

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

**Charakterizace a využití buněčné linie HepG2**

Bakalářská práce

University of Pardubice  
Faculty of chemical technology

**Characterization and use of the HepG2 cell line**

Bachelor thesis

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Eva Svobodová**  
Osobní číslo: **C17218**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Charakterizace a využití buněčné linie HepG2**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši pojednávající o savčí buněčné linii HepG2. V úvodní části bakalářské práce popište původ HepG2 buněk a zaměřte se také na způsob jejich kultivace.
2. V hlavní části práce tuto buněčnou linii podrobně charakterizujte, uveďte konkrétní příklady využití buněk HepG2 při *in vitro* testování. Porovnejte testování toxicity látek *in vitro* a *in vivo*.
3. Ke studiu tématiky použijte především zahraniční odbornou literaturu. Vyhledávání zdrojů provádějte prostřednictvím elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod. Informace přehledně zpracujte podle pokynů a doporučení školitele.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

**Mgr. Jiří Handl**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce:

**Mgr. Pavlína Majtnerová**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

**20. prosince 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**3. července 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

## **Prohlašuji:**

Práci s názvem *Charakterizace a využití buněčné linie HepG2* 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 20. 5. 2021

Eva Svobodová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala Mgr. Pavlíně Majtnerové za potřebné rady, věcné připomínky, a především za trpělivost a motivaci, kterou mi k vypracování této bakalářské práce dodala. Dále Mgr. Jiřímu Handlovi, Ph.D. za přispění cenných rad a informací. V neposlední řadě patří velké poděkování mé rodině a přátelům, kteří mi po celou dobu studia na Univerzitě Pardubice byli tou největší oporou.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce je věnována popisu savčí buněčné linii HepG2 konkrétně buněčné linii HepG2. Úvodní část je zaměřena na přehled a popis jednotlivých živočišných buněčných kultur, dále na kultivaci savčích buněk včetně kultivačních médií a poslední kapitola je zaměřena na buněčné modely. V hlavní části práce jsou buňky HepG2 charakterizovány, konkrétně jejich původ, morfologické znaky, jejich biochemické vlastnosti a kultivace. V druhé polovině práce jsou pak shrnuty vybrané studie využívající jako buněčný model buněčnou linii HepG2.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

kultivace buněk, buněčné modely, buněčná linie HepG2, využití HepG2

## **TITLE**

*Characterization and the use of the HepG2 cell line*

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis is devoted to the description of mammalian cells, specifically the HepG2 cell line. The introduction is focused on an overview and description of individual animal cell cultures, the cultivation of mammalian cells, including culture media, and the last chapter on cell models. In the half part of of the work is described the characterization of HepG2 cells, specifically the origin, morphological features, biochemical properties and culture. In the second half, it is presented five selected studies focusing on the use of the HepG2 cell line.

## **KEYWORDS**

cell cultivation, cell models, cell line HepG, use of the HepG2

# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ .....	11
SEZNAM TABULEK .....	12
ÚVOD .....	14
<b>1 KULTURY ŽIVOČIŠNÝCH BUNĚK .....</b>	<b>15</b>
1.1 Transformace .....	18
1.2 Transfekce .....	20
<b>2 KULTIVACE SAVČÍCH BUNĚK .....</b>	<b>21</b>
2.1 Kultivační podmínky .....	21
2.2 Kultivační média .....	22
2.2.1 EMEM / MEM .....	23
2.2.2 DMEM a RPMI médium .....	24
2.2.3 Ham's F10, F12 a DMEM/F12 .....	25
2.3 Subkultivace buněk .....	26
2.4 Buněčné modely .....	27
<b>3 CHARAKTERIZACE HepG2 .....</b>	<b>29</b>
3.1 Původ buněčné linie HepG2 .....	29
3.2 Morfologické znaky .....	30
3.3 Biochemické vlastnosti .....	31
3.4 Kultivace HepG2 .....	32
3.5 Cytochrom P450 .....	32
<b>4 VYUŽITÍ BUNĚK HepG2 .....</b>	<b>34</b>
4.1 Médium buněčné kultury ovlivňuje reakci na cytotoxicitu selenu .....	34
4.2 Cytotoxický účinek esenciálního oleje z listů <i>Conobea scoparioides</i> .....	37
4.3 Zelený čaj a černý čaj inhibují proliferaci a migraci buněk HepG2 .....	38
4.4 Antioxidační aktivity a ochranné účinky peptidů kachních embryí .....	42
4.5 Exprese enzymů v buňkách HepG2 kultivovaných nanotechnologií .....	44



<b>5</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>47</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>48</b>

## SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Vznik imortalizovaných buněčných linií .....	16
Obrázek 2: Schéma buněčných kultur .....	28
Obrázek 3: Buňky HepG2 pod mikroskopem se zvětšením 400x .....	30
Obrázek 4: Testované buňky HepG2 .....	36
Obrázek 5: Změna morfologie buněk v závislosti na koncentraci.....	40
Obrázek 6: Inhibovaná invaze HepG2 .....	41
Obrázek 7: Fluorescenční obrazy dichlorofluoresceinu v buňkách HepG2 .....	44
Obrázek 8: Morfologie buněk HepG2 za použití konvenční destičky.....	45

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Rozdíly primární a sekundární buněčné kultury.....	17
Tabulka 2: Obsah bioaktivních složek v zeleném a černém čaj .....	39
Tabulka 3: Změna podílu apoptotických buněk u HepG2 buněk ovlivněných černým nebo zeleným čajem.....	41

## SEZNAM ZKRATEK

Akt	proteinkináza B
BME	„Eagle's Basal Medium” - Eaglovo bazální médium
cDNA	„complementary DNA” - komplementární DNA
CYP	cytochrom P450
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle's Medium“ - Dulbekovo modifikované Eaglovo médium
DPPH	„2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl” - 2,2-difenyl-1-picrylhydrazyl
EGCG	„epigallocatechin gallate” - epigalokatechin galát
EMEM	„Eagle's Minimum Essential Medium“ - Eagleovo minimální esenciální médium
EO	esenciální olej
FBS	„fetal bovine serum” - fetální hovězí sérum
FCS	„fetal calf serum” - fetální telecí sérum
Ham's	Hamova směs
HB	„hepatoblastoma” - hepatoblastom
HCC	„hepatocellular carcinoma” - hepatocelulární karcinom
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
HH	„human hepatocytes” - lidské hepatocyty
HPLC	„high-performance liquid chromatography“ - vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LDL	„low-density-lipoprotein” - lipoproteiny o nízké hustotě
MEM	„Minimum Essential Medium“ - Minimální esenciální médium
MSC	seleno-methylselenocystein
PBS	„phosphate-buffered saline“ - fosfátový pufr
PI3K	„phosphoinositide 3-kinase” - fosfatidylinositol-3-kináza
ROS	„reactive oxygen species” - reaktivní formy kyslíku
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute”
VLDL	„very-low-density lipoprotein“ - lipoproteiny o velmi nízké hustotě

## ÚVOD

Buněčná kultura je souborem buněk, které rostou za kontrolovaných podmínek. V praxi se jedná o kultivaci buněk získaných z buněk živočišných. Udržovaný a kontrolovaný růst buněk zdokonalený do dnešní podoby velmi usnadnil výzkumy různého typu. Celá řada výzkumů je zaměřena právě na problematiku rakoviny a nádorové buňky jsou pro ně vhodným materiálem pro získání buněčných linií, jako je například buněčná linie HepG2.

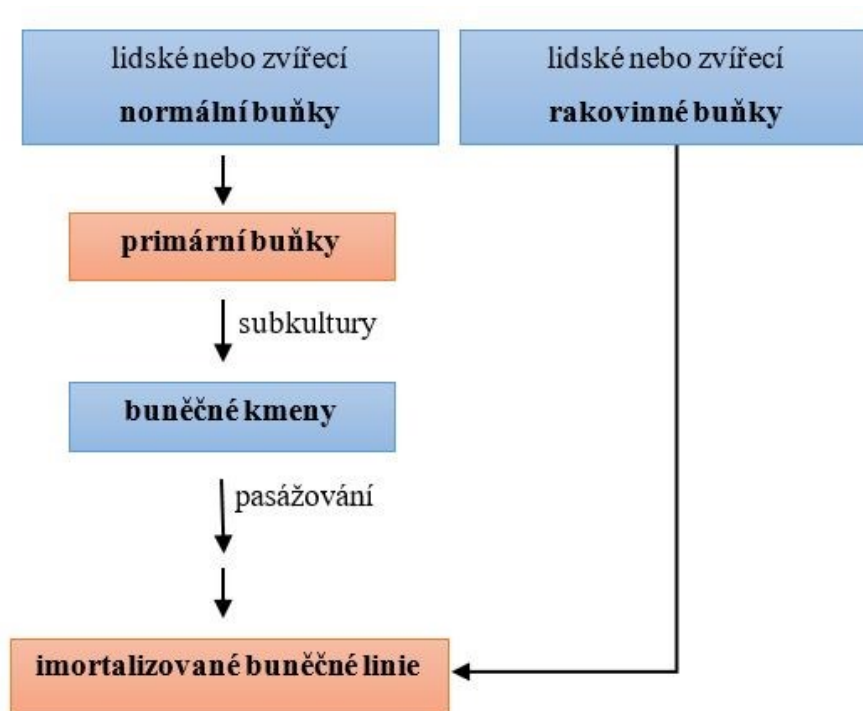
HepG2 je buněčná linie odvozená z buněk lidského karcinomu jater, z jaterní tkáně patnáctiletého mladíka, který měl dobře diferencovaný hepatocelulární karcinom (López-Terrad et al., 2009). Buněčnou linii HepG2 lze považovat za skvělý *in vitro* model, který se běžně používá ve studiu metabolismu léčiv, studiu hepatotoxicity a slouží zároveň k porozumění mechanismů spojených nejen s nádorovým bujením, ale i mnoha dalšími onemocněními jater.

Cílem této bakalářské práce bylo charakterizovat zmíněnou buněčnou linii HepG2, popsat její vlastnosti a využití především v oboru medicíny. V závěru práce je popsáno několik vědeckých studií, ve kterých jsou HepG2 buňky testovány.

# 1 KULTURY ŽIVOČIŠNÝCH BUNĚK

Kultura živočišných buněk je významným nástrojem biologického výzkumu. Zahrnuje izolaci buněk z tkáně před zavedením kultury do vhodného umělého prostředí. Buňky mohou být získány z mnohobuněčných eukaryot, již zavedených buněčných linií nebo zavedených buněčných kmenů. V polovině 20. století se kultivace živočišných buněk stala běžnou laboratorní technikou, ale koncept udržování živých buněčných linií oddělených od původního tkáňového zdroje byl objeven již v 19. století. Počáteční izolace buněk z tkání může být dosaženo rozkladem tkáně pomocí enzymatických či mechanických metod. Zdrojem izolovaných buněk je obvykle prostředí *in vivo*, ale někdy jsou buňky také odvozeny od existující buněčné linie nebo buněčného kmene (Bhatia, 2019). Mezi kultury živočišných buněk patří i lidské buněčné kultury, které mají svůj velký význam nejen pro buněčnou terapii. Živočišné kultury buněk se dělí do 4 skupin – primární a sekundární buněčné kultury, buněčné kmeny a buněčné linie (Yao et al., 2017).

*Primární kultury* jsou kultury vyizolované nebo získané přímo ze zvířecí či lidské tkáně enzymatickými, popřípadě mechanickými metodami. Tyto buňky jsou obvykle pomalu rostoucí, heterogenní a nesou všechny rysy tkáně svého původu. Protože jsou odvozeny z tkáně a nejsou modifikovány, jsou podobné stavu *in vivo*. Z tohoto důvodu poskytují vynikající modelové systémy pro studium fyziologie a biochemie buněk (např. metabolické studie, stárnutí, studium signalizace), účinků léků a toxických sloučenin na buňky. Tyto kultury se přestanou dělit (nebo stárnout) po určitém počtu buněčných dělení a může být obtížné je kultivovat a udržovat. Primárním cílem této kultury je udržovat růst buněk na vhodném podkladu dostupném ve formě skleněných nebo plastových nádob za kontrolovaných podmínek prostředí. Vyznačují se svojí krátkodobou životností, která se počítá jen na několik dní, proto je potřeba buňky pasážovat (Bhatia, 2019). Dále se rozlišuje původ primárních kultur, zda kultura pochází z fyziologických buněk nebo buněk nádorových. Fyziologické (normální) tkáně obvykle vedou ke vzniku buněčných linií, které se množí pouze po určitou dobu, zatímco nádorové tkáně vytvářejí souvislé buněčné linie, které se mohou nepřetržitě množit, dokud mají dostatek živin (Geraghty et al., 2014). Princip vzniku imortalizovaných buněčných linií z primárních buněk normálních a rakovinných je naznačen v obrázku č. 1.



**Obrázek 1: Vznik imortalizovaných buněčných linií**

(Převzato a upraveno dle: Ryu, 2017).

Mezi nejčastější typy primárních buněk používaných ve výzkumu patří epitelové buňky, fibroblasty, svalové buňky nebo mezenchymální kmenové buňky (Kasper et al., 2018). Kultury jsou zpočátku heterogenní (představují směs typů buněk přítomných ve tkáni) a právě kvůli své omezené životaschopnosti mohou být udržovány *in vitro* pouze po omezenou dobu. Věk živočišného zdroje ovlivňuje zdraví a odolnost buněčné kultury – buňky tkáně z mladších, embryonálních nebo časně postnatálních zvířat přežívají lépe a bývají zdravější než buňky tkáně starších zvířat. Populace primárních buněk bude také vždy více heterogenní než kultura imortalizovaných buněk, bez ohledu na to, jak opatrný byl vědec při extrakci a čištění požadovaných buněk. Primární tkáňová kultura umožňuje přímé zkoumání buněk v pečlivě kontrolovaném prostředí *in vitro*. Tyto experimenty mohou být zvláště výhodné pro srovnání mezi buňkami získanými ze zvířete divokého typu a buňkami získanými z geneticky modifikovaného zvířete (Carter et al., 2015). Předpokládá se, že vývoj kontinuálních buněčných linií z primárních kultur zahrnuje mutaci, která mění jejich vlastnosti ve srovnání s vlastnostmi konečných buněčných linií. Sériové subkultivování buněčných linií v čase může zvýšit šance na genotypovou a fenotypovou variabilitu (Bhatia, 2019).

*Sekundární buněčná kultura* vzniká po prvním pasážování buněk, přechodem na jiný druh kultivačního systému. Pasážování se obvykle provádí, když buňky v adherentních kulturách spotřebují veškerý dostupný substrát nebo když buňky v suspenzních kulturách překonají kapacitu média pro podporu dalšího růstu. Buněčná proliferace začne klesat nebo se úplně zastaví. Aby se udržela optimální hustota buněk pro další růst a aby se podpořila další proliferace, musí být primární kultura subkultivována (Bhatia, 2019). Nejzákladnější rozdíly mezi primární a sekundární buněčnou kulturou jsou přehledně představeny v tabulce č. 1.

**Tabulka 1: Rozdíly primární a sekundární buněčné kultury**

(Převzato a upraveno dle: Bhatia, 2019).

<b>Primární buněčná kultura</b>	<b>Sekundární buněčná kultura</b>
Přímo získaná ze živočišné nebo rostlinné tkáně	Pochází z primární kultury
Úzce připomíná rodičovskou tkáň	Minimální podobnost s rodičovskou tkání
Biologická odpověď buňky může být blíže reakci v prostředí <i>in vivo</i>	Biologická odpověď buňky se může lišit od prostředí <i>in vivo</i>
První kultura pocházející z původních buněk	Pochází ze stávající kultury
Nelze transformovat	Lze transformovat
Menší šance mutace	Může zvýšit pravděpodobnost mutace nebo genetické změny primárních buněk
Omezená životnost	Prodlužuje životnost buněk
Riziko kontaminace je vysoké	Riziko kontaminace je nižší
Těžší údržba	Poměrně snadno se udržuje

*Buněčné kmeny* jsou odvozeny buď z primární kultury, buněčné linie nebo klonováním buněk majících specifické vlastnosti nebo vlastnosti, které musí být definovány. Buněčné kmeny jsou buňky, které byly přizpůsobeny kultuře, ale na rozdíl od buněčných linií mají diploidní chromozomovou výbavu a konečný dělicí potenciál, což znamená, že před smrtí prodělají pouze omezený počet buněčných dělení.

Maximální počet dělení, které je buňka schopna prodělat je označován jako tzv. Hayflickův limit (Bhatia, 2019). Hayflickův limit definuje počet možných buněčných dělení a závisí na délce chromozomálních telomer, které se zkracují ve standardních buňkách při každém dělení buněk. V simulaci je výchozí Hayflickův limit normální



kmenové buňky 72 jako aproximace realistického čísla mezi 50 a 70 (Shay a Wright, 2000). Každá buňka vyvíjející se z buněčného dělení je označena Hayflickovým limitem svého předchůdce mínus 1 (Groten et al., 2018).

Neimortalizované buňky se přestanou dělit po 40 až 60 zdvojnásobení populace a poté ztrácí svou schopnost proliferace a vstupují do stavu senescence (Hayflick, 1998). Senescence, jinak řečeno buněčné stárnutí, je definováno jako zastavení buněčného cyklu vyvolané řadou mechanismů, včetně zkracování telomer, jiných forem genotoxického stresu, nebo zánětlivých cytokinů (Florido et al., 2011). Bylo zjištěno, že zdvojnásobení populace lidské buněčné linie je 50 až 100krát, zatímco myší buněčné linie se před zánikem rozdělí 20–30krát (Bhatia, 2019).

*Buněčné linie* jsou trvale ustavené buněčné kultury, které se vyznačují neomezenou životaschopností a schopností množit se donekonečna za použití vhodného čerstvého média a prostoru pro množení (Ulrich et al., 2001). Buněčné linie vznikají z buněčných kmenů procesem transformace nebo izolací přímo ze živé tkáně, například z nádorových buněk, u kterých dochází k selhání buněčného cyklu. Jsou imortalizované, transformované a tumorigenní (Bhatia, 2019).

Poté, co jsou požadované buňky izolovány ze živé tkáně, mohou být následně udržovány za pečlivě kontrolovaných podmínek. Tyto podmínky se liší pro každý typ buňky, ale obecně je tvoří vhodné nádoby se substrátem nebo médiem, které dodává základní živiny (aminokyseliny, uhlohydráty, vitamíny, minerály), růstové faktory, hormony a plyny (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>) a reguluje fyzikálně-chemické prostředí (pH pufr, osmotický tlak, teplota). Většina buněk vyžaduje povrch nebo umělý substrát (přilnavá nebo jednovrstvá kultura), zatímco jiné mohou být pěstovány volně plovoucí v kultivačním médiu (suspenní kultura) (Bhatia, 2019; Verma et al., 2020).

## 1.1 Transformace

Jedním z kritických kroků ve vývoji rakovinné buňky je získání neomezené replikační délky života, tzv. imortalizace. Experimentální modelové systémy navržené ke studiu buněčné transformace *ex vivo* se dosud spoléhaly na *in vitro* výběr subpopulace buněk, které byly imortalizovány ošetřením chemických nebo fyzikálních mutagenů a výběrem vzácných klonálních variant (Lundberg et al., 2002).

Vývoj *in vitro* testů pro detekci přeměny normálních buněk na nádorové buňky v kultuře, proces zvaný buněčná transformace, tedy představoval hlavní pokrok ve výzkumu rakoviny. Takové testy jsou určeny k detekci transformovaných buněk, které vykazují *in vitro* růstové vlastnosti nádorových buněk po expozici kultury normálních buněk karcinogennímu činidlu. Prvním a nejrozšířenějším testem buněčné transformace je fokální test, který vyvinuli Howard Temin a Harry Rubin v roce 1958. Fokální test je založen na schopnosti rozpoznat skupinu transformovaných buněk jako morfoloicky odlišné proti pozadí normálních buněk na povrchu kultivační misky. Zaostřovací test využívá tři vlastnosti transformovaných buněk: změněné morfologie, ztráty kontaktní inhibice a ztráty inhibice růstu závislé na hustotě. Výsledkem je vytvoření kolonie morfoloicky změněných transformovaných buněk, které přerůstají pozadí normálních buněk v kultuře (Cooper, 2000).

Pojem transformace v souvislosti s živočišnými buňkami znamená změnu vedoucí k jejich nekontrolovatelnému růst, tudíž ke vzniku nádorových buněk. Tento proces může nastat spontánně, může být indukovan chemicky nebo virově (Holmes a Jobling 1996). Když primární kultura prochází genetickou transformací, rozdělí se a vznikne immortalizovaná sekundární buněčná linie. Mutace, které nastávají, postihují geny signálních drah, buněčné apoptózy, reparace DNA apod. I přes deregulaci řady intracelulárních signalizačních systémů je nekontrolovaný růst nádoru výsledkem selhání buněčného cyklu a apoptózy, které doplňkově ovlivňují homeostázu tkání. Nádorové buňky jsou charakteristické poruchou právě této rovnováhy, která je způsobena zvýšením rychlosti buněčného cyklu a rezistencí k indukci apoptózy (Cooper, 2000). Během buněčného dělení jedné kmenové buňky nastává postupná akumulace několika mutací v uvedených skupinách genů, které rezultují v její nádorovou transformaci (Vassilev a Depamphilis 2017). Kromě toho velké množství studií prokázalo, že nádorové buňky se musí vyhnout imunitnímu rozpoznávání a rekrutovat angiogenní i neangiogenní normální buňky, jako jsou makrofágy, aktivované fibroblasty a zánětlivé buňky a musí formovat mikroprostředí tumoru za účelem pokroku k plné malignitě (Egeblad et al., 2010; Quezada et al., 2011; Giancotti, 2014).

## 1.2 Transfekce

Transfekce je proces umělého zavádění nukleových kyselin (DNA nebo RNA) do eukaryotních buněk pomocí jiných prostředků než virové infekce. Takové zavedení cizí nukleové kyseliny za použití různých chemických, biologických nebo fyzikálních metod může vést ke změně vlastností buňky, což umožňuje studium genové funkce a exprese proteinu v kontextu buňky. Při transfekci může zavedená nukleová kyselina v buňkách přechodně existovat, takže je exprimována pouze po omezenou dobu a nereplikuje se, nebo může být stabilní a integrovat se do genomu příjemce a replikovat se, když je hostitelský genom replikuje (Bao a Palecek, 2016; Chahal et al., 2011).

## 2 KULTIVACE SAVČÍCH BUNĚK

### 2.1 Kultivační podmínky

Savčí buňky se obecně inkubují při 37 °C, což je teplota blízká tělesné teplotě mateřského organismu. Vlhkost v inkubátoru se udržuje okolo 90 %, aby nedocházelo k nežádoucímu odpařování vody z kultivačního média a zároveň nedocházelo ke změně koncentrace ostatních složek v něm obsažených. Jak kyslík, tak oxid uhličitý jsou nezbytné složky a dodávají se buď jako směs CO<sub>2</sub> a vzduchu dodávaného do kultivační nádoby nebo se vytváří těsným uzavřením nádoby, aby se zachoval CO<sub>2</sub> produkovaný buněčným metabolismem. Ke standardním kultivačním podmínkám tedy patří 5% atmosféra CO<sub>2</sub>. Pro dosažení dobré experimentální reprodukovatelnosti je nezbytné definované složení buněčného kultivačního média (van der Valk et al., 2010).

Nejjednodušší médium je Ringerův roztok s optimální koncentrací různých solí pro zachování tkáně například srdečních svalů žáby (Ringer a Buxton 1887). Pro udržení živých buněk a tkání po delší dobu by médium mělo obsahovat také složky, jako jsou živiny a látky pufrující pH. Tento typ média vytvořil Harry Eagle, který vyvinul Eagleovo minimální esenciální médium („Eagle's Minimum Essential Medium”, EMEM) (Eagle, 1955b). Podobné základní médium, které modifikoval Renato Dulbecco, Dulbekovo modifikované Eaglovo médium, („Dulbecco's Modified Eagle's Medium”, DMEM), se stále používá k udržování primárních buněčných kultur a buněčných linií (van der Valk et al., 2010).

Aby buňky zůstaly naživu delší dobu, zachovala se možnost proliferace, migrace a diferenciací, musí být bazální médium doplněno několika složkami. K tomuto účelu se do média přidává sérum. Fetální hovězí sérum („fetal bovine serum”, FBS) slouží jako perfektní volba pro většinu těchto účelů a je současným standardem. Používá se jako levný doplněk k zajištění optimálního kultivačního média. Sérum poskytuje nosiče nebo chelátory pro labilní nebo ve vodě nerozpustné živiny, hormony a růstové faktory, inhibitory proteáz, nízké hladiny gama globulinů, vitamíny, stopové prvky, váže a neutralizuje toxické části. FBS je komplex velkého množství definovaných i nedefinovaných složek, které v kultivačním médiu zastávají specifické funkce (Paschoal et al., 2014; Arora, 2013).

Použití FBS je však kontroverzní z několika důvodů. V první řadě odběr séra způsobuje zbytečné utrpení ještě nenarozenému teleti. Za druhé, mohou nastat změny složení séra ve výrobní šarži z důvodů rozdílného podnebí a kontinentu, ve kterém žije chovaná zvíř. Tudíž záleží na tom, kde a kdy bylo shromážděno, protože to způsobuje fenotypové rozdíly v buněčných kulturách, což má za následek variaci výsledků. Kromě toho je z důvodu pravděpodobnosti kontaminace použitých živočišných produktů silně bráněno v produkci nových biologických léčivých přípravků (van der Valk et al., 2004; Schiff, 2005; Gstraunthaler et al., 2013). Ve skutečnosti je až 20–50 % komerčních FBS virově pozitivních (Wessman a Levings, 1999). Doporučuje se denně zkoumat buněčné kultury pod mikroskopem s fázovým kontrastem, aby se identifikovaly jakékoli známky kontaminace nebo změny morfologie a adhezivních vlastností buněk (Donato et al., 2015).

Kvůli těmto důvodům je možnost zakoupení uměle nasyntetizovaného FBS, které v buněčné kultuře představuje největší variabilitu, a proto bylo kdysi označeno jako „černá skříňka“ buněčné kultury (Marazzi et al., 2011). Na trhu se můžeme setkat s označením séra - fetální telecí sérum („fetal calf serum“, FCS). Pokud jde pouze o telecí sérum (nikoli fetální) znamená to, že sérum pochází z telat poté, co se narodily.

## 2.2 Kultivační média

Růstové médium nebo kultivační médium je pevná, kapalná nebo polotuhá látka určená k podpoře růstu mikroorganismů, buněk nebo malých rostlin. Různé typy médií se využívají pro pěstování různých typů buněk (Madigan a Martinko, 2005). Při kultivaci savčích buněk se nejčastěji používají syntetická kapalná média, která můžeme rozdělit do čtyř kategorií. První z nich je skupina médií obsahující sérum. Jedná se o již zmíněné FBS, které je nejčastějším doplňkem v živočišných kultivačních médiích. Další skupinou jsou média bez séra. Nepřítomnost séra v médiích má mnoho nedostatků a může vést k závažným nesprávným interpretacím v imunologických studiích (Kerbel et al., 1976; Sůla et al., 1980). Tato média jsou obecně specificky formulována tak, aby podporovala kulturu jediného buněčného typu. Tato média jsou také označována jako „definovaná kultivační média“, protože komponenty těchto médií jsou přesně známy (Arora, 2013).

Chemicky definovaná média obsahují ultračisté anorganické a organické složky bez kontaminace a mohou také obsahovat čisté proteinové přísady, jako jsou růstové faktory. Jejich složky jsou produkovány v bakteriích nebo kvasinkách genetickým

inženýrstvím s přidavkem vitamínů, cholesterolu, specifických aminokyselin a mastných kyselin. Poslední skupinou jsou média bez bílkovin, která neobsahují žádné proteiny a obsahují pouze neproteinové složky. Ve srovnání s médii doplněnými sérem, podporuje použití média bez bílkovin lepší růst buněk, expresi proteinů a usnadňuje následné čištění jakéhokoli exprimovaného produktu. EMEM nebo médium „Roswell Park Memorial Institute” (RPMI), jsou média, která jsou popsána níže, neobsahují proteiny, pouze v případě potřeby jsou obohacena o proteinový doplněk (Arora, 2013).

Eaglovo bazální médium („Eagle’s Basal Medium”, BME), vyvinuté Harrym Eaglem v roce 1955, je jedním z nejrozšířenějších syntetických buněčných kultivačních médií. Eagle popisuje několik „bazálních“ médií, která se od sebe mírně liší. Tato formulace bazálního média byla vyvinuta na základě četných studií provedených na konci padesátých let s cílem určit základní nutriční požadavky a další faktory kritické pro růst buněk v kultuře. Historicky byl BME použit ve studiích prováděných k měření růstové odpovědi normálních a transformovaných myších L buněk a lidských HeLa buněk v monovrstvé kultuře s 13 esenciálními aminokyselinami a 9 přidanými vitamíny (Eagle 1954, 1955a). BME obsahuje biotin (vitamín B7), o kterém Eagle později zjistil, že je zbytečný. Jeho EMEM z roku 1959 zdvojnásobuje množství mnoha aminokyselin, aby se lépe přizpůsobilo složení bílkovin v kultivovaných lidských buňkách. BME prokázalo širokou použitelnost pro podporu růstu monovrstev široké škály buněčných linií a je předchůdce EMEM a DMEM.

### **2.2.1 EMEM/MEM**

EMEM, častěji používáno MEM, získané v centru rakoviny Iowské univerzity z hovčízího pankreatu je jedním z nejrozšířenějších syntetických buněčných kultivačních médií. Časné pokusy kultivovat normální savčí fibroblasty a určité podtypy HeLa buněk odhalily, že měly specifické nutriční požadavky, které by BME nemohlo splnit. MEM zahrnuje vyšší koncentrace aminokyselin, takže médium více přibližuje složení proteinů kultivovaných savčích buněk. MEM se používá pro kultivaci široké škály buněk pěstovaných v monovrstvách, např. buněk HepG2. Volitelné doplnění neesenciálních aminokyselin do formulací, které obsahují buď Hanksovu nebo Earlovu sůl, rozšířilo užitečnost tohoto média (Arora, 2013; Yao et al., 2017).

Formulace byla dále modifikována volitelnou eliminací vápníku, aby se umožnil růst buněk v suspenzní kultuře. MEM, doplněné nejen o 10% FBS obsahuje definované množství glukózy, aminokyselin, vitaminů, inzulínu, transferinu, specifických růstových faktorů. K prevenci bakteriální kontaminace se do média přidávají antibiotika (penicilin, streptomycin). Většina buněčných linií roste dobře při pH 7,4, při poklesu pH na 6,5 přestávají růst a při pH nižší než 6,5 ztrácí životaschopnost. Jako indikátor pH v médiu může být použita fenolová červeň. Při pH 7,4 je zbarvení média červené, při poklesu pH (spotřeba živin, nahromadění metabolitů) se barva mění do žluta, a to je signál pro výměnu média za čerstvé (Ippolito et al., 2016).

### **2.2.2 DMEM a RPMI médium**

DMEM a RPMI médium jsou také často používané alternativy. DMEM má vyšší koncentraci vápníku (1,8 mM) a nižší koncentraci fosfátu (1 mM) než RPMI, které obsahuje 0,8 mM vápníku a 5 mM fosfátu.

RPMI médium vyvinuli George E. Moore, Robert E. Gerner a H. Addison Franklin v roce 1966 v Roswell Park Memorial institutu, od kterého se odvodil název média (Budziak et al., 2019). Toto médium bylo původně vyvinuto pro dlouhodobou kultivaci lidských leukemických/lymfatických buněk v suspenzi, ale právě institutem bylo shledáno vhodným médiem pro kultivaci různých savčích buněk, např. buněk HepG2 (Petronini et al., 1996). RPMI médium obsahuje pyruvát sodný, fenolovou červeň, L-glutamin. Dále se přidává 2 000 mg/l glukózy, 25 mM kyselina hydroxyethyl piperazinethansulfonová (“hydroxyethyl-piperazineethane-sulfonic acid”, HEPES) a od ostatních médií se liší tím, že obsahuje redukční činidlo glutathion a vysoké koncentrace vitaminů. Médium obsahuje biotin, vitamín B12 a kyselinu paraaminobenzoovou, které se nenacházejí v EMEM ani v modifikovaném DMEM (Arora, 2013; Thermofisher, 2015; Krawczyk et al., 2018). Kromě toho jsou vitamíny inositol a cholin přítomny ve velmi vysokých koncentracích. RPMI médium neobsahuje žádné proteiny, lipidy nebo růstové faktory, a proto je obohaceno obvykle o 10% FBS. Médium používá pufrovací systém hydrogenuhličitanu sodného (2,0 g/l), a proto k udržení fyziologického pH vyžaduje prostředí 5–10% CO<sub>2</sub> (Krawczyk et al., 2018). RPMI médium podporuje růst široké škály buněk v suspenzi, které následně rostou jako monovrstvy. Pokud je RPMI médium správně doplněno sérem, má širokou škálu využití pro savčí buňky, včetně kultury čerstvých lidských lymfocytů, buněk HepG2,

fúzních protokolů a růstu hybridních buněk, jako jsou myší hybridomové buňky, pro přípravu protilátek (Arora, 2013).

DMEM bylo původně používáno pro kultivaci myších embryonálních kmenových buněk a obsahovalo 1 000 mg/l glukózy (Evans a Kaufman, 1981). Ukázalo se, že další varianta s 4500 mg/l glukózy je optimální pro kultivaci různých typů. Modifikace Dulbecca je vylepšená doplňková formulace, která zvyšuje obsah vybraných aminokyselin a vitamínů v původním Eaglově médiu až čtyřikrát. DMEM je bazální médium, stejně jako RPMI médium neobsahuje proteiny ani látky podporující růst. Z tohoto důvodu vyžaduje doplnění, nejčastěji o 5–10% FBS. DMEM využívá pufrovací systém hydrogenuhličitanu sodného (3,7 g/l), a proto vyžaduje umělé hladiny CO<sub>2</sub> k udržení požadovaného pH. V práškovém stavu má ale médium sklon k vypuštění pufru, proto je formulováno bez něj. DMEM je přístupno v mnoho variantách, například s řadou koncentrací glukózy, stejně jako alternativa s L-glutaminem a bez něj (Behjousiar et al., 2012). Výrobky bez indikátoru pH fenolové červeně jsou k dispozici pro aplikace citlivé na estrogen. Buňky úspěšně kultivované v DMEM zahrnují primární fibroblasty, neurony, gliové buňky, buňky hladkého svalstva a v neposlední řadě buňky HepG2 (Arora, 2013; Krawczyk et al., 2018).

### **2.2.3 Ham's F10, F12 a DMEM/F12**

Hamovy směsi byly původně vyvinuty pro podporu klonálního růstu vaječnickových buněk čínského křečka. V původní formulaci bylo provedeno mnoho modifikací včetně Hamova média F12, složitější formulace než původní F10 vhodná pro propagaci bez séra. Směsi byly uzpůsobeny pro použití s nebo bez suplementace séra, v závislosti na typu kultivovaných buněk (Arora, 2013).

Bylo prokázáno, že Ham's F10 podporuje růst lidských diploidních buněk, například lidských fibroblastových buněk a bílých krvinek pro chromozomální analýze a vytváří skvělé prostředí nejen pro kultivaci HepG2 buněk (Arora, 2013; De Cecco et al., 2019).

Ham's F12 směs živin byla vyvinuta právě pro používání bez séra pro jednobuněčné kultury vaječnickových buněk křečka. Coonova modifikace Ham's F12 se skládá z téměř dvojnásobného množství aminokyselin a pyruvátu ve srovnání s F12 a zahrnuje také kyselinu askorbovou. Tento typ směsi byl vyvinut pro kultivaci hybridních buněk produkovaných virovou fúzí (Arora, 2013).



DMEM/F12, směs DMEM a Ham's F12 je extrémně bohaté a komplexní médium. Podporuje růst širokého spektra typů buněk jak v sérovém, tak bezsérovém přípravku. HEPES pufr je obsažen v konečné koncentraci 15 mM, aby se kompenzovala ztráta pufrovací kapacity vzniklé eliminací séra (Arora, 2013).

### 2.3 Subkultivace buněk

Při subkultivaci neboli pasážování savčích buněk se musí pipetovat jemně, aby nedošlo k porušení struktury buněk, které jsou velmi křehké, když jsou vystaveny vlivu disociačního činidla. K jejím narušení může dojít také v případě, že se disociační činidlo nechá působit moc dlouho, to znamená delší dobu, než která je potřebná k oddělení buněk. Buňky je obtížné oddělit v případě, že jejich růst je stoprocentně konfluentní nebo přímo před vznikem subkultury. Pro lepší separaci se používá disociační činidlo s vyšší koncentrací a inkubuje se při 37 °C pro zvýšení enzymatické aktivity. Před samotným přidáním činidla se preparát dvakrát promyje sterilním fosfátovým pufrům („phosphate-buffered saline“, PBS) (Shafiee et al., 2017).

Pro pasážování buněk se dvakrát propláchnou vrstva buněk PBS a přidá se na dno kultivační nádoby přehřátý (37 °C) 0,05% roztok trypsinu se kterým se buňky inkubují 5–7 minut. Jakmile se buňky oddělí, neutralizuje se trypsin přidáním čtyřnásobného objemu kompletního růstového média s 10% FBS a buňky se jemně resuspendují pipetováním. Při čekání na oddělení buněk se nesmí třepat s kultivační nádobou, aby nedošlo ke shlukování (Hoess et al., 2007).

Specifičtějším pojmem je subkultivace, kde jsou buňky nejprve rozděleny, než byly přeneseny do více buněčných kultivačních nádob. Během tohoto procesu jsou proliferující buňky rozděleny, což umožňuje vývoj nových buněčných linií. Tento krok je označován jako pasáž a číslo pasáže konkrétně odkazuje na to, kolikrát byla buněčná linie subkultivována. Četné adherentní buněčné kultury přestávají proliferovat, když dosáhnou konfluentního stádia - když zcela zakryjí povrch buněčné kultivační nádoby. Pokud zůstanou buňky v konfluentním stádiu po delší dobu, zemřou. Adherentní buněčné kultury by tedy měly být pravidelně pasážovány, to znamená, když buňky dosáhnou konfluentního stádia a pokryjí dno nádoby ze 70 %, část buněk musí být pasážována nebo subkultivována do nové nádoby na kultivaci buněk. Nedoporučuje se však subkultivovat adherentní buňky více než každých 48 hodin, protože musí být trypsinizovány. Naproti tomu suspenzní kultury s vysokou hustotou

buněk vyžadují častější rutinní pasážování, protože rychle zpotřebovávají kultivační médium (Bhatia, 2019).

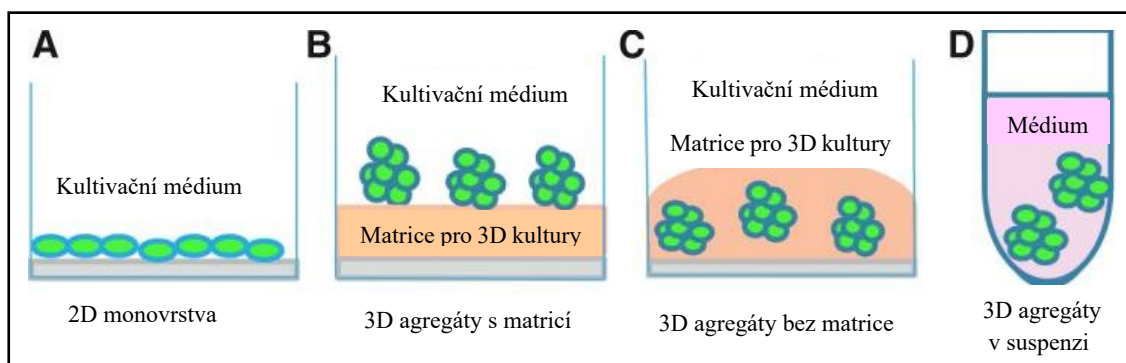
## 2.4 Buněčné modely

Protože téměř všechny buňky v prostředí *in vivo* jsou obklopeny jinými buňkami a extracelulární matricí trojrozměrným (3D) způsobem, dvojrozměrná (2D) buněčná kultura adekvátně nezohledňuje přirozené 3D prostředí buněk (Justice et al., 2009). Výsledkem je, že 2D buněčné kultivační testy někdy poskytují zavádějící a nepředvídatelná data pro odezvy *in vivo* (Weaver et al., 1997; Birgersdotter et al., 2005). V současné době při objevování léčiv začíná standardní postup screeningu sloučenin testy založenými na 2D buněčné kultuře, po nichž následují testy na zvířecích modelech, do klinických hodnocení. Pouze asi 10 % sloučenin úspěšně prochází klinickým vývojem (Breslin a O'Driscoll, 2013).

V tradiční 2D monovrstvé kultuře buňky ulpívají a rostou na rovném povrchu. Takové nastavení monovrstvy umožňuje, aby všechny buňky dostávaly během růstu homogenní množství živin a růstových faktorů z média (Huang et al., 2013). Monovrstva se skládá hlavně z proliferujících buněk, protože nekrotické buňky se obvykle od povrchů oddělí a snadno se během výměny média odstraní. Buňky pěstované ve 2D kultuře jsou obvykle plošší a napjatější, než by se objevily *in vivo*. Abnormální buněčná morfologie v 2D kultuře ovlivňuje mnoho buněčných procesů včetně buněčné proliferace, diferenciací, exprese genu a proteinu. Buňky ztrácí svoji polaritu, což vede ke změnám reakcí buněk na další jevy jako je např. apoptóza (Kapałczyńska et al., 2016).

Když se kultivuje v 3D kultivačních systémech, buňky tvoří agregáty nebo sféroidy v matrici, na matrici nebo v suspenzním médiu. V buněčných agregátech/sféroidech interakce buňka-buňka a interakce buňka-extracelulární matrice více napodobují přirozené prostředí *in vivo*, takže morfologie buněk se podobá přirozenému stavu jako v těle. Kromě toho jsou 3D sféroidy složeny z buněk v různých stádiích, obvykle z proliferujících, neklidných, apoptotických, hypoxických a nekrotických buněk (Kim, 2005; Khaitan et al., 2006). Vnější vrstvy sféroidu, které jsou vysoce vystaveny médiu, se skládají hlavně z životaschopných proliferujících buněk (Khaitan et al., 2006). Jádrové buňky přijímají z média méně kyslíku, růstových faktorů a živin a mají sklon být v klidovém nebo hypoxickém stavu (Mehta et al., 2012).

Na obrázku č. 2 je znázorněno schéma tradičních 2D buněčných kultur a tři typické 3D buněčné kultury. Zatímco tradiční 2D kultura obvykle roste do monovrstvy na skle nebo na plastových lahvích (obr. 2A), buňky 3D buněčných kultur rostou do 3D agregátů nebo sféroidů pomocí lešení/matrice (obr. 2B, 2C) nebo bez lešení (obr. 2D) (Breslin a O'Driscoll, 2013).



**Obrázek 2: Schéma buněčných kultur**

(Převzato a upraveno dle: Breslin a O'Driscoll, 2013).

Ideální 3D kultivační systém pro nádorové buňky by měl být netoxický, biologicky rozložitelný a dobře definovaný. Předchozí studie ukázaly, že samoskládající se peptid RADA16-I se skládá z přírodních aminokyselin, které mohou být spontánně sestaveny do skafoldů z nanovláken o průměru asi 20 nm. Tento peptid může napodobovat *in vivo* 3D mikroprostředí a podporovat připojení různých savčích buněk, včetně krysích buněk PC12 a krysích jaterních progenitorových buněk (Holmes et al., 2000, Semino et al., 2003). Kromě toho byl tento typ materiálu široce používán v regenerativní medicíně, včetně reparace mozku a hojení ran (Ellis-Behnke al., 2006, Meng et al., 2009, Wu et al., 2010)

## 3 CHARAKTERIZACE HepG2

### 3.1 Původ buněčné linie HepG2

Immortalizovaná buněčná linie HepG2 byla původně izolována v roce 1979 Barbarou Knowles spolu s kolegy a mylně označena jako hepatocelulární karcinom. Zkratka HepG2 znamená hepatom (hepatocelulární karcinom), podle stupně diferenciaci označen G2, jako dobře diferencovaný. Patent „buněčná linie odvozená od lidského hepatomu“ byl podán v roce 1980 vyšetřovatelky z Filadelfie (Aden et al., 1979). Od té doby jsou HepG2 buňky zařazeny do úložiště ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) jako lidská buněčná linie (HB8065) odvozená z tkáně jater 15letého bělocha s dobře diferencovaným hepatocelulárním karcinomem (López-Terrad et al., 2009). Následně doktorka Knowles přezkoumala histopatologické pozadí nádoru, z kterého HepG2 vznikly. Nádor vyexcidován prodlouženou lobektomií z jater mladíka byl klasifikován jako klasický příklad epiteliálního hepatoblastomu (Knowles et al., 1980).

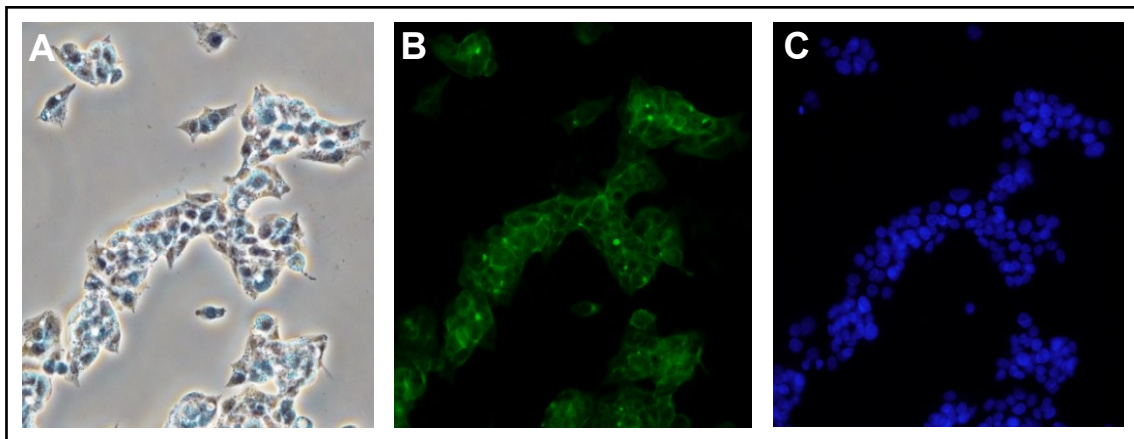
Hepatoblastom je zárodečná malignita hepatocelulárního původu a zároveň nejčastější primární nádor jater postihující děti v prvních letech života, což představuje asi 45 % zhoubných hepatocelulárních nádorů kojenců a malých dětí. Asi 16 % perinatálních nádorů jater je hepatoblastom, který vzniká z nediferencované embryonální tkáně a vyskytuje se jako epiteliální nebo epiteliálně-mezenchymální (Copel, 2018). Dětský hepatocelulární karcinom je vzácný nádor spojený s mnohem horší prognózou a agresivním chováním než hepatoblastom a výrazně méně citlivý na chemoterapii. Může se vyskytnout již ve věku jednoho roku a u dětí nemusí předcházet cirhóza. Rozlišování mezi těmito nádory je někdy obtížné, zejména u starších dětí, a právě pro tyto účely se využívá buněčná linie HepG2 (López-Terrad et al., 2009).

Histologický typ jaterního nádoru, ze kterého vznikla buněčná linie HepG2, byl téměř 30 let předmětem významného zmatku. Během této doby byly HepG2 buňky široce používány v různých oblastech, jako je metabolismus jater, vývoj, onkogeneze a hepatotoxicita. Ve vědecké literatuře (PubMed) je od roku 1979 do března 2009 více než 9 000 odkazů HepG2, ve kterých je HepG2 označována jako hepatokarcinom, hepatom více než 7000krát a jako hepatoblastom méně než 500krát (López-Terrad et al., 2009).

### 3.2 Morfologické znaky

HepG2 jsou adherentní buňky s vysokou mírou proliferace. (López-Terrad et al., 2009). Pokud se buňky drží pevného povrchu, rostou jako jednovrstvé malé agregáty tvořící charakteristické shluky nebo ostrůvky a tím vykazují epiteliální vzhled (Roth et al., 2008).

Snímky HepG2 buněk jsou zobrazeny na obrázku č. 3 (A-C). Na obrázku č. 3 je mikroskopem zachycené třikrát stejné zorné pole buněk HepG2 se zvětšením 400x. V první části obrázku (část 3A) jsou buňky vyfocené ve fázovém kontrastu. Jak je na obrázku vidět, HepG2 buňky vytváří charakteristické ostrůvky. Základní vrstva ostrůvků je tvořena živými buňkami, horní vrstvy tvoří buňky mrtvé. Na snímku č. 3B jsou buňky zachyceny po obarvení jejich aktinových vláken pomocí faloidinu značeného fluoresceinisothiokyanátem, a na snímku č. 3C modře svítí obarvená jádra pomocí barvy Hoechst 33258.



**Obrázek 3: Buňky HepG2 pod mikroskopem se zvětšením 400x**

A) buňky pod fázovým kontrastem, B) obarvená aktinová vlákna buněk pomocí fluoresceinisothiokyanátu, C) obarvená jádra buněk pomocí barvy Hoechst 33258

Buňky HepG2 lze úspěšně pěstovat ve velkém měřítku a stimulovat lidským růstovým hormonem (Donato et al., 2015). Po naočkování při nízké hustotě získávají podlouhlou nediferencovanou morfologii. Aktivně se dělí a po dosažení 70% konfluency vytvoří typické kolonie podobné hepatocytům obklopené buňkami podobnými biliárnímu epitelu (Costantini et al., 2013).

Za určitých kultivačních podmínek může dojít k polarizaci buněk HepG2 s vytvářením struktur podobných žlučovým kanálkům mezi sousedními buňkami (Sormunen et al., 1993). Žlučové kanálky jsou vytvářeny *de novo* dvěma nebo více buňkami. Tvorba kanálků je doprovázena zřetelnou akumulací membránových a mikrovilárních proteinů jako jsou např. fodrin, aktin a villin na apikálních površích buněk (Sormunen et al., 1993).

### 3.3 Biochemické vlastnosti

HepG2 buněčná linie má širokou škálu metabolických funkcí specifických pro játra, jako je například syntéza a sekrece plazmatických proteinů, metabolismus cholesterolu a triglyceridů, metabolismus a transport lipoproteinů, syntéza žlučových kyselin, glykogenová syntéza nebo inzulínová signalizace. Konfluentní vrstvy HepG2 exprimují normální receptory lipoproteinů s nízkou hustotou („low-density lipoprotein“, LDL) a pokračují v metabolizaci chylomikronů, lipoproteinů s velmi nízkou hustotou („very-low-density lipoprotein“, VLDL), LDL a lipoproteinů s vysokou hustotou (Javitt et al., 1990, Donato et al., 2015).

Běžně se používají ve studiích hepatotoxicity, metabolismu léčiv a jiných látek podstupujících biotransformaci. Jsou také netumorigenní a vyznačují se vysokou mírou proliferace. Jsou schopny vylučovat mnoho plazmatických proteinů, jako je transferrin, fibrinogen, plazminogen nebo albumin. Kromě toho jsou buňky HepG2 ideálním *in vitro* modelem pro studium intracelulární dynamiky žlučových kanálů a sinusových membránových proteinů a lipidů v lidských hepatocytech. Studium takové dynamiky přispívá k lepšímu porozumění onemocněním jater, která jsou důsledkem nesprávné distribuce proteinů na povrchu buněk (López-Terrad et al., 2009).

Rovněž byly vyvinuty slibné nové buněčné modely, jako jsou buňky HepaRG, které řeší problém nízkých metabolických profilů pozorovaných v buňkách HepG2. Buněčná linie HepaRG odvozena z jaterního nádoru pacientky trpící hepatokarcinomem je složená ze směsi buněk podobných hepatocytům a žlučovým buňkám, si ve skutečnosti zachovává schopnost metabolismu léčiv srovnatelnou s kapacitou primárních lidských hepatocytů („human hepatocytes“, HH) (Gripon et al. 2002, Lambert et al. 2009; Ramaiahgari, 2014). Bylo prokázáno, že buňky HepaRG udržují jaterní funkce a expresi jaterně specifických genů na hladinách srovnatelných s HH (Anthérieu et al. 2010).

### 3.4 Kultivace HepG2

Komerčně dostupná média pro kultivaci buněčné linie HepG2 obsahují pufrý, anorganické soli, glukózu, aminokyseliny, vitamíny a četné bioaktivní sloučeniny, ale jejich hladiny se mohou podstatně lišit (Arodin Selenius et al., 2019). HepG2 buňky se nejčastěji kultivují v MEM, které obsahuje FBS, glukózu, aminokyseliny, vitamíny, inzulín, transferin, antibiotika a specifické růstové faktory (Ippolito et al., 2016). Dalším hojně využívaným médiem pro kultivaci buněk HepG2 je DMEM, které obsahuje glukózu, čtyřnásobnou koncentraci aminokyselin a vitamínů, vyšší koncentraci vápníku a nižší koncentraci fosfátu a využívá pufrovacího systému hydrogenuhličitanu sodného (Arora, 2013). Je možnost využít DMEM se zvýšeným obsahem glukózy. Varianty pro kultivaci buněk jsou RPMI médium a Ham's F12 médium. RPMI médium obsahuje pyruvát sodný, fenolovou červeň, L-glutamin, glukózu, HEPES a od ostatních médií se liší tím, že obsahuje redukční činidlo glutathion a vysoké koncentrace vitamínů (ThermoFisher, 2015). Stejně jako DMEM, je RPMI médium bezbílkovinné. HepG2 buňky se inkubují při 37 °C atmosféře 5 % CO<sub>2</sub>. Jakmile buňky pokryjí ze 70 % dno kultivační nádoby, musí se buňky pasážovat (Bhatia, 2019).

### 3.5 Cytochrom P450

Buňky HepG2 mají nevýhodu omezené biotransformační aktivity kvůli nízké hladině nebo chybějících důležitých enzymů cytochromu P 450, které se podílejí na oxidaci léčiv ve fázi I v játrech, například CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2A6 nebo CYP2D6 (Rodríguez-Antona et al., 2002; Westerink a Schoonen, 2007; Guo et al, 2011).

Cytochrom P450 označuje skupinu enzymů obsahujících hem jako kofaktor, který funguje jako monooxygenáza (Munro et al., 2007). Název cytochrom P450 (CYP) je založen na skutečnosti, že redukovaná forma enzymu komplexovaného s oxidem uhelnatým vykazuje silné absorpční maximum v ultrafialovo-viditelném spektru při 450 nm (Bui et al., 2012).

U savců tyto proteiny oxidují steroidy, mastné kyseliny a xenobiotika a jsou důležité pro odstraňování různých sloučenin, jakož i pro syntézu a rozklad hormonů (Munro et al., 2007). Dráhy CYP jsou klasifikovány podobnými genovými sekvencemi; je jim přiřazeno číslo rodiny (např. CYP1, CYP2) a písmeno podrodiny (např. CYP1A,

CYP2D) a poté jsou rozlišeny číslem pro isoformu nebo jednotlivý enzym (např. CYP1A1) (Nelson, 2009).

CYP oxidoreduktázy hrají v těchto procesech významnou roli, a proto dostatečné úrovně exprese CYP jsou předpokladem fyziologicky relevantních studií metabolismu nebo toxicity jater (Zhang et al., 2016). Mezi strategie k překonání nedostatku aktivit CYP v HepG2 patří mimo jiné použití chemických agonistů pro indukci CYP, které však nezvyšují aktivitu enzymu CYP1A2 na úroveň primárních lidských hepatocytů (Westerink a Schoonen, 2007).

CYP1A2 je jedním z nejhojnějších CYP v lidských játrech (přibližně 13 %), který metabolizuje asi 20 % klinicky používaných a důležitých léků, jako je například klozapin, lidokain. CYP1A2 je jedním z hlavních enzymů, které bioaktivují řadu prokarcinogenů, a proto indukce CYP1A2 může zvýšit karcinogenitu těchto sloučenin. Tento enzym také metabolizuje několik důležitých endogenních sloučenin včetně steroidů, retinolů, melatoninu, uroporfyrinogenu a kyseliny arachidonové. (WU et al., 1999; Zhou et al., 2009). Obecně substráty CYP1A2 obsahují planární kruh, který se vejde na úzké aktivní místo enzymu a podobně jako CYP1A1 a 1B1 je primárně regulován aromatickým uhlovodíkovým receptorem (Zhou et al., 2009).

HepG2 buňky mají však ve srovnání s primárními lidskými hepatocyty nevýhodu omezené biotransformační aktivity kvůli nízké nebo dokonce chybějící expresi oxidoreduktáz cytochromu P450 (CYPs) (Rodriguez- Antona et al., 2008). Mezi strategie k překonání nedostatku aktivit CYP v HepG2 patří mimo jiné použití chemických agonistů pro indukci CYP, které však nezvyšují aktivitu enzymu CYP1A2 na úroveň primárních lidských hepatocytů (Westerink a Schoonen et al., 2007).

Geneticky vytvořené buněčné linie HepG2-1A2 se stabilní nadměrnou expresí lidského CYP1A2 byly vytvořeny transdukcí expresního vektoru na bázi lentiviru kódujícího lidskou CYP1A2 komplementární DNA („complementary DNA”, cDNA), následovanou selekcí jednoho klonu antibiotického zeocinu. Některé klony buněk HepG2-1A2 mohou vykazovat morfologii podobnou „dlažební kostce“ typické pro hepatocyty a doba pro zdvojnásobení populace se nemusí významně lišit od rodičovských buněk HepG2 (Steinbrecht et al., 2020).



## 4 VYUŽITÍ BUNĚK HepG2

Buňky HepG2 jsou vysoce diferencované a vykazují mnoho genotypových rysů normálních jaterních buněk (Sassa et al. 1987). Jejich hlavní omezení je nicméně spojeno s jejich nízkými metabolickými kapacitami ve srovnání s primárními hepatocyty, což je činí vhodnými pro testování toxicity mateřské molekuly, ale méně vhodné pro testování toxicity metabolitů (Xu et al., 2004, Westerink a Schoonen et al., 2007).

Byly navrženy různé strategie k překonání funkčních omezení buněk HepG2, včetně jejich transfekce expresními vektory kódujícími geny pro specifické proteiny nebo transkripční faktory (Donato et al., 2013). Výsledkem je, že buňky odvozené od HepG2 byly stabilně nebo přechodně exprimujícím lidským CYP a dalšími enzymy úspěšně vytvořeny, což poskytuje cenné nástroje pro studie metabolismu léčiv a hepatotoxicity (Donato et al., 2010, Tolosa et al., 2013).

Použití systémů HepG2 s nadměrnou expresí CYP má také některé nevýhody, jako je původ rakovinných buněk a nedostatek dalších jaterních specifických funkcí. Široké spektrum možných aplikací těchto buněk HepG2 exprimujících CYP, zejména v rané fázi vývoje léčiva, může rychle a snadno poskytnout důležité informace o metabolismu léčiva v játrech a o toxicitě potenciálních metabolitů. Tímto způsobem lze nevhodné kandidáty na léčiva vyloučit v prvotní fázi farmakologických studií, aby se zajistily náklady a snížily se pokusy na zvířatech *in vivo* (Steinbrecht et al., 2019).

### 4.1 Médium buněčné kultury ovlivňuje reakci na cytotoxicitu selenu

Cílem této studie bylo zjistit, zda složení kultivačních médií může ovlivnit citlivost HepG2 buněk na selenové sloučeniny. Redox-aktivní selenové sloučeniny mají velmi zajímavé růstově modulační vlastnosti, a jsou proto vysoce relevantními léky pro léčbu rakoviny (Brodin et al., 2015; Misra et al., 2015). Autoři se věnují studiu cytotoxicity, proliferace, morfologie, exprese markerů pro epiteliální a mezenchymální diferenciaci, hladinám thiolu a exprese selenoenzymu thioredoxin reduktázy (Arodin Selenius et al., 2019). Studie byla provedena na více buněčných liniích, ale pro účely této práce jsou zde zmíněny informace týkající se pouze buněčné linie HepG2.

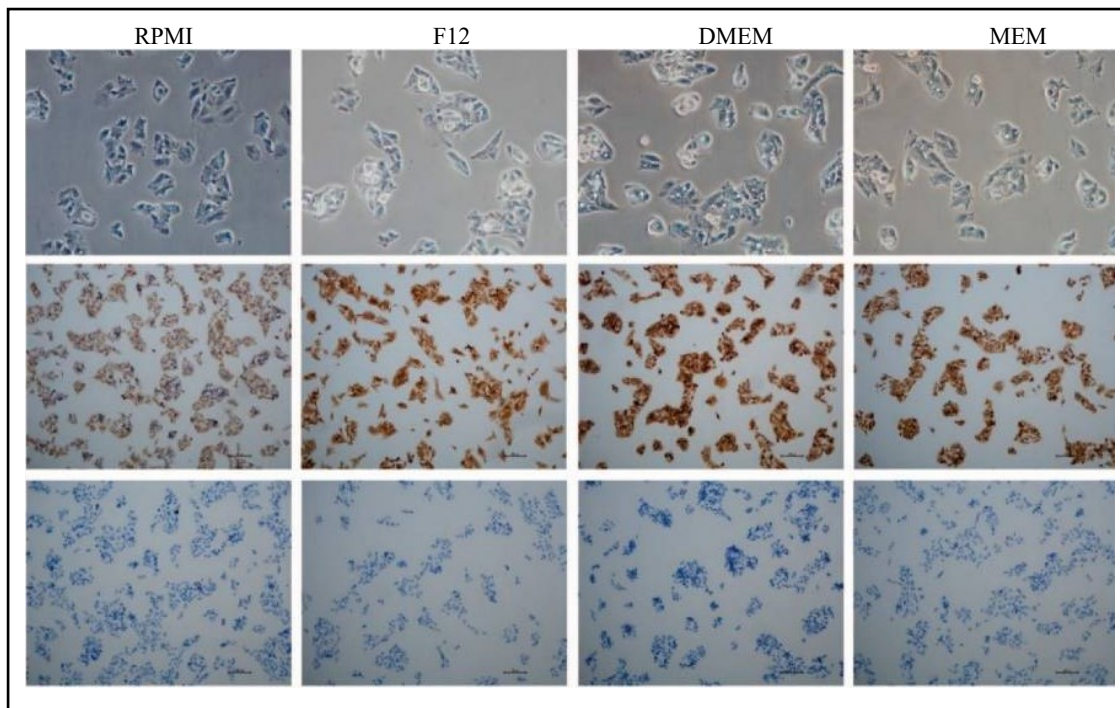
Pro vyřešení otázky variability kultivačních podmínek byla porovnána čtveřice běžně používaných buněčných kultivačních médiích (RPMI médium, Ham's F12 médium, DMEM a MEM) s 10% FBS a při standardních kultivačních podmínkách.

Byla hodnocena toxická odpověď na selenit a seleno-methylselenocystein (MSC), dále buněčný růst a redoxní homeostáza. Pro stanovení růstu v různých médiích byly buňky naočkovány při stejné hustotě v den nula a spočítány po obarvení trypanovou modří. Po čtyřech dnech v kultuře byly buňky sklizeny, zředěny ve stejném objemu jako při naočkování a byly spočítány životaschopné buňky (Arodin Selenius et al., 2019).

Výsledky poukazují na to, že kultivace a ošetření buněk HepG2 v MEM médiu významně více snížilo toxicitu selenu, zejména seleničitanu, oproti kultivaci v DMEM. Dále byly buňky významně citlivější na MSC, když byly kultivovány v Ham's F12 médiu ve srovnání s RPMI médiem (Arodin Selenius et al., 2019).

Buněčná kultura v DMEM zvýšila rychlost proliferace, zatímco kultivace buněk v MEM vedla k nejnižší míře proliferace. Aby se toto potvrdilo, byla analyzována bazální hladina ATP v buňkách kultivovaných během 72 hodin (Arodin Selenius et al., 2019).

Koncentrace thiolů ve studovaném buněčném kultivačním médiu kolísala mezi 25 a 40  $\mu\text{M}$ . To znamená, že tyto variace neovlivnily intracelulární thioly buněk. Intracelulární a extracelulární obsah thiolu v HepG2 buňkách nebyl ovlivněn žádnými médii. Buňky byly kultivované po šest pasáží v nových médiích na skleněných sklíčkách, fixovány a barveny na epiteliální (cytokeratin 18 - CK18) a mezenchymální (vimentin) markery. Na obrázku č. 4 je vytvořený přehled mikroskopických snímků testovaných HepG2 buněk se zvětšením 400x. V prvním řádku jsou vyfoceny buňky světelným mikroskopem v jednotlivých médiích a v řádku druhém exprese epiteliálního markeru CK18. Ze snímků vyplývá, že v HepG2 buňkách byla exprese CK18 po kultivaci v RPMI médiu (obr. 4, 1. sloupec) mírně nižší, ale buňky byly negativní na vimentin (obr. 4, 3. řádek) nezávisle na kultivačním médiu (Arodin Selenius et al., 2019).



**Obrázek 4: Testované buňky HepG2**

Mikroskopické snímky testovaných HepG2 buněk. 1. řádek - světelná mikroskopie 40x, 2. řádek - exprese epiteliálního markeru CK18, 3. řádek - exprese mezenchymálního markeru Vimentin; 1. sloupec zleva - buňky v RPMI médiu, 2. sloupec - buňky v Ham's F12 médiu, 3. sloupec - buňky v DMEM médiu, 4. sloupec - buňky v MEM médiu.

(Převzato a upraveno dle: Arodin Selenius et al., 2019).

Experimenty provedené na této studii ukazují, že buněčná odpověď na selen je určena použitým kultivačním médiem. Ačkoli vysoká hladina extracelulárních thiolů, zejména cysteinu, vyvolává účinné vychytávání a výraznou cytotoxicitu selenu, média s vysokým bazálním obsahem cystinů nemají za následek zvýšenou cytotoxicitu. Protože jedním z významných mechanismů cytotoxicity selenu je tvorba reaktivních forem kyslíku („reactive oxygen species“, ROS) v důsledku redoxních cyklů s thiolem a kyslíkem, může složení DMEM s vysokými hladinami glukózy a cystinů podporovat ochranu před tvorbou ROS zprostředkovanou selenem (Misra et al., 2015; Arodin Selenius et al., 2019).

## 4.2 Cytotoxický účinek esenciálního oleje z listů *Conobea scoparioides*

*Conobea scoparioides* je populární léčivá rostlina používaná k léčbě leishmaniózy, bolesti nebo beri-beri. Kromě toho byla popsána inhibice buněčné adheze, antioxidační, cytotoxické a leishmanicidní aktivity sloučenin nebo frakcí *C. scoparioides*.

V této práci byl zkoumán potenciální účinek a chemické složky esenciálního oleje (EO) z listů *C. scoparioides* proti rakovině jater *in vitro* a *in vivo* pomocí buněčného modelu lidského hepatocelulárního karcinomu HepG2. Kvantifikace viability buněk byla prováděna pomocí Alamarové modři. Buňky byly nasazeny do destiček a inkubovány po dobu 72 hodin. Pro kvantifikaci buněčné smrti byla použita souprava detekce apoptózy. K posouzení potenciálního účinku EO proti rakovině jater byly buňky HepG2 očkované subkutánně do myši těžké kombinované imunodeficiency (SCID) (Lima et al., 2020).

Zvířata byla náhodně rozdělena do čtyř skupin: skupina 1 - zvířata, která dostala vehikulum (5% DMSO - dimetylsulfoxid) (n = 20); skupina 2 - zvířata, která dostala pozitivní kontrolu 5- fluorouracil (10 mg/kg, n = 10); skupina 3 - zvířata, která dostala EO v dávce 40 mg/kg (n = 10); a skupina 4 - zvířata, která dostala EO v dávce 80 mg/kg (n = 10). 24 hodin po implantaci nádoru byla zvířata ošetřována intraperitoneálně jednou denně po dobu jednadvaceti po sobě následujících dnů. Jeden den po ošetření byla zvířata anestezována a vzorky periferní krve byly odebrány z brachiální tepny. Potom byla zvířata usmrcena předávkováním anestetiky, nádory byly vyříznuty a okamžitě zváženy (Lima et al., 2020). Pro posouzení cytotoxicity EO byla použita buněčná linie, která byla kultivována 48 hodin standartně ve vlhké atmosféře 5% CO<sub>2</sub> při 37 °C.

Rozborem složení EO bylo detekováno třináct sloučenin, z nichž 10 (představujících 98,2 % EO) bylo identifikováno na základě vlastních retenčních indexů a hmotnostní spektrálních fragmentů. Terpenoidy představovaly 96,9 % složení vzorku. Hlavními složkami EO byly thymolmethylether (59,7 %), thymol (14,9 %) a  $\alpha$ -felandren (13,1 %) (Lima et al., 2020). *In vitro* cytotoxický účinek EO z listů *C. scoparioides* byl hodnocen pomocí barvení Alamarové modře a výsledek pro buňky HepG2 byl 13,50  $\mu$ g/ml. Pro rakovinné buňky HepG2 byla pozorována hodnota koncentrace, která indukuje 50% inhibici růstu buněk (IC<sub>50</sub>) v rozmezí 2,09  $\mu$ g/ml (Lima et al., 2020).

Co se týče vyhodnocení životaschopných buněk, při koncentracích 12,5; 25 a 50 µg/ml zvýšil EO apoptotické buňky (časné + pozdní apoptotické buňky) na 8,48 %; 21,28 % a 22,96 %, oproti 5,25 % pozorovaným při negativní kontrole. Inkubace s 5- fluorouracilem také zvýšila buněčnou smrt. Navíc EO způsobil snížení objemu buněk, jak bylo pozorováno pomocí morfologických změn charakteristických pro apoptotickou buněčnou smrt (Lima et al., 2020).

Protože EO z listů *C. scoparioides* vykazoval *in vitro* cytotoxicitu v HepG2 buňkách, byl zkoumán také *in vivo* protinádorový rakovinový potenciál tohoto EO ve vývoji HepG2 buněk v xenograftovém modelu (Li et al., 2017). Významné snížení růstu HepG2 buněk bylo pozorováno v obou skupinách ošetřených EO. Tyto výsledky naznačují potenciální protirakovinný účinek EO z listů *C. scoparioides in vitro* a *in vivo*, což naznačuje, že se může jednat o nového kandidáta bylinné medicíny (Lima et al., 2020).

### **4.3 Zelený čaj a černý čaj inhibují proliferaci a migraci buněk HepG2**

Řada studií prokázala, že čaj z rostliny *Camellia sinensis* – Čajovník čínský má řadu zdravotních účinků, jako je zmírnění metabolického syndromu, protinádorový účinek a posílení imunity (Robertson, 1983; Sheikhzadeh et al., 2011; Basu et al., 2013). Extrakt černého čaje chrání játra před peroxidací lipidů indukovanou chloridem uhličitým, což zpožďuje progresi zánětu jater a rakovinu jater u myši (Fadhel et al., 2002). Dráha přenosu signálu fosfatidylinositol 3- kinázy/protein kinázy B („phosphoinositide 3- kinase“, PI3K/Akt) hraje roli v regulaci buněčné proliferace a apoptózy a úzce souvisí s výskytem a vývojem rakoviny jater (Wei et al., 2017).

V této studii byly zpracovány čerstvé listy stejné odrůdy čajovníků černého čaje a zeleného čaje různými technologiemi a s použitím buněk HepG2 jako buněčného modelu byla studována účinnost a molekulární mechanismus extraktů černého a zeleného čaje k inhibici růstu nádorových buněk a migraci buněk, odhalující nový protinádorový potenciál černého a zeleného čaje při rakovině jater (Sun et al., 2020).

Monomerní složky extraktů černého a zeleného čaje byly analyzovány kolorimetricky a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií („high-performance liquid chromatography“, HPLC), s testem 3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5- difenyltetrazolium bromidem (MTT) a testy tvorby kolonií, které byly použity k posouzení proliferace a viability buněk. Účinky černého a zeleného čaje na apoptózu buněk HepG2 byly

ověřeny průtokovou cytometrií, testem hojením ran a Transwellovými experimenty použitými k detekci buněčné invaze a metastáz exprese PI3K/Akt byla stanovena metodou Western blot (Sun et al., 2020).

Buňky HepG2 byly ošetřeny extrakty čajů po dobu 48 hodin. Poté byly kultivovány po dobu 10 dnů při 37 °C v 5% CO<sub>2</sub>, dokud se neobjevily velké kolonie viditelné pouhým okem. Buňky byly promyty PBS, fixovány a barveny 0,1% krystalovou violetí (Sun et al., 2020). Pro detekci migrace buněk byl proveden Transwell migrační/invazivní test (Sun et al., 2020).

Jak je uvedeno v tabulce č. 2, obsah aminokyselin a rozpustného cukru v extraktech černého a zeleného čaje se významně nelišil. Množství flavanolů a kofeinu v extraktu z černého čaje bylo významně vyšší než v extraktu ze zeleného čaje, přičemž obsah polyfenolu v zeleném čaji byl téměř dvakrát vyšší než u černého čaje. Kromě toho byl obsah katechinů v zeleném čaji téměř třikrát vyšší. Ještě důležitější je, že obsah epigalokatechinu galátu („epigallocatechin gallate”, EGCG), který je v čaji považován za nejdůležitější účinnou látku, byl v extraktu zeleného čaje 13krát vyšší než v extraktu černého čaje (Sun et al., 2020).

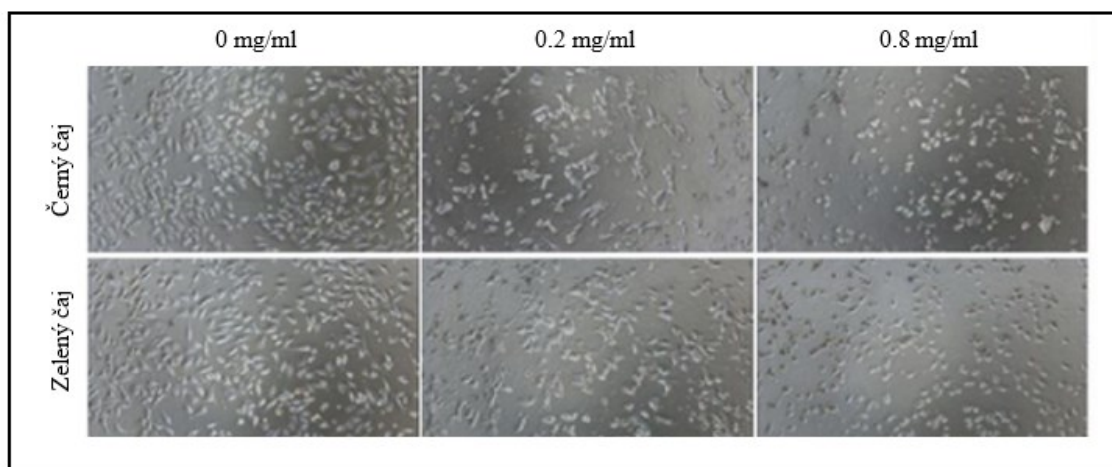
**Tabulka 2: Obsah bioaktivních složek v zeleném a černém čaj**

(Převzato a upraveno dle: Sun et al., 2020).

	Černý čaj	Zelený čaj
Čajové polyfenoly (%)	12,19 ± 0,25	21,74 ± 0,80
Aminokyseliny (%)	2,70 ± 0,01	2,72 ± 0,01
Rozpustné cukry (%)	9,68 ± 1,06	9,11 ± 0,91
Flavonoly (%)	27,26 ± 0,10	20,19 ± 0,02
Kofein (mg/g)	95,63 ± 0,10	83,09 ± 0,12
EGCG (mg/g)	5,77 ± 0,39	77,84 ± 0,33
Katechiny (mg/g)	76,20 ± 1,61	209,20 ± 3,26

Pro stanovení, zda černý a zelený čaj mohou inhibovat proliferaci buněk HepG2, byla pozorována morfologie a proliferace buněk HepG2. Po ošetření čajem byly pozorovány smrštěné buňky, jak je zachyceno níže na obrázku č. 5. Z mikroskopického

obrázku je zřejmé, že čím vyšší je koncentrace extraktu, tím jasnější je inhibice buněčné proliferace. V zorném poli 0,8 mg/ml je zřejmě méně buněk než v poli s nulovou koncentrací, ale hlavně se v něm nachází buňky smrštěné. Test tvorby kolonií ukázal, že jak černý čaj, tak zelený čaj posílily inhibici buněčné proliferace, která se zvyšovala s narůstající koncentrací. Cytotoxické účinky čajových extraktů na lidské buňky HepG2 byly hodnoceny testem MTT. Po 24 a 48 hodinách byla proliferace buněk inhibována při dávce více než 0,25 mg/ml, ale koncentrace pod 0,25 mg/ml extraktu by mohla ovlivnit přežití rakovinných buněk. Inhibiční účinek zeleného čaje byl silnější než účinek černého čaje (Sun et al., 2020).



**Obrázek 5: Změna morfologie buněk v závislosti na koncentraci**

Mikroskopické snímky buněk HepG2 ošetřených extraktem z černého čaje a zeleného čaje. HepG2 buňky byly ošetřeny černým a zeleným čajem v koncentracích 0 (sloupec vlevo), 0,2 mg/ml (prostřední sloupec) a 0,8 mg/ml (sloupec vpravo).

(Převzato a upraveno dle: Sun et al., 2020).

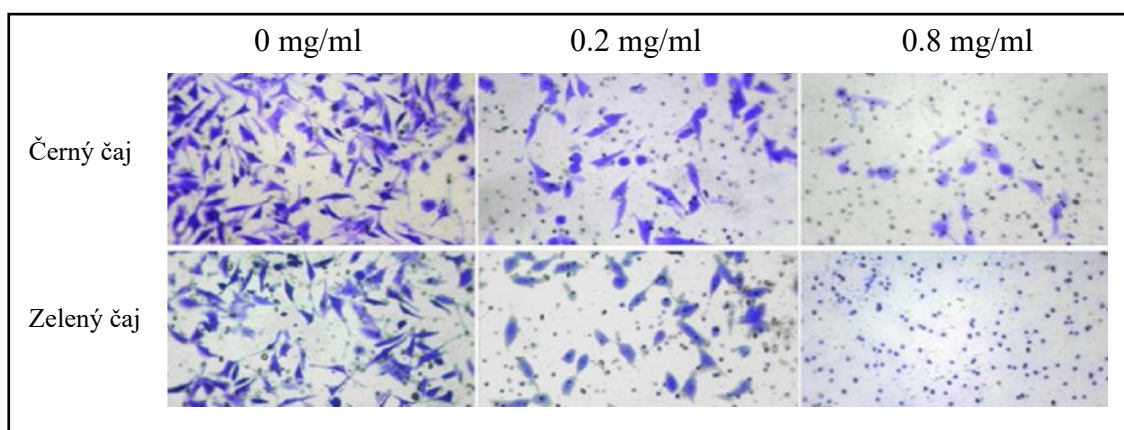
V tabulce č. 3 jsou shrnuty výsledky analýzy pomocí průtokové cytometrie. Po ošetření buněk HepG2 1,0 mg/ml černého nebo zeleného čaje po dobu 24 hodin se podíl apoptotických buněk zvýšil na 38,5 % a 64,0 %, což naznačuje, že vysoké koncentrace černého a zeleného čaje indukují apoptózu v buňkách HepG2 (Sun et al., 2020).

**Tabulka 3: Změna podílu apoptotických buněk u HepG2 buněk ovlivněných černým nebo zeleným čajem**

(Převzato a upraveno dle: Sun et al., 2020).

Koncentrace suspenze (mg/ml)	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Černý čaj (%)	9,9	11,5	12,9	26,6	38,5
Zelený čaj (%)	7,5	10,5	34,2	50,9	64,0

Dále bylo v této studii prokázáno, že ošetření černým čajem a zeleným čajem inhibovalo migraci buněk HepG2 v závislosti na čase a koncentraci. Na obrázku č. 6 jsou zobrazeny výsledky Transwell migračního/invazivního testu. Ukazují, že černý čaj a zelený čaj inhibovaly invazi HepG2 buněk. Ve srovnání s kontrolní skupinou byla schopnost ošetřených buněk ve skupině černého a zeleného čaje proniknout do matrigelu, který byl obsažen v transwell komoře, významně snížena. Počet migrovaných buněk ve skupině černého čaje byl výrazně vyšší než ve skupině zeleného čaje v koncentraci 0,8 mg/ml (Sun et al., 2020).



**Obrázek 6: Inhibovaná invaze HepG2**

Mikroskopické snímky buněk HepG2 ošetřených extraktem z černého a zeleného čaje.

HepG2 buňky byly ošetřeny černým a zeleným čajem v koncentracích 0 – kontrolní skupina (sloupec vlevo), 0,2 mg/ml (prostřední sloupec) a 0,8 mg/ml (sloupec vpravo).

(Převzato a upraveno dle: Sun et al., 2020).

K posouzení účinku černého a zeleného čaje na expresi proteinů pro přežití spojených s cestou PI3K/Akt v buňky HepG2 byl použit Western blot test. Je zajímavé, že ošetření černým a zeleným čajem výrazně potlačilo hladiny fosfo-PI3K a p-Akt proteinů v závislosti na čase a na koncentraci, zatímco nemělo téměř žádný účinek na celkovou expresi PI3K a Akt proteinu. Kromě toho byla provedena kvantitativní



analýza hladin proteinů, která ukazuje, že stejně jako účinky na inhibici růstu buněk byl regulační účinek zeleného čaje na signální dráhu PI3K/Akt v buňkách HepG2 významnější než u černého čaje. Tyto výsledky ukazují, že černý a zelený čaj mohou částečně inaktivovat signalizaci PI3K/Akt, čímž ovlivňují proliferaci buněk HepG2 (Sun et al., 2020).

Extrakty černého čaje a zeleného čaje *Camellia sinensis* prokázaly různé stupně inhibice buněčné migrace a invaze, přičemž zelený čaj indukuje větší míru apoptózy buněk HepG2. Kromě toho extrakty zeleného i černého čaje inhibovaly růst buněk HepG2 a indukovaly apoptózu prostřednictvím PI3K/Akt. Dále zapříčinily migraci a invazi buněk prostřednictvím signální dráhy matricových metaloproteináz. Kromě toho měl zelený čaj silnější inhibiční účinek na buňky rakoviny jater než černý čaj, což může být způsobeno vysokým obsahem důležitých účinných látek, jako je EGCG, v zeleném čaji.

Tato studie odhalila účinky fermentovaného (černého) a nefermentovaného (zeleného) čaje na buňky rakoviny jater, což poskytuje základ pro zkoumání čajových extraktů pro jejich protinádorový potenciál (Sun et al., 2020).

#### **4.4 Antioxidační aktivity a ochranné účinky peptidů kachních embryí**

Bioaktivní peptidy podporují mnoho funkcí metabolismu a fyziologické regulace, jako je například podpora trávení, zlepšení imunity, regulace hormonů, antibakteriální účinky, antivirové účinky, snížení krevního tlaku, změkčení krevních cév a oddálení senility (Bartesaghi et al., 2017). Jako typ bioaktivního peptidu mohou antioxidační peptidy redukovat ROS (He et al., 2019).

Tato studie se zabývá antioxidačními aktivitami různých segmentů peptidů, ZT1 ( $\leq 3$  KD), ZT2 ( $\leq 10$  KD) a ZT3 ( $\leq 30$  KD), odvozené od peptidů embryí kachen a zkoumá jejich ochranné účinky proti oxidačnímu poškození vyvolanému  $H_2O_2$  v buňkách HepG2 (He et al., 2019).

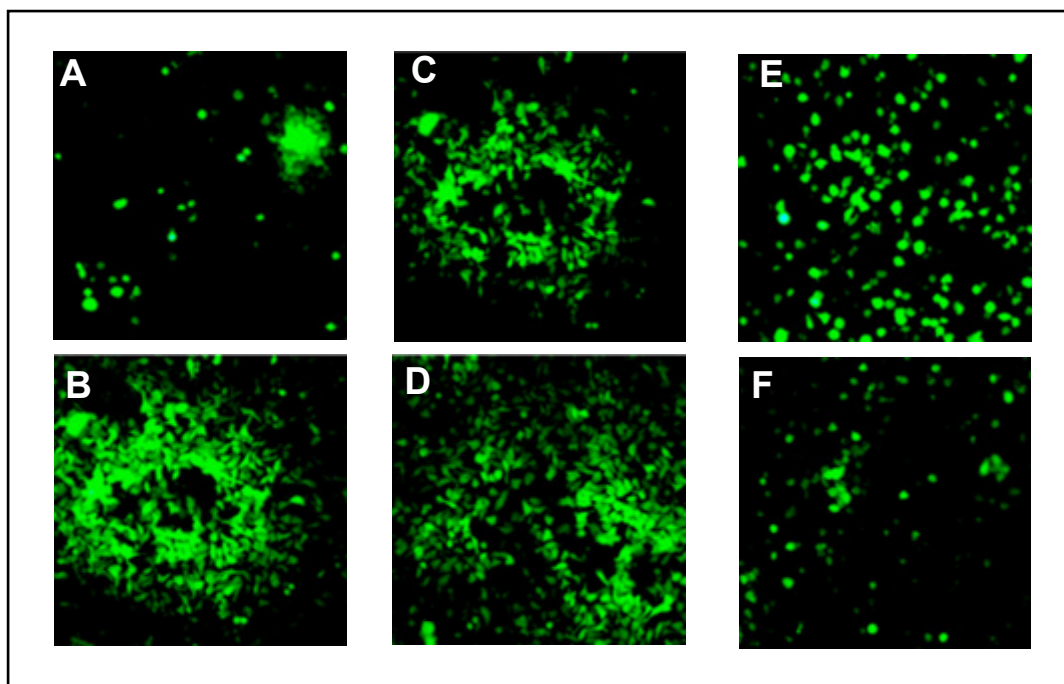
Oplozená zdravá kachní vejce byla inkubována v inkubátoru při 38,5 °C s relativní vlhkostí 72 % a byla obracována jednou za 2 hodiny. Po inkubaci do 15 dnů byla kachní embrya odebrána a umístěna do ledničky. Dále byla embrya homogenizována, nalita do podnosu a umístěna do mrazicí odstředivky, aby se získal lyofilizovaný prášek peptidové směsi (He et al., 2019).

Při testování cytotoxicity kachních embryí na buňkách HepG2 byly buňky kultivovány po dobu 24 hodin při 37 °C v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře, v médiu s 10% FBS, 2% penicilinem G a streptomycinem v médiu DMEM (He et al., 2019).

Při stanovení ROS byly buňky HepG2 inkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C. Ochranná skupina byla inkubována s peptidovým roztokem v konečné koncentraci 1 mg/ml, 5 mg/ml nebo 10 mg/ml. Mezitím byla zraněná skupina inkubována v kultivačním médiu po dobu 24 hodin a poškozená skupina s ochrannou skupinou se inkubovaly 2 hodiny v roztoku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Poté byl přidán roztok 2,7- dichlorofluorescein diacetát („2,7- dichlorodihydrofluorescein diacetate“, DCFH-DA). DCFH-DA je druh fluorescenčního barviva, které může volně pronikat buněčnou membránou. Intracelulární ROS oxidují nefluorescenční DCFH-DA na fluorescenční dichlorofluorescein (DCF). Detekcí intenzity fluorescence DCF lze získat hladinu ROS v buňkách. Čím je intenzita fluorescence silnější, tím vyšší je obsah ROS v buňkách (He et al., 2019).

Výsledky ukázaly, že peptidy izolované z kachních embryí mohou inhibovat poškození ROS na buňkách HepG2. ZT1, ZT2 a ZT3 inhibovaly oxidační stres vyvolaný H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. V experimentální skupině se zvýšením koncentrace peptidu byla zvýšena, jak schopnost inhibovat oxidační stres, tak ochranný účinek před oxidačním poškozením buněk, což ukazuje, že ochranné účinky ZT1, ZT2 a ZT3 na přežití buněk byly všechny závislé na koncentraci. Konkrétní případy jsou zachyceny na obrázku č. 7. Například, když byla koncentrace ZT1 10 mg/ml (obr.7E), byla míra přežití o něco nižší než u kontrolní skupiny (obr. 7A).

Intenzita fluorescence DCF v HepG2 buňkách byla významně zvýšena po ošetření H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve srovnání s kontrolní skupinou (obr.7A). Konkrétně, když koncentrace ZT1 byla 1 mg/ml, byla relativní intenzita fluorescence pouze 29,31 (obr. 7C), což bylo nižší než 41,89 pro skupinu ošetřenou 10 mg/ml ZT3 (obr. 7E). V kombinaci s testem cytotoxicity tato práce prokázala, že ochranné účinky peptidů kachních embryí na buňky HepG2 byly dosaženy spíše inhibicí oxidačního stresu než stimulací proliferace buněk HepG2 (He et al., 2019).



**Obrázek 7: Fluorescenční obrazy dichlorofluoresceinu v buňkách HepG2**

Mikroskopické snímky fluorescencních obrazů DCF po přidání fluorescenčního barviva DCFH-DA. A) kontrolní skupina bez ošetření  $H_2O_2$ ; B) HepG2 buňky ošetřeny  $H_2O_2$ ; C) ZT1 [1 mg/ml 3 KD] s ošetřením  $H_2O_2$ ; D) ZT1 [1 mg/ml 30 KD] +  $H_2O_2$ ; E) ZT3 [10 mg/ml 30 KD] +  $H_2O_2$ ; F) ZT3 [10 mg/ml 3 KD] +  $H_2O_2$ .

(Převzato a upraveno dle: He et al., 2019)

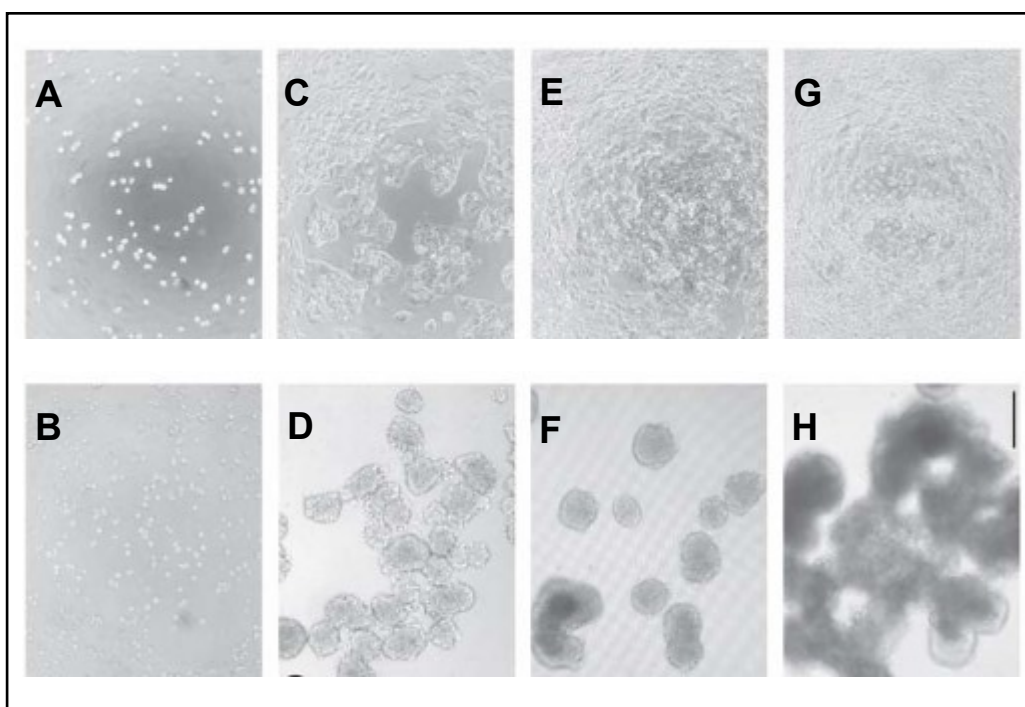
Tato práce hodnotila antioxidační aktivita a ochranné účinky peptidů kachních embryí proti oxidačnímu poškození HepG2 vyvolanému  $H_2O_2$ . Při nízké koncentraci vykazuje ZT1 silnější antioxidační kapacitu *in vitro* a také silnější inhibiční účinky na oxidační stres vyvolaný  $H_2O_2$  a poškození buněk HepG2 než ZT2 a ZT3, což ukazuje, že ZT1 lze použít jako nový přírodní antioxidant v potravinách průmysl a léčivých přípravcích (He et al., 2019).

#### 4.5 Exprese enzymů v buňkách HepG2 kultivovaných nanotechnologií

Nanokulturní destička („nanoculture plate“, NCP) je nedávno vyvinutá destička, která sestává z texturovaného povrchu se specifickými charakteristikami, které indukují tvorbu sféroidů: mikrofabrikace s mikro-čtvercovým vzorem na povrchu kultury. NCP lze použít k vytvoření jednotných adhezivních sféroidů rakovinných buněčných linií za použití konvenčních technik bez potřeby jakýchkoli živočišných sloučenin (Nakamura et al., 2011).

V této studii byla testována účinnost nedávno vyvinutého 3D kultivačního systému a podpora systému s vytvořením buněčné kultury HepG2 s 3D architekturou. Dalším cílem studie bylo testování charakteristiky a výkonnosti buněk HepG2 vytvořených v tomto systému zkoumáním úrovně exprese CYP (Nakamura et al., 2011).

Buňky HepG2 byly udržovány při 37 °C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> v DMEM obsahujícím 10% FBS, 100 U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu. Pro měření hladin exprese mRNA albuminu a CYP v buňkách HepG2 byla použita kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (qRT-PCR). Když byly buňky HepG2 podrobeny 3D kultuře s použitím NCP, rychle vytvořily adhezivní sféroidy. Od 3. do 12. dne tvořily agregáty se sféroidní 3D architekturou, které jsou vidět na obrázku č. 8D, 8F, 8H. Na rozdíl od toho se buňky HepG2 pěstované s jednovrstvou destičkou připojily k povrchu jamky a vytvořily mnohem plošší konfigurace od 3. do 12. dne (obr. 8C, 8E, 8G) (Nakamura et al., 2011).



**Obrázek 8: Morfologie buněk HepG2 za použití konvenční destičky**

Buňky HepG2 po kultivaci za použití konvenční destičky v 0 dnech (A), 3 dny (C), 6 dní (E) a 12 dní (G). A za použití NCP v 0 dnech (B), 3 dny (D), 6 dní (F) a 12 dní (H). Bar, 200 µm. (Převzato a upraveno dle: Nakamura et al., 2011).

Závěr po porovnání dvou destiček byl, že počet buněk byl vyšší pro jednovrstvou destičku. Životaschopnost buněk pro každý typ kultury se také mírně, ale významně lišila mezi dvěma kultivačními systémy: Buňky HepG2 pěstované s NCP vykazovaly mírně nižší životaschopnost buněk než buňky pěstované s monovrstvou (Nakamura et al., 2011).

Hladiny exprese albuminové mRNA v buňkách HepG2 byly významně vyšší v NCP kultuře než v monovrstvové kultuře v 12. den. Kumulativní obsah albuminu byl významně vyšší ve 12. dni v kultivačním médiu buněk HepG2 pěstovaných s NCP než v médiu buněk kultivovaných s monovrstvou kulturou (Nakamura et al., 2011).

Hladina exprese mRNA CYP1A1 v buňkách HepG2 pěstovaných s NCP byla významně vyšší než hladina, která se pěstovala s monovrstvou kultivační destičkou v den 12. Hladina exprese mRNA CYP1A2 v buňkách HepG2 pěstovaných s NCP byla významně vyšší než u hladin kultivovaných s monovrstvou kultivační destičkou v den 6. a 12. Podobně byly hladiny exprese mRNA CYP2B6, CYP2D6 a CYP3A4 signifikantně vyšší v buňkách kultivovaných s NCP než v buňkách kultivovaných v monovrstvé kultuře v den 12. (Nakamura et al., 2011).

Tyto výsledky naznačují, že NCP usnadnila tvorbu 3D buněčné architektury HepG2 a zvýšila úroveň exprese albuminu a CYP mRNA ve srovnání s monovrstvou, což činí systém NCP užitečným nástrojem pro hodnocení metabolismu léčiv *in vitro*. Sferoidy, které jsou tvořeny přeskupením a zhutňováním buněčných agregátů buněk derivovaných z jater, včetně primárních hepatocytů nebo buněčných linií, jsou považovány za užitečnější pro výzkumné účely než buňky pěstované v konvenčních monovrstvových kulturách (Nakamura et al., 2011).

## 5 ZÁVĚR

V úvodní části této bakalářské práce jsem definovala pojem buněčná kultura, vytvořila přehled jednotlivých typů živočišných buněčných kultur a přiblížila podstatu immortalizace. Následně jsem se zaměřila na kultivaci savčích buněk. V kapitole jsou zahrnuty kultivační podmínky včetně popisu kultivačních médií a jejich složení a v neposlední řadě buněčné modely. Hlavní část mé bakalářské práce byla věnována buňkám HepG2. V první polovině této části jsem buňky HepG2 charakterizovala, konkrétně jejich původ, morfologické znaky, biochemické vlastnosti a problematiku jejich kultivace. V druhé polovině jsem představila pět vybraných studií se zaměřením na využití HepG2, ve kterých se potvrzuje, že buněčnou linií HepG2 lze považovat za vhodný *in vitro* model, hlavně ve studiích metabolismu léčiv, hepatotoxicity a že nám může sloužit k porozumění nejen mechanismů souvisejících se vznikem nádrových onemocnění, ale i mnoha dalších onemocnění jater.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ADEN, David P., Alice FOGEL, Barbara B. KNOWLES, et al. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* [online]. 1979, **282**(5739), 615-616 [cit. 2020-04-20]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/282615a0
2. ANTHÉRIEU, Sébastien, Christophe CHESNÉ, Ruoya LI, et al. Stable Expression, Activity, and Inducibility of Cytochromes P450 in Differentiated HepaRG Cells. *Drug Metabolism and Disposition* [online]. 2010, **38**(3), s. 516-525. [cit. 2020-03-30]. ISSN 0090-9556. Dostupné z: doi:10.1124/dmd.109.030197.
3. ARODIN SELENIUS, Lisa, Marita WALLENBERG LUNDGREN, Rim JAWAD, et al. The Cell Culture Medium Affects Growth, Phenotype Expression and the Response to Selenium Cytotoxicity in A549 and HepG2 Cells. *Antioxidants* [online]. 2019, **8**(5) [cit. 2020-06-11]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox8050130.
4. ARORA, Meenakshi. Cell Culture Media: A Review. *Materials and Methods* [online]. 2013, **3** [cit. 2020-05-11]. ISSN 2329-5139. Dostupné z: doi:10.13070/mm.en.3.175.
5. BAHARVAND, Hossein, Seyed M. HASHEMI, Saeid KAZEMI ASHTIANI a Ali FARROKHI. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. *The International Journal of Developmental Biology* [online]. 2006, **50**(7), s. 645-652. [cit. 2020-05-02]. ISSN 0214-6282. Dostupné z: doi:10.1387/ijdb.052072hb.
6. BAO, X. a S.P. PALECEK. Genetic Engineering in Stem Cell Biomanufacturing. *Stem Cell Manufacturing* [online]. Elsevier, 2016, s. 1-25. [cit. 2020-04-28]. ISBN 9780444632654.
7. BARTESAGHI, Silvina, Daniel HERRERA, Débora M. MARTINEZ, et al. Tyrosine oxidation and nitration in transmembrane peptides is connected to lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2017, **622**, s. 9-25. [cit. 2020-07-03]. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1016/j.abb.2017.04.006.

8. BASU, Arpita, Nancy M. BETTS, Afework MULUGETA, Capella TONG, et al. Green tea supplementation increases glutathione and plasma antioxidant capacity in adults with the metabolic syndrome. *Nutrition Research* [online]. 2013, **33**(3), s. 180-187. [cit. 2020-07-20]. ISSN 02715317. Dostupné z: doi:10.1016/j.nutres.2012.12.010.
9. BASU, Srijoni, Chandra BOSE, Nupur OJHA, Nabajit DAS, Jagaree DAS, et al. Evolution of bacterial and fungal growth media. *Bioinformation* [online]. 2015, **11**(4), s. 182-184. [cit. 2020-07-20]. ISSN 09738894. Dostupné z: doi:10.6026/97320630011182.
10. BEHJOUSIAR, Alireza, Cleo KONTORAVDI, Karen M. POLIZZI a Jonathan A. COLES. In Situ Monitoring of Intracellular Glucose and Glutamine in CHO Cell Culture. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(4) [cit. 2020-05-02]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0034512.
11. BHATIA, Saurabh. Introduction to animal tissue culture science. *Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, Volume 3* [online]. IOP Publishing, 2019, [cit. 2020-06-02]. ISBN 978-0-7503-1347-6. Dostupné z: doi:10.1088/2053-2563/aafac0ch1.
12. BIRGERSDOTTER, Anna, Rickard SANDBERG a Ingemar ERNBERG. Gene expression perturbation in vitro - A growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Seminars in Cancer Biology* [online]. 2005, **15**(5), s. 405-412. [cit. 2020-05-13]. ISSN 1044579X. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcancer.2005.06.009.
13. BRESLIN, Susan a Lorraine O'DRISCOLL. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today* [online]. 2013, **18**(5-6), s. 240-249. [cit. 2020-07-21]. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2012.10.003.
14. BRODIN, Ola, Staffan EKSBORG, Marita WALLENBERG, et al. Pharmacokinetics and Toxicity of Sodium Selenite in the Treatment of Patients with Carcinoma in a Phase I Clinical Trial: The SECAR Study. *Nutrients* [online]. 2015, **7**(6), s. 4978-4994. [cit. 2020-06-11]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu7064978.



15. BUDZIAK, KAR CZ, MAKOWSKI, et al. Non-Typical Fluorescence Effects and Biological Activity in Selected 1,3,4-thiadiazole Derivatives: Spectroscopic and Theoretical Studies on Substituent, Molecular Aggregation, and pH Effects. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(21) [cit. 2020-06-05]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20215494.
16. BUI, Soi H., Kirsty J. MCLEAN, Myles R. CHEESMAN, Justin M. BRADLEY, et al. Unusual Spectroscopic and Ligand Binding Properties of the Cytochrome P450-Flavodoxin Fusion Enzyme XplA. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2012, **287**(23), s. 19699-19714. [cit. 2020-05-15]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M111.319202.
17. CARTER, Matt a Jennifer C. SHIEH. *Guide to Research Techniques in Neuroscience* [online]. Amsterdam: Elsevier, 2015, [cit. 2020-06-02]. ISBN 9780128005118. Dostupné z: doi:10.1016/C2013-0-06868-5.
18. COOPER GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. [online]. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000, [cit. 2020-06-05]. ISBN10: 0-87893-106-6.
19. COPEL, Joshua. *Obstetric imaging: Fetal Diagnosis and Care* [online]. 2. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2018, [cit. 2020-04-03]. ISBN 9781437725568.
20. COSTANTINI, S., G. DI BERNARDO, M. CAMMAROTA, et al. Gene expression signature of human HepG2 cell line. *Gene* [online]. 2013, **518**(2), s. 335-345. [cit. 2020-04-28]. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2012.12.106.
21. DE CECCO, Marco, Takahiro ITO, Anna P. PETRASHEN, et al. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature* [online]. 2019, **566**(7742), s.73-78. [cit. 2020-05-12]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-018-0784-9.
22. DONATO, M. Teresa, David HALLIFAX, Laura PICAZO, et al. Metabolite Formation Kinetics and Intrinsic Clearance of Phenacetin, Tolbutamide, Alprazolam, and Midazolam in Adenoviral Cytochrome P450-Transfected HepG2 Cells and Comparison with Hepatocytes and In Vivo. *Drug Metabolism and Disposition* [online]. 2010, **38**(9), s. 1449-1455. [cit. 2020-04-28]. ISSN 0090-9556. Dostupné z: doi:10.1124/dmd.110.033605.

23. DONATO, M., Ramiro JOVER a M. GÓMEZ-LECHÓN. Hepatic Cell Lines for Drug Hepatotoxicity Testing: Limitations and Strategies to Upgrade their Metabolic Competence by Gene Engineering. *Current Drug Metabolism* [online]. 2013, **14**(9), s. 946-968. [cit. 2020-04-28]. ISSN 13892002. Dostupné z: doi:10.2174/1389200211314090002.
24. DONATO, María Teresa, Laia TOLOSA a María José GÓMEZ-LECHÓN. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. VINKEN, Mathieu a Vera ROGIERS, ed. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research* [online]. New York, NY: Springer New York, 2015, s. 77-93. [cit. 2020-04-28]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-2073-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-2074-7\_5.
25. EAGLE, H (1954). The specific amino acid requirements of a mammalian cell (strain L) in tissue culture. [online]. *J Biol Chem*. 214 (2): 839–52. [cit. 2020-04-25]. PMID: 14381421. Dostupné z: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)70932-0/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)70932-0/pdf).
26. EAGLE, H (1955a). The specific amino acid requirements of a human carcinoma cell (strain hela) in tissue culture. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. **102**(1), s. 37-48. [cit. 2020-04-25]. ISSN 1540-9538. Dostupné z: doi:10.1084/jem.102.1.37.
27. EAGLE, H (1955b). Nutrition Needs of Mammalian Cells in Tissue Culture. *Science* [online]. 1955, **122**(3168), s. 501-504. [cit. 2020-04-25]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.122.3168.501.
28. EGEBLAD, Mikala, Elizabeth S. NAKASONE a Zena WERB. Tumors as Organs: Complex Tissues that Interface with the Entire Organism. *Developmental Cell* [online]. 2010, **18**(6), s. 884-901. [cit. 2020-06-05]. ISSN 15345807. Dostupné z: doi:10.1016/j.devcel.2010.05.012.
29. ELLIS-BEHNKE, R. G., Y.-X. LIANG, S.-W. YOU, D. K. C. TAY, S. ZHANG, et al. Nano neuro knitting: Peptide nanofiber scaffold for brain repair and axon regeneration with functional return of vision. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2006, **103**(13), s. 5054-5059. [cit. 2020-06-05]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0600559103.

30. EVANS, M. J. a M. H. KAUFMAN. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* [online]. 1981, **292**(5819), s. 154-156. [cit. 2020-04-15]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/292154a0.
31. FADHEL, Zaineb A. a Suham AMRAN. Effects of black tea extract on carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in liver, kidneys, and testes of rats. *Phytotherapy Research* [online]. 2002, **16**(S1), s. 28-32. [cit. 2020-08-05]. ISSN 0951-418X. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.793.
32. FLORIDO, Roberta, Tamara TCHKONIA a James L. KIRKLAND. Aging and Adipose Tissue. *Handbook of the Biology of Aging* [online]. Elsevier, 2011, s. 119-139. [cit. 2020-05-09]. ISBN 9780123786388. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-378638-8.00005-1.
33. GERAGHTY, R J, A CAPES-DAVIS, J M DAVIS, et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *British Journal of Cancer* [online]. 2014, **111**(6), s. 1021-1046. [cit. 2020-04-18]. ISSN 0007-0920. Dostupné z: doi:10.1038/bjc.2014.166.
34. GIANCOTTI, Filippo G. Deregulation of cell signaling in cancer. *FEBS Letters* [online]. 2014, **588**(16), s. 2558-2570. [cit. 2020-06-05]. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/j.febslet.2014.02.005.
35. GRIPON, P., S. RUMIN, S. URBAN, et al. Nonlinear partial differential equations and applications: Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2002, **99**(24), s. 15655-15660. [cit. 2020-03-30]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.232137699.
36. GROTEN, Jenny, Anusha VENKATRAMAN a Roland MERTELSMANN. Modeling and Simulating Carcinogenesis. *Precision Medicine* [online]. Elsevier, 2018, s. 277-295. [cit. 2020-05-09]. ISBN 9780128053645. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-805364-5.00012-3.
37. GSTRAUNTHALER, Gerhard, Toni LINDL a Jan VAN DER VALK. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. *Cytotechnology* [online]. 2013, **65**(5), s. 791-793. [cit. 2020-04-25]. ISSN 0920-9069. Dostupné z: doi:10.1007/s10616-013-9633-8.

38. GUO, Lei, Stacey DIAL, Leming SHI, et al. Similarities and Differences in the Expression of Drug-Metabolizing Enzymes between Human Hepatic Cell Lines and Primary Human Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* [online]. 2011, **39**(3), s. 528-538. [cit. 2020-06-05]. ISSN 0090-9556. Dostupné z: doi:10.1124/dmd.110.035873.
39. HAYFLICK, L. The cell biology of aging. *Clinics in geriatric medicine* **1**(1). [online]. 1985, s. 15-27. [cit. 2020-04-19].
40. HAYFLICK, L. a P.S. MOORHEAD. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* [online]. 1961, **25**(3), s. 585-621. [cit. 2020-04-18]. ISSN 00144827. Dostupné z: doi:10.1016/0014-4827(61)90192-6.
41. HAYFLICK, Leonard. A Brief History of the Mortality and Immortality of Cultured Cells. *The Keio Journal of Medicine* [online]. 1998, **47**(3), s.174-182. [cit. 2020-04-18]. ISSN 1880-1293. Dostupné z: doi:10.2302/kjm.47.174.
42. HAYFLICK, Leonard. How and why we age. *Experimental Gerontology* [online]. 1998, **33**(7-8), s. 639-653. [cit. 2020-04-18]. ISSN 05315565. Dostupné z: doi:10.1016/S0531-5565(98)00023-0.
43. HE, Ying, Lijun BU, Huadong XIE a Guizhao LIANG. Antioxidant activities and protective effects of duck embryo peptides against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in HepG2 cells. *Poultry Science* [online]. 2019, **98**(12), s. 7118-7128. [cit. 2020-07-29]. ISSN 00325791. Dostupné z: doi:10.3382/ps/pez430.
44. HOESS, A., N. TEUSCHER, A. THORMANN, et al. Cultivation of hepatoma cell line HepG2 on nanoporous aluminum oxide membranes. *Acta Biomaterialia* [online]. 2007, **3**(1), s. 43-50. [cit. 2020-04-25]. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2006.07.007.
45. HOLMES, RANDALL K., and Michael G. JOBLING. "Genetics." *Medical Microbiology* [online]. edited by Samuel Baron, 4th ed., University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. [cit. 2020-06-05]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/>.
46. HOLMES, T. C., S. DE LACALLE, X. SU, G. LIU, A. RICH a S. ZHANG. Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2000, **97**(12), s. 6728-6733. [cit. 2020-05-06]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.97.12.6728.

47. HUANG, Hongzhou, Ying DING, Xiuzhi S. SUN, Thu A. NGUYEN a Adam J. ENGLER. Peptide Hydrogelation and Cell Encapsulation for 3D Culture of MCF-7 Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* [online]. 2013, **8**(3) [cit. 2020-05-07]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0059482.
48. CHAHAL, P., Y. DUROCHER a A. KAMEN. Cell Transfection. *Comprehensive Biotechnology* [online]. Elsevier, 2011, s. 395-401. [cit. 2020-06-05]. ISBN 9780080885049. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-088504-9.00042-8.
49. IPPOLITO, Joseph E., Matthew W. BRANDENBURG, Xia GE, et al. Extracellular pH Modulates Neuroendocrine Prostate Cancer Cell Metabolism and Susceptibility to the Mitochondrial Inhibitor Niclosamide. *PLOS ONE* [online]. 2016, **11**(7) [cit. 2020-05-02]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0159675.
50. JAVITT, Norman B. Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *The FASEB Journal* [online]. 1990, **4**(2), s. 161-168. [cit. 2020-04-28]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fasebj.4.2.2153592.
51. JUSTICE, Bradley A., Nadia A. BADR a Robin A. FELDER. 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays. *Drug Discovery Today* [online]. 2009, **14**(1-2), s. 102-107. [cit. 2020-07-05]. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2008.11.006.
52. KAPALCZYŃSKA, Marta, Tomasz KOLENDA, Weronika PRZYBYŁA, et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science* [online]. Arch Med Sci. 2018, **14**(4), s. 910-919. [cit. 2020-07-21]. ISSN 1734-1922. Dostupné z: doi:10.5114/aoms.2016.63743
53. KASPER, Cornelia, Verena CHARWAT a Antonina LAVRENTIEVA, ed. *Cell Culture Technology* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2018 [cit. 2020-06-02]. Learning Materials in Biosciences. ISBN 978-3-319-74853-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-74854-2.
54. KERBEL, R S, and D BLAKESLEE. Rapid adsorption of a foetal calf serum component by mammalian cells in culture. A potential source of artifacts in studies of antisera to cell-specific antigens. *Immunology* [online]. 1976, **31** (6), s. 881-91. [cit. 2020-05-21] PMID: 1086828. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1445184/>.

55. KHAITAN, Divya, Sudhir CHANDNA, MB ARYA a BS DWARAKANATH. *Journal of Translational Medicine* [online]. 4(1) [cit. 2020-05-05]. ISSN 14795876. Dostupné z: doi:10.1186/1479-5876-4-12.
56. KIM, Jong Bin. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Seminars in Cancer Biology* [online]. 2005, 15(5), s. 365-377. [cit. 2020-06-05]. ISSN 1044579X. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcancer.2005.05.002.
57. KNOWLES, B., C. HOWE a D. ADEN. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* [online]. 1980, 209(4455), s. 497-499. [cit. 2020-04-20]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.6248960.
58. KRAWCZYK, Krzysztof M., Damian MATAK, Lukasz SZYMANSKI, et al. Culture in embryonic kidney serum and xeno-free media as renal cell carcinoma and renal cell carcinoma cancer stem cells research model. *Cytotechnology* [online]. 2018, 70(2), s. 761-782. [cit. 2020-06-05]. ISSN 0920-9069. Dostupné z: doi:10.1007/s10616-017-0181-5.
59. LAMBERT, Carine B., Catherine SPIRE, Nancy CLAUDE a Andre GUILLOUZO. Dose- and time-dependent effects of phenobarbital on gene expression profiling in human hepatoma HepaRG cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2009, 234(3), s. 345-360. [cit. 2020-03-30]. ISSN 0041008X. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2008.11.008.
60. LI, Huimin, Dengzhao JIANG, Lei ZHANG a Jiazhong WU. Inhibition of Tumor Growth of Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells in a Nude Mouse Xenograft Model by the Total Flavonoids from *Arachniodes exilis*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2017, 2017, s. 1-9. [cit. 2020-08-08]. ISSN 1741-427X. Dostupné z: doi:10.1155/2017/5310563.
61. LIMA, Emilly J.S.P. de, Sheila S. FONTES, Mateus L. NOGUEIRA, et al. Essential oil from leaves of *Conobea scoparioides* (Cham. & Schltdl.) Benth. (Plantaginaceae) causes cell death in HepG2 cells and inhibits tumor development in a xenograft model. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. 2020, 129 [cit. 2020-08-03]. ISSN 07533322. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2020.110402.

62. LÓPEZ-TERRADA, Dolores, Sau Wai CHEUNG, Milton J. FINEGOLD a Barbara B. KNOWLES. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Human Pathology* [online]. 2009, **40**(10), s. 1512-1515. [cit. 2020-03-30]. ISSN 00468177. Dostupné z: doi:10.1016/j.humpath.2009.07.003.
63. LUNDBERG, Ante S, Scott H RANDELL, Sheila A STEWART, et al. Immortalization and transformation of primary human airway epithelial cells by gene transfer. *Oncogene* [online]. 2002, **21**(29), s. 4577-4586. [cit. 2020-06-05]. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1205550.
64. MADIGAN M., MARTINKO J., eds. Brock Biology of Microorganisms. 2. *Prentice Hall*. [online]. 2005, [cit. 2020-06-03]. ISBN 0-13-144329-1.
65. MARAZZI, Janine, Jonas KLEYER, Juan Manuel Viveros PAREDES a Jürg GERTSCH. Endocannabinoid content in fetal bovine sera - Unexpected effects on mononuclear cells and osteoclastogenesis. *Journal of Immunological Methods* [online]. 2011, **373**(1-2), s. 219-228. [cit. 2020-05-25]. ISSN 00221759. Dostupné z: doi:10.1016/j.jim.2011.08.021.
66. MEHTA, Geeta, Amy Y. HSIAO, Marylou INGRAM, et al. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release* [online]. 2012, **164**(2), s. 192-204. [cit. 2020-06-05]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2012.04.045.
67. MENG, Hui, Liyan CHEN, Zhaoyang YE, et al. The effect of a self-assembling peptide nanofiber scaffold (peptide) when used as a wound dressing for the treatment of deep second degree burns in rats. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online]. 2009, **89B**(2), s. 379-391. [cit. 2020-06-05]. ISSN 15524973. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.31226.
68. MISRA, Sougat, Mallory BOYLAN, Arun SELVAM, Julian SPALLHOLZ a Mikael BJÖRNSTEDT. Redox-Active Selenium Compounds - From Toxicity and Cell Death to Cancer Treatment. *Nutrients* [online]. 2015, **7**(5), s. 3536-3556. [cit. 2020-06-11]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu7053536.
69. MUNRO, Andrew W., Hazel M. GIRVAN a Kirsty J. MCLEAN. Cytochrome P450–redox partner fusion enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2007, **1770**(3), s. 345-359. [cit. 2020-04-28]. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2006.08.018.

70. NAKAMURA, Kazuaki, Natsuko KATO, Kazuko AIZAWA, Reiko MIZUTANI, Junji YAMAUCHI a Akito TANOUE. Expression of albumin and cytochrome P450 enzymes in HepG2 cells cultured with a nanotechnology-based culture plate with microfabricated scaffold. *The Journal of Toxicological Sciences* [online]. 2011, **36**(5), s. 625-633. [cit. 2020-08-08]. ISSN 0388-1350. Dostupné z: doi:10.2131/jts.36.625.
71. NELSON, Celeste M. a Mina J. BISSELL. Modeling dynamic reciprocity: Engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. *Seminars in Cancer Biology* [online]. 2005, **15**(5), s. 342-352. [cit. 2020-04-28]. ISSN 1044579X. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcancer.2005.05.001.
72. NELSON, David R. The Cytochrome P450 Homepage. *Human Genomics* [online]. 2009, **4**(1) [cit. 2020-04-28]. ISSN 1479-7364. Dostupné z: doi:10.1186/1479-7364-4-1-59.
73. PASCHOAL BELTRAN, Juliana Fontes, Sandra Suarez PATIÑO, Thaissa BERNARDINO, Alexandre REZENDE, et al. Adaptation to serum-free culture of HEK 293T and Huh7.0 cells. *BMC Proceedings* [online]. 2014, **8**(S4) [cit. 2020-06-02]. ISSN 1753-6561. Dostupné z: doi:10.1186/1753-6561-8-S4-P259.
74. PETRONINI, Pier GIORGIO, et al. Cell susceptibility to apoptosis by glutamine deprivation and rescue: Survival and apoptotic death in cultured lymphoma-leukemia cell lines. *Journal of cellular physiology* 169.1 [online]. 1996, s. 175-185. [cit. 2020-06-01]. Dostupné z: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199610\)169:1<175::AID-JCP18>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199610)169:1<175::AID-JCP18>3.0.CO;2-C)
75. QUEZADA, Sergio A., Karl S. PEGGS, Tyler R. SIMPSON a James P. ALLISON. Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication. *Immunological Reviews* [online]. 2011, **241**(1), s. 104-118. [cit. 2020-05-]. ISSN 01052896. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01007.x.
76. RAMAIAHGARI, Sreenivasa C., Michiel W. DEN BRAVER, Bram HERPERS, Valeska TERPSTRA et al. A 3D in vitro model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver-like properties for repeated dose high-throughput toxicity studies. *Archives of Toxicology* [online]. 2014, [cit. 2020-08-06]. ISSN 0340-5761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-014-1215-9.



77. RINGER, Sydney a Dudley W. BUXTON. Upon the Similarity and Dissimilarity of the behaviour of Cardiac and Skeletal Muscle when brought into relation with Solutions containing Sodium, Calcium and Potassium Salts. *The Journal of Physiology* [online]. 1887, **8**(5), s. 288-295. [cit. 2020-04-25]. ISSN 00223751. Dostupné z: doi:10.1113/jphysiol.1887.sp000260.
78. ROBERTSON, Alastair. Effects of catechin concentration on the formation of black tea polyphenols during in vitro oxidation. *Phytochemistry* [online]. 1983, **22**(4), s. 897-903. [cit. 2020-07-20]. ISSN 00319422. Dostupné z: doi:10.1016/0031-9422(83)85018-3.
79. RODRÍGUEZ-ANTONA, C., M. T. DONATO, A. BOOBIS, R. J. EDWARDS, et al. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica* [online]. 2008, **32**(6), s. 505-520. [cit. 2020-05-15]. ISSN 0049-8254. Dostupné z: doi:10.1080/00498250210128675.
80. ROTH, Susanne, Peter LANGGUTH, Karsten SPICHER a Harald ENZMANN. Comparative toxicity and cell-tissue distribution study on nanoparticulate iron complexes using avian embryos and HepG2-cells. *Translational Research* [online]. 2008, **151**(1), s. 36-44. [cit. 2020-04-03]. ISSN 19315244. Dostupné z: doi:10.1016/j.trsl.2007.09.001.
81. RYU, Wang-Shick. Diagnosis and Methods. *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses* [online]. Elsevier, 2017, s. 47-62. [cit. 2020-12-08]. ISBN 9780128008386.
82. SASSA, Shigeru, Osamu SUGITA, Richard A. GALBRAITH a Attallah KAPPAS. Drug metabolism by the human hepatoma cell, Hep G2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1987, **143**(1), s. 52-57. [cit. 2020-04-28]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/0006-291X(87)90628-0.
83. Scientific T.F. Recommended Media Types for Common Cells: RPMI 1640 Media. *Thermo Fisher Scientific* [online]. 2015 [cit. 2020-05-02]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/classical-media/rpmi.html>.

84. SEMINO, Carlos E., Joshua R. MEROK, Gracy G. CRANE, et al. Functional differentiation of hepatocyte-like spheroid structures from putative liver progenitor cells in three-dimensional peptide scaffolds. *Differentiation* [online]. 2003, **71**(4-5), s. 262-270. [cit. 2020-06-05]. ISSN 03014681. Dostupné z: doi:10.1046/j.1432-0436.2003.7104503.x.
85. SHAFIEE, Abbas a Kiarash KHOSROTEHRANI. In vitro Co-culture of Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Colony Forming Cells. *BIO-PROTOCOL* [online]. 2017, **7**(20) [cit. 2020-04-25]. ISSN 2331-8325. Dostupné z: doi:10.21769/BioProtoc.2587.
86. SHAY, Jerry W. a Woodring E. WRIGHT. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2000, **1**(1), s. 72-76. [cit. 2020-04-25]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/35036093.
87. SHEIKHZADEH, Najmeh, Katayoon NOFOUZI, Abbas DELAZAR a Ali Khani OUSHANI. Immunomodulatory effects of decaffeinated green tea (*Camellia sinensis*) on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology* [online]. 2011, **31**(6), s. 1268-1269. [cit. 2020-07-20]. ISSN 10504648. Dostupné z: doi:10.1016/j.fsi.2011.09.010.
88. SCHIFF, LEONARD J. Review: Production, Characterization, and testing of banked mammalian cell substrates used to produce biological products. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* [online]. 2005, **41**(3) [cit. 2020-04-25]. ISSN 1543-706X. Dostupné z: doi:10.1290/0503024.1.
89. SORMUNEN R., S. ESKELINEN, VP. LEHTO. Bile canaliculus formation in cultured HEPG2 cells. *Lab Invest* [online]. 1993, **68**(6), s. 652-62. [cit. 2020-06-26]. PMID: 8390592. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8390592/>.
90. STEINBRECHT, S., S. KAMMERER a J.-H. KÜPPER. HepG2 cells with recombinant cytochrome P450 enzyme overexpression: Their use and limitation as in vitro liver model. *Journal of Cellular Biotechnology* [online]. 2019, **5**(1), s. 55-64. [cit. 2020-03-31]. ISSN 23523689. Dostupné z: doi:10.3233/JCB-189013.
91. STEINBRECHT, Susanne, Nadine PFEIFER, Natalie HERZOG, Nadine KATZENBERGER, et al. HepG2-1A2 C2 and C7: Lentivirus vector-mediated stable and functional overexpression of cytochrome P450 1A2 in human hepatoblastoma cells. *Toxicology Letters* [online]. 2020, **319**, s. 155-159. [cit. 2020-03-31]. ISSN 03784274. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2019.11.006.

92. SÚLA, K., et al. "Addition of serum to the medium used for preparation of cell suspensions as a possible source of artifacts in cell-mediated reactions studied by means of the popliteal lymph node test." *Journal of immunogenetics* [online]. 1980, 7(6), 483-489 [cit. 2020-07-10]. ISSN 0960-7420. Dostupné z: doi:10.1111/j.1744-313X.1980.tb00743.x.
93. SUN, Lingli, Yuanlong ZHANG, Wenji ZHANG, Xingfei LAI, et al. Green tea and black tea inhibit proliferation and migration of HepG2 cells via the PI3K/Akt and MMPs signalling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. 2020, **125** [cit. 2020-07-06]. ISSN 07533322. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2020.109893.
94. TOLOSA, Laia, M. José GÓMEZ-LECHÓN, Gabriela PÉREZ-CATALDO, et al. HepG2 cells simultaneously expressing five P450 enzymes for the screening of hepatotoxicity: identification of bioactivable drugs and the potential mechanism of toxicity involved. *Archives of Toxicology* [online]. 2013, **87**(6), s. 1115-1127. [cit. 2020-05-02]. ISSN 0340-5761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-013-1012-x.
95. ULRICH, A.B., P.M. POUR, Ruoya LI, et al. Cell Lines: History, characteristics, and current issues. *Encyclopedia of Genetics* [online]. Elsevier, 2001, **16**(2), s. 310-311. [cit. 2020-05-09]. ISBN 9780122270802. ISSN 14455781. Dostupné z: doi:10.1006/rwgn.2001.0173.
96. VAN DER VALK, J., D. BRUNNER, K. DE SMET, et al. Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro* [online]. 2010, **24**(4), s. 1053-1063. [cit. 2020-04-25]. ISSN 08872333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2010.03.016.
97. VAN DER VALK, J., D. MELLOR, R. BRANDS, et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicology in Vitro* [online]. 2004, **18**(1), s. 1-12. [cit. 2020-04-25]. ISSN 08872333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2003.08.009.
98. VASSILEV, Alex a Melvin DEPAMPHILIS. Links between DNA Replication, Stem Cells and Cancer. *Genes* [online]. 2017, **8**(2) [cit. 2020-06-05]. ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes8020045.
99. VERMA, Anju, Megha VERMA a Anchal SINGH. Animal tissue culture principles and applications. *Animal Biotechnology* [online]. Elsevier, 2020, s. 269-293. [cit. 2020-05-06]. ISBN 9780128117101. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4.

100. WEAVER, V.M., O.W. PETERSEN, F. WANG, C.A. LARABELL, et al. Reversion of the Malignant Phenotype of Human Breast Cells in Three-Dimensional Culture and In Vivo by Integrin Blocking Antibodies. *Journal of Cell Biology* [online]. 1997, **137**(1), s. 231-245. cit. 2020-05-07]. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.137.1.231.
101. WEI, Shuang, Yijing DING a Xinhui HAN. TDSC: Two-Stage DDoS Detection and Defense System Based on Clustering. In: *2017 47th Annual IEEE/IFIP International Conference on Dependable Systems and Networks Workshops (DSN-W)* [online]. IEEE, 2017, s. 101-102. [cit. 2020-07-21]. ISBN 978-1-5386-2272-8. Dostupné z: doi:10.1109/DSN-W.2017.11.
102. WESSMAN, S J., and R L. LEVINGS. Benefits and Risks Due to Animal Serum Used in Cell Culture Production. *Developments in Biological Standardization*, [online]. 1999, **99**, s. 3-8. [cit. 2020-04-25]. PMID: 10404869. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10404869/>.
103. WESTERINK, Walter M.A. a Willem G.E.J. SCHOONEN. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicology in Vitro* [online]. 2007, **21**(8), s. 1581-1591. [cit. 2020-04-28]. ISSN 08872333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2007.05.014.
104. WU, Defeng a Arthur I. CEDERBAUM. Ethanol-Induced Apoptosis to Stable HepG2 Cell Lines Expressing Human Cytochrome P-450E1. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* [online]. 1999, **23**(1), s. 67-76. [cit. 2020-04-16]. ISSN 0145-6008. Dostupné z: doi:10.1111/j.1530-0277.1999.tb04025.x.
105. WU, Min, Zehong YANG, Yanfei LIU, Bo LIU a Xiaojun ZHAO. The 3-D Culture and In Vivo Growth of the Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2 in a Self-Assembling Peptide Nanofiber Scaffold. *Journal of Nanomaterials* [online]. 2010, **2010**, s. 1-7. [cit. 2020-06-05]. ISSN 1687-4110. Dostupné z: doi:10.1155/2010/437219.
106. WU, Xiaohong, Minkui LIN, Yanfen LI, Xin ZHAO a Fuhua YAN. Effects of DMEM and RPMI 1640 on the biological behavior of dog periosteum-derived cells. *Cytotechnology* [online]. 2009, **59**(2), s. 103-111. [cit. 2020-04-20]. ISSN 0920-9069. Dostupné z: doi:10.1007/s10616-009-9200-5.

107. XU, Jinghai J., Dolores DIAZ a Peter J. O'BRIEN. Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2004, **150**(1), s. 115-128. [cit. 2020-04-28]. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2004.09.011.
108. YAO, Tatsuma a Yuta ASAYAMA. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive Medicine and Biology* [online]. 2017, **16**(2), s. 99-117. [cit. 2020-06-02]. ISSN 14455781. Dostupné z: doi:10.1002/rmb2.12024.
109. ZHANG, H.-F., Z.-H. LI, J.-Y. LIU, et al. Correlation of Cytochrome P450 Oxidoreductase Expression with the Expression of 10 Isoforms of Cytochrome P450 in Human Liver. *Drug Metabolism and Disposition* [online]. 2016, **44**(8), s. 1193-1200. [cit. 2020-04-28]. ISSN 1521-009X. Dostupné z: doi:10.1124/dmd.116.069849.
110. ZHOU, Shu-Feng, Li-Ping YANG, Ming WEI, Wei DUAN a Eli CHAN. Insights into the Structure, Function, and Regulation of Human Cytochrome P450 1A2. *Current Drug Metabolism* [online]. 2009, **10**(7), s. 713-729. [cit. 2020-04-30]. ISSN 13892002. Dostupné z: doi:10.2174/138920009789895552.