoxyribóza-fosfátové kostry a také vznikem chemických modifikací purinových a pyrimidinových bází, které se projeví jako mutace nebo řetězcové zlomy v DNA.⁴¹ Oxidační poškození bílkovin je zapříčiněno oxidací aminokyselin v proteinech, což vede k nevratným změnám, mezi které patří fragmentace, agregace, oxidace –SH skupin a citlivost k proteolytickému štěpení.

Všechny tyto výše popsané toxické účinky vedou *in vitro* k uvolnění cytozolového enzymu laktátdehydrogenázy do kultivačního média. Syntéza proteinů je snížena v závislosti na rostoucí koncentraci tBHP a navíc se také snižuje obsah glykogenu v buňce.⁴²

Po expozici tBHP izolované hepatocyty ztrácejí integritu buněčné membrány. Snížená hladina GSH zvyšuje fosforylázovou aktivitu, což je nepřímý ukazatel množství volného cytozolového Ca^{2+} , jehož koncentrace je zvýšená. Tento vzrůst je způsoben tokem z mitochondrií, endoplazmatického retikula a extracelulárního prostoru. Zvýšená hladina Ca^{2+} zapříčiňuje aktivaci mnoha Ca^{2+} dependentních degradačních enzymů, které poškozují buněčné struktury - fosfolipázy atakují fosfolipidy buněčné membrány, proteázy štěpí membránové a cytoskeletové proteiny, ATPázy prohlubují depleci ATP a endonukleázy způsobují fragmentaci chromatinu. Všechny tyto pochody přispívají k buněčné smrti.⁴³

Působením tBHP také dochází k aktivaci kyseliny arachidonové, která uniká z fosfolipidů plazmatické membrány díky fosfolipáze PLA_2 .³⁹

Mezi další patofyziologické mechanismy patří indukce změny permeability mitochondriální membrány spojené s její depolarizací. Dochází k zastavení oxidativní fosforylace a tím ke snížení množství ATP. Nabobtnání mitochondriální membrány umožní uvolnění cytochromu c do cytosolu. Tyto procesy vedou k nefunkčnosti mitochondrií a tím i ke smrti celé buňky.⁴⁴

3. Experimentální část

3.1 Seznam použitých chemikálií

0,4% roztok trypanové modře (Tryptan blue, Sigma-Aldrich, Německo)
 kolagen typu I (Collagen Type I from Rat Tail, Sigma-Aldrich, Německo)
 20 mM kyselina octová (CH₃COOH, M_r=60,05)
 Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, Německo)
 LDH reagent R₁ (Ecoline S+, Německo)
 LDH reagent R₂ (Ecoline S+, Německo)
 deionizovaná voda
 terciální butylhydroperoxid (CH₃)₃COOH, M_r=90,12 (Sigma-Aldrich, Německo)

3.2 Příprava roztoků

Izolační roztoky

Roztok A

8 g NaCl; 0,4 g KCl; 0,0977 g MgSO₄.xH₂O; 0,1206 g Na₂HPO₄.12H₂O; 0,06 g KH₂PO₄; 2,188 g NaHCO₃; 0,19 g EGTA, doplníme do 1000 ml destilovanou vodou, 7 minut sytíme karbogenem (95 % O₂ + 5 % CO₂), aby výsledné pH bylo 7,3 – 7,4.

Roztok B

4,8 g NaCl; 0,24 g KCl; 0,05862 g MgSO₄.xH₂O; 0,07236 g Na₂HPO₄.12H₂O; 0,036 g KH₂PO₄; 0,3528 g CaCl₂.2H₂O, 1,314 g NaHCO₃; doplníme do 600 ml destilovanou vodou, 7 min. sytíme karbogenem (95 % O₂ + 5 % CO₂), aby výsledné bylo pH 7,3 – 7,4; obvykle používáme 0,055 g surové kolagenasy do 200 ml recirkulačního roztoku.

Roztok C

Krebs-Henseleitův roztok (K-H roztok): pro přípravu 1 l roztoku jsme v deionizované vodě rozpustili 6,9 g NaCl; 0,36 g KCl, 0,1441 g MgSO₄.xH₂O; 0,13 g KH₂PO₄; 0,374 g CaCl₂.2H₂O; 2 g NaHCO₃; 0,9 g glukózy a 1,333 g albuminu.

Kompletní Williamsovo kultivační médium

Williamsovo kultivační médium E bez fenolčerveně a L-glutaminu (Biotech) před kultivací obohatíme o fetální bovinní sérum (10 %, Biotech), L-glutamin (2 mM, Biotech), penicilin (200 IU/ml, Biotech), streptomycin (0,2 mg/ml, Biotech), inzulín (0,08 IU/ml, Actrapid HM inj., Novo Nordisk), prednizolon (0,5 µg/ml, Solu-Decotin, Merck) a glukagon (0,008 µg/ml, Glukagen 1 mg inj HYPOKIT, Novo Nordik). Těmito látkami obohacené Williamsovo E médium nazýváme již jako kompletní.

Reakční roztoky

Reakční směs pro LDH

Smícháme 4 díly LDH reagentu R₁ (fosfátový pufr 65 mmol/l, pH 7,5; pyruvát 0,8 mmol/l) a 1 díl LDH reagentu R₂ (Good's pufr pH 9,6; NADH 1 mmol/l) a pečlivě promícháme.

Pracovní roztok WST-1

Do 10 ml roztoku C (K-H roztoku) napipetujeme 1 ml WST-1. Promícháme a okamžitě dávkujeme.

Zásobní roztok 0,5 M tBHP

V 1 ml čerstvé deionizované vody rozpustíme 0,04506 g tBHP. Roztok je třeba připravovat vždy čerstvý.

3.3 Přístroje a laboratorní pomůcky

Dry bath incubator (Major science, Taiwan)

fluorimetr a spektrofotometr Infinite M200 (Tecan, Rakousko)

pipety Finnpipette (Thermo, Finsko)

centrifuga Rotina 38R (Hettich Zentrifugen, Německo)

mikroskop Olympus CK40 (Olympus, Japonsko)

mikrozkumavky (Neptune, Mexiko)

96-jamkové mikrotitrační destičky (Nunclon Surface, Dánsko)

laminární box Clean Air (Jouan, Francie)

mrazák –20 °C Arctis (AEG-Electrolux, Německo)

mrazák –80 °C (Sanyo ultra low, Japonsko)

inkubátor (Sanyo CO₂ incubator, Japonsko)

sonikátor (Bandeline, Německo)

analytické váhy Classic Plus (Mettler Toledo, Švýcarsko)

3.4 Izolace hepatocytů

3.4.1 Pokusná zvířata

Pokusy byly prováděny na dospělých potkaních samcích kmene Wistar o hmotnosti 180 až 240 g. Potkani byli chováni za standardních podmínek při konstantní teplotě 23 ± 1 °C, relativní vlhkosti vzduchu 55 ± 10 %, výměně vzduchu 12 – 14x za hodinu a při 12ti hodinovém světelném režimu (6,00 – 18,00 hod.). Potkani byli ustájeni v klecích po 6 – 10 potkanech. Po celou dobu měli volný přístup k vodě a potravě.

3.4.2 Izolace hepatocytů

Izolace hepatocytů se provádí dvoustupňovou kolagenázovou perfúzí jater.¹⁵ Principem celého postupu je nejprve rozvolnění desmozomů mezi hepatocyty při absenci Ca²⁺, a v druhém kroku rozrušení extracelulární matrix díky účinku kolagenázy za přítomnosti Ca²⁺.

Potkana nejprve uvedeme do etherové narkózy a poté jej přemístíme na operační stůl a fixujeme. Břišní stěnu dezinfikujeme jodovou tinkturou a dutina břišní otevíráme stříhem ve tvaru „V“ skrz kůži a svalovinu. Orgány dutiny břišní následně odsuneme k levé straně těla zvířete, čímž se odkryje přístup k *v. cava inferior*, do které aplikujeme heparin ve fyziologickém roztoku (200 m.j. na 100 g hmoty potkana). Tupou preparací uvolníme *v. portae*, do které zavedeme kovovou kanylu napojenou na perfúzní aparaturu. Ta je naplněna perfúzním roztokem temperovaným na 37 °C a nasyceným karbogenem.

Nejprve provedeme perfúzi *in situ* roztokem A bez obsahu Ca²⁺. O úspěšnosti perfúze svědčí rychlé, homogenní odbarvení jater a postupné zvětšování jejich objemu. Po chvíli zastavíme přívod perfúzního roztoku a prostříhneme dolní dutou žílu, abychom předešli mechanickému poškození jater

tlakem. Poté co nejrychleji vyjmeme játra z dutiny břišní, opláchneme je v kádince s fyziologickým roztokem, upevníme do speciálního stojánku a dokončíme jejich proplach roztokem A.

Následně pokračujeme recirkulační perfúzí jater roztokem s obsahem kolagenázy (Collagenasa Cruda, Sevapharma) a Ca^{2+} v roztoku B. Optimální doba této perfúze je 14 minut. Stálý perfúzní tlak v obou stupních promývání je zajištěn výškou spádu perfúzního roztoku. Po ukončení recirkulační perfúze játra ponoříme do roztoku C s bovinním sérovým albuminem a jaterní tkáň jemně mechanicky rozvolníme. Přítomnost albuminu je nezbytná pro zachování koloidně-osmotických podmínek. Získanou suspenzi buněk přefiltrujeme přes sterilní 4x složenou gázu do centrifugační zkumavky a centrifugujeme po dobu 5 minut při 4° C a 500 ot./min. Supernatant odsajeme a buňky znovu resuspendujeme v roztoku C. Následuje centrifugace za stejných podmínek a celý postup je pak ještě jednou opakujeme. Bezprostředně po izolaci stanovíme viabilitu izolovaných buněk.

3.5 Stanovení viability pomocí barvení trypanovou modří

Hodnocení viability izolovaných hepatocytů se provádí pomocí barvení trypanovou modří (Seglen 1976).¹⁶ Principem použití trypanové modře je její schopnost vnikat porušenou cytoplazmatickou membránou do mrtvých buněk, díky čemu dochází k jejich obarvení. Živé buňky zůstávají neobarvené.

Vlastní hodnocení provádíme pod mikroskopem u preparátu naředěného na koncentraci cca 10^6 bb/ml, z něhož odebereme 10 μl suspenze a toto množství smícháme na podložním sklíčku s 10 μl 0,4% trypanové modře. Po přiložení krycího sklíčka ihned pozorujeme (zvětšení 200x) a počítáme mrtvé a živé buňky alespoň v deseti polích. Následně spočítáme poměr mezi živými a všemi buňkami a tím zjistíme viabilitu. Viabilita izolovaných buněk u všech v této práci zmiňovaných experimentů dosahovala nejméně 90 %.

3.6 Počítání buněk

Před kultivací hepatocytů je důležité zjištění jejich počtu, které se provádí v Bürkerově komůrce.

10 μ l resuspendovaných buněk napipetujeme do mikrozkuhavky s 990 μ l Krebs-Henseleitova média, protřepeme a takto připravenou suspenzí plníme Bürkerovu komůrku. Počítáme buňky klasickým způsobem ve 2 x 25 velkých čtvercích. S ohledem na to následně suspenzi hepatocytů naředíme na koncentraci potřebnou pro další experimenty.

3.7 Kultivace hepatocytů *in vitro*

Kultivace primokultur hepatocytů provádíme na 96-jamkových mikrotitračních destičkách (96-WP) kolagenovaných kolagenem typu I (from rat tail, Sigma-Aldrich). Kolagenaci provádíme napipetováním kolagenu rozpuštěného v kyselině octové (20 mmol/l) do určené jamky WP či na Petriho misku a jeho ponecháním zde po dobu 10 minut. Následuje jeho odlití a také nutná neutralizace pomocí K-H roztoku anebo Williamsova média E.

Pro použití v dalších experimentech je nutno ze suspenze izolovaných hepatocytů připravit zásobní suspenzi o denzitě 1 mil. bb/ml. Tu získáme naředěním původní suspenze Williamsovým médiem E. Při pipetování hepatocytů je nutné suspenzi pečlivě míchat, aby buňky nesedimentovaly ke dnu.

Doposud používané podmínky pro kultivaci hepatocytů byly: objem média 100 μ l o denzitě 300 000 bb/ml (= 30 000bb/j) a 2 h seeding. Cílem naší práce bylo zjistit, jestli doba seedingu a objem kultivačního média může ovlivňovat viabilitu hepatocytů.

3.7.1 Vliv objemu kultivačního média na viabilitu buněk

Potřebnou denzitu buněk pro kultivaci získáme naředěním suspenze hepatocytů o denzitě 1 mil. bb/ml pomocí kompletního Williamsova média E. Do jamek 96-WP pipetujeme postupně 100; 125; 150; 175; 200 μ l suspenze hepatocytů o denzitách viz. tabulka I., aby počet buněk v jamkách byl 30 000 bb/j. Takto připravenou destičku umístíme do CO₂ inkubátoru (5 % CO₂, 37 °C) a inkubujeme 1 hodinu. Po uplynutí inkubační doby z destičky vyklepneme médium a provedeme stanovení viability pomocí WST-1.

Tabulka I:

Příprava suspenzí o různých denzitách pro určení vlivu objemu kultivačního média na viabilitu buněk:

Objem pipetovaný do jamky (μl)	100	125	150	175	200
Denzita suspenze (*10 ³ bb/ml)	300	240	200	171,4	150
Objem potřebný pro 96-WP (ml)	9,6	12	14,4	16,8	19,2
Objem suspenze 1 mil. bb/ml (ml)	2,88	2,88	2,88	2,88	2,88
Objem Williamsova media E (ml)	6,72	9,12	11,52	13,92	16,32

3.7.2 Vliv doby seedingu na viabilitu buněk

Ze zásobní suspenze o denzitě 1 mil. bb/ml si připravíme ředěním pomocí kompletního Williamsova média E suspenzi o denzitě 300 000 bb/ml (pipetujeme 100 μl/j), tak aby výsledná denzita buněk v jamkách byla stejná.

Připravené 96-WP vložíme do CO₂ inkubátoru (5 % CO₂, 37 °C) a inkubujeme po 1, 2, 3 hodiny. Po uplynutí příslušné doby vyjmeme destičku z inkubátoru, vyklepneme médium a provedeme stanovení WST-1.

3.8 Stanovení aktivity laktátdehydrogenázy

Laktátdehydrogenáza (LDH) je cytoplazmatický enzym, který katalyzuje přeměnu kyseliny pyrohroznové na kyselinu mléčnou a zpět.

3.8.1 Příprava vzorku

Po ukončení kultivace buněk a inkubace v CO₂ inkubátoru (5 % CO₂, 37 °C) odebereme z každé jamky supernatant, který můžeme okamžitě analyzovat, nebo zamrazit při –20 °C pro pozdější analýzu. Tak zjistíme aktivitu extracelulární LDH.

Pro zjištění intracelulární aktivity LDH po odsátí supernatantu napipetujeme ke zbylým buňkám chlazenou deionizovanou vodou a necháme zmrazit při –80 °C po dobu 15 minut, což způsobí lyzi buněk. Po rozmražení odebereme supernatant a stanovujeme aktivitu LDH.

3.8.2 Postup stanovení LDH

Do každé jamky mikrotitrační destičky napipetujeme 20 μl dříve odebraného supernatantu a 200 μl reakční směsi pro LDH, kterou vytemperujeme na 37 °C.

Okamžitě spektrofotometricky proměřujeme (Infinite M200, Tecan) každou jamku při $\lambda=340$ nm po dobu 6 minut a sledujeme pokles absorbance v čase.

LDH-L vypočítáme jako podíl aktivit LDH extracelulární ku LDH celkové.

Pro zjištění aktivity LDH používáme výpočet:

$$\Delta A/\text{min} \times \text{faktor} = \text{aktivita LDH (U/l)}$$

Faktor = 2618 (pro NADH $\lambda = 340$ nm byl použit extinkční koeficient 6300 1/(M.cm))

3.8.3 Testování linearit stanovení LDH

Ze suspenze hepatocytů o denzitě 1 mil. bb/ml připravíme ředěním pomocí kompletního Williamsova média E suspenze o denzitě 600 000 bb/ml a 300 000 bb/ml. Ředění viz. tabulka II. Do 96-WP pipetujeme po 100 μ l suspenze, výsledná denzita je tedy 60 000 bb/j., resp. 30 000 bb/j. Destičku vložíme do CO₂ inkubátoru (5 % CO₂, 37 °C) a necháme buňky 2 hodiny přisednout. Poté odebereme z jednotlivých jamek kultivační médium, ve kterém stanovíme extracelulární LDH. Do jamek s přisedlými buňkami napipetujeme 100 μ l Williamsova media E a následně provedeme sonikaci (5 s), která zajistí úplné rozrušení cytoplazmatické membrány a vyplavení veškeré intracelulární LDH do média.

Tabulka II:

Příprava roztoků o různých denzitách:

Denzita suspenze (*10 ³ bb/ml)	300	600
Objem suspenze 1 mil. bb/ml (ml)	2,88	5,76
Objem Williamsova média E (ml)	6,72	3,84

3.8.4 Optimalizace teploty při stanovení LDH

Ze zásobní suspenze o denzitě 1 mil. bb/ml si připravíme ředěním pomocí kompletního Williamsova média E suspenze o denzitě 300 000 bb/ml (pipetujeme 100 μ l/j), 200 000 bb/ml (150 μ l/j), které dávkujeme na 96-WP. Takto připravené destičky inkubujeme 2 h v CO₂ inkubátoru (5 % CO₂, 37 °C). Po ukončení inkubace odebereme z každé jamky kultivační médium. Stanovíme aktivitu LDH, vždy 20 μ l kultivačního média a 200 μ l reakční směsi pro LDH, kterou předem vytemperujeme na 37 °C. Vlastní stanovení aktivity LDH provádíme při 20 °C a 37

°C. Porovnááme aktivitu LDH mezi stejnými vzorky stanovovanými při různých teplotách.

3.9 Stanovení WST-1

Podstatou tohoto testu je redukce tetrazoliové soli na barevný produkt – formazan. Redukce jsou schopny jen metabolicky aktivní, tedy viabilní buňky. Míra redukce závisí na stupni aktivity buněk.

3.9.1 Postup stanovení WST-1

Po ukončení inkubace buněk v CO₂ inkubátoru vyklepneme kultivační médium a do každé jamky napipetujeme 100 µl pracovního roztoku WST-1, který si připravíme těsně před tím. Proměříme spektrofotometricky (Infinite M200, Tecan) při $\lambda=460$ nm v čase t_0 , poté destičku opět vložíme do inkubátoru a další měření provedeme v čase $t_1=60$ minut.

Vyhodnocení provádíme jako zjištění rozdílu absorbancí v čase t_1 a t_0 .

3.9.2 Optimalizace doby inkubace bb s WST-1

Pro optimalizaci stanovení WST-1 do každé jamky pipetujeme 100 µl činidla WST-1. Provedeme spektrofotometrické měření při $\lambda=460$ nm v čase t_0 , v čase $t_1=60$ minut, čase $t_2=120$ minut a čase $t_3=180$ minut, mezi jednotlivými měřeními ponecháme destičku v inkubátoru. Sledujeme nárůst absorpance v závislosti na čase.

3.10 Toxické poškození hepatocytů - tBHP

Pro sledování toxického působení tBHP si připravíme ze zásobního 0,5 M roztoku tBHP koncentrace 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 mM tBHP naředěním zásobního roztoku tBHP roztokem C (viz. tabulka III). Tyto roztoky připravujeme těsně před jejich použitím.

Pro testování používáme suspenze o denzitě 300 000 bb/ml (pipetujeme 100 µl/j), 200 000 bb/ml (150 µl/j). Po 1, 2 hodinovém seedingu v CO₂ inkubátoru (5 % CO₂, 37 °C), z destiček vyklepneme kultivační médium a buňky převrstvíme

různými koncentracemi tBHP o objemech 100 μ l, resp. 150 μ l. Jako kontrolu pipetujeme čistý roztok C. Jako negativní kontrolu použijeme jamky, ve kterých byla suspenze hepatocytů nahrazena pouze Williamsovým médiem E.

Po 15, popř. 30 minutové inkubaci v CO₂ inkubátoru (5 % CO₂, 37 °C) s tBHP médiem odebereme a provedeme stanovení LDH (extracelulární i intracelulární). Do jamek s přisedlými buňkami napipetujeme 100 μ l, resp. 150 μ l studené deionizované vody a zmrazíme. Po rozmražení odebereme supernatant, ve kterém stanovíme intracelulární LDH. Kromě stanovení LDH aktivity provedeme i stanovení WST-1.

Tabulka III:

Příprava koncentrační řady tBHP:

Koncentrace tBHP (mM)	0,0	0,1	0,5	1,0	1,5
Objem 0,5 mM tBHP (μ l)	0	2	10	20	30
Objem roztoku C (ml)	10,000	9,998	9,990	9,980	9,970

3.11 Statistické vyhodnocení

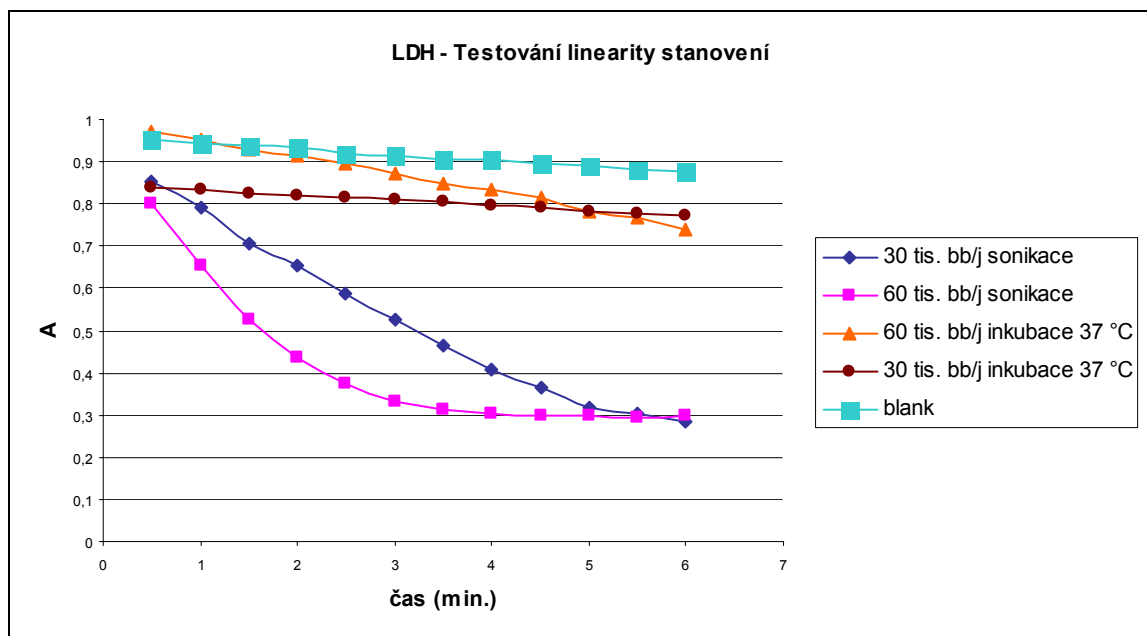
Porovnání mezi skupinami dat bylo provedeno pomocí analýzy rozptylu ANOVA. Následné porovnání skupin s kontrolní skupinou bylo provedeno s využitím Dunnettova post-testu ($p=0,05$). Veškerá data jsou vyjádřena jako průměr \pm S.D.

4. Výsledky

4.1 Stanovení aktivity laktátdehydrogenázy

4.1.1 Testování linearity stanovení LDH

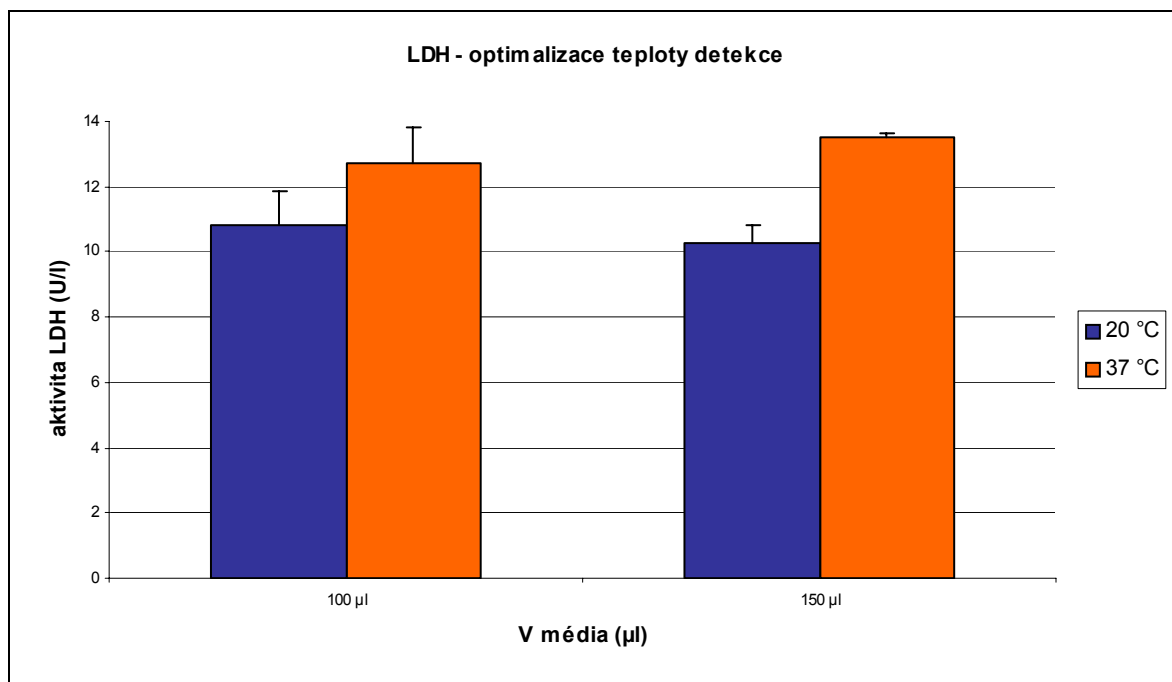
Byla optimalizována denzita buněk pro stanovení LDH (obr. 12). U buněk o denzitě 60 a 30 tis. bb/j byla provedena sonikace, aby byla zajištěna maximální možná aktivita LDH. Linearita byla při denzitě 60 tis. bb/j zachována do absorbance $A = 0,5$; po dobu 90 s; pro denzitu 30 tis. bb byl signál lineární po dobu 4 minut. Dále byla stanovena extracelulární aktivita LDH u denzit 60 a 30 tis. bb/j inkubovaných v termostatu při 37 °C. Linearita byla zachována v obou případech po 6 minut. S ohledem na tyto výsledky bylo zjištěno, že zvolené parametry stanovení LDH jsou plně dostačující pro stanovení intra- i extracelulární aktivity LDH pro obě denzity buněk. Všechny pokusy byly dále prováděny s denzitou 30 000 bb/j.



Obr. 12: Optimalizace denzity buněk pro stanovení aktivity LDH (n = 4, kultivace - 100 μ l média, 2 h seeding).

4.1.2 Optimalizace teploty detekce

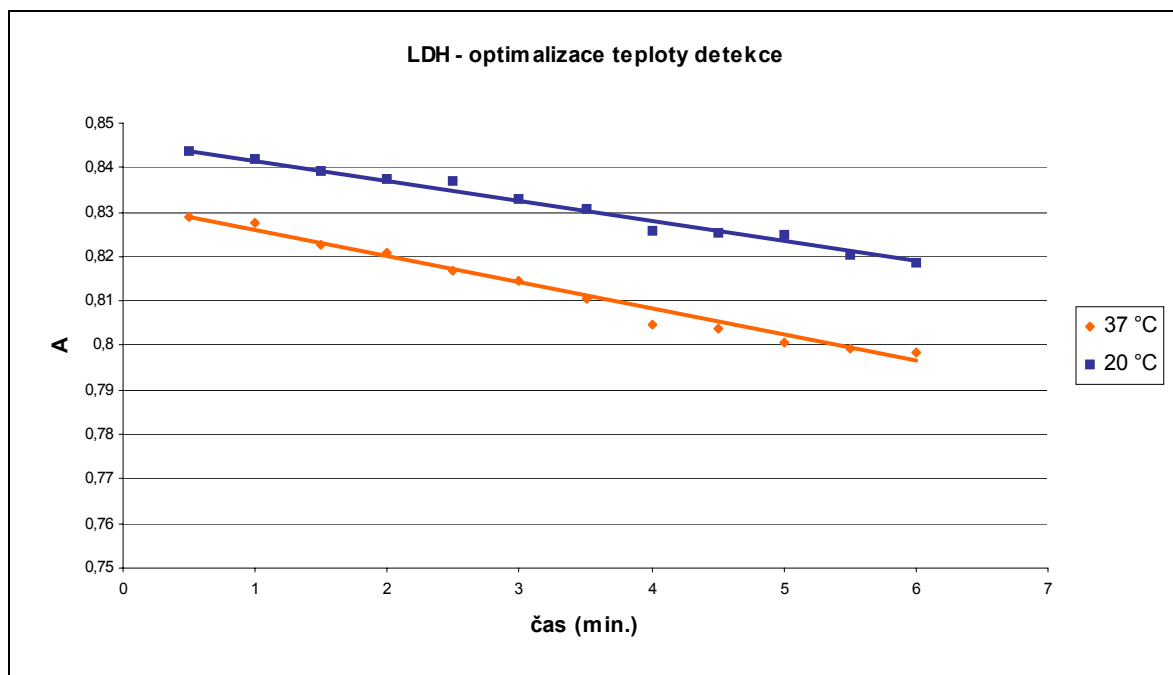
Byla sledována aktivita laktátdehydrogenázy v totožných vzorcích analyzovaných při teplotách 20 °C a 37 °C (data viz. tabulka IV). U prvního vzorku, který byl odebrán od buněk inkubovaných se 100 µl kultivačního média, vzrostla aktivita LDH při 37 °C oproti 20 °C o 17,18 %. U druhého vzorku byl objem kultivačního média 150 µl; zde vzrostla aktivita LDH o 31,58 % (obr. 13). Protože se potvrdil náš předpoklad, že teplota má významný vliv na aktivitu LDH, zvolili jsme pro další stanovení aktivit LDH teplotu detekce 37 °C. (Závislosti absorbance a času u totožného vzorku při teplotě 20 °C i 37 °C jsou zobrazeny na obr. 14.)



Obr. 13: Optimalizace teploty detekce při stanovení aktivity LDH (n = 5, kultivace – 100 µl, 150 µl média, 2 h seeding).

Tabulka IV: Optimalizace teploty detekce při stanovení LDH (hodnoty k obr. 13).

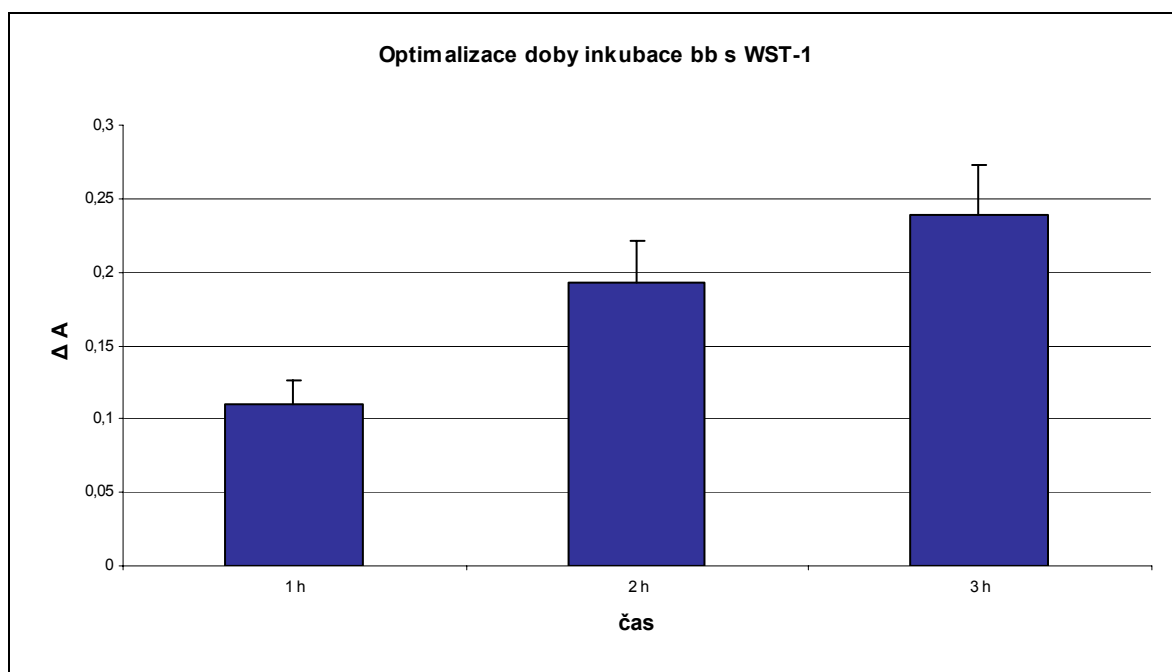
V (µl)	Teplota (°C)	Aktivita LDH (U/l)
100	20	10,849 ± 0,997
	37	12,713 ± 1,134
150	20	10,294 ± 0,552
	37	13,540 ± 0,708



Obr. 14: Optimalizace teploty detekce při stanovení LDH (kultivace – 100 μ l média, 2 h seeding).

4.2 WST-1 test - Optimalizace doby inkubace buněk s WST-1 reagentem

Byla testována doba inkubace buněk s WST-1. Z grafu (obr. 15) vyplývá, že signál s délkou inkubace roste (data viz. tabulka V). Pro další stanovení byla z důvodu časové úspory používána 1 h inkubace, při které je ale nárůst signálu dostatečně vysoký.



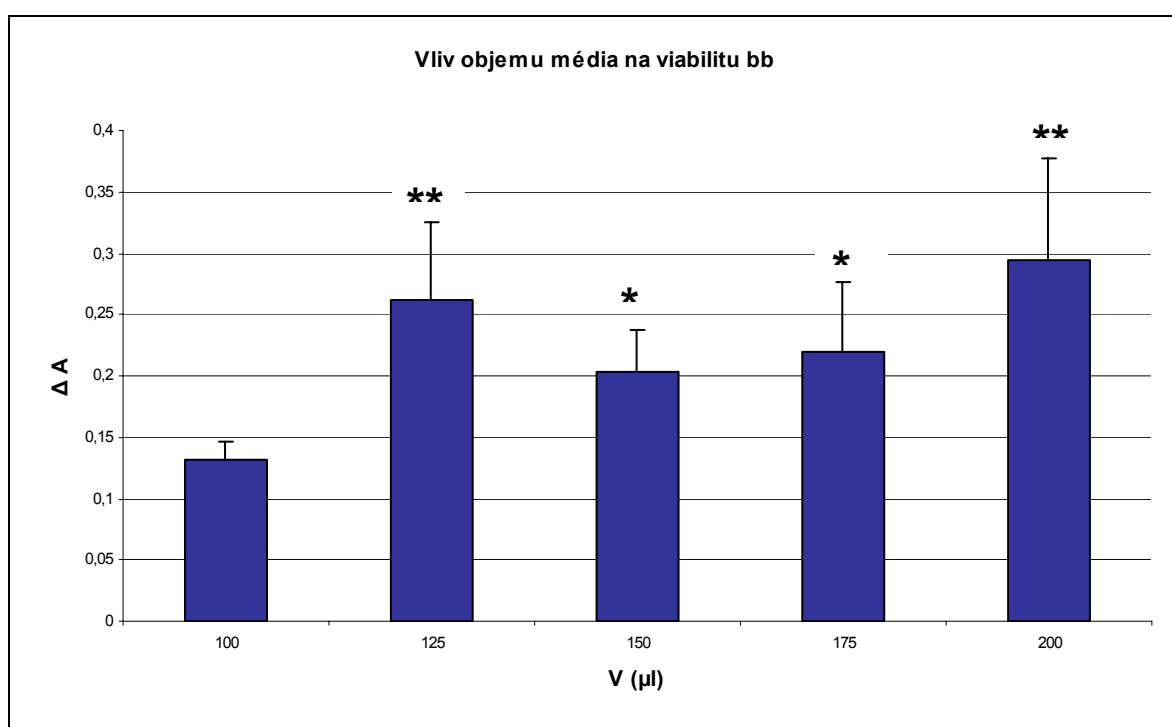
Obr. 15: Optimalizace doby inkubace buněk s WST-1 (n = 8, kultivace - 100 μ l média, 1 h seeding).

Tabulka VI: Optimalizace doby inkubace buněk s WST-1 (hodnoty k obr. 15).

čas	ΔA
1 h	0,110 \pm 0,017
2 h	0,193 \pm 0,028
3 h	0,239 \pm 0,034

4.3 Vliv objemu kultivačního média na viabilitu buněk

Byl sledován vliv objemu kultivačního média na viabilitu buněk. Míra viability byla sledována pomocí WST-1 testu. Doposud byl v naší laboratoři při kultivacích buněk v 96-WP používán objem kultivačního média 100 μl . Z grafu (obr. 16) vyplývá, že objem média statisticky významně ovlivňuje viabilitu kultivovaných hepatocytů – s rostoucím objemem se zvyšuje i viabilita buněk (data viz. tabulka VI). U všech objemů byla prokázána vyšší dehydrogenázová aktivita v porovnání s původně používaným objemem 100 μl .



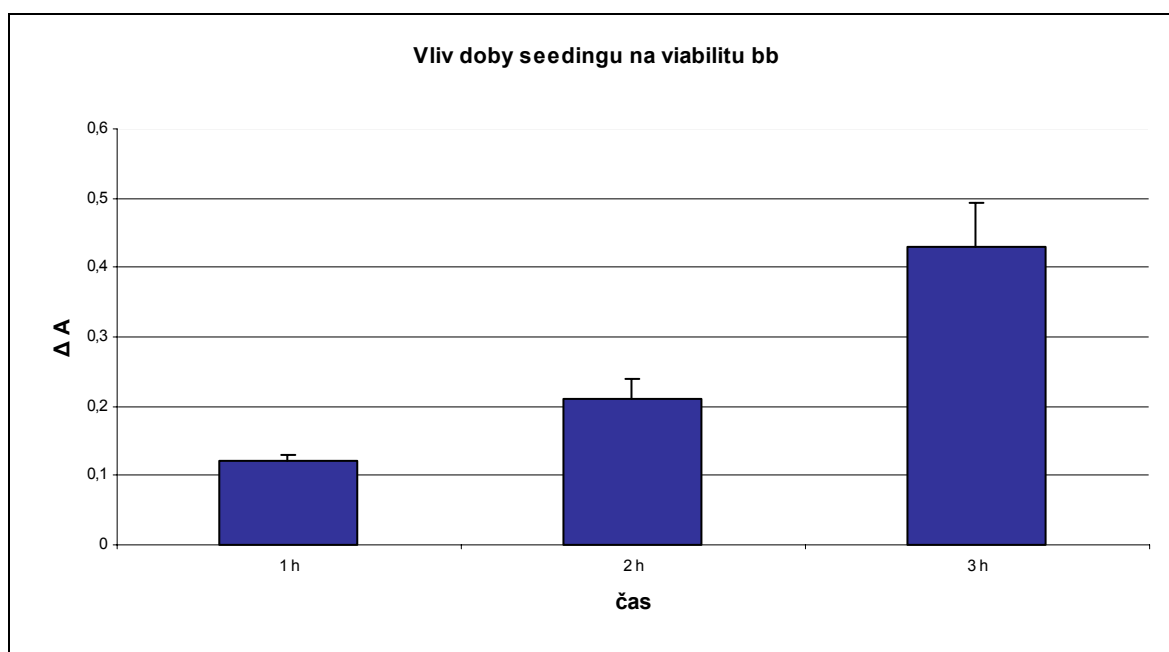
Obr. 16: Vliv objemu kultivačního média na viabilitu hepatocytů (n = 8, kultivace - 1 h seeding; * - p < 0,05; ** - p < 0,01, porovnáno s 100 μl .)

Tabulka VI: Vliv různých objemů média na WST-1 (hodnoty k obr. 16).

V (μl)	ΔA
100	0,131 ± 0,015
125	0,262 ± 0,063
150	0,204 ± 0,033
175	0,219 ± 0,057
200	0,294 ± 0,083

4.4 Vliv doby seedingu na viabilitu buněk

U kultivovaných hepatocytů byla určována závislost viability buněk určené pomocí WST-1 testu (1 hod. inkubace s WST-1 reagentem) a doby seedingu (= přisednutí buněk po kultivaci). Doposud byl při práci s kultivovanými buňkami standardně používán 2 hodinový seeding. Z grafu (obr. 17) vyplývá, že s rostoucí dobou seedingu se viabilita hepatocytů významně zvyšuje (data viz. tabulka VII). Tento nálezn může svědčit o odeznívajícím postizolačním stresu, popř. může souviset s tím, že během delší doby seedingu stačí přisednout na kolagen větší počet buněk.



Obr. 17: Vliv délky seedingu na viabilitu hepatocytů (n = 8, kultivace - 100 μ l média).

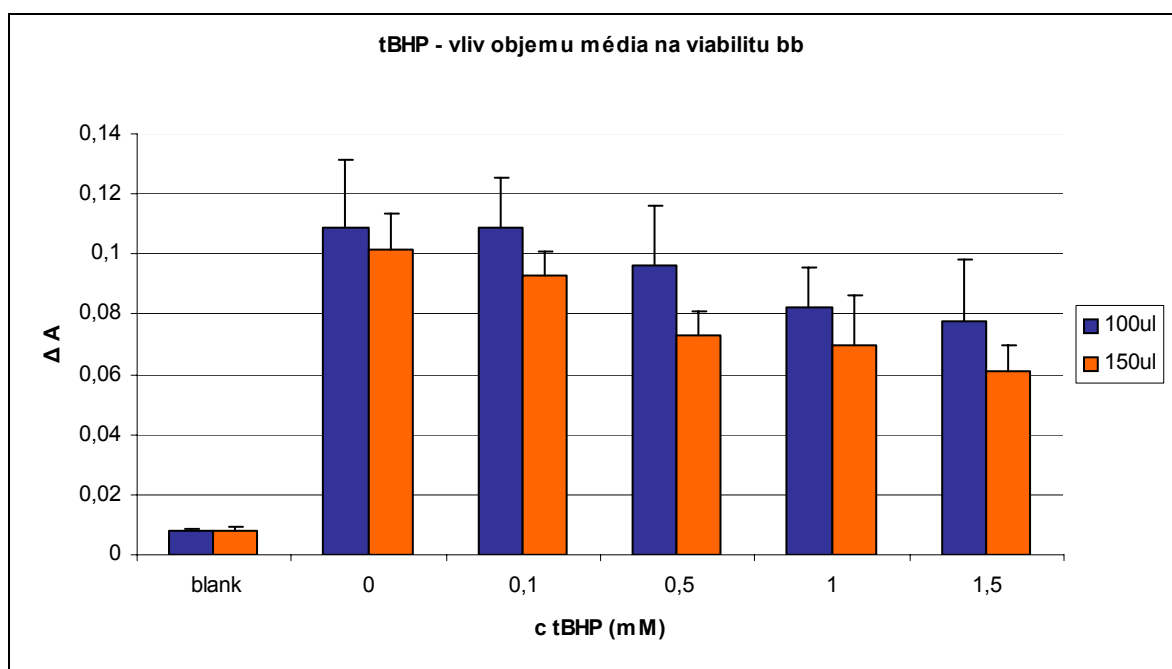
Tabulka VII: Vliv seedingu (hodnoty k obr. 17).

Seeding	ΔA
1 h	0,123 \pm 0,006
2 h	0,211 \pm 0,027
3 h	0,429 \pm 0,065

4.5 Toxické poškození hepatocytů – tBHP

4.5.1 Vliv objemu média na viabilitu buněk při inkubaci s tBHP

Byl sledován vliv objemu média obsahujícího různé koncentrace tBHP (0; 0,1; 0,5; 1; 1,5 mM) na viabilitu hepatocytů. Viabilita buněk stanovovaná pomocí WST-1 klesá v obou případech s rostoucí koncentrací tBHP. U koncentrační řady s objemem média 150 μ l je z grafu (obr. 18) patrné, že hodnoty jsou oproti koncentrační řadě s objemem 100 μ l média nižší (data viz. tabulka VIII), což svědčí patrně o větším poškození hepatocytů. Rozdíl mezi těmito páry hodnot nicméně není statisticky významný.

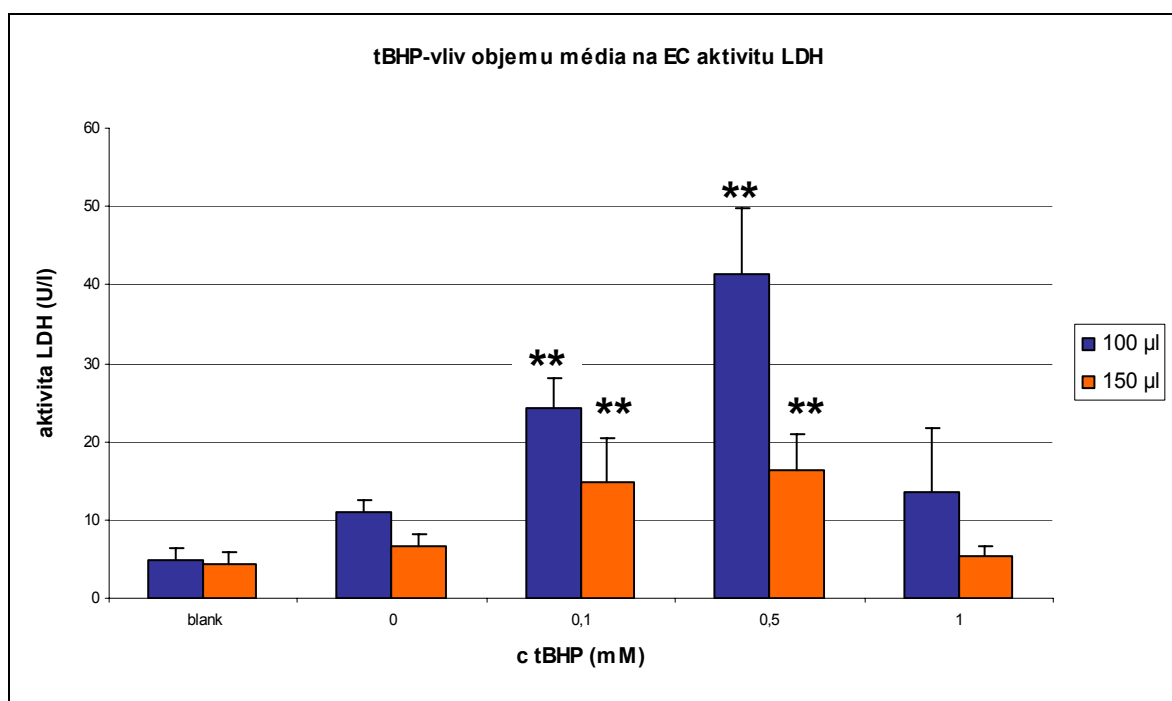


Obr. 18: Vliv objemu média o různých koncentracích tBHP na WST-1 (n = 8, kultivace - 100 μ l, 150 μ l média, 2 h seeding, 15 min. inkubace s 100 μ l, 150 μ l tBHP).

Tabulka VIII : Vliv objemu média na viabilitu buněk (hodnoty k obr. 18).

c tBHP (mM)	ΔA (100 μ l)	ΔA (150 μ l)
blank	0,008 ± 0,001	0,008 ± 0,001
0,0	0,109 ± 0,022	0,101 ± 0,012
0,1	0,109 ± 0,017	0,093 ± 0,008
0,5	0,096 ± 0,020	0,073 ± 0,008
1,0	0,082 ± 0,013	0,069 ± 0,017
1,5	0,077 ± 0,021	0,061 ± 0,008

Vliv objemu média obsahujícího různé koncentrace tBHP na viabilitu hepatocytů byl také sledován pomocí testování aktivity LDH. Extracelulární aktivita LDH roste v obou případech s rostoucí koncentrací tBHP (obr.19), (data viz. tabulka IX), poškození hepatocytů se tedy s rostoucí koncentrací tBHP zvyšuje (kromě 1 mM tBHP). U koncentrační řady s objemu média 150 μ l je z grafu (obr. 19) patrné, že hodnoty jsou oproti koncentrační řadě s objemem 100 μ l média nižší, což svědčí o menším poškození buněk inkubovaných v tomto objemu média.

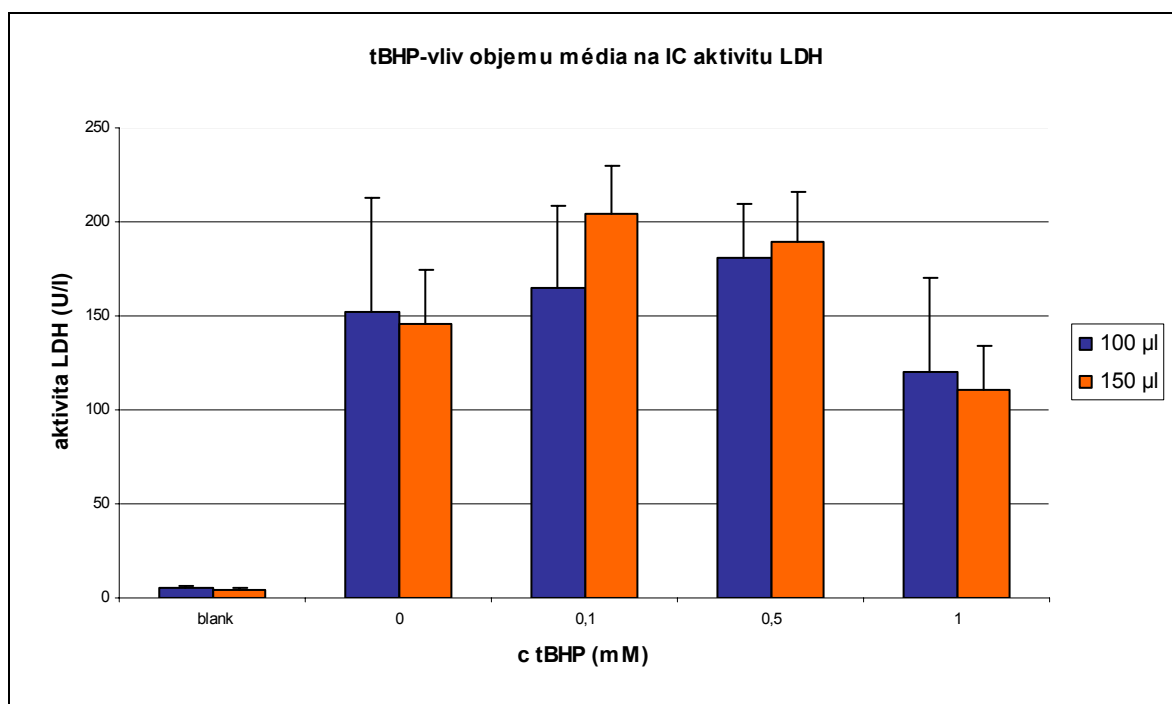


Obr. 19: Vliv objemu média na extracelulární aktivitu LDH po inkubaci s tBHP (n = 6, kultivace – 100 μ l, 150 μ l média, 2 h seeding, 15 min. inkubace s 100 μ l, 150 μ l tBHP; ** - p < 0,01, porovnáno s 0 mM tBHP.)

Tabulka IX: Vliv objemu média na EC LDH (hodnoty k obr.19).

c tBHP (mM)	Aktivita EC LDH (100 μ l)	Aktivita EC LDH (150 μ l)
blank	4,904 \pm 1,463	4,241 \pm 1,522
0,0	11,004 \pm 1,531	6,667 \pm 1,418
0,1	24,225 \pm 3,769	14,748 \pm 5,795
0,5	41,373 \pm 8,304	16,301 \pm 4,608
1,0	13,430 \pm 8,215	5,349 \pm 1,324

Vedle extracelulární byla analyzována i intracelulární aktivita LDH. Z údajů uvedených na obr. 20 vyplývá, že u buněk inkubovaných ve 100 μ l a 150 μ l nedošlo k odlišným změnám intracelulární aktivity po inkubaci s tBHP. Intracelulární aktivita LDH navíc zůstala téměř stálá u většiny koncentrací tBHP.



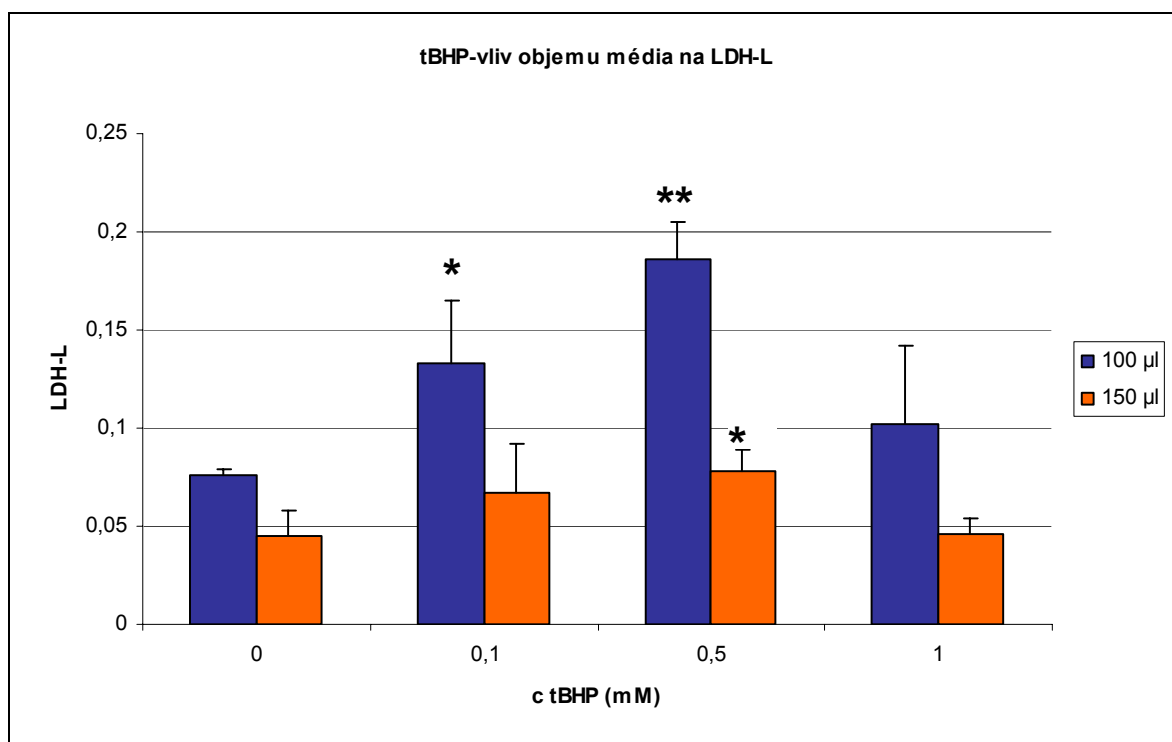
Obr. 20: Vliv objemu média na intracelulární aktivitu LDH po inkubaci s tBHP (n = 6, kultivace – 100 μ l, 150 μ l média, 2 h seeding, 15 min. inkubace s 100 μ l, 150 μ l tBHP).

Tabulka X: Vliv objemu média na IC LDH (hodnoty k obr.20).

c tBHP (mM)	Aktivita IC LDH (100 μ l)	Aktivita IC LDH (150 μ l)
blank	4,826 \pm 1,387	4,119 \pm 0,223
0,0	152,385 \pm 60,363	145,473 \pm 28,607
0,1	165,126 \pm 43,076	204,396 \pm 25,278
0,5	180,869 \pm 28,317	189,831 \pm 25,828
1,0	119,957 \pm 49,974	110,515 \pm 23,155

Z hodnot intra- a extracelulární aktivity LDH byly nakonec vypočteny hodnoty LDH-L. V obou případech se s rostoucí koncentrací tBHP (data viz. Tabulka XI) mění i hodnoty LDH-L; u 100 μ l se poškození hepatocytů s rostoucí koncentrací tBHP statisticky významně zvyšuje. U koncentrační řady s objemem média 150 μ l

je z grafu (obr. 21) patrné, že hodnoty jsou oproti koncentrační řadě s objemem 100 μ l média nižší, což svědčí o menším poškození buněk.



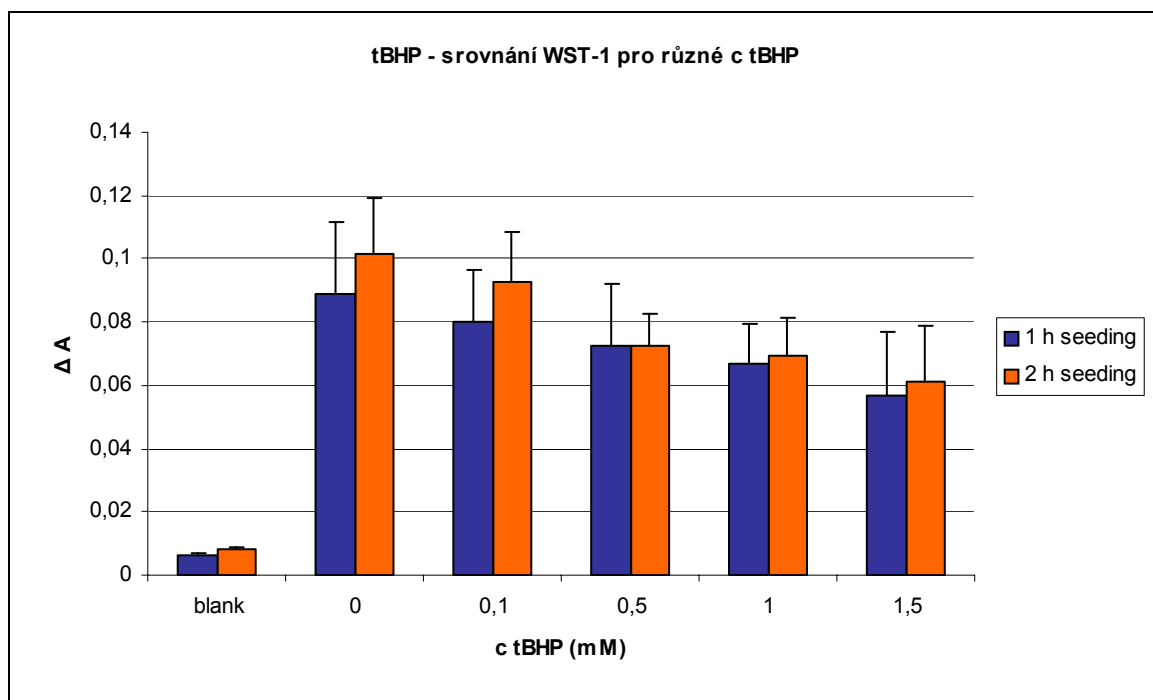
Obr. 21: Vliv objemu média o různých koncentracích tBHP na LDH-L (n = 6, kultivace – 100 μ l, 150 μ l média, 2 h seeding, 15 min. inkubace s 100 μ l, 150 μ l tBHP; * - p < 0,05; ** - p < 0,01, porovnáno s 0 mM tBHP.)

Tabulka XI: Vliv objemu média na LDH-L (hodnoty k obr.21).

c tBHP (mM)	Aktivita EC LDH (100 μ l)	Aktivita EC LDH (150 μ l)
0,0	0,076 ± 0,029	0,045 ± 0,013
0,1	0,133 ± 0,032	0,067 ± 0,025
0,5	0,186 ± 0,019	0,078 ± 0,011
1,0	0,102 ± 0,039	0,046 ± 0,007

4.5.2 Vliv doby seedingu na viabilitu buněk inkubovaných s tBHP

Byl sledován vliv délky seedingu (1, 2 hod.) na hepatocyty inkubované s různými koncentracemi tBHP. Viabilita hepatocytů stanovovaná pomocí WST-1 (obr. 22) byla u obou testovaných seedingů shodná (data viz. Tabulka XII).



Obr. 22: Vliv různých koncentrací tBHP a různých dob seedingů na WST-1 (n = 8, kultivace - 150 μ l média, 1 h, 2h seeding, 15 min. inkubace s 150 μ l tBHP).

Tabulka XII: Vliv seedingu na viabilitu buněk (hodnoty k obr. 22).

c tBHP (mM)	ΔA (1 h seeding)	ΔA (2 h seeding)
blank	0,006 \pm 0,002	0,008 \pm 0,001
0,0	0,089 \pm 0,016	0,101 \pm 0,012
0,1	0,080 \pm 0,016	0,093 \pm 0,008
0,5	0,073 \pm 0,006	0,073 \pm 0,008
1,0	0,067 \pm 0,010	0,069 \pm 0,017
1,5	0,057 \pm 0,010	0,061 \pm 0,008

5. Diskuze a závěr

Buněčné kultury izolovaných hepatocytů *in vitro* patří v dnešní době mezi nejpoužívanější biologické modely ve výzkumu. Jsou používány při studiu buněčných mechanismů specifických pro jaterní buňky, studiu jaterních onemocnění, hepatotoxicity a metabolismu. Buněčné kultury jsou pro testování velice vhodné, protože se pracuje s dobře charakterizovaným buněčným typem a výsledky nejsou ovlivněny interakcemi s jinými buněčnými typy.

Na druhou stranu je třeba počítat i s omezeními, které použití buněčných kultur přináší. Buňky jsou kultivovány za nefyziologických podmínek v umělém kultivačním médiu, jehož složení není zcela shodné se složením vnitřního prostředí. Kultivace jsou prováděny v atmosféře s mnohonásobně vyšším tlakem kyslíku, než odpovídá situaci *in vivo*. Kultivované buňky také postrádají přítomnost jiných buněčných typů, se kterými by *in vivo* komunikovaly. Odlišnost kultivace hepatocytů *in vitro* od situace *in vivo* vede ke změnám morfologie buněk, jejich citlivosti na různé podněty, mění se i exprese genů. Kultura hepatocytů *in vitro* tedy nemusí zcela správně odrážet podmínky *in vivo*.

Cílem práce bylo popsat vliv různých kultivačních podmínek (denzita buněk, objem kultivačního média a doby seedingu) na viabilitu buněk a to u intaktních buněk a u buněk inkubovaných s modelovou hepatotoxickou látkou – tBHP. Ze získaných dat potom určit optimální podmínky pro kultivaci hepatocytů.

Proto aby bylo možné správně posoudit stav hepatocytů při různých kultivačních podmínkách bylo nejprve nutné provést optimalizaci metod pro zjištění viability buněk kultivovaných na vícejamkových destičkách: stanovení aktivity laktátdehydrogenázy a testu WST-1.

Laktátdehydrogenáza je enzym lokalizovaný téměř výhradně v cytoplasmě a je přítomný ve všech buňkách těla. Neporušená cytoplazmatická membrána je pro LDH nepropustná, pokud ale dojde k jejímu porušení, uniká LDH do kultivačního média, kde je možno ji detekovat.

Nejdříve byla testována různá denzita buněk, kvůli zjištění linearity stanovení intracelulární i extracelulární aktivity LDH. Testovány byly denzity 30 000 bb/j a 60 000 bb/j, u kterých byla nejdříve stanovena intracelulární LDH. U denzity

30 000 bb/j byla linearita signálu zachována po dobu 4 minut, u 60 000 bb/j jen 90 s. Při stanovení extracelulární LDH byla zachována linearita v obou případech v celém rozsahu. Protože bylo dále pracováno pouze s denzitou 30 000 bb/j, byly použité parametry stanovení shledány jako optimální.

Doposud byla detekce aktivity LDH prováděna standardně při 37 °C, což je teplota doporučená výrobcem kitu pro stanovení aktivity LDH (Ecoline S+). Bylo třeba zjistit, zda by bylo možné detekci provádět při 20 °C a tím odstranit krok, při kterém je třeba inkubovat reakční směs pro LDH a temperovat detekční celou spektrofotometru na 37 °C. Byla stanovena aktivita LDH v totožných vzorcích kultivačního média s detekcí při 20 °C a 37 °C. Z výsledků bylo patrné, že aktivita LDH při 37 °C je průměrně o 20 % vyšší, než při 20 °C. Tím se potvrdilo, že pro detekci aktivity LDH je optimální teplota 37 °C. A proto byla při této teplotě prováděna další stanovení.

Dále bylo nutné optimalizovat dobu, po kterou má být buněčná kultura hepatocytů inkubována s Cell Proliferation Reagent WST-1. WST-1 je po přidání do kultury hepatocytů přeměněn působením mitochondriálních a cytoplazmatických dehydrogenáz na formazan, který je poté spektrofotometricky detekován. Jako optimální inkubace s WST-1 byla doposud používána doba 2 h.⁴⁵ Pro zjištění, zda je tato kultivační doba optimální i v našich podmínkách, byla kultura hepatocytů inkubována s WST-1 po 1, 2, 3 hodiny. Z výsledků bylo patrné, že s rostoucí dobou kultivace hepatocytů s WST-1 roste signál přibližně lineárně. Vhodné by tedy bylo inkubovat buňky s WST-1 po dobu 3 hodin, kdy je signál nejvyšší. Pro běžná stanovení by ale byla 3 hodinová inkubace příliš časově náročná, a proto je možné detekci provádět i po 1 h, kdy je nárůst signálu dostatečně vysoký a zároveň je zkrácena doba stanovení.

Dalším testovaným parametrem byl vliv různých objemů kultivačního média na viabilitu buněk kultivovaných v 96-WP. Doposud byl jako standardní používán objem kultivačního média 100 µl, do 96-WP je ovšem možné pipetovat i vyšší objemy, proto byl sledován vliv na viabilitu buněk u objemů 100, 125, 150, 175 a 200 µl, přičemž byla ve všech jamkách výsledná denzita buněk shodná a to 30 000 bb/j. Viabilita buněk byla stanovována testem WST-1. Z výsledků je zřejmé, že objem média statisticky významně ovlivňuje viabilitu kultivovaných hepatocytů, s rostoucím objemem se viabilita buněk zvyšuje, u všech testovaných objemů byla prokázána vyšší dehydrogenázová aktivita v porovnání s původně

používaným objemem 100 μ l. Tento nárůst by mohl souviset s tím, že jsou hepatocyty kultivovány v atmosféře s mnohonásobně vyšším tlakem kyslíku, než odpovídá situaci *in vivo*. S narůstajícím objemem média ale parciální tlak kyslíku klesá a může se více přibližovat situaci *in vivo*, a proto buňky vykazují zvýšenou dehydrogenázovou aktivitu. Pro toto naše tvrzení jsme nenalezli žádné relevantní tvrzení v odborné literatuře.

V rámci optimalizace kultivačních podmínek byl testován i vliv seedingu buněk k povrchu 96-WP potaženého vrstvou kolagenu na jejich viabilitu. V původních pracích se doporučovaný čas seedingu lišil: 1,5 h⁴⁶, 2-3 h¹², 3 h⁴⁷. Během seedingu dochází k přisedání buněk k extracelulární matrix (kolagen typu I), a také k postupnému zmírňování důsledků izolačního stresu. Izolační stres vzniká použitím proteolytických enzymů, narušením buněčného mikroprostředí a ztrátou intercelulárních kontaktů.¹²

Vliv doby seedingu na viabilitu buněk byl zjišťován testem WST-1. Po 1, 2, 3 hodinách seedingu bylo z 96-WP vyklepnuto kultivační médium a přisednuté buňky byly 1 h inkubovány s WST-1. Z výsledků vyplývá, že s rostoucí dobou seedingu se viabilita hepatocytů významně zvyšuje, pravděpodobně díky většímu počtu přisedlých buněk a odeznění izolačního stresu. Z námi testovaných časů byla maximální viabilita buněk nalezena po 3 hodinovém seedingu.

Pro ověření výsledků, které byly zjištěny u intaktních buněk, bylo provedeno stanovení vlivu doby seedingu a různých objemů média na viabilitu buněk inkubovaných s modelovou hepatotoxickou látkou – tBHP.

tBHP je hepatotoxin používaný pro studium mechanismu buněčných změn způsobených účinkem volných radikálů. V buňkách vyvolává oxidační stres, jehož následkem je lipoperoxidace, zlomy v DNA, dysfunkce mitochondrií a poškození proteinů, což vede k buněčné smrti.⁴⁰

Vliv objemu média na viabilitu hepatocytů, které byly po přisednutí inkubovány 15 minut s různými koncentracemi tBHP, byl sledován pomocí stanovení aktivity LDH a WST-1 testem. Viabilita hepatocytů byla srovnávána u buněk kultivovaných ve standardním objemu média 100 μ l a objemu 150 μ l, u kterého byla v předchozích pokusech zjištěna viabilita vyšší.

Z výsledků bylo zjištěno, že viabilita klesá s rostoucí koncentrací tBHP u obou testovaných objemů. Tomu odpovídá snižování dehydrogenázové aktivity stanovované pomocí testu WST-1. Také nárůst extracelulární aktivity LDH a LDH-

L svědčí pro rostoucí poškození buněk. Snížení aktivity LDH i LDH-L u koncentrace tBHP 1 mM pravděpodobně souvisí s oxidačním poškozením bílkovin, které je tak rozsáhlé, že způsobilo neschopnost LDH přeměňovat substrát.⁴² U koncentrační řady s objemem média 150 μ l je z výsledků patrné, že hodnoty zjištěné testem WST-1 jsou oproti 100 μ l média nižší, což svědčí o větším poškození hepatocytů. Rozdíl mezi těmito páry hodnot ale není statisticky významný.

Při srovnávání viability stanovením aktivity extracelulární LDH a LDH-L výsledky ukazují nárůst enzymové aktivity v médiu u buněk inkubovaných v objemu média 100 μ l oproti objemu 150 μ l. Tento nálezn pravděpodobně svědčí pro vyšší odolnost vůči toxicitě tBHP u hepatocytů inkubovaných ve větším objemu média, resp. za nižšího parciálního tlaku kyslíku.

Jako další parametr byl sledován vliv délky seedingu na viabilitu hepatocytů inkubovaných s různými koncentracemi tBHP. Viabilita buněk klesá s rostoucí koncentrací tBHP, což odpovídá i předchozím měřením. Při 2 hodinovém seedingu je viabilita hepatocytů oproti 1 h seedingu mírně vyšší, tento rozdíl ale není statisticky významný.

Shrneme-li získané optimální podmínky stanovení laktátdehydrogenázy spektrofotometrickou metodou a srovnáme-li je s původně používanými podmínkami optimalizovaná denzita buněk 30 000 bb/j a teplota detekce 37 °C se shoduje se standardně používanými podmínkami. Pro stanovení WST-1 jsme určili optimální dobu inkubace buněk s reagentem na 1 hodinu.

Dále jsme sledovali vliv objemu kultivačního média na viabilitu hepatocytů. Zjistili jsme, že viabilita s rostoucím objemem média roste, což bylo potvrzeno jak u intaktních buněk, tak u buněk ovlivněných hepatotoxinem tBHP. Růst viability by mohl souviset s klesajícím parciálním tlakem kyslíku ve větším objemu kultivačního média.

Na závěr jsme sledovali vliv doby seedingu na viabilitu hepatocytů. Z výsledků vyplývá, že viabilita se s rostoucí dobou seedingu zvyšuje, což se potvrdilo u intaktních buněk. U buněk inkubovaných s tBHP ale nebyl rozdíl ve viabilitě mezi různě dlouho přisedajícími buňkami statisticky významný.

Z našich výsledků vyplývá, že kultivační podmínky mohou velmi významně ovlivňovat viabilitu buněk a pravděpodobně i jejich odolnost vůči toxickým látkám.

Seznam literatury

1. Brodanová M., Kordač V.: Klinická hepatologie, Grada Avicenum, Praha, 1993, s.11-13.
2. web – www.jatra.navajo.cz/jatra.jpg, 16.2.2009.
3. web – www.jatra.navajo.cz/jatra.jpg, 16.2.2009.
4. Janqueira L. C., Carneiro J., Kelley R. O.: Základy histologie, 7. vydání, H&H, Jinočany, 1997, s. 303-318.
5. Wilhelm Z., Hegyi P.: Fyziologie jater, *Praktické lékařství*, 2007, 3, s. 242-245.
6. Paulsen D. F.: Histologie a buněčná biologie, 1.vydání, H&H, Jinočany, 2004, s. 244-248.
7. web – www.en.wikipedia.org/wiki/Hepatic_lobule, 16.2.2009.
8. Trojan S. a kol.: Fyziologie, Avicenum, 1987.
9. web – www.vivo.colostate.edu/.../histo_acinus.html, 16.2.2009.
10. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.: Harperova biochemie, 4. české vydání, H&H, Jinočany, 2002.
11. Maurel P.: The use of adult human hepatocytes in primary culture and other in vitro systems to investigate drug metabolism in man, *Adv. Drug Del. Rev.*, 1996, 22, s. 105-132.

12. Kučera O., Lotková H., Křiváková P., Roušar T., Červinková Z.: Modelové systémy pro studium toxického poškození hepatocytů *in vitro*, *Československá fyziologie*, 2006, 3, s. 103-110.
13. Červenková K., Belejová M., Veselý J., Chmela Z., Rypka M., Ulrichová J., Modrianský M., Maurel P.: Cell suspensions, cell cultures, and tissue slices – Important metabolic *in vitro* systems, *Biomed. Papers*, 2001, 145(2), s. 57-60.
14. Bach P.H., Vickers A. E. M., Fisher R.: The use of tissue slices for pharmacotoxicology studies, The report and recommendations of ECVAM workshop 20, *Alternat. Lab. Animals*, 1996, 24, s. 893-923.
15. Berry M. N., Edwards A. M., Barritt G. J.: High-yield preparation of isolated hepatocytes from rat liver. Isolated Hepatocytes preparation. Properties and Application, Elsevier, New York, 1991, s. 15-81.
16. Seglen P. O.: Preparation of isolated rat liver cells, *Methods Cell Biol.*, 1976, 13, s. 29-83.
17. Mascotti K. et al.: HPC viability measurement: trypan blue versus akridine orange and propidium iodide, *Transfusion*, 2000, 40, s. 693-696.
18. Altman S. et al.: Comparison of Trypan Blue Dye Exclusion and fluorimetric Assay for Mammalian Cell Viability Determinations, *Biotechnology Progress*, 1993, 9, s. 671-674.
19. Kružík P., Moos J., Vlček R.: Analyzátory buněk a částic, *In vitro diagnostika*, 2006, 3, s. 4-5.
20. Nieminen A. L., Gores G. J., Bond J. M., et al.: A novel cytotoxicity Screening assay using a multiwell fluorescence scanner, *Toxicol. and Appl. Pharm.*, 1992, 115, s. 147-155.

21. web - www.vscht.cz/kch/kestazeni/post03/25.pdf, 16.3.2009.
22. Sauch J. F., Flanigan D., Galvin M. L., Berman D., Jakubowski W.: Propidium iodide as an indicator of *Giardi* cyst viability, *Appl. and Envir. Mikrob.*, 1991, s. 3243-3247.
23. Berridge M. V. et al.: The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts, *Biochemica*, 1996, 4, s. 15-19.
24. Mosmann T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. of Immunol. Methods*, 1983, 65, s. 55-63.
25. Scudiero D. A. et al.: Evaluation of soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines, *Cancer Res.*, 1988, 48, s. 4827-4833.
26. Rohem N. W., Rodgers G. H., Hatfield S. M., Glasebrook A. L.: An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT, *J. Immunol. Methods*, 1991, 142, s. 257-265.
27. Ishiyama M., Tominaga H., Sakamoto K., Ohkura Y., Ueno K., Watanabe M.: Novel cell proliferation and cytotoxicity assays using a tetrazolium salt produces a water-soluble formazan dye, *In Vitro Toxicol.*, 1995, 8, s. 187-190.
28. web - www.ub.es/biocel/wbc/biocel/pdf/08%20-%20WST02.pdf, 30.3.2009.
29. Racek, J. et al.: *Klinická biochemie*, 1. vydání. Galén, Praha, 1999.
30. Fotakis G., Timbrell J. A.: In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicol. Lett.*, 2006, 160, s. 171-177.

31. Neumeister, Besenthal, Liebrich: *Klinikleitfaden Labordiagnostik*, Urban&Fischer, München/Jena, 2003.
32. Hwang Y. C., Bark S., Ellery C. A. et al.: Sorbitol dehydrogenase: a novel target for adjunctive protection of ischemic myocardium, *Faseb J.*, 2003, 17, s. 2331.
33. Masopust, J.: *Klinická biochemie. Požadování a hodnocení biochemických vyšetření*, Karolinum, Praha, 1998.
34. Novák F.: *Úvod do klinické biochemie*, Praha, 2002, s. 247-248.
35. Pernet P., Vaurbourdolle M., Lim S. K., Cynober I., Giboudeau, J.: Kinetic nephelometric determination of albumin produced by rat hepatocytes in culture, *Clin. Chem. Acta*, 1996, 249, s.141-147.
36. Higashiyama S., Noda M., Muraoka S., Uyama N., Kawada N., Ide T., Kawase M., Yagi K.: Maintenance of hepatocyte functions in coculture with hepatic stellate cells, *Biochem. Eng. J.*, 2004, 20, s. 113-118.
37. Haidara K., Morel I., Abalea V., Gascon B. M., Denizeau F.: Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced apoptosis in rat hepatocytes: involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum, *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1542, s. 173-185.
38. Lazzé M. C., Pizzala R., Savio M., Stivala L. A., Prosperi E., Bianchi L.: Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells, *Mut. Res.*, 2003, 535, s.103-115.
39. Martín C., Martínez R., Navarro R., Ruiz-Sanz J. I., Lacort M., Begona Ruiz-Larrea M. B.: Tert-butylhydroperoxide-induced lipid signaling in hepatocytes: involvement of glutathione and free radicals, *Biochemical Pharmacol.*, 2001, 62, s. 705-712.

40. Van der Laan L., Oyen W. J. G., Verhofstad A. A. J., Tan E. C. T. H., Ter Laak H. J., Gabreels-Festen A., Hendriks T., Goris R. J. A.: Soft tissue repair capacity after oxygen-derived free radical-induced damage in one hindlimb of the rat, *J. of Surg. Res.*, 1997, 72, s. 60-69.
41. Dizdaroglu, M.: Chemical determination of free radical-induced damage to DNA, *Free Radic. Biol. Med.*, 1991, 10, s. 225-242.
42. Buc-Calderon P., Latour I., Roberfroid M.: Biochemical changes in isolated hepatocytes exposed to tert-butylhydroperoxide. Implications for its cytotoxicity, *Cell Biol. and Toxicol.*, 1991, 7, s. 129-143.
43. Orrenius S., Burkitt M. J., Kass G. E., Dypbukt J. M., Nicotera P.: Calcium ions and oxidative cell injury, *Ann. Neurol.*, 1992, 32, s. 33-42.
44. Byrne A. M., Lemasters J. J., Nieminen A. L.: Contribution of increased mitochondrial free Ca^{2+} to the mitochondrial permeability transition induced by tert-butylhydroperoxide in rat hepatocytes, *Hepatology*, 1999, 29, s. 1523-1531.
45. Kučera O., Lotková H., Kandár R., Héžová R., Mužáková V., Červinková Z.: The model of D-galaktosamine-induced injury of rat hepatocytes in primary culture, *Acta Medica*, 2006, 49(1), s. 59-65.
46. Starke P. E., Hoek J. B., Farber J. L.: Calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of irreversible cell injury in cultured hepatocytes, *J. Biol. Chem.*, 1986, 261(7), s. 3006-3012.
47. Gorla G. R., Malhi H., Gupta S.: Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells, *J. Cell Sci.*, 2001, 114, s. 2943-2951.