

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

STUDIUM TOXICITY TĚŽKÝCH KOVŮ
V SUSPENZNÍCH BUNĚČNÝCH SYSTÉMECH
DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Tereza Hrušovská
VEDOUCÍ PRÁCE: RNDr. Jiří Handl, Ph.D.
KONZULTANT: Mgr. Jan Čapek, Ph.D.

2023

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

STUDY TOXICITY OF HEAVY METALS IN
SUSPENSION CELL SYSTEMS

THESIS

AUTHOR: Bc. Tereza Hrušovská

SUPERVISOR: RNDr. Jiří Handl, Ph.D.

CONSULTANT: Mgr. Jan Čapek, Ph.D.

2023

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza Hrušovská**
Osobní číslo: **C21472**
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Studium toxicity těžkých kovů v suspenzních buněčných systémech**
Téma práce anglicky: **Study Toxicity Of Heavy Metals In Suspension Cell Systems**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na toxicitu vybraných těžkých kovů v suspenzních buněčných systémech *in vitro*. Cytotoxicitu charakterizujte s využitím moderních bioanalytických metod. Studujte zejména mechanismy buněčného poškození po inkubaci buněk s CdCl₂.
2. V rámci teoretické části se zaměřte na shrnutí základních principů kultivace buněčných kultur a buněčných linií. Hlavním tématem teoretické části pak bude zejména popis nejčastějších buněčných modelů suspenzních buněk využívaných pro studium cytotoxicity těžkých kovů. Zaměřte se také na obecný popis cytotoxického působení těžkých kovů v organismu. V souvislosti se studiem cytotoxicity těžkých kovů shrňte i možnosti využití moderních bioanalytických metod včetně testů na stanovení metabolické aktivity u suspenzních buněčných linií.

Experimentální část:

1. V rámci praktické části se zaměřte na přípravu a dlouhodobou kultivaci vybraných suspenzních buněčných linií pro potřeby pokročilých bioanalytických metod. U vybrané suspenzní buněčné linie popište změny, ke kterým dochází při působení modelových těžkých kovů. Zaměřte se zejména na cytotoxické působení CdCl₂ a porovnejte výsledky i s dalšími toxiny, jako je například cisplatina. K detekci funkčních změn u buněk inkubovaných s toxiny využijte stanovení buněčné viability a koncentrace glutathionu, popřípadě dalších bioanalytických metod.
2. Získaná experimentální data zpracujte a diskutujte. Výsledky práce následně porovnejte s výstupy jiných autorů.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Ke zpracování literárního přehledu využijte elektronické databáze
(*ScienceDirect, NCBI, PubMed, Web of Science*)

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Jiří Handl, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Jan Čapek, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji:

Práci s názvem „**Studium toxicity těžkých kovů v suspenzních buněčných systémech**“ 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 se 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 5. 5. 2023

Bc. Tereza Hrušovská v.r.

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych ráda poděkovala mému vedoucímu diplomové práce RNDr. Jiřímu Handlovi, Ph.D. za odborné zkušenosti, cenné rady a shovívavost při vedení mé diplomové práce. Nemalou zásluhu na dokončení práce má rovněž Mgr. Jan Čapek, Ph.D. a Mgr. Pavlína Nývltová, Ph.D., kterým bych ráda poděkovala za věcné připomínky a pomoc při zpracování diplomové práce. Nesmím zapomenout věnovat své díky paní laborantce Bc. Ivaně Fousové za vlídné přijetí, přátelskou atmosféru a vysvětlení všech potřebných úkonů při práci v buněčné laboratoři. Nakonec bych ráda poděkovala své rodině především za podporu a trpělivost, kterou mi poskytují po celou dobu studia.

ANOTACE

Předložená diplomová práce se zabývá studiem toxicity těžkých kovů *in vitro* pomocí pokročilých moderních bioanalytických metod. Teoretická část diplomové práce je zaměřena na působení těžkých kovů rtuti a kadmia. Dále jsou také zmíněny nejčastěji používané buněčné modely suspenzních buněk pro studium cytotoxicity těžkých kovů. Závěrečná pasáž teoretické části diplomové práce je zaměřena na využití moderních bioanalytických metod pro stanovení cytotoxicity těžkých kovů na lidských suspenzních buněčných liniích. Experimentální část práce shrnuje přípravu a kultivaci buněčných linií HL-60, Jurkat a Raji. Dále je diplomová práce věnována popisu cytotoxického působení CdCl_2 , HgCl_2 a cisplatinu u zvolené buněčné linie Jurkat. K detekci funkčních změn buněk Jurkat inkubovaných s výše zmíněnými toxiny bylo využito stanovení koncentrace intracelulárního glutathionu a dehydrogenázové aktivity. Získané výsledky byly vyhodnoceny, diskutovány a následně v závěru diplomové práce shrnuty.

KLÍČOVÁ SLOVA

suspenzní buněčné linie, Jurkat, cytotoxicita, kadmium, rtuť, buněčná viabilita

ANNOTATION

This diploma thesis deals with the study of heavy metal toxicity *in vitro* using advanced modern bioanalytical methods. The theoretical part of the thesis is focused on the effects of heavy metals such as mercury and cadmium. Furthermore, the most commonly used cell suspension models for the study of heavy metal cytotoxicity are also mentioned. The following theoretical part of the thesis focusses on the use of modern bioanalytical methods to determine heavy-metal cytotoxicity in human suspension cell lines. The experimental part is devoted to the preparation and cultivation of HL-60, Jurkat and Raji cell lines. An additional topic of the thesis is to describe the cytotoxic effects of CdCl₂, HgCl₂ and cisplatin on the Jurkat cell line. The determination of intracellular glutathione concentration and dehydrogenase activity of Jurkat cells was used to detect functional changes in the cell line tested. The selected tests were evaluated in the time range of 1-6 h and 24 h. As a conclusion, in the diploma thesis, all measured results are described and subsequently discussed.

KEYWORDS

Suspension Cell Lines, Jurkat, Cytotoxicity, Cadmium, Mercury, Cell Viability

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK	11
SEZNAM ZKRATEK	12
ÚVOD	14
1 TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1 BUNĚČNÉ MODELY	15
1.1.1 Kultivace buněčných linií	17
1.1.2 Kultivační biomateriál	18
1.1.3 Kontaminace	19
1.1.4 Autentizace buněčných linií	21
1.2 LIDSKÉ SUSPENZNÍ BUNĚČNÉ LINIE	23
1.2.1 Historie suspenzních buněčných linií	23
1.2.2 Klasifikace leukemicko-lymfomových linií	25
1.2.3 HL-60	26
1.2.4 Jurkat	27
1.2.5 Raji	29
1.2.6 Zavedení nových leukemicko-lymfomových linií	30
1.2.7 Panel nádorových buněčných linií LL-100	31
1.3 KADMIUM	33
1.3.1 Mechanismus toxicity kadmia	33
1.3.2 Nežádoucí účinky kadmia	36
1.3.3 Prevence a eliminace kadmia	36
1.4 RTUŤ	38
1.4.1 Mechanismus toxicity rtuti	38
1.4.2 Nežádoucí účinky rtuti	40
1.4.3 Prevence a léčba otravy rtutí	41
1.5 HODNOCENÍ CYTOTOXICITY TĚŽKÝCH KOVŮ	42
1.5.1 Detekce intracelulární dehydrogenázové aktivity (WST-1 test)	43
1.5.2 Detekce intracelulární hladiny glutathionu (MCB test)	44
2 CÍLE PRÁCE	46
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	47
3.1 SEZNAM POUŽITÉHO MATERIÁLU A POMŮCEK	47
3.1.1 Biologický materiál	47
3.1.2 Chemikálie a roztoky	47

3.1.3	Laboratorní pomůcky, přístroje a software.....	47
3.1.4	Příprava kultivačního média.....	48
3.1.5	Příprava roztoků.....	49
3.2	POSTUP KULTIVACE BUNĚČNÝCH LINÍÍ	50
3.2.1	Kultivace buněčné linie HL-60	50
3.2.2	Kultivace buněčné linie Jurkat.....	50
3.2.3	Kultivace buněčné linie Raji.....	51
3.3	BIOANALYTICKÉ METODY POUŽITÉ PRO TESTOVÁNÍ TOXICKÝCH Vlivů.....	52
3.3.1	Detekce intracelulární dehydrogenázové aktivity (WST-1 test).....	52
3.3.2	Detekce intracelulární hladiny glutathionu (MCB test).....	52
3.3.3	Statistické hodnocení naměřených dat	52
4	VÝSLEDKY	53
4.1	Optimalizace buněčné linie	53
4.2	Optimalizace koncentrací testovaných těžkých kovů	57
4.3	Stanovení dehydrogenázové aktivity buněčné linie Jurkat.....	59
4.4	Stanovení hladiny glutathionu buněčné linie Jurkat	61
5	DISKUZE.....	63
	ZÁVĚR	71
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	72

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Mikrobiální kontaminace.....	20
Obrázek 2: Mikrofotografie buněk HL-60	27
Obrázek 3: Mikrofotografie buněk Jurkat	28
Obrázek 4: Mikrofotografie buněk Raji	30
Obrázek 5: Mechanismus toxického působení ledvin.....	35
Obrázek 6: Přeměna vitálního barviva	44
Obrázek 7: Enzymatická přeměna monochlorbimanu na glutathionový adukt	45
Tabulka 1: Historické milníky vzniku suspenzních buněčných linií	24
Tabulka 2: Klasifikace buněčných linií.....	25
Tabulka 3: Dehydrogenázová aktivita po expozici CdCl ₂ a HgCl ₂ u buněčné linie Jurkat.....	60
Tabulka 4: Hladina glutathionu po expozici CdCl ₂ a HgCl ₂ u buněčné linie Jurkat.....	62
Graf 1: Dehydrogenázová aktivita po expozici CdCl ₂ u vybraných buněčných linií.....	54
Graf 2: Hladina glutathionu po expozici CdCl ₂ u vybraných buněčných linií.....	56
Graf 3: Dehydrogenázová aktivita a hladina glutathionu po expozici HgCl ₂ u buněčné linie Jurkat.....	58

SEZNAM ZKRATEK

AO	akridinová oranž
ATP	adenosintrifosfát
ATRA	kyselina all-trans retinová
BAL	2,3-dimerkaptopropanol
CCF-STTG1	lidské astrocyty
DMPS	2,3-dimerkapto-propan-1-sulfonát
DMSA	meso-2,3-dimerkaptosukcinová kyselina
DMSO	dimethylsulfoxid
EB	ethidium bromid
EBV	virus Epstein–Barrové
ELISA	imunisorbční enzymatická metoda
FBS	fetální bovinní sérum
FCS	fetální telecí sérum
GSH	glutathion
HEK293	buněčná linie lidských embryonálních ledvin
HTLV-1	virus lidské T-buněčné leukemie-1
HTLV-2	virus lidské T-buněčné leukemie-2
LDH	laktátdehydrogenáza
LL buněčné linie	leukemicko-lymfomové buněčné linie
LUHMES	primární lidské neurální buňky
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy
MBB	monobromobiman
MCB	monochlorbiman
MTP	mitochondriální transmembránový potenciál
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NAPA	N-acetyl-D-Penicilamin
Nrf2	jaderný faktor-erytroidní 2 p45-související faktor 2
PCR	polymerázová řetězová reakce
PES	fenazin etosulfát
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
ROS	reaktivní formy kyslíku

-SH	thiolové skupiny
SNP	jednonukleotidové polymorfismy
STR	krátké tandemové repetice
WST-1	2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2Htetrazolium-5-karboxanilid

ÚVOD

Těžké kovy jsou přirozeně se vyskytující prvky, největší zastoupenou skupinou jsou přechodné kovy, dále polokovy, lanthanoidy, a rovněž aktinoidy. Jejich společným charakteristickým znakem je vysoká hustota, a také jejich toxické působení jak na lidský organismus, tak na životní prostředí. Ve výčtu těžkých kovů nejčastěji nalezneme olovo, arsen, měď, zinek, rtuť, kobalt, antimon, selen a kadmium. Některé těžké kovy jsou pro správnou funkci lidského organismu nezbytné, jiné těžké kovy jsou naopak již ve stopovém množství pro člověka nebezpečné. Některé z těchto kovů mohou vyvolat vážné zdravotní následky jako je například neurotoxicita, nefrotoxicita, plicní toxicita nebo hepatotoxicita, které mohou nastat z důvodu dlouhodobého vystavení lidského organismu vysokým dávkám těžkých kovů.

Prostřednictvím *in vitro* experimentů prováděných na buněčných modelech jsou získávány poznatky pro určení a vyhodnocení potenciální škodlivosti látek. Buněčné modely mohou být rozčleněny do tří skupin, a to na primární buněčné kultury, buněčné linie a kmenové buňky. Podle dostupné literatury jsou jak adherentní, tak suspenzní buněčné linie hojně užívány ve výzkumu cytotoxicity těžkých kovů. V našem případě byly pro studium potenciálního cytotoxického působení vybraných těžkých kovů zvoleny dlouhodobě kultivovatelné suspenzní buněčné linie HL-60, Jurkat a Raji, které jsou charakteristické postupným růstem a neomezenou proliferací. Na hodnocení buněčného poškození a změn se lze dívat z různých pohledů. K tomuto účelu je využívána široká škála moderních bioanalytických metod. Tyto metody mohou zahrnovat také pozorování funkce buněčného metabolismu, kdy je zejména detekována životaschopnost buněk. Fluorescenční techniky s vizualizačními sondami lze rovněž využít při sledování buněčné apoptózy. Hodnocení toxických účinků těžkých kovů lze charakterizovat také z pohledu schopnosti antioxidantní ochrany, přičemž velice často bývá analyzována koncentrace nejvýznamnějšího intracelulárního antioxidantu glutathionu, případně oxidační stres anebo mitochondriální transmembránový potenciál. Rovněž lze také studovat změny exprese proteinů. Mezi testované markery patří zejména proapoptotický protein Bax, apoptotický protein Bcl-2 nebo cytochrom C.

V této diplomové práci byl posuzován stav metabolické aktivity buněk při hodnocení toxického působení CdCl_2 a HgCl_2 na vybrané suspenzní buněčné linii. Buněčná viabilita, respektive intracelulární dehydrogenázová aktivita byla analyzována s využitím WST-1 testu založeném na redukci tetrazoliové soli na barevný formazanový produkt, který byl následně spektrofotometricky detekován. Další sledovaným parametrem byla intracelulární koncentrace glutathionu podílející se na regulaci buněčného cyklu, a kromě jiného má také vliv na buněčnou proliferaci a regulaci apoptózy.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 BUNĚČNÉ MODELY

Buněčné modely jsou užitečným nástrojem při *in vitro* testování potenciálně toxických látek. Odběrem buněčného materiálu z rostlin nebo živočichů jsou získávány buněčné kultury, ze kterých mohou být následně vytvořeny buněčné linie (Bhatia, 2019). Buněčné modely využívané v klinické praxi lze rozdělit do několika typů (Segeritz, 2017).

Prvním typem buněčných modelů jsou primární buněčné kultury, které jsou izolovány z lidských tkání pomocí mechanických nebo enzymatických technik. Primární buněčné kultury lze rovněž připravit i ze zvířecích tkání (Segeritz, 2017). Primární buňky obsahují všechny znaky původní tkáně, tudíž vykazují shodné karyotypy. Rovněž mají schopnost proliferace a disponují omezenou životaschopností. Vyizolovaným buňkám je třeba poskytnout vhodné kultivační podmínky. V kultivačních miskách přirozeně dochází ke změnám v kultivačním médiu, dále k vyčerpání živin, a postupně také k nárůstu většího množství buněk, případně k tvorbě toxických metabolitů. Všechny tyto změny je nutné sledovat a následně i eliminovat včasným buněčným pasážováním. Pro zachování plynulé proliferace je nutné vytvořit z vykultivovaných buněk sekundární buněčnou kulturu (Bhatia, 2019). Nejčastěji využívané primární buněčné kultury jsou odvozeny z epitelových a svalových buněk, z fibroblastů nebo kmenových mezenchymálních buněk (Kasper, 2018). Často jsou využívány také hepatocyty získané z jaterních explantátů, primární lidské gliové buňky z mozkové tkáně, B buňky z tonzilárního materiálu a mikroglie z fetální a dospělé tkáně (Borgmannová, 2005; Helm, 2021; Mizze, 2018; Segeritz, 2017).

Druhým typem buněčných modelů jsou kmenové buňky. Lidské kmenové buňky jsou ve výzkumech a studiích používány ve velké míře. Přispívají k porozumění biologickým mechanismům v lidském organismu, a díky svým vlastnostem mají velký potenciál v terapii různých onemocnění (Bindu, 2011). Jednou z jejich hlavních vlastností je schopnost sebeobnovy a tvorby nových kmenových buněk. Další charakteristickou vlastností kmenových buněk je schopnost diferenciaci. Nespecializované kmenové buňky jsou schopné přeměny na buňky specializované. Díky jejich charakteristickým vlastnostem je možno kmenové buňky dlouhodobě a teoreticky až neomezeně dlouhou dobu kultivovat (Bindu, 2011).

Kmenové buňky lze podle schopnosti diferenciaci rozdělit na pět typů – totipotentní, pluripotentní, multipotentní, oligopotentní a unipotentní. Buňky totipotentní dokáží vytvořit jakékoliv v těle se vyskytující buňky a následně celý životaschopný organismus. Z totipotentních kmenových buněk jsou tvořeny buňky pluripotentní, které také mohou být

přeměněny na různé v těle se vyskytující buňky. Konkrétně do této skupiny patří buňky embryonální. Dalším typem jsou buňky multipotentní. Ty produkují potomstvo, které tvoří pouze buňky dané tkáně. Tedy například z hematopoetických kmenových buněk v kostní dřeni vznikají výhradně krevní elementy. Do této skupiny spadají kromě hematopoetických buněk také nervové a mezenchymové kmenové buňky. Jako oligopotentní jsou označovány buňky schopné diferenciaci pouze na některé specializované buněčné typy, zejména myeloidní a lymfoidní kmenové buňky. Posledním typem jsou buňky unipotentní, které vytvářejí výhradně jeden buněčný typ.

Třetím buněčným modelem jsou buněčné linie, které jsou vytvářeny zejména subkulturací nádorových a imortalizovaných buněčných kultur. Buněčné linie jsou považovány za trvale udržitelné buněčné kultury nepřetržitě se množící po dodání kultivačního média. Rozdělují se do dvou skupin na finitní a kontinuální. Jako finitní jsou nazývány buněčné linie, které jsou nejčastěji izolovány z fyziologických tkání. Zahrnují buňky, které dokáží mnohonásobně zvětšit svoji populaci, a to 20-100x. Zároveň je nelze subkultivovat neomezeně. Nádorové buňky dávají vzniknout naopak kontinuálním liniím a jejich hlavním znakem je postupný růst a neomezená proliferace (Bhatia, 2019). Buněčné linie jsou transformované buňky, které byly přeměněny maligní transformací. K transformaci buněk může dojít spontánně, ale také uměle. (Segeritz, 2017). Spontánní imortalizace u lidských buněk *in vitro* je však ojedinělá (Duncan, 2000). Umělá imortalizace nastává vlivem fyzikálních, chemických nebo biologických faktorů. Nejčastěji je způsobena biologickými vlivy, a to konkrétně viry (Lundberg, 2002). K tomuto procesu se využívá zejména virus Epstein–Barrové (EBV), a rovněž vir lidské T-buněčné leukemie-1 (HTLV-1) (Drexler, 2013). Tyto buňky již nemají schopnost kontroly nad vlastním množením, což může být způsobeno několika faktory. Vliv mají především genetické změny a mutace (Bhatia, 2019). Genetické změny u uměle imortalizovaných buněčných linií mohou být velmi blízké změnám, ke kterým dochází při maligní transformaci v organismu (Capes-Davis, 2010).

Důležitou charakterizací těchto buněk je Hayflickův limit, který popisuje fakt, že každá lidská buňka je schopná pouze omezeného množství dělení za ideálních podmínek *in vitro* (Hayflick, 1965). Po určitém počtu dělení dochází obvykle u nádorových buněk k ukončení jejich růstu. To je označováno pojmem senescence neboli buněčné stárnutí. Jako senescentní jsou označovány lidské buňky, které nejsou ovlivňovány mitogeny a neproliferují v daném časovém období, například 30 dní (Duncan, 2000).

1.1.1 Kultivace buněčných linií

Buněčné kultury je možné rozdělit do dvou skupin. Do první skupiny lze zařadit buňky adherentní, které pro správný růst a proliferaci potřebují adherovat na kultivační povrch. Převážná část buněčných linií je připravována ve formě jednovrstevných adherentních buněk. Tyto buňky mají polygonální nebo ostrý tvar a jsou odvozeny z různých typů tkání. Druhou skupinou jsou buňky suspenzní, které naopak dokáží proliferovat neadherované, volně plovoucí v médiu. Tyto buňky bývají většinou kulovitěho tvaru a nejčastěji jsou izolovány z krve, kdy se v krevním řečišti pohybují volně (Bhatia, 2019; Segeritz, 2017).

Pro každou buněčnou linii je důležitým parametrem volba příhodných růstových podmínek. Optimální teplota pro jednotlivé linie je individuální, záleží zejména na teplotě mikroprostředí, ze kterého buňky pocházejí. Samozřejmě také závisí na konkrétním typu kultury. Pro udržení požadované teploty při buněčné kultivaci jsou využívány inkubátory, které regulují teplotu prostředí. V rozmezí teplot 15-26°C bývají inkubovány buněčné linie získané z chladnokrevných zvířat. Většina savčích, a tedy i lidských buněčných kultur je obvykle inkubována při teplotě 36-37°C. V praxi jsou nejčastěji využívány takové typy inkubátorů, které jsou zároveň schopné regulovat i hladinu CO₂, jež je pro buněčné kultivace také důležitá. Ideální hladina CO₂ pro dlouhodobé udržení buněčné kultury je 5 %. Při snížení této hladiny může nastat nežádoucí změna hodnoty pH. Fyziologickou hodnotu pH je proto nutné důsledně hlídat u většiny buněk. V mírně kyselejších podmínkách se transformovaným buňkám lépe daří. Pro růst těchto buněk je vhodné rozmezí pH 7,0 – 7,4. Buněčné linie odvozené z fibroblastů dávají přednost lehce zásaditějšímu prostředí, čemuž odpovídají hodnoty pH 7,4 – 7,7 (Segeritz, 2017).

K proliferaci buněk je zapotřebí energie dodávaná zejména v podobě glukózy. Metabolickým zpracováním glukózy dochází ke vzniku vedlejších produktů, jako je CO₂, kyselina mléčná a kyselina pyrohroznová. Z důvodu nutnosti vykompenzování hladiny CO₂ je do kultivačního média přidáván hydrogenuhličitanový pufr. Kromě tohoto anorganického pufru lze využít i pufrы organického charakteru. Konkrétně se jedná o HEPES, který obsahuje kyselinu 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonovou anebo MOPS, který obsahuje kyselinu 3-(N-morflino)propansulfonovou. Většina kultivačních médií obsahuje indikátory pH. Jedním z nejpoužívanějších indikátorů je fenolová červeň, která se v zásaditém prostředí barví do růžova a v kyselém prostředí do žluta, čímž umožňuje barevné rozlišení pH (Segeritz, 2017).

1.1.2 Kultivační biomateriál

Buněčné kultivační médium se suplementy a teplota 37°C jsou některými z řady faktorů potřebných k navození optimálního prostředí pro buněčný růst. Mezi důležité základní složky kultivačních médií patří hlavně vitamíny, minerály, hormony, sacharidy, růstové faktory a aminokyseliny. Součástí jsou i látky, které zajišťují vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti médií, například osmotický tlak a optimální pH pro růst buněčné kultury (Segeritz, 2017). Podle druhu buněčné kultury se významně liší výživové nároky, osmolalita a optimální hodnota pH. Spotřeba živin závisí rovněž na rychlosti buněčného růstu kultury (Baust, 2017). Je důležité zajistit buňkám prostředí, které je blízké fyziologickým podmínkám v živém organismu. K tomu je využíván růstový substrát (Segeritz, 2017).

Pro obohacení se do média přidává sérum. Konkrétně fetální bovinní sérum (FBS) dodává kultivovaným buňkám hormony, růstové faktory a chová se jako nosič enzymů a lipidů (Segeritz, 2017). Cílem některých laboratoří je postupně snižovat nebo dokonce zcela eliminovat přítomnost živočišných složek v kultivačních médiích. Z tohoto pohledu se za klíčové považuje snižování právě FBS a fetálního telecího séra (FCS) (Segeritz, 2017; Muraglia, 2017). Důležité je zejména omezení využití FBS a FCS v klinických studiích, kdy může přítomnost těchto složek ovlivnit podmínky pro buněčnou izolaci a proliferaci (Muraglia, 2017). Omezování využití živočišných produktů je zásadní zejména z hlediska vysokého rizika jejich kontaminace, a také z důvodu nežádoucích inhibičních nebo stimulačních vlivů. Tato séra se kompenzují jinými složkami, které jsou z hlediska svého složení daleko lépe definovány (Segeritz, 2017). Alternativou FBS nebo FCS jsou deriváty lidských krevních destiček (Muraglia, 2017).

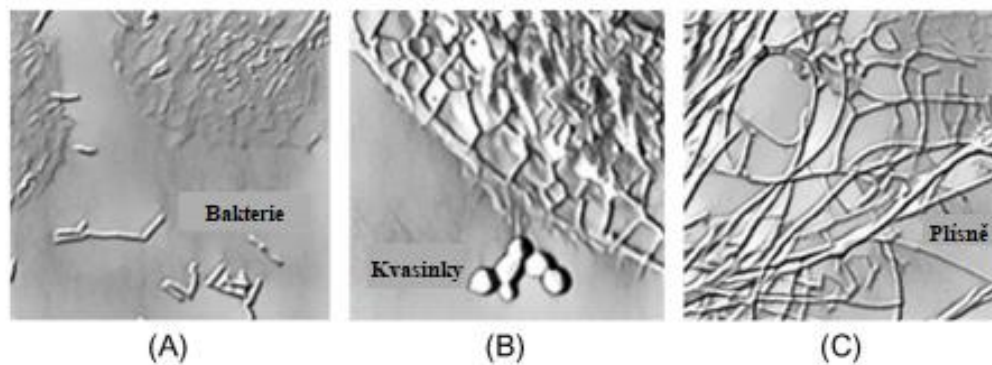
Za další nezbytnou složku kultivačních médií lze považovat antibiotika, která u kultivovaných buněčných linií slouží jako ochrana proti bakteriální kontaminaci. Do média se přidává nejčastěji gentamicin, penicilin nebo streptomycin. Gentamicin a streptomycin patří do skupiny aminoglykosidů, které způsobují ototoxicitu a nefrotoxicitu. Penicilin působí jako inhibitor syntézy peptidoglykanu, jenž je důležitý pro stavbu bakteriální buněčné stěny. Na rozdíl od penicilinu, streptomycin ničí mikrobiální buňky narušením bílkovinné syntézy prostřednictvím poškození čtení kodonů, způsobené navázáním 30 S podjednotky na malou 16 S rRNA (Ryu, 2017). Ve studiích na lidských jaterních buňkách bylo prokázáno, že antibiotikum dokáže způsobit změny v regulaci a expresi genů *in vitro*. Konkrétně rifampicin indukuje změnu aktivity oblastí eukaryotické DNA zodpovědných za transkripci genů. Dalším antibiotikem využívaným při kultivaci buněk je

metformin, který vykazuje schopnost potlačit glukoneogenezi (Smith, 2014; Luizon, 2016). U lidí bylo zjištěno pouze několik případů ovlivňování genové exprese pomocí antibiotik i přes jejich potenciální toxicitu (Schwarze, 1981; Martinez-Liarte, 1995; Feng, 2020). I přes některé výše uvedené závěry lze říci, že účinky antibiotik na regulaci genové exprese u lidských buněčných linií nebyly zatím dostatečně prozkoumány (Llobet, 2015). Zároveň přesný mechanismus smrti mikrobiálních buněk prozatím také není zcela objasněn (Ryu, 2017).

1.1.3 Kontaminace

Buněčných kontaminantů je celá řada. Pro zjednodušení je lze rozdělit do dvou hlavních kategorií, a to na biologické a chemické. Mezi biologické řadíme houby, kvasinky, bakterie, mykobakterie, parazity, mykoplazmata a viry (Baust, 2017, Segeritz, 2017). Do chemických kontaminantů patří zejména těžké kovy, volné radikály, detergenty a endotoxiny (Baust, 2017). Biologické kontaminanty dokáží velmi negativně ovlivnit genotyp a fenotyp dané buněčné kultury. Tuto negativní změnu způsobují zejména kompeticí s kultivovanými buňkami o důležité živiny. Dále pak syntézou vedlejších toxických, kyselých nebo alkalických produktů. Ke změně fenotypu a genotypu může rovněž dojít působením určitého viru na genom buněk (Segeritz, 2017). Z těchto kategorií lze za nejčastější kontaminanty označit kontaminanty mikrobiální (Baust, 2017; Segeritz, 2017).

Bakterie a plísňe jsou častými biologickými kontaminanty (Baust, 2017). V závislosti na typu mohou mít bakterie tvar tyčinek, koků, anebo mohou být sotva pozorovatelné pod mikroskopem (Obr. 1). Za bakteriální kontaminaci lze považovat také prokaryotické mikroorganismy. Poté, co je buněčná kultura kontaminována bakteriemi, trvá díky jejich rychlému množení pouze jednotky dní, než jsou bakterie mikroskopicky odhaleny. Snadné množení pak přispívá k rychlejšímu šíření infekce. Kontaminované buněčné linie jsou nejčastěji zakalené a může být přítomen i typický zápach. Kromě toho bakterie dokáží změnit pH kultivačního média, to konkrétně způsobuje změnu jeho zbarvení (Segeritz, 2017).



Obrázek 1: Mikrobiální kontaminace, (A – bakterie, B – kvasinky, C – plísně), (upraveno dle: Segeritz, 2017).

Kontaminace bakteriemi a plísněmi je snadno odhalitelná z důvodu rychlého odumírání buněk (Baust, 2017). Výjimkou jsou mykobakterie a mykoplazmata (Baust, 2017). Například kmen *Escherichia coli* má větší velikost (přibližně 2 μm) a dokáže se pohybovat pomocí bičíku, proto ho lze pozorovat v mikroskopu, na rozdíl od rodu *Mycoplasma*. Rod *Mycoplasma* je totiž nepohyblivý a morfologicky menší než 1 μm . Z toho vyplývá, že infekce způsobené mykoplazmaty mohou být snadno přehlédnuty. Odhaleny bývají až snížením kvality kultivovaných buněk. U buněk může následně nastat pokles buněčné proliferace a rovněž buněčná smrt. Prostřednictvím polymerázové řetězové reakce (PCR), imunofluorescenčního barvení nebo imunosorbční enzymatické metody (ELISA) se preventivně testují buněčné kultury na přítomnost mykoplazmat (Segeritz, 2017). Pro růst plísní jsou charakteristická propojená mnohobuněčná tenká vlákna. Kontaminace způsobená plísní může být taktéž spojená se značným zápachem. Plísně se šíří pomocí spor vzduchem, z tohoto důvodu je potřeba takto kontaminované kultury okamžitě zničit (Segeritz, 2017).

Mezi biologické kontaminanty dále zahrnujeme také kvasinky a viry. Kvasinky rostou v oválných formách o velikosti do 15 μm . Jsou schopné nepohlavního rozmnožování a také produkce mnohobuněčných řetězců (Segeritz, 2017). Naopak viry narůstají pouze do velikosti 300 nm. Do buněčných kultur se mohou dostat zejména při používání výrobků živočišného původu, především FBS a trypsinu. Pro pracovníky laboratoře jsou viry hrozbou závažného zdravotního rizika (Segeritz, 2017). Virová detekce je obtížná, většinou nemá žádný viditelný cytopatický účinek na buňky, tudíž je pro její odhalení zapotřebí využít specifické metody jako je elektronová mikroskopie, polymerázová řetězová reakce, imunocytochemie nebo metoda ELISA (Baust, 2017; Segeritz, 2017).

Ke kontaminaci taktéž může dojít zanesením nečistot. Například se jedná o změkčovadla v kultivačních nádobách (Segeritz, 2017). V případě smísení dvou rozdílných buněčných kultur pak hovoříme o tzv. křížové kontaminaci (Baust, 2017). Ta může nastat z mnoha důvodů, zejména využitím společných médií a dalších reagentů při kultivaci jiných buněčných kultur nebo nesprávnou technikou práce. Ke zkřížení také dochází při špatné manipulaci s danou kulturou, vlivem chybné identifikace nebo nesprávným označením linie (Capes-Davis, 2010).

V případě kontaminace buněčné kultury je v první řadě důležité určit zdroj kontaminace a odstranit kontaminované buněčné kultury, aby nedošlo k následnému rozšíření infekčních agens do jiných kultur. Materiál, který přišel do styku s kontaminovanými buňkami je potřeba zlikvidovat. Všechny povrchy dotýkající se znečištěné nádoby je nutné řádně vydezinfikovat (Segeritz, 2017).

1.1.4 Autentizace buněčných linií

Pro určení správné identity buněčné linie je třeba provést autentizaci. Samotné testování lze provádět celou řadou postupů (Capes-Davis, 2010). První křížová kontaminace byla rozpoznána u buněčné linie HeLa prostřednictvím chromozomální a izoenzymové metody (Nelson-Rees, 1976; Gartler, 1967). Starším přístupem testování je určení karyotypu dané linie a existujících markerů. Identifikace rovněž závisí na druhu buněk. Ne všechny analýzy lze totiž aplikovat pro veškeré buněčné linie, zejména pokud se jedná o molekulárně biologické metody jako je například profilování krátké tandemové repetice (STR) lokusů. Některé buněčné banky a laboratoře zveřejnily pro individuální buněčné kultury jejich STR profily k možnému porovnání. Při porovnávání STR profilů je nutné brát v úvahu fakt, že u nádorových vzorků dochází k proměnlivosti mikrosatelitů a úbytku heterozygoty, proto nejsou tolik geneticky stálé jako jiné tkáňové buňky. Proto je potřeba nacházet podobné shody a nevyhledávat pouze stoprocentně identické profily STR v databázích (Capes-Davis, 2010). Většina studií ukazuje, že dostačující podobnost STR profilů je 80 % (Masters, 2001; Lorenzi, 2009). Dalšími metodami pro autentizaci buněčných linií jsou multilokusová analýza otisků DNA, analýza fragmentů PCR a také DNA *barcoding*, který se používá k identifikaci mezidruhové kontaminace. Pro vzorky, které je obtížné rozlišit z důvodu příbuzenského zkřížení (například u hlodavců), je vhodná analýza polymorfismu jednotlivých nukleotidů (SNP). Tuto metodu lze také aplikovat k ověření, zda je buněčná linie zvířecí nebo lidská. Posledním využívaným

postupem je určení hybridomů pomocí sekvenování variabilních oblastí lehkých řetězců, kde se stanovují exprimované markery (Capes-Davis, 2010).

1.2 LIDSKÉ SUSPENZNÍ BUNĚČNÉ LINIE

Leukemicko-lymfomové (LL) buněčné linie jsou využívány především pro hlubší porozumění biologii nádorových onemocnění. Tyto linie jsou využívány ale i v dalších studiích (Matsuo, 1998; Drexler, 1994). Poskytují informace v oblasti farmakologie, biotechnologie, a rovněž biomedicíny. Dále jsou důležité v cytogenetických, virologických, hematologických, imunologických a molekulárně biologických výzkumech. Jejich využití je významné pro rozvoj terapeutických možností. Velkou výhodou je celosvětová dosažitelnost stejných buněk a velká zásoba biologického materiálu (Drexler, 2010; Drexler, 2020).

Každý rok narůstá počet lidských LL buněčných linií, celkový odhad již existujících linií je více než 1000 (Drexler, 2013). Autoři Drexler et al 2010 provedli průzkum u zhruba 554 LL buněčných linií. Ve studii bylo stanoveno, že 34 % těchto linií bylo odvozeno od pacientů při začínajících projevech onemocnění nebo od pacientů trpících stanovenými diagnózami. Naopak 54 % vytvořených linií odpovídá vzorkům od pacientů v konečném stádiu nemoci nebo při relapsu (Drexler, 2010).

1.2.1 Historie suspenzních buněčných linií

Na Univerzitě Johnse Hopkinse v Baltimoru v roce 1951 vytvořil George Otto Gey a jeho kolegové první lidskou buněčnou linii. Tato linie, označovaná jako HeLa buňky, byla pojmenována podle dádkyně Henrietty Lacksové (Drexler, Macleod, 2010). Dalším významným objevem byl vznik lidských buněčných kontinuálních linií z Burkittova lymfomu, jenž byl objeven Robertem Pulvertaftem na Univerzitě v Ibadanu v roce 1963. Vytvořil nejznámější buněčnou hematopoetickou linii Raji, odvozenou přibližně od 100 nigerijských pacientů s lymfomem (Drexler, 2010; Drexler, 2013). Leukemická lidská linie J-111, která se podařilo izolovat Burkovi a Osgoodovi, byla pravděpodobně získána od pacienta s akutní myeloidní leukémií. V roce 1955 byla prokázána genetická shoda linie J-111 s buněčnou linií HeLa. Jedná se o prvotní známou křížovou kontaminaci. Další historicky používané buněčné linie jsou vypsány v Tab. 1 (Drexler, Macleod, 2010).

Tabulka 1: Historické milníky vzniku suspenzních buněčných linií, (*Rok publikování; ALL – akutní lymfoblastoidní leukemie; AML – akutní myeloidní leukemie; BCP – prekurzor B-buněk; CML-BC – chronická myeloidní leukemie v blastické krizi; HCL – vlasatobuněčná leukemie; MDS – myelodysplastický syndrom; NHL – ne Hodgkinův lymfom; NK – přirozený zabíječ; PEL – primární výpotkový lymfom, (upraveno dle: Drexler, Macleod, 2010).

ROK *	BUNĚČNÁ LINIE	TYP BUŇKY (ONEMOCNĚNÍ)
1964	Raji	Zralé B-buňky (Burkittův NHL)
1965	CCRF-CEM	Nezralé T-buňky (ALL)
1967	RPMI 8226	Plazmatické buňky (mnohočetný myelom)
1972	MOLT 3	Nezralé T-buňky (ALL)
1973	K-562	Erytroidní (CML-BC)
1974	U-698 M	Zralé B-buňky (NHL)
1974	SU-DHL-1	ALCL (NHL)
1976	U-937	Monocytární (lymfom)
1977	Reh	Prekurzorové buňky B (ALL)
1977	NALM-1	Prekurzorové buňky B (CML-BC)
1977	Jurkat	Lymfoblastické (leukémie)
1977	HL-60	Myelocytární (AML)
1979	L 428	Hodgkinovy buňky (Hodgkinův lymfom)
1980	HUT 78/H9	Zralé T-buňky (Sézaryho)
1980	CTCL-2	Zralé T-buňky (Sézaryho)
1981	JOK-1	Zralé B-buňky (HCL)
1982	697	Prekurzorové buňky B (BCP-ALL)
1982	HEL	Erytroidní (AML M6)
1985	RS4;11	Prekurzorové buňky B (BCP-ALL)
1985	KU812	Myelocytární (CML-BC)
1985	MEG-01	Megakaryocytární (CML-BC)
1985	YT	NK buňky (T-ALL)
1985	EoL-1	Myelocytární (leukémie)
1986	HDLM-2	Hodgkinovy buňky (Hodgkinův lymfom)
1988	HBL-2	Zralé B-buňky (B-NHL)
1988	HMC-1	Myelocytární (leukémie)
1988	M-07e	Megakaryocytární (AML M7)
1989	TF-1	Erytroidní (AML M6)
1989	OCI/AML3	Monocytární (AML M4)
1991	ME-1	Monocytární (AML M4eo)
1991	Kasumi-1	Myelocytární (AML M2)
1991	NB4	Myelocytární (AML M3)
1991	DoHH2	Zralé B-buňky (B-NHL)
1994	Karpas 1106P	Zralé B-buňky (B-NHL)
1994	MDS92	Myelocytární (MDS)
1996	BC-1	Zralé B-buňky (PEL)
1996	MUTZ-3	Monocytární (AML M4)
2003	FA-AML-1	Myelocytární (AML M2)
2005	CAL-1	Dendritický (NK lymfom)

1.2.2 Klasifikace leukemicko-lymfomových linií

Skupina LL buněčných linií obsahuje celou řadu hematopoetických buněčných linií. V neposlední řadě se do tohoto souboru připojily také dendritické buňky (Drexler, Macleod, 2010). Buněčné linie LL se rozdělují do dvou typů. První typ poukazuje na diagnózu pacienta, druhý typ ukazuje na specifické vlastnosti buněk. Jednotlivými charakteristickými znaky pro druhý typ buněčné linie LL jsou konkrétně cytogenetické aberace, imunofenotypy, markery nebo funkční rysy. Téměř všechny hematopoetické buněčné linie rostou v kultivačním médiu ve formě suspenze. Za vhodných podmínek dokáží přežít hematopoetické buňky *in vitro* několik dní až týdnů (Drexler, 2013).

Pro posouzení správného zařazení buněčné linie slouží imunofenotypizace využívající specifické protilátky, pomocí kterých se prokazují specifické CD znaky na povrchu buněk. K tomu je zapotřebí panel protilátek proti konkrétním strukturám. Některé linie mají stejné vlastnosti, proto je nelze přímo přiřadit pouze k jedné buněčné linii a mohou se označovat jako erytrocytární-megakaryocytární nebo myelomonocytární (Tab. 2) (Drexler, 2013).

Tabulka 2: Klasifikace buněčných linií, (NK – přirozený zabíječ), (upraveno dle: Drexler, 2013).

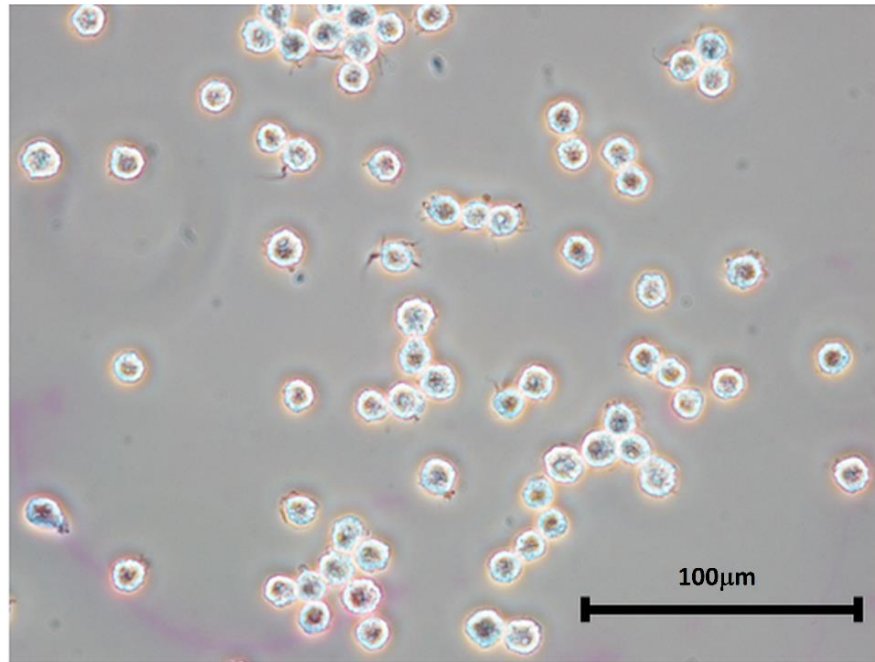
Hlavní typ buňky	Fyziologická buněčná linie	Typ a podtyp buněčné linie
Lymfoidní	B-buňky	Prekurzorová linie B-buněk Zralá linie B-buněk Linie plazmatických buněk
	T-buňky	Linie nezralých T-buněk Zralá linie T-buněk
	NK buňky	Linie NK buněk
Myeloidní	Myelocytární	Myelocytární buněčná linie
	Monocytární	Monocytární buněčná linie
	Erytrocytární	Erytrocytární buněčná linie
	Megakaryocytární	Megakaryocytární buněčná linie

1.2.3 HL-60

Buněčná linie HL-60 byla vytvořena Stevenem J. Collinsem a jeho spolupracovníky v roce 1977. Byla získána z periferní krve pacientky trpící akutní promyelocytární leukémií. Morfologicky se téměř všechny buňky HL-60 vyskytují v promyelocytárním nezralém stádiu a obsahují azurofilní granula. Kromě již zmíněného stádia se mohou buňky objevovat i ve formě myelocytů a myeloblastů (Koeffler, 1980).

Buňky promyelocytární lidské buněčné linie HL-60 patří mezi prekurzorové buňky. V závislosti na využití různých chemických látek mají buňky HL-60 možnost monocytární anebo terminální myeloidní diferenciaci (Wang, 2009). Díky tomu se mohou diferencovat na granulocyty nebo makrofágy. Diferenciace může být indukována například po aplikaci dimethylsulfoxidu (DMSO) nebo kyseliny all-trans retinové (ATRA), do kultivačního média (Wang, 2020). Při použití ATRA dochází ke vzniku all-trans 4-hydroxy-retinové a 4-keto-retinové kyseliny, které jsou zodpovědné za myeloidní přeměnu buněk HL-60 (Wang, 2009).

Buněčná linie HL-60 (Obr. 2) je využívána k pochopení imunitních mechanismů v lidském organismu. Primárně se jedná o pozorování endocytózy a jednotlivých funkcí neutrofilů (Wang, 2020). Použití linie lidské myeloidní leukémie umožňuje lépe pochopit buněčnou biologii a možnost zavedení terapeutických postupů v praxi. Kromě již zmíněného nacházejí buňky HL-60 využití i při vývoji monoklonálních protilátek (Koeffler, 1980).



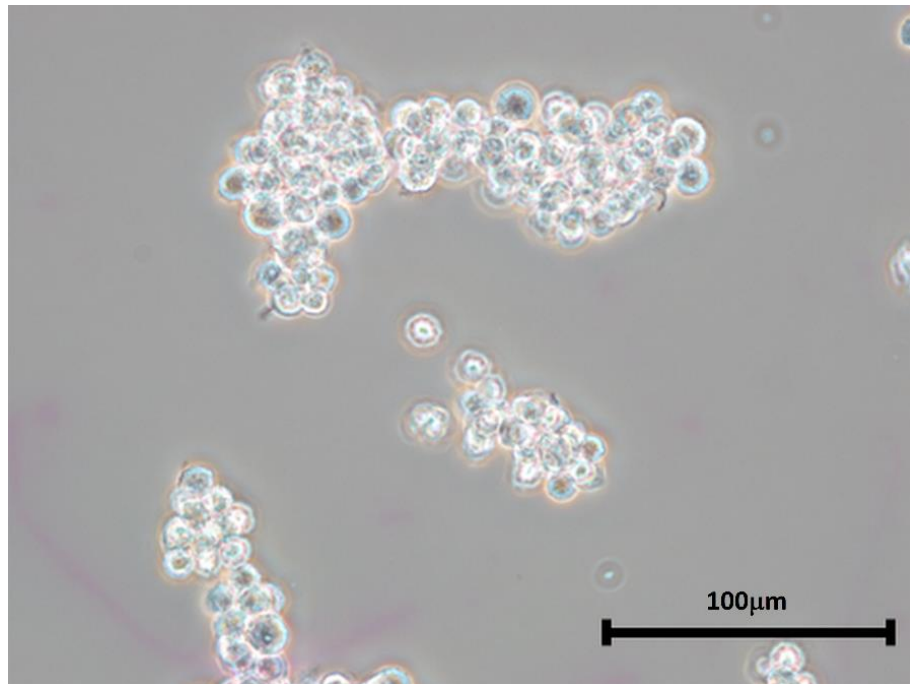
Obrázek 2: Mikrofotografie buněk HL-60, (fázový kontrast, zvětšení 200x, měřítko: 100 µm).

1.2.4 Jurkat

Další často používaná suspenzní buněčná linie byla objevena v roce 1977 a byla pojmenována Jurkat. Byla získána z krevního vzorku čtrnáctiletého pacienta s akutní lymfoblastickou leukémií (Gioia, 2018). Tato buněčná linie je významným *in vitro* systémem pro výzkum T-lymfocytů. Buňky Jurkat disponují kulatou morfológií a na kultivaci nejsou příliš náročné (Chen, 2018). Pro zajištění správného růstu buněk Jurkat v kultivačním médiu je zapotřebí lidských T-buněčných růstových faktorů, například interleukinu-2 (Abraham, 2004). Interleukin-2 je významným cytokinem podporujícím proliferaci T i B lymfocytů. Aktivované B-lymfocyty jsou součástí krevního řečiště a ovlivňují imunitní reakce (Chen, 2018). Po vybuzení fytohemaglutininem se podařilo prokázat schopnost buněk Jurkat produkovat právě interleukin-2. Po získání původní buněčné linie Jurkat bylo zjištěno, že byla kontaminována mykoplazmaty. Po odstranění zjištěné kontaminace došlo k vytvoření nového klonu Jurkat E6-1, který se následně stal standardně využívanou linií (Abraham, 2004).

Buněčná linie Jurkat (Obr. 3) se stala nástrojem pro pochopení několika signálních drah, především potom signalizace T-buněčných receptorů. U buněčné linie byly na přelomu 21. století objeveny určité abnormality, zejména v genové expresi. Nejvýznamnější změny byly zaznamenány u regulátorů fosfatidylinositolové signalizace, zejména u signalizace fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K), která souvisí se signálními ději T-buněčných receptorů. Z tohoto důvodu došlo k vyvrácení linie Jurkat jako vhodného buněčného modelu

pro sledování T-lymfocytů. V posledních letech se počet publikací s využitím buněčné linie Jurkat se snížil, ale i tak je dále hojně používána v biomedicinském výzkumu (Gioia, 2018). Pro imunologické studie T-lymfocytů se nejčastěji aplikuje linie Jurkat E6-1, z důvodu eliminace náchylnosti ke kontaminaci způsobené mykoplazmaty (Chen, 2018).

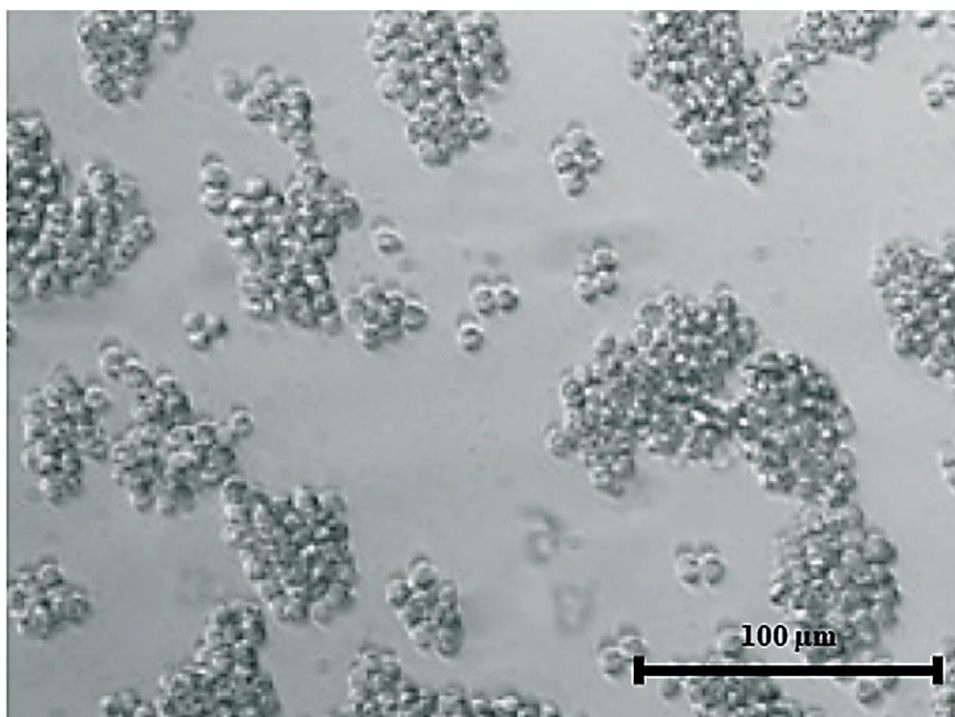


Obrázek 3: Mikrofotografie buněk Jurkat, (fázový kontrast, zvětšení 200x, měřítko: 100 µm).

1.2.5 Raji

Denis Burkitt v roce 1958 jako první popsal a zaznamenal u dětí syndrom, který je pojmenován Burkittův lymfom. Onemocnění se projevuje nádorem v čelisti s následným šířením do kostní dřeně. Tento syndrom je označován jako mimořádná podoba non-Hodgkinova lymfomu. Jelikož v roce 2007 ve Spojených státech tvořili dospělí pacienti nad 40 let přibližně 59 % veškerých případů této nemoci, vyplývá z toho, že onemocnění nejsou zasaženi pouze jedinci v dětském věku nebo mladé dospělosti. Při aplikaci různých přístupů léčby, například víceprvkové chemoterapie nebo podobných postupů jako u akutní lymfocytární leukémie se vyléčí kolem 60-90 % dětských pacientů. U dospělých jsou výsledky ve větší míře proměnlivé, a to i z důvodu menšího množství studií (Perkins, 2008).

Buněčné linie odvozené z Burkittova lymfomu byly aplikovány pro širokou škálu vyšetření. Jedna z těchto buněčných linií byla pojmenována Raji a vycházela ze zralých B-buněk (Obr. 4). Karpova et al 2005 určili konečný cytogenetický charakter linie Raji. K molekulárně cytogenetickému profilování byly využity různé techniky, například fluorescenční in situ hybridizace, komparativní genomová hybridizace nebo spektrální karyotypizace. Bylo zjištěno, že v případě kultivace po dobu několika desítek let zůstal genom buněk Raji poměrně stabilní. Výsledky této studie zmiňují nalezené genomové aberace vyskytující se společně s translokací. Tyto genomové aberace mohou být prostřednictvím znalostí genetických odchylek u nádorové linie Raji využívány k usnadnění interpretace získaných informací ze sledovaného modelu. Zjištěné poznatky jsou důležité pro další výzkumy Burkittova lymfomu (Karpova, 2005).



Obrázek 4: Mikrofotografie buněk Raji, (světlé pole, zvětšení 200x, měřítko: 100 μm), (upraveno dle: Winarska, 2017).

1.2.6 Zavedení nových leukemicko-lymfomových linií

Nejčastěji využívanou technikou tvorby nových LL linií je přímá aplikace neoplastických buněk do suspenzních kultur. Pro výběr použitelné linie je důležitá znalost diagnózy pacienta, od kterého jsou získávány buňky (Drexler, 2013). U některých LL linií je možné využít informace o profilech genové exprese díky genomovému sekvenování (Barretina, 2012; Garnett, 2012). Nové LL buněčné linie je však velmi těžké vytvořit a často tyto pokusy nejsou zdařilé. Eliminace neoplastických buněk z daného prostředí může vést k neúspěšnému založení nových linií. Primární příčinou je zhoršení kvality kultivačního média vedoucí k odumírání těchto buněk. Další příčinou může být prorůstání lymfoblastických buněk, fibroblastů nebo makrofágů médiem. Prostřednictvím stanovení cytogenetických abnormalit a funkčních testů by se měla prokazovat neoplasticita nových buněčných linií. To ale není dostačující charakterizace (Drexler, 2013).

Každá buněčná linie by měla být nejdříve řádně charakterizována. Nejdůležitější kritéria k popisu a následnému uveřejnění nově vytvořených linií LL se podařilo stanovit v článku Drexlerovi et al 2020. Posuzuje se zde, jestli jsou dané linie monoklonálního původu, tedy zda vycházejí pouze z jedné buňky. Z odlišných autentických buněk se mohou

vytvořit subklony žijící *in vitro*, a také existující pospolu při delší kultivaci (Drexler, 2020). Rovněž musí být popsány a zaznamenány i linie nově zakládané pomocí transformace virů EBV, HTLV-1 nebo virus lidské T-buněčné leukemie-2 (HTLV-2). Dalším důležitým požadavkem je vyšetření biologických vlastností buněk, například syntéza DNA, RNA, míra apoptózy, charakterizace buněčného cyklu a exprese glykoproteinu P (Drexler, 2013). Podstatnou součástí je taktéž ověření pravosti. Nově vytvořené buněčné linie by měly mít odlišné vlastnosti, které se stanovují pomocí cytogenetické karyotypizace a imunofenotypové analýzy. Díky těmto technikám je možné získat základní klíčové informace pro charakterizaci LL buněk (Drexler, 2013).

Buňky se množí kontinuálně a také samovolně, není potřeba žádných růstových faktorů (Drexler, 2020). Jelikož může docházet k zadržení přirozených nebo také primárních neoplastických buněk v buněčné kultuře po dobu několika měsíců, je za nesmrtelnou buněčnou linii považována kultura, která nepřetržitě proliferuje nejméně 6 měsíců a ideálně více než 1 rok (Drexler, 2013). U dlouhodobě kultivovaných buněčných linií může nastat u schopnějších buněk přemnožení oproti pomalým nebo oslabeným buňkám (Drexler, 2020).

1.2.7 Panel nádorových buněčných linií LL-100

K zjištění nezbytných informací pro vědecké výzkumy se používají panely buněčných nádorových linií. V roce 1980 vznikl panel NCI-60 jako prostředek pro vývoj nových léčiv. Tento panel obsahuje 60 linií reprezentujících 9 odlišných nádorů. Národní onkologický ústav USA nejdříve chtěl využívat tento panel pro diagnostiku léčiv místo transplantovaných nádorů zvířecích modelů. Časem ale došlo ke změně účelu využití panelu na informační oporu pro výzkumné činnosti (Drexler, 2020). Panel NCI-60 zahrnuje pouze 5 linií LL. Navíc byly vyjádřeny pochybnosti týkající se některých linií z tohoto panelu, a proto bylo nutné vytvořit panel nový (Drexler, 2020). Později vznikl v Japonsku panel se 45 buněčnými liniemi, který se zabýval solidními nádory (Nakatsu, 2005; Sandberg, 2005; Wang, 2006).

Panel LL-100 zahrnující 100 buněčných linií popisuje různorodost 22 typů leukemických lymfomů. Tyto linie mohou být využity k posunu znalostí biologie samotného onemocnění leukemie a daných lymfomů na vyšší úroveň, a dále mohou zlepšit jejich spolehlivost jakožto výzkumných modelů. Další buněčné linie by měly být postupně přidávány kvůli rozšíření souboru informací a povinné charakterizace (Drexler, 2020).

K sestavení panelu nádorových buněčných linií LL-100 Drexler et al 2020 nahromadili přes 740 linií LL. V průběhu vybírání pomocí předem stanovených podmínek se počet linií

snížil přibližně na 520. Nejdříve byly ze seznamu vyřazeny linie, které patří mezi subklony, zkříženě kontaminované, obtížně kultivovatelné, kontroverzní nebo sesterské buněčné linie. V neposlední řadě byly vyloučeny linie, jež nejsou rozšířené ve větší míře. Došlo rovněž k eliminaci kontaminace způsobené mykoplazmaty a viry. Po celkovém odečtení zůstalo 242 buněčných linií. Nakonec byly preferovány linie s masivní proliferací, snadnou dostupností a dobrou charakterizací. Pro tento panel byly vybrány pouze reprezentativní buněčné linie pro dané onemocnění (Drexler, 2020).

Primárně z důvodu celistvosti potřebných údajů, genetických poznatků a typů linií je panel LL-100 považován za unikátní. Dále také obsahuje profilové informace včetně imunofenotypizace, molekulární analýzy, cytogenetiky, morfologie a kultivace. Všech 100 buněčných linií bylo samozřejmě podrobena ověření pravosti (Dirks, 2013; Uphoff, 2010; Uphoff, 2013; Uphoff, 2019).

1.3 KADMIUM

Kadmium je měkký stříbrnobílý kov s podobnými chemickými a fyzikálními vlastnostmi jako rtuť a zinek. Tento prvek je nerozpustný ve vodě, nehořlavý (na vzduchu vzniká oxid kademnatý) a odolný proti korozi. Cd patří do skupiny těžkých kovů (Genchi, 2020). Tento kov se zařazuje mezi toxické látky vykazující teratogenní a mutagenní účinky. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny určila Cd jako lidský karcinogen (Mao, 2007; Tinkov, 2018).

V lidském organismu dochází k hromadění kadmia po celý život (Mao, 2007). Cílovým orgánem pro kumulaci Cd jsou ledviny, konkrétně se jedná o proximální tubuly, ve kterých dochází k hypertrofii epitelálních buněk, a v důsledku buněčného poškození ke vzniku proteinurie a polyurie. Kadmium v ledvinách má poločas rozpadu přibližně 45 let (Yan, 2021).

Cd má velké využití v průmyslu, díky čemuž je zařazeno mezi stálé kontaminanty životního prostředí. Používá se především jako stabilizátor produktů z PVC a korozivní činidlo. Je rovněž součástí baterií a barevných pigmentů. Do životního prostředí se Cd uvolňuje při spalování fosilních paliv, při tavení a následné rafinaci niklu a mědi, v neposlední řadě také při hnojení fosfátovými hnojivy a při recyklaci elektronického odpadu. Za zvýšené množství Cd v atmosféře, vodě a půdě může také sopečná činnost, lesní požáry nebo těžba kovů. V přírodě se Cd objevuje v malých koncentracích, primárně v ložiscích olova, zinku, a také v rudách zinku (Genchi, 2020).

Mezi primární zdroje kontaminace Cd pro člověka patří půda, pitná voda, vzduch, cigarety, potraviny a plastové dětské hračky (Yan, 2021). V souvislosti s daným typem cigaret je expozice Cd různá, nicméně jedna cigareta obsahuje přibližně 1-2 μg Cd. Cd se ve velké míře také vyskytuje v organismech vodních živočichů, jako jsou mlži, krabi, korýši a ústřice. V rámci potravy ho nacházíme ve vnitřnostech, zejména v ledvinkách a játrech, rovněž je obsažen v kakaových bobech a semenech olejnatých rostlin. Na rozdíl od živočišných potravin zahrnujících mléčné produkty, vejce a maso obsahují větší množství Cd suroviny pocházející z rostlin v souvislosti s kontaminací půdy. Mezi tyto rostlinné suroviny zejména patří brambory, rýže, celer a mrkev (Genchi, 2020).

1.3.1 Mechanismus toxicity kadmia

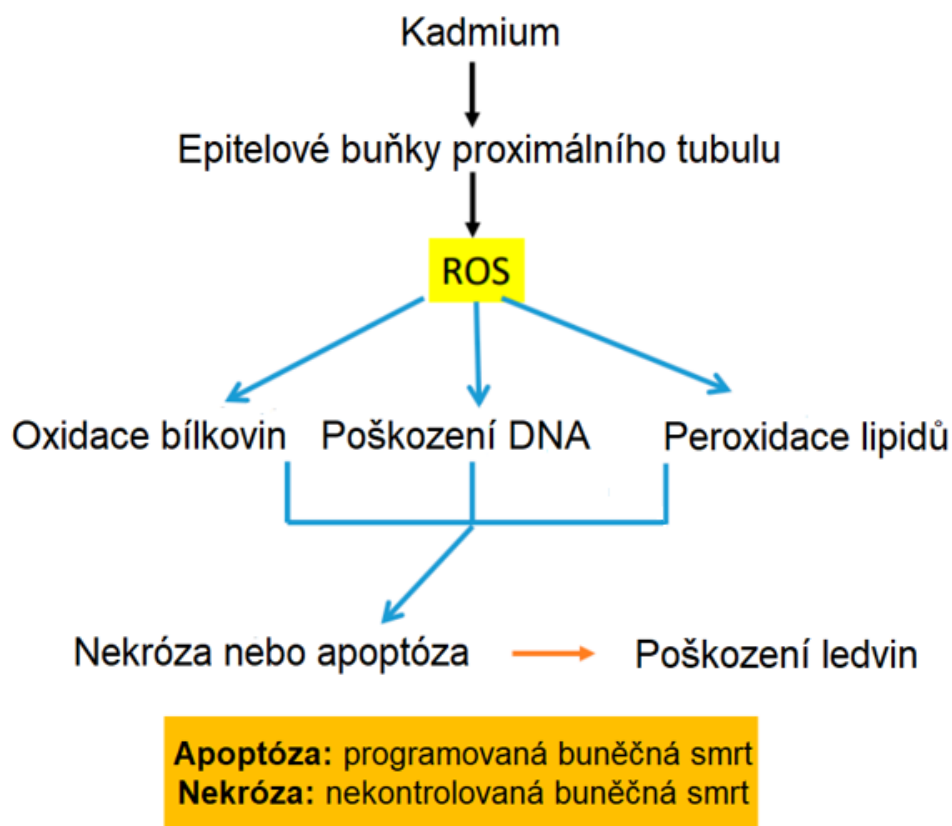
V největší míře dochází k absorpci kadmia dýchacími cestami, naopak nejméně gastrointestinálním traktem (Genchi, 2020). Cd má velkou afinitu k thiolovým skupinám (-SH).

Snadno tedy tvoří komplexy s peptidy a proteiny. V krvi se kov poutá na proteiny a peptidy obsahující cystein, nejvíce na albumin a glutathion (GSH). Krví je Cd transportováno do jater. Játra uvolňují a vytvářejí metalothionein silně vázající Cd, vzniklý komplex je považován za netoxický, jedná se tedy o detoxikaci (Yan, 2021). Může dojít k uvolnění komplexu kadmium-metalothioneinu do krevního oběhu a následnému transportu do proximálního tubulu ledvin (Klaassen, 2010). Po vyvázání z komplexu se volná forma Cd může opět spojit s metalothioneinem v ledvinách a vyvolat zde tvorbu nového metalothioneinu. Pokud se spotřebuje veškeré množství metalothioneinu, Cd se hromadí, a dochází tak ke vzniku nefrotoxicity (Yan, 2021).

Zásadním mechanismem toxicity kadmia je ovlivňování mitochondrií. Ty patří mezi významné orgány, které se účastní syntézy fosfolipidů, lipidů, aminokyselin, a rovněž také spouští apoptózu. Důležitou funkcí dýchacího řetězce mitochondrií je zajištění homeostázy pomocí oxidativní fosforylace a vytvoření energie v podobě adenosintrifosfátu (ATP) (Genchi, 2020). Studie Mao et al 2007 byla zaměřena na sledování účinků působení Cd na mitochondrie, konkrétně u buněčné linie HEK293. V rámci této studie byly charakterizovány mechanismy kadmiiem navozené programované buněčné smrti. Apoptóza nastala po 6-9 hodinách expozice Cd (Mao, 2007). Kadmium může prostupovat do mitochondrií a následně se v nich akumulovat. Nejspíše to je způsobeno membránovými mitochondriálními kanály, nebo také receptory a přenašeči molekul rozpuštěných látek. Po vstupu do mitochondrií mohou být na Cd navázány proteiny se skupinami -SH. Kadmium dokáže ovlivnit funkci daných proteinů inhibicí aktivity enzymů dýchacího řetězce. Zejména se jedná o enzym laktátdehydrogenázu (LDH), ATPázu, glutathionperoxidázu a superoxid dismutázu (Yan, 2021; Genchi, 2020).

Na karcinogenezi indukovanou Cd má vliv zvýšení propustnosti membrány, a rovněž pokles mitochondriálního transmembránového potenciálu (MTP). K tomu dochází prostřednictvím exprese apoptotického proteinu Bcl-2, vyloučením cytochromu C a následně aktivací kaspázy-3 (Mao, 2007; Genchi, 2020). Tyto všechny faktory by mohly nasvědčovat větší produkci mitochondriálních ROS, které mají schopnost poškodit DNA, lipidy i proteiny. Rovněž dochází k poškození metabolických drah, a v neposlední řadě mitochondriálních transportérů a kanálů. Závěrem toho procesu je narušení biologických funkcí makromolekul. Proto může nastat programovaná i nekontrolovaná buněčná smrt, a následně nevratné poškození ledvin. Tyto procesy jsou zobrazeny na Obr. 5 (Yan, 2021). Při intoxikaci vyššími koncentracemi těžkého kovu dochází k nekrotické smrti ledvinných buněk (Mao,

2007). Prostřednictvím jiného výzkumu byl zjištěn výskyt otoku a deformace mitochondrií ledvin po toxickém působení kadmia (Liu, 2019).



Obrázek 5: Mechanismus toxického poškození ledvin, (ROS – reaktivní formy kyslíku), (upraveno dle: Yan, 2021).

Programovanou buněčnou smrt lze rovněž popsat prostřednictvím dvoufázového účinku iontů Cd^{2+} a Hg^{2+} . Tato studie poukazuje na fakt, že kovové ionty mohou vyvolat buněčnou proliferaci při nízkých koncentracích, a u vyšších hodnot ji inhibovat. Vysoké koncentrace iontů Cd^{2+} a Hg^{2+} zvyšují možnost spuštění programované buněčné smrti. Dvoufázový účinek způsobený ionty může být ovlivněn činností dráhy mitogenem aktivovaných proteinkináz (MAPK) (Hao, 2009). Dalším výzkumem bylo zjištěno, že dráha fosfolipázy C se také účastní apoptózy vyvolané Cd v buňkách lidských embryonálních ledvin. Po 24hodinovém vystavení buněčné linie účinkům Cd došlo k razantnímu zvýšení intracelulárních hladin Ca^{2+} iontů. Taktéž byla zjištěna větší činnost proteázy kalpainu ve spojení s procesem iontů Ca^{2+} (Lawal, 2012).

Nefrotoxicita Cd může být také popsána pomocí uvolnění LDH. Dalším sledovaným parametrem je zvýšená činnost antioxidantních enzymů a malondialdehydu, a také poškození DNA. Po expozici Cd dochází k inhibici syntézy ATP a zvýšení produkce ROS. Mění se také poměr hladin redukovaného a oxidovaného glutathionu, kdy dochází k iniciaci vychytávání ROS. Citlivost buněk na Cd je s největší pravděpodobností ovlivňována endogenními hladinami enzymů (Lawal, 2010).

1.3.2 Nežádoucí účinky kadmia

Po expozici kadmia dochází u člověka ke vzniku řady nežádoucích účinků. Cytotoxické vlivy mohou vyvolat apoptotické nebo nekrotické účinky. Kadmium způsobuje poškození správné funkce jater, ledvin, nadledvin a varlat, osteomalacii, plicní edém a také poruchu krvetvorby. Dále může Cd působit na kosterní systém, sluch a zrak. Kadmium má rovněž vliv na menstruační cyklus a reprodukční hormony žen i mužů. V neposlední řadě také ovlivňuje jednotlivé fáze těhotenství. Expozice kovu podněcuje předčasný porod anebo potrat. Cd nacházející se v moči a krvi má spojitost s cévní příhodou mozkovou, nemocí periferních tepen a srdeční ischemickou chorobou (Genchi, 2020). Ve spojitosti s environmentálním nebo pracovním vystavením člověka kadmiu byl prokázán zvýšený výskyt rakoviny, konkrétně u plic, prostaty, prsu, nosohltanu, močového měchýře a slinivky břišní (Mezynska, 2018).

Se vdechováním Cd spojeném s kouřením může docházet ke vzniku nejrůznějších onemocnění dýchacích cest (Genchi, 2020). Taha et al 2018 prokázali vysokou koncentraci Cd v moči a séru u jedinců závislých na cigaretách. Zjistili, že dlouhodobý příjem Cd může mít osteotoxický efekt, což následně vede k postupnému poškození a ztrátě kostní tkáně (Genchi, 2020).

1.3.3 Prevence a eliminace kadmia

Správným výběrem stravy bohaté na živiny obsahující primárně flavonoidy, vitamíny a vlákninu, lze zmírnit cytotoxické účinky kadmia na lidský organismus (Cui, 2021). Flavonoidy patří do skupiny polyfenolů a mohou se klasifikovat podle obsahujících složek do několika tříd. Zejména to jsou flavony (luteolin, apigenin), flavonoly (kvercetin, kaempferol, myricetin), flavanony (taxifolin, hesperitin) a flavanoly (katechin). Veškeré tyto živiny získáváme z rostlinných produktů, primárně z citrusových plodů, hroznů, cibule, čaje, bobulovin a červeného vína (Serafini, 2010). Proti toxickým vlivům jsou rovněž používány různé extrakty biologických látek a léčivých rostlin, které jsou označovány

jako přírodní antioxidanty. Mezi přírodní antioxidanty například patří spirulina, pepřovník lolot a zelený čaj (Cui, 2021).

Rostlinné flavonoidy se nacházejí v podobě volných anebo vázaných flavonoidních necukerných zbytků neboli aglykonů. Existuje více typů mechanismů působení flavonoidů, avšak veškeré jejich pozitivní účinky ještě nejsou známy. V trávicím traktu jsou ionty kadmia vychytávány chelatací prostřednictvím kvercetinu. Kadmium se posléze méně vstřebává, a lze ho snadněji vyloučit z těla. K prevenci vzniku oxidačního stresu přispívá eliminace ROS a snížení oxidační degradace lipidů. Tyto děje byly popsány v některých zmíněných studiích (Achanzar, 2000; Achanzar, 2002). Flavonoidy a jejich deriváty isoflavony mají preventivní účinek před působením volných radikálů na DNA řetězce a proteiny (Cui, 2021).

Těžké kovy, které se akumulují v životním prostředí, vyvolávají u lidí těžké zdravotní problémy. Proto je velmi důležité dbát na jejich eliminaci. Z vodních toků mohou být odstraněny pomocí membránové separace, iontové výměny, reverzní osmózy nebo také chemickým srážením. Využití těchto metod je velmi drahé z důvodu spotřeby chemikálií a energie. K eliminaci Cd z půdních roztoků a odpadních vod se používají nanočástice, a to konkrétně TiO_2 , Al_2O_3 a AgNO_3 (Genchi, 2020).

1.4 RTUŤ

Rtuť patří do skupiny těžkých toxických kovů a vykazuje teratogenní účinky (Kolipinski, 2019). Vyznačuje se lesklým stříbrně bílým vzhledem (Bensefa-Colas, 2011). V životním prostředí se rtuť běžně vyskytuje a nachází se ve třech různých podobách. Mezi základní formy Hg patří organická, anorganická (Hg^{2+}), a také elementární neboli kovová (Hg^0) (Yang, 2020; Bernhoft, 2011). Elementární Hg má ojedinělé vlastnosti, vykazuje se velkou těkavostí při nižší teplotě, a také kapalností při teplotě pokojové (Kolipinski, 2019). Organická Hg je tvořena sloučeninami s funkčními skupinami zahrnujícími atomy uhlíku, například se jedná o ethyl-, methyl- anebo fenyl-. Nejčastěji je zmiňovaná methylrtuť a poté ethylrtuť. Jednotlivé formy Hg mají díky rozdílnému chemickému složení různý farmakokinetický účinek, a také klinický význam (Yang, 2020; Bernhoft, 2011). Veškeré tyto formy mají ojedinělý toxický charakter a odlišují se i transportním mechanismem (Yang, 2020).

Ve stravě se hojně vyskytuje anorganická Hg, ale absorbováno je méně než 10 % (Yang, 2020). Velké množství organické rtuti obsahující zejména skupiny methyl- a dimethyl- je obsaženo ve tkáních mořských ryb. Mikroorganismy mění elementární Hg na organickou, kterou ostatní živočichové přijímají ve vodě (Bernhoft, 2011).

V přírodě se rtuť nejvíce nachází v elementární podobě nebo ve formě sulfidu (Bernhoft, 2011). Celosvětově největší zastoupení Hg je v povrchových půdách v porovnání s vodním prostředím nebo atmosférou (Yang, 2020). Rtuť je do životního prostředí uvolňována také ze sopečné činnosti, a rovněž z hornin (Bernhoft, 2011). Primárním zdrojem Hg je lidská činnost. Až 80 % vzniklých ročních emisí je způsobeno antropogenními zdroji (Yang, 2020). K uvolnění Hg do atmosféry dochází prostřednictvím spalování uhlí i těžbou Hg a zlata (Bernhoft, 2011). Elementární Hg je také využívána jako amalgámová výplň zubů, která je z jedné poloviny tvořena Hg, druhá polovina výplně se skládá ze slitiny různých kovů. Světová zdravotnická organizace zveřejnila informaci, že amalgámové výplně vypouštějí přibližně denně 2-28 mg par Hg (Kolipinski, 2019). Rtuť rtuťnatá, označovaná také pojmem kalomel (Hg_2Cl_2), je v některých zemích využívána i jako projímadlo (Bernhoft, 2011).

1.4.1 Mechanismus toxicity rtuti

Rtuť se dostává do lidského organismu v první řadě inhalací (Bernhoft, 2011). Páry elementární Hg pronikají do organismu vdechováním přes sliznice a plíce, následně dochází k oxidační přeměně na reaktivní rtuťnatý ion Hg^{2+} . Tato forma Hg je následně

transportována krví (Yang, 2020). Obecně se pro rtuťovou akumulaci stává cílovým orgánem mozek a nervová soustava. Konkrétně je Hg transportována na membráně erytrocytů (Bernhoft, 2011). Kromě mozkové tkáně se rovněž elementární Hg nachází v myokardu, játrech, nadledvinách, kosterní svalovině nebo slinivce břišní (Kolipinski, 2019). Rtuť elementární je schopná difundovat přes hematoencefalickou bariéru, buněčné membrány, a rovněž placentu. Následně se hromadí v plodovém mozku (Bernhoft, 2011). Anorganická forma Hg je málo pohyblivá, nedifunduje lehce přes membrány, a tím pádem se špatně uvolňuje z buněk. Rtuťnatý ion vykazuje afinitu k selenoproteinům a selenu, které zajišťují antioxidační ochranu. Vzniklé ireverzibilní vazebné spojení mezi Hg^{2+} a selenem má důležitý vliv na možné stanovení rtuti v mozku i po několika letech (Kolipinski, 2019). Anorganická a elementární rtuť se dokáže přeměnit na organickou sloučeninu zvanou methylrtuť. Tento proces probíhá za pomoci různých mikroorganismů. Nejvýznamnější jsou bakterie redukující sírany a železo (Kolipinski, 2019). Methylrtuť je absorbována ve střevech a následně může být akumulována ve tkáních. Nedokáže tak snadno překročit hematoencefalickou bariéru na rozdíl od elementární formy Hg. Po vstupu do mozku dochází v mozkové tkáni k procesu demethylace methylrtuti na elementární Hg (Yang, 2020; Bernhoft, 2011).

Veškeré formy rtuti způsobují přeměnu kvárterních nebo terciárních struktur bílkovin. Následně vzniká vazba mezi Hg a selenohydroxylovými a sulfhydroxylovými skupinami, které jsou posléze vázány na aminokyseliny obsahující atomy síry (Bernhoft, 2011). Kromě těchto zmíněných skupin je Hg schopná se poutat i na další skupiny, obzvláště na aminové, amidové, fosforylové nebo karboxylové. Jako inhibované nebo neaktivní se označují enzymy a proteiny s Hg navázanou na tyto výše popsané skupiny. V dalším kroku dochází k přeměně konformace, struktury a funkce proteinů (Kolipinski, 2019). Prostřednictvím tohoto systému rtuť ovlivňuje funkčnost subcelulárních struktur a správnou činnost orgánů (Bernhoft, 2011).

Organická a anorganická forma Hg rovněž způsobuje smrt neurálních buněk, což vede k vážným neurologickým příznakům, do nichž spadá například hluchota, mozková obrna a poruchy zraku (Harada, 1978; Harada, 2001). Nízké koncentrace organické Hg vyvolávají spíše buněčnou smrt na rozdíl od vysokých koncentrací, které vedou k nekróze buněk (Yang, 2020). Rtuťnaté ionty v nižších koncentracích způsobují pokles antioxidantu glutathionu, z tohoto důvodu oxidační stres pomalu narůstá. Oxidační stres je jedním z mechanismů toxicity rtuti a může vést k buněčné smrti (Kolipinski, 2019). Velmi ojediněle se objevuje chronická otrava rtuťnatými solemi (Bernhoft, 2011). Cytotoxické působení anorganické a organické rtuti mezi sebou vykazuje některé podobnosti. Jedná se zejména o způsobení buněčné smrti,

ovlivnění antioxidačního systému a eliminaci cytokinů. Oproti tomu je výrazné odlišení v působení toxických mechanismů, ale rozdíly nejsou ještě řádně zaznamenány (Yang, 2020).

Ethylrtuť a methylrtuť, představující další formy Hg vykazují shodné symptomy, ale účinky methylrtuti jsou zmapovány více než účinky ethylrtuti. Přeměněná organická methylrtuť se transportuje po celém organismu. Pravděpodobně negativně ovlivňuje syntézu proteinů a také DNA transkripci. Mezi další vlivy methylrtuti, způsobující narušení správné funkce organismu, mohou spadat například vznik volných radikálů, narušení tvorby neurotransmiterů nebo poškození nervového periferního systému. Methylrtuť vykazuje schopnost snižovat činnost NK buněk neboli přirozených zabíječů, což vede ke vzniku chronického únavového syndromu (Bernhoft, 2011). Ve studiích Harada 1978 a Harada et al 2001 byla prokázána také buněčná apoptóza indukovaná Hg.

1.4.2 Nežádoucí účinky rtuti

Vystavení lidského organismu účinkům Hg je závislé na dávce a délce expozice. Vysoké hladiny způsobují významné neurologické a také vývojové vady (Yang, 2020). Elementární páry Hg způsobují vážnou pneumonitidu, která může vést v krajních situacích až ke smrti. Rovněž také ovlivňují funkce imunitního systému, ledvin, periferních nervů nebo svalových a endokrinních činností. Nízké koncentrace par Hg vyvolávají různé příznaky, zvláště únavu, pokles hmotnosti, slabost nebo problémy s gastrointestinálním systémem. Postižení ledvin a gastrointestinálního traktu jsou vyvolávána zejména rtuťnatými solemi, typicky se jedná o sloučeninu HgCl_2 . U pacientů dochází ke vzniku krvavého průjmu, bolesti břicha, zvracení, denaturaci bílkovin enterocytů a nekróze střevních buněk. Důvodem smrti pacienta potom může být peritonitida nebo hypovolemický šok. Toxické účinky na ledviny zahrnují autoimunitní glomerulonefritidu, anebo ledvinnou tubulární nekrózu. Expozice vyšší koncentrace rtuti má souvislost se vznikem svalového třesu a erytému, může být doprovázena změnou osobnosti, chování nebo ztrátou paměti. Tyto příznaky povětšinou přetrvávají i v případě přerušení expozice rtuti, a to především ty neurologické (Bernhoft, 2011).

Další nebezpečnou sloučeninou rtuti je methylrtuť hromadící se v řetězci potravního ekosystému. Primárně představuje velké riziko pro zdraví lidí i živočichů (Yang, 2020). V prenatálním období může působení Hg vyvolat závažnou mozkovou obrnu. Expozice postnatální naopak vykazuje například ataxii, sluchové a zrakové poranění, parestézii nebo klonické záchvaty (Bernhoft, 2011).

1.4.3 Prevence a léčba otravy rtutí

Anorganická rtuť ve formě Hg^{2+} může být jednoduše chelatována pomocí různých látek, zejména pomocí sloučenin s obsahem -SH skupin. Mezi tyto sloučeniny například patří meso-2,3-dimerkaptosukcinová kyselina (DMSA), 2,3-dimerkaptopropanol (BAL), N-acetyl-d-penicilamin (NAPA) anebo 2,3-dimerkпто-propan-1-sulfonát (DMPS). Využití jednotlivých látek k léčebným postupům je však odlišné. Jako nejvyužívanější chelatační činidla jsou označována DMSA a DMPS, využívají se pro léčbu chronické i akutní otravy (Bensefa-Colas, 2011). To potvrzuje i studie Blanusa et al 2005 která prokázala, že při intoxikaci rtutí u dospělých i dětí měla větší účinnost léčba s použitím DMSA a DMPS než po aplikaci látky BAL. K tomu bylo zjištěno, že sloučenina DMPS má výraznější působení než DMSA (Blanusa, 2005). Nasazení BAL při léčbě je pro svoji nízkou účinnost ve světě omezováno (Bensefa-Colas, 2011). Chelatační činidlo DMSA se využívá, pokud je hladina kreatininu vyšší než 200 $\mu\text{g/g}$, a také pokud dochází k systémové intoxikaci organismu. Před vznikem anurické fáze selhání ledvin je perorálně podáváno DMSA, a to nejprve v denní dávce 30 mg/kg po dobu 5 dní, posléze je dávka upravena na 20 mg/kg látky po dobu 20 dní (Bensefa-Colas, 2011).

Po akutní otravě způsobené anorganickou rtutí je nutno zajistit výplach žaludku, a to co nejdříve, avšak maximálně do 6 hodin po požití tohoto těžkého kovu. Účinnost výplachu je ověřována prostřednictvím rentgenového snímkování. Následně je indikováno endoskopické vyšetření jícnu pro zjištění možných následků. Pro posílení vylučování Hg stolicí a eliminování vzniku enterohepatálního oběhu je možnost aplikovat thiolové pryskyřice. Látky DMSA a DMPS nemají prokázanou potřebnou účinnost při léčbě intoxikace vyvolané organickou Hg (Bensefa-Colas, 2011).

Prevencí před expozicí Hg je dekontaminace používaných pracovních ploch a jednotlivých prostor, například změnou sloučenin na netěkavé látky. Dalším možným postupem je snížení teploty prostředí na 18-20°C, využití odsávacího zařízení nebo také čištění odpadních vod. Do omezení vzniku rizik vystavování rtuti rovněž spadají ochranné pomůcky zaměstnanců a ochrana životního prostředí, kdy se nesmí likvidovat rtuťnatý odpad kanalizací (Bensefa-Colas, 2011).

1.5 HODNOCENÍ CYTOTOXICITY TĚŽKÝCH KOVŮ

V současné době je množství experimentů probíhajících na zvířatech snižováno a nahrazováno alternativními testy *in vitro*. Při alternativních testech jsou využívány různé buněčné linie nebo jednotlivé tkáně jako modelové systémy. Stanovení vitality buněk se stává důležitým parametrem pro porozumění dráždivosti látek, buněčné proliferaci, a také sledování mechanismu působení toxicity na jednotlivé orgány (Joo, 2019).

Na hodnocení cytotoxicity těžkých kovů se lze dívat z různých pohledů a použitelnosti metod. Jedním z nich je sledování funkčního metabolismu buněk, kdy jsou používány například formazanové testy popisující životaschopnost buněk. K tomu jsou zapotřebí tetrazoliové sloučeniny, konkrétně pozitivně nabitý 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT), který lehce proniká do vitálních buněk. Naopak další skupinou jsou negativně nabitě látky špatně difundující do životaschopných buněk. Patří sem ve vodě rozpustný 2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium (WST-1), 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid (XTT) a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium (MTS). Tetrazoliové sloučeniny XTT, MTS a WST-1 bývají často využívány s intermediárním akceptorem elektronů, a to z důvodu transportu jednotlivých elektronů z plazmatické membrány anebo cytoplasmy. Tento přesun elektronů je potřebný ke snadnější redukci tetrazoliové sloučeniny na barevný formazanový produkt, který se následně stanovuje. Další metodou pro určení vitality buněk je stanovení proteázové aktivity s fluorogenním proteázovým substrátem, nebo testování v reálném čase pomocí činidel pro-substrátu a luciferázy získané z mořských krevet (Riss, 2013).

Pro stanovení apoptózy se využívají fluorescenční techniky s použitím vizualizačních sond, například Hoechst 33258, akridinová oranž (AO), ethidium bromid (EB) anebo barvení buněk pomocí TUNEL testu. K hodnocení apoptózy je využívána fluorescenční sonda Hoechst 33258, která obarvuje jádra životaschopných buněk modře díky kondenzaci chromatinu a karyopyknóze. Barvivo AO dokáže obarvit jadernou DNA a proniká do buňky přes neporušenou membránu, na rozdíl od EB, který barví buňky až po ztrátě membránové integrity. Obě fluorescenční sondy vitální buňky zbarvují zeleně, časné apoptické buňky vyzařují zelenožlutou fluorescenci a pozdní apoptické a nekrotické buňky se zbarvují oranžově. Ale nekrotické buňky již neobsahují chromatin. Test TUNEL je využíván k charakterizaci buněk prostřednictvím fragmentace DNA s použitím zeleného barviva fluoresceinu značeného

deoxyuridin trifosfátem. Detekce *in situ* probíhá pomocí průtokové cytometrie nebo fluorescenční mikroskopie (Huang, 2015).

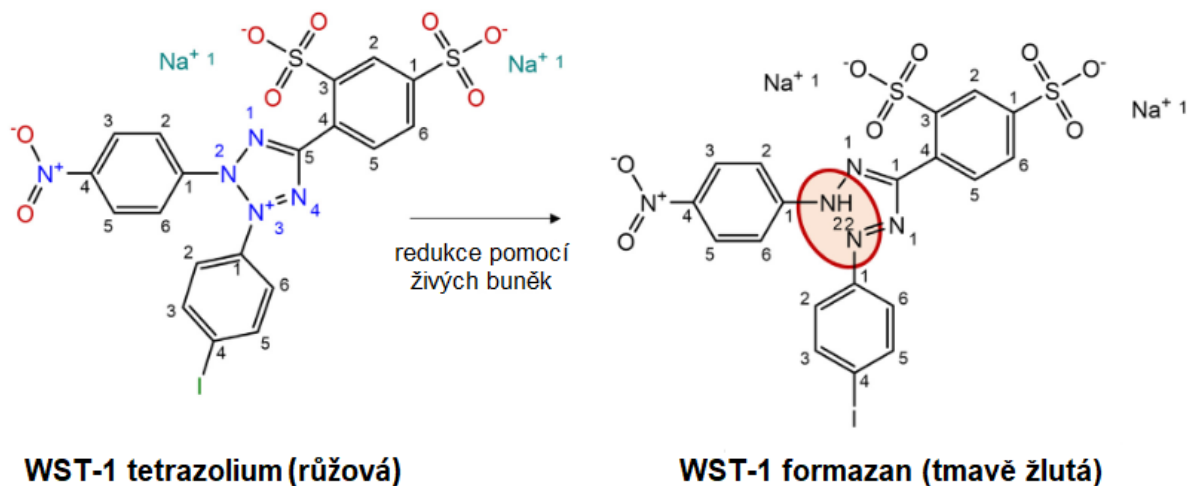
Hodnocení toxicity těžkých kovů lze popsat také z pohledu změn antioxidační ochrany, kdy se sleduje například GSH, oxidační stres a MTP, který má spojitost s oxidativní fosforylací (Huang, 2015; Du, 2010). GSH je nízkomolekulární thiol, který se nachází ve dvou volných podobách, zejména jako oxidovaný GSH disulfid a redukovaný GSH. Jako intracelulární antioxidant má širokou škálu funkcí a podílí se na různých buněčných procesech. Například zajišťuje zadržení skupin -SH v proteinech, regeneraci antioxidantů, detoxikaci volných radikálů, optimalizaci redoxního buněčného prostředí, anebo detoxikaci xenobiotik (Čapek, 2017). GSH disponuje rovněž ochrannou funkcí před chemickým a oxidačním porušením buněk. Kritické snížení hladiny GSH způsobuje větší náchylnost buněk k toxickým látkám. Po vazbě GSH s elektrofilními xenobiotiky, jejich vzniklými metabolity nebo volnými radikály dochází ke vzniku konjugátů, které jsou již snadno a rychle eliminovány z buněk. Probíhající reakce jsou buď enzymatické, katalyzované glutathion-S-transferázami nebo neenzymatické (Stevenson, 2002).

Rovněž lze studovat změny exprese proteinů. Důležité testované markery jsou například poly (ADP-ribóza) polymeráza a proapoptotický protein Bax. Pro obecné studium toxicity je vždy vhodná kombinace základního testu buněčného metabolismu například s testem kapacity antioxidační ochrany buněk (Huang, 2015; Du, 2010).

1.5.1 Detekce intracelulární dehydrogenázové aktivity (WST-1 test)

Tento spektrofotometrický test je využíván k hodnocení životaschopnosti buněk. Test je založený na WST-1, který je redukován na žlutě zbarvený formazan 4-[1-(4-jodfenyl)-5-(4-nitrofenyl)-formaz-3-yl]-1,3-benzen disulfonát (Obr. 6) (Joo, 2019). Přestup WST-1 do buňky je znemožněn z důvodu jeho hydrofilicity a negativního náboje. Činidlo WST-1 je proto využíváno s intermediárními akceptory elektronů. Do této skupiny spadá fenazin ethylsulfát a fenazin methylsulfát. Tyto akceptory procházejí do vitálních buněk, kde dochází k redukci a přenosu elektronů. Následně dochází k jejich uvolnění do extracelulárního prostředí, kde se činidlo WST-1 mění na formazanový produkt (Riss, 2013). Tento proces je dependentní na NADH koenzymu obsaženému v životaschopných buňkách (Joo, 2019). Z toho důvodu je WST-1 test používán k určení buněčné proliferace a viability buněk (Shin, 2020). Test WST-1 má velké výhody oproti MTT testu. Hlavní výhodou je rozpustnost

formazanu ve vodných roztocích. Do postupu tedy není potřeba zahrnovat extrakci pomocí rozpouštědla (Joo, 2019).

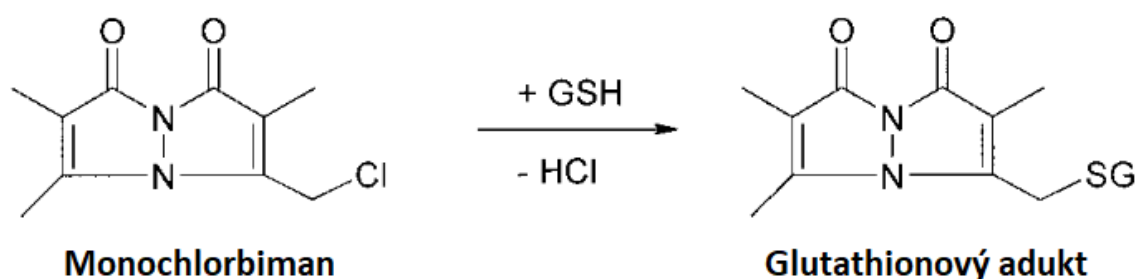


Obrázek 6: Přeměna vitálního barviva, (WST-1 tetrazolium – 2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium, WST-1 formazan – 4-[1-(4-jodofenyl)-5-(4-nitrofenyl)-formaz-3-yl]-1,3-benzen disulfonát), (upraveno dle: Joo, 2019).

1.5.2 Detekce intracelulární hladiny glutathionu (MCB test)

Tento spektrofluorometrický test je používán ke stanovení hladiny GSH neboli tripeptidu γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycinu, který se využívá především ke studiu buněčné toxicity v živých buňkách. Ke stanovení GSH i ostatních thiolů je zapotřebí fluorescenčního barviva, které se přidává do kultivačního média. Primárně se využívají nefluorescenční sloučeniny bimany, zejména monochlorobiman (MCB) nebo monobromobiman (MBB). Tyto látky disponují schopností snadné difuze přes buněčné membrány, kde mohou následně interagovat s thioley nacházejícími se v buňkách. Pro stanovení GSH je specifitější reakce s MCB, proto se používá častěji než MBB (Nauen, 2002; Čapek, 2017). Reakce je založená na vzniku fluorescenčních GSH aduktů po vazbě s nefluorescenčním MCB a GSH, vzniklá vazba konjugátu je poté spektrofluorometricky stanovována. K tomuto procesu dochází za enzymové katalýzy glutathion-S-transferázy (Obr. 7) (Nauen, 2002). Z důvodu zhášení chlorovou skupinou nezreagovaný MCB nedisponuje fluorescencí (Stevenson, 2002). GSH se vyhodnocuje ve formě procentuálního zastoupení koncentrace GSH ovlivněných buněk vztažených k procentům koncentrace GSH kontrolních buněk, které nejsou ovlivněné toxickými látkami (Čapek, 2017).

Naopak méně specifická reakce nastává s odlišnými bimany, konkrétně se substrátem MBB, protože ten reaguje i s jinými redukovanými thioley a nejedná se tak o specifickou reakci pouze pro stanovení GSH (Stevenson, 2002). MBB je využíván především jako fluorescenční značka pro detekci biologických látek. Touto metodou můžeme rovněž mezi sebou rozlišit jednotlivé kmeny bakterií, rostlin nebo i živočichů, a to pomocí detekce jednotlivých aktivit enzymu glutathion-S-transferázy (Nauen, 2002).



Obrázek 7: Enzymatická přeměna monochlorbimanu na glutathionový adukt, (GSH – glutathion-S-transferáza, HCl – kyselina chlorovodíková), (upraveno dle: Nauen, 2002).

2 CÍLE PRÁCE

1. Dlouhodobě kultivovat vybrané suspenzní buněčné linie a využít je pro studium cytotoxicity CdCl_2 .
2. U zvolené buněčné linie podrobněji otestovat cytotoxicitu CdCl_2 v porovnání s působením jiného těžkého kovu, popřípadě cisplatinu.
3. K charakterizaci cytotoxického účinku těžkých kovů u buněk využít bioanalytické metody určené pro stanovení buněčné viability a koncentrace glutathionu.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 SEZNAM POUŽITÉHO MATERIÁLU A POMŮCEK

3.1.1 Biologický materiál

- Buněčná linie lidské akutní lymfoblastické leukémie Jurkat
- Buněčná linie lidské akutní promyelocytární leukémie HL-60
- Buněčná linie lidského Burkittova lymfomu Raji

3.1.2 Chemikálie a roztoky

- Cisplatina (CisPt), $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ (Mr = 300,1 g/mol; Sigma Aldrich, USA)
- Deionizovaná voda pro buněčné kultury (Lonza, USA)
- Fetální bovinní sérum (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Fluorescenční sonda MCB, $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_2$ (Mr = 226,66 g/mol; Sigma Aldrich, USA)
- Fosfátový pufr (PBS) (pH 7,4; Gibco, USA)
- Chlorid kademnatý, CdCl_2 (Mr = 183,32 g/mol; Sigma Aldrich, USA)
- Chlorid rtuťnatý, HgCl_2 (Mr = 271,52 g/mol; Sigma Aldrich, USA)
- L-glutamin, $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ (Mr = 146,14 g/mol; Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Neesenciální aminokyseliny (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Penicilin/streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Proliferační činidlo WST-1 (Roche, Německo)
- Pyruvát sodný, $\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$ (Mr = 110,04 g/mol)
- Růstové médium RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

3.1.3 Laboratorní pomůcky, přístroje a software

- Automatické pipety Eppendorf (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga Labofuge 400 (Heraeus Instrument, Německo)
- Centrifugační zkumavky (15 mL; Jet Biofil, Čína)
- CO_2 inkubátor (PHCbi, Japonsko)
- Destičkový spektrofotometr a spektrofluorimetr Tecan Spark (Tecan, Rakousko)
- Invertovaný mikroskop Nikon Eclipse Ts2 (Nikon, Japonsko)
- Kultivační lahve NUNC T75 s filtrem (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

- Laminární box Airstrem (ESCO, USA)
- Mikrotitrační destičky 96jamkové (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Mikrozkušavky (0,5; 1,5; 2 a 5 mL; Eppendorf, Německo)
- Multisizer 4e Coulter Counter (Beckman Coulter, USA)
- Pasteurova pipeta
- Sérologické pipety (10, 25 mL; Jet Biofil, Čína)
- Sterilní špičky (10, 100, 1000 μ L)
- Thermoblock
- Vodní lázeň Isotemp GPD 10 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Vortex (Heathrow Scientific, USA)

Software

- Adobe Photoshop (Adobe Inc., USA)
- Microsoft Office – Word, Excel (Microsoft, USA)
- OriginPro 9.0.0 (OriginLab, USA)
- Tecan SparkControl (Tecan, Rakousko)

3.1.4 Příprava kultivačního média

Kultivační médium pro buněčnou linii HL-60 – K přípravě kultivačního média o objemu 100 mL pro buněčnou linii HL-60 bylo spotřebováno 100 mL média RPMI 1640 s/bez fenolové červeně. Dále bylo přidáno 10 mL FBS, 1 mL L-Glutaminu (2mM) a nakonec 0,5 mL penicilinu a streptomycinu o koncentracích 50 μ g/mL. Hotové médium bylo uchovááno v lednici při přibližně 4°C a před každým použitím bylo vyhřáto ve vodní lázni na 37°C.

Kultivační médium pro buněčnou linii Jurkat a Raji – K přípravě kultivačního média o objemu 100 mL pro buněčnou linii Jurkat, resp. Raji bylo spotřebováno 100 mL růstového média RPMI 1640 s/bez fenolové červeně. Dále byl roztok doplněn 10 mL FBS, 1 mL L-Glutaminu (2mM), 1 mL pyruvátu sodného (1mM), 1 mL neesenciálních aminokyselin (1% roztok) a následně bylo přidáno 0,5 mL penicilinu a streptomycinu o koncentracích 50 μ g/mL. Připravené médium bylo uchovááno v chladu o teplotě 4°C a před dalším použitím bylo vyhřáto ve vodní lázni na 37°C.

3.1.5 Příprava roztoků

Fosfátový pufr – K deionizované vodě o objemu 45 mL bylo přidáno 5 mL zásobního PBS, vzniklý roztok byl důkladně promíchán. Připravený fosfátový pufr byl uchováván v chladu při 4°C a před každým použitím byl vyhříván ve vodní lázni na 37°C.

Zásobní a pracovní roztoky cisplatin (CisPt) – Zásobní roztok CisPt ($c = 1 \text{ mmol/L}$) byl připraven navážením 1,5 mg CisPt a jejím rozpuštěním v 5 mL destilované vody a uchováván v lednici při 4°C. Z něj byl připraven 10x naředěný pracovní roztok o koncentraci 500 $\mu\text{mol/L}$ a objemu 400 μL . Pracovní roztok byl připravován vždy čerstvý před každým ovlivňováním buněk.

Zásobní a pracovní roztoky chloridu kadmnatého (CdCl_2) – Zásobní roztok CdCl_2 ($c = 20 \text{ mmol/L}$) byl připraven navážením 18,3 mg CdCl_2 a jejím rozpuštěním v 5 mL destilované vody a uchováván v lednici při 4°C. Z něj byly připraveny pracovní roztoky o koncentracích 50, 250, 500, 750, 1000 $\mu\text{mol/L}$. Pracovní roztoky byly připravovány vždy čerstvé před každým ovlivňováním buněk.

Zásobní a pracovní roztoky chloridu rtuťnatého (HgCl_2) – Zásobní roztok HgCl_2 ($c = 10 \text{ mmol/L}$) byl připraven navážením 13,6 mg HgCl_2 a jejím rozpuštěním v 5 mL destilované vody a uchováván v lednici při 4°C. Z něj byly připraveny pracovní roztoky o koncentracích 50, 250, 500, 750, 1000 $\mu\text{mol/L}$. Pracovní roztoky byly připravovány vždy čerstvé před každým ovlivňováním buněk.

Pracovní roztok pro stanovení dehydrogenázové aktivity (WST-1 roztok) – Pracovní WST-1 roztok byl připraven ředěním 1:1, smícháním 300 μL PBS a 300 μL vyhřátého zásobního roztoku WST-1 o koncentraci 10 mmol/L. Pracovní roztok byl připravován vždy čerstvý před každým stanovením buněk.

Pracovní roztok pro stanovení hladiny GSH (MCB roztok) – Pracovní roztok MCB o koncentraci 240 $\mu\text{mol/L}$ byl připraven ze zásobního roztoku monochlorobimanu o koncentraci 10 mmol/L vždy čerstvý před každým měřením.

3.2 POSTUP KULTIVACE BUNĚČNÝCH LINIÍ

3.2.1 Kultivace buněčné linie HL-60

Ke kultivaci buněčné linie HL-60 bylo zapotřebí 10 mL vyhrátého kultivačního média, které bylo s buněčnou suspenzí HL-60 vloženo do kultivační lahve. V inkubátoru byly tyto buňky inkubovány při 37°C v atmosféře 5% CO₂. Po třech dnech došlo k výměně kultivačního média a v intervalu 7-8 dní byly buňky pasážovány.

K vlastnímu pasážování buněk byla použita centrifugační zkumavka o objemu 15 mL, do které bylo z kultivační lahve odebráno kultivační médium včetně buněčné složky. Následně byl do centrifugační zkumavky přidán PBS o objemu 3 mL, kterým byla kultivační láhev propláchnuta. V centrifuze byla buněčná suspenze odstředována 5 minut při rychlosti 1500 ot/min. Vzniklý supernatant byl ze zkumavky odebrán a následně byla buněčná peleta znovu suspendována v čerstvém médiu pro buněčnou linii HL-60, které neobsahovalo fenolovou červen.

Dále bylo potřeba spočítat celkové množství buněk v suspenzi, k tomu byl použit analyzátor Multisizer 4e Coulter Counter. Do měrné kyvety bylo napipetováno 10 mL PBS a 100 µL suspenze buněk. Po určení množství buněk byly nasazeny buňky o denzitě 60×10^3 buněk ve 100 µL roztoku do každé jamky mikrotitrační destičky podle schématu zvoleného experimentu. Následně proběhlo ovlivnění buněk přidáním 10 µL připravených roztoků CisPt, CdCl₂ nebo HgCl₂, dle plánu daného experimentu. Po aplikaci všech reagensů byla mikrotitrační destička inkubována při 37°C po dobu 24 hodin. Po uplynutí inkubační doby proběhlo vlastní stanovení GSH a dehydrogenázové aktivity.

3.2.2 Kultivace buněčné linie Jurkat

Ke kultivaci buněčné linie Jurkat bylo zapotřebí 10 mL vyhrátého kultivačního média, které bylo s buněčnou suspenzí Jurkat vloženo do kultivační lahve. V inkubátoru byly tyto buňky inkubovány při 37°C v atmosféře 5% CO₂. Po třech dnech došlo k výměně kultivačního média a v intervalu 7-8 dní byly buňky pasážovány.

K vlastnímu pasážování buněk byla použita centrifugační zkumavka o objemu 15 mL, do které bylo z kultivační lahve odebráno kultivační médium včetně buněčné složky. Následně byl do centrifugační zkumavky přidán PBS o objemu 3 mL, kterým byla kultivační láhev propláchnuta. V centrifuze byla buněčná suspenze odstředována 5 minut při rychlosti 1500 ot/min. Vzniklý supernatant byl ze zkumavky odebrán a následně byla buněčná peleta

znovu suspendována v čerstvém médiu pro buněčnou linii Jurkat, které neobsahovalo fenolovou červeň.

Dále bylo potřeba spočítat celkové množství buněk v resuspendované suspenzi, k tomu byl použit analyzátor Multisizer 4e Coulter Counter. Do měrné kyvety bylo napipetováno 10 mL roztoku PBS a 100 μ L suspenze buněk. Po určení množství buněk byly nasazeny buňky o denzitě 20×10^3 buněk ve 100 μ L roztoku do každé jamky mikrotitrační destičky podle schématu zvoleného experimentu. Následně proběhlo ovlivnění buněk přidáním 10 μ L připravených roztoků CisPt, CdCl₂ nebo HgCl₂, dle plánu daného experimentu. Po aplikaci všech reagensů byla mikrotitrační destička inkubována při 37°C po dobu 24 hodin. Po uplynutí inkubační doby proběhlo vlastní stanovení GSH a dehydrogenázové aktivity.

3.2.3 Kultivace buněčné linie Raji

Ke kultivaci buněčné linie Raji bylo zapotřebí 10 mL vyhřátého kultivačního média, které bylo s buněčnou suspenzí Raji vloženo do kultivační lahve. V inkubátoru byly tyto buňky inkubovány při 37°C v atmosféře 5% CO₂. Po třech dnech došlo k výměně kultivačního média a v intervalu 7-8 dní byly buňky pasážovány.

K vlastnímu pasážování buněk byla použita centrifugační zkumavka o objemu 15 mL, do které bylo z kultivační lahve odebráno kultivační médium včetně buněčné složky. Následně byl do centrifugační zkumavky přidán PBS o objemu 3 mL, kterým byla kultivační láhev propláchnuta. V centrifuze byla buněčná suspenze odstředována 5 minut při rychlosti 1500 ot/min. Vzniklý supernatant byl ze zkumavky odebrán a následně byla buněčná peleta znovu suspendována v čerstvém médiu pro buněčnou linii Raji, které neobsahovalo fenolovou červeň.

Dále bylo potřeba spočítat celkové množství buněk v resuspendované suspenzi, k tomu byl použit analyzátor Multisizer 4e Coulter Counter. Do měrné kyvety bylo napipetováno 10 mL roztoku PBS a 100 μ L suspenze buněk. Po určení množství buněk byly nasazeny buňky o denzitě 20×10^3 buněk ve 100 μ L roztoku do každé jamky mikrotitrační destičky podle schématu zvoleného experimentu. Následně proběhlo ovlivnění buněk přidáním 10 μ L připravených roztoků CisPt, CdCl₂ nebo HgCl₂, dle plánu daného experimentu. Po aplikaci všech reagensů byla mikrotitrační destička inkubována při 37°C po dobu 24 hodin. Po uplynutí inkubační doby proběhlo vlastní stanovení GSH a dehydrogenázové aktivity.

3.3 BIOANALYTICKÉ METODY POUŽITÉ PRO TESTOVÁNÍ TOXICKÝCH VLIVŮ

3.3.1 Detekce intracelulární dehydrogenázové aktivity (WST-1 test)

Po uběhnutí určeného času inkubace vybrané buněčné linie bylo napipetováno 12 μL pracovního roztoku proliferačního činidla WST-1 do celé mikrotitrační destičky. Absorbance byla spektrofotometricky měřena v čase 0 a 60 min s využitím destičkového spektrofotometru Tecan Spark při vlnové délce 440 nm. Dehydrogenázová aktivita buněk byla vyhodnocena nejdříve odečtením výsledků jednotlivých detekovaných absorbancí (60 – 0 minut) a následně byla porovnána s hodnotami kontrolních buněk a vyjádřena v procentech.

3.3.2 Detekce intracelulární hladiny glutathionu (MCB test)

Po uběhnutí určeného času inkubace vybrané buněčné linie bylo napipetováno 20 μL pracovního roztoku MCB do celé mikrotitrační destičky. Fluorescence byla spektrofotometricky měřena po dobu 20 min s využitím destičkového spektrofotometru Tecan Spark při excitační a emisní vlnové délce 394/490 nm. Koncentrace GSH byla porovnána s hodnotami kontrolních buněk a vyjádřena v procentech.

3.3.3 Statistické hodnocení naměřených dat

Veškeré uskutečněné experimenty proběhly vždy minimálně ve dvou samostatných na sobě nezávislých analýzách. Sledované parametry byly stanoveny v každém experimentu vždy ve formě tripletu ($n = 3$). Výsledky jednotlivých experimentů byly uvedeny jako průměr \pm SD, vztaženo ke kontrolním buňkám. Ke statistickému hodnocení naměřených dat byl využit softwar OriginPro 9.0.0., konkrétně jednorozměrová analýza rozptylu (ANOVA) s následným využitím Bonferroniho post–testu.

4 VÝSLEDKY

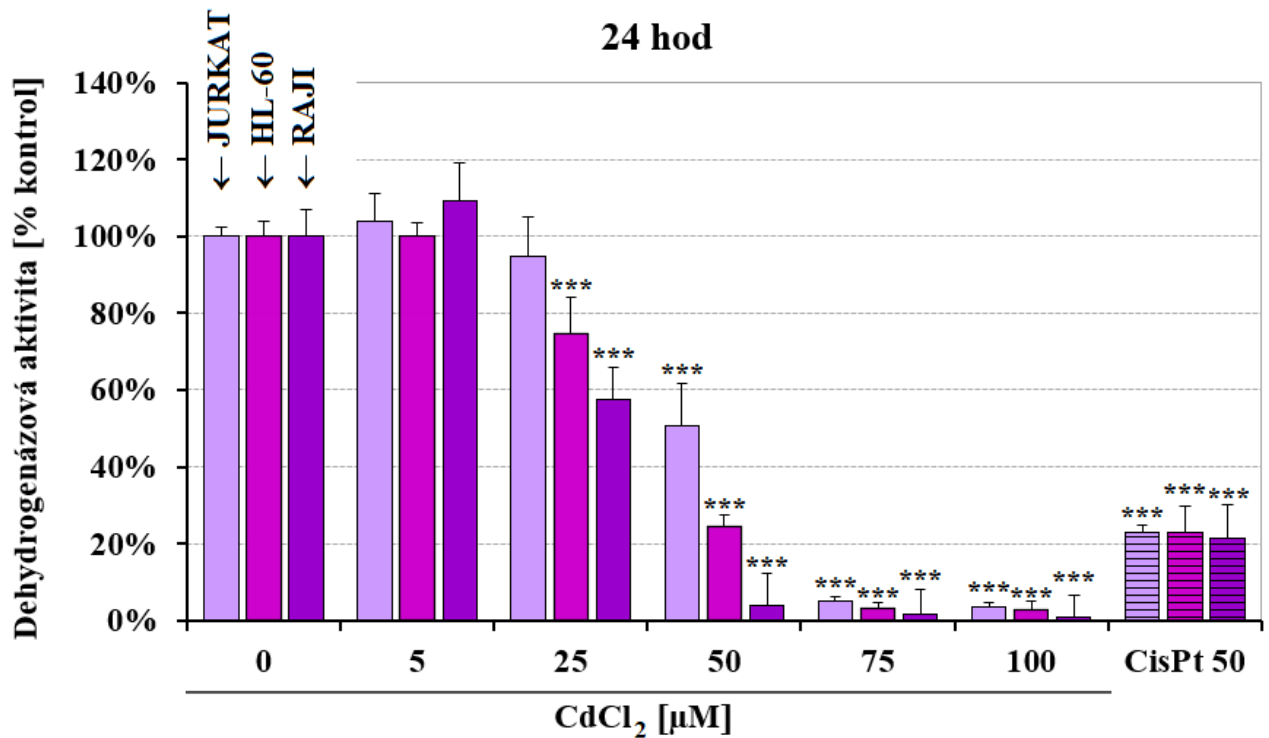
4.1 Optimalizace buněčné linie

Ke stanovení možného výskytu oxidačního stresu, a také změny intracelulární dehydrogenázové aktivity, je důležité vybrat vhodný buněčný *in vitro* model pro samotné testování vlivů vybraných látek, který nejlépe demonstuje jejich působení. Ke stanovení dehydrogenázové aktivity se často v odborných pracích ostatních autorů využívají buňky Jurkat, HL-60 a Raji (Bagchi, 2000; Nemmiche, 2011; Tsangaris, 1998), proto jsme se je rozhodli využít i v naší práci. Pro testování cytotoxicity CdCl₂ u námi vybraných buněčných linií jsme zvolili široké rozmezí koncentrací CdCl₂, a to 5-100 μM, a jako pozitivní kontrolu jsme zvolili CisPt o koncentraci 50 μM (Graf 1).

Po 24hod inkubaci buněk Jurkat s vybranými koncentracemi CdCl₂ jsme detekovali koncentračně závislý pokles intracelulární dehydrogenázové aktivity. Po inkubaci buněk s nižšími koncentracemi CdCl₂ (5 a 25 μM) nedošlo k signifikantně významnému poklesu dehydrogenázové aktivity. Naopak nejvýznamnější pokles dehydrogenázové aktivity byl detekován u buněk inkubovaných s 100 μM CdCl₂, a to o 97 % ve vztahu ke kontrolním buňkám.

Dehydrogenázová aktivita u buněk HL-60 po inkubaci s vybranými toxiny byla postupně snížena, po inkubaci s 5 a 25 μM CdCl₂ nebyla detekována signifikantní změna v dehydrogenázové aktivitě. Signifikantní pokles dehydrogenázové aktivity byl detekován po expozici buněk 50 μM CdCl₂, a to o 76 % ve srovnání s kontrolními buňkami. Nejvýznamnější snížení dehydrogenázové aktivity u buněk HL-60 bylo detekováno po expozici 75 a 100 μM CdCl₂, obě koncentrace CdCl₂ snížily dehydrogenázovou aktivitu v porovnání s kontrolními buňkami o 97 %. Po expozici buněk Raji s 5 μM CdCl₂ jsme detekovali zvýšení dehydrogenázové aktivity, naopak signifikantní snížení dehydrogenázové aktivity způsobily až koncentrace 50-100 μM CdCl₂, a to přibližně o 98 % v porovnání s kontrolními buňkami.

U všech testovaných buněčných linií byl detekován obdobný pozvolně klesající trend dehydrogenázové aktivity, významnější snížení dehydrogenázové aktivity vidíme po inkubaci buněk způsobeným vyššími koncentracemi CdCl₂. Při porovnání všech testovaných buněčných linií lze sledovat podobné detekované hodnoty u koncentrací 5, 75 a 100 μM CdCl₂. Po expozici 50 μM CisPt na buňky Jurkat došlo k poklesu dehydrogenázové aktivity o 77 % v porovnání s kontrolními buňkami.



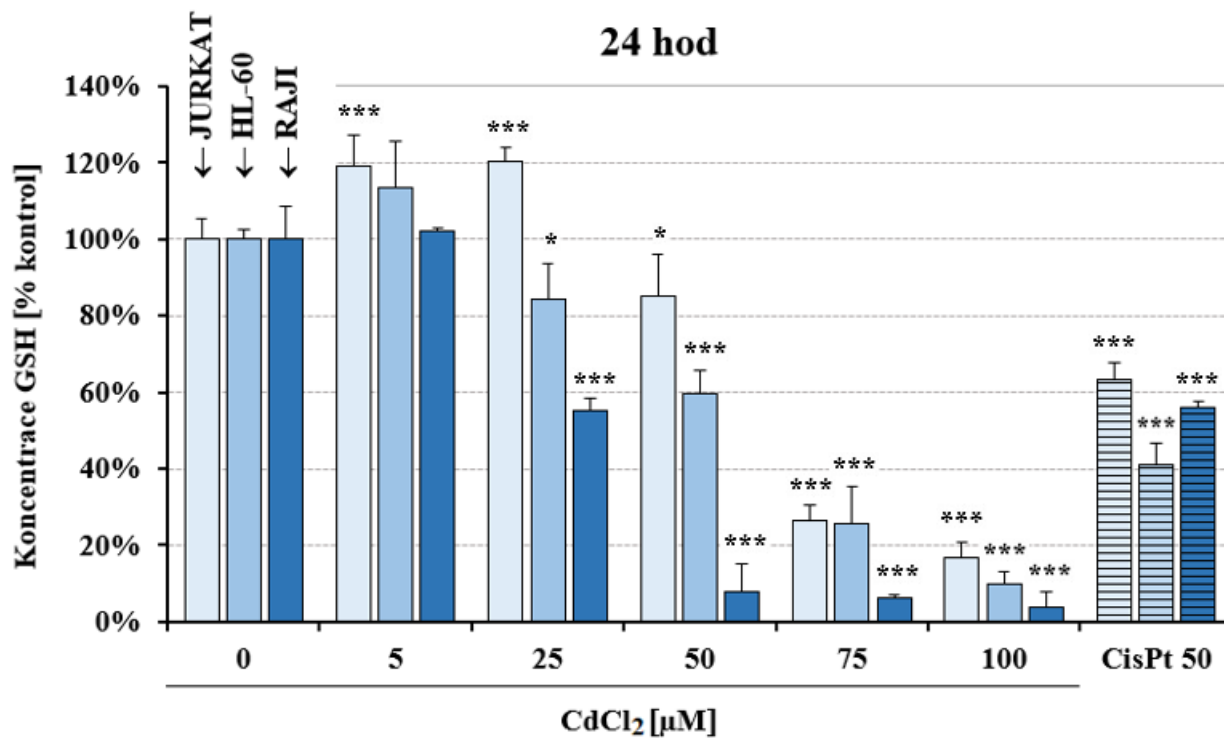
Graf 1: Dehydrogenázová aktivita po expozici CdCl₂ u vybraných buněčných linií. Vliv toxinu na dehydrogenázovou aktivitu u buněk Jurkat, HL-60 a Raji exponovaných CdCl₂ (5–100 μM), cisplatině (CisPt; 50 μM) po 24hod inkubaci s využitím metody WST-1. Intracelulární dehydrogenázová aktivita buněk byla vztažena ke kontrolním buňkám (= 100 %) a vyjádřena jako průměr ± SD (***, $p < 0,001$; vs. kontroly v daném časovém intervalu).

Následně jsme se zabývali pozorováním změn intracelulární koncentrace GSH pro charakteristické popsání toxického působení CdCl₂. K tomuto stanovení byly použity buněčné linie Jurkat, HL-60 a Raji, které jsme rovněž zvolili pro určení dehydrogenázové aktivity buněk (Graf 2). Široké rozmezí koncentrací CdCl₂ (5-100 μM) a pozitivní kontrola CisPt (50 μM) byly vybrány k určení optimálních koncentrací pro testování buněčné linie.

Po 24hod inkubaci jsme u buněčné linie Jurkat detekovali zvýšení intracelulární koncentrace GSH o 19 % a o 20 %, po expozici 5 a 25 μM CdCl₂. Signifikantní pokles koncentrace GSH byl detekován u buněk inkubovaných s 75 a 100 μM CdCl₂ v porovnání s kontrolními buňkami. Výrazný pokles GSH na hodnotu 27 ± 4 % v porovnání s kontrolními buňkami byl detekován u buněk inkubovaných se 75 μM CdCl₂. Po expozici nejvyšší testované koncentrace CdCl₂ (100 μM) dochází k poklesu intracelulární koncentrace GSH o 83 % v porovnání s kontrolními buňkami. Po 24hod inkubaci buněčné linie HL-60 dochází ke zvýšení hladiny GSH po expozici 5 μM CdCl₂. K významnému poklesu koncentrace GSH po expozici 25 a 50 μM CdCl₂ u buněk HL-60 nedošlo.

Naopak nejvýznamnější pokles koncentrace GSH byl detekován inkubací buněk s 100 μM CdCl_2 , konkrétně hladina GSH klesla o 90 % ve srovnání s kontrolními buňkami. Při porovnání testovaných buněčných linií Jurkat a HL-60 lze sledovat podobně detekované hodnoty u koncentrace 75 a 100 μM CdCl_2 . Nezaznamenali jsme signifikantní pokles koncentrace GSH po ovlivnění buněk Raji 5 a 25 μM CdCl_2 , k významnému poklesu o 92 % došlo až po expozici 50 μM CdCl_2 . Po ovlivnění buněk Raji 100 μM CdCl_2 jsme detekovali nejvýznamnější snížení koncentrace GSH, hladina klesla o 96 % vzhledem ke kontrolním buňkám. Po expozici koncentrace 50, 75 a 100 μM CdCl_2 na buněčnou linii Raji pozorujeme srovnatelné hodnoty koncentrace GSH.

Srovnatelný klesající trend koncentrace pozorujeme u buněčné linie HL-60 a Raji, kdy dochází k postupnému poklesu intracelulární hladiny GSH v závislosti na koncentraci buněk. U buněk inkubovaných s vyšší koncentrací CdCl_2 bylo detekováno signifikantní snížení koncentrace GSH. U buněčné linie Jurkat naopak po expozici nižších koncentrací 5 a 25 μM CdCl_2 dochází k přechodnému zvýšení koncentrace GSH, následný pokles GSH byl detekován po inkubaci s vyššími koncentracemi 50, 75 a 100 μM CdCl_2 . Tato skutečnost byla jedním z rozhodujících faktorů k výběru buněčné linie Jurkat pro další testování, kde jsme stanovovali vliv užších koncentrací vybraných těžkých kovů. Největší pokles koncentrace GSH pozorujeme u buněk HL-60 inkubovaných s 50 μM CisPt , a to o 59 % v porovnání s kontrolními buňkami. Koncentrace GSH u ostatních buněčných linií po jejich expozici 50 μM CisPt byla shodná.



Graf 2: Hladina glutathionu po expozici CdCl₂ u vybraných buněčných linií. Vliv toxinu na hladinu GSH u buněk Jurkat, HL-60 a Raji exponovaných CdCl₂ (5–100 μM), cisplatině (CisPt; 50 μM) po 24 hod s využitím metody MCB ($\lambda_{Ex}/Em = 394/490$ nm). Intracelulární koncentrace GSH byla vztažena ke kontrolním buňkám (= 100 %) a vyjádřena jako průměr \pm SD (***, $p < 0,001$; vs. kontroly v daném časovém intervalu).

4.2 Optimalizace koncentrací testovaných těžkých kovů

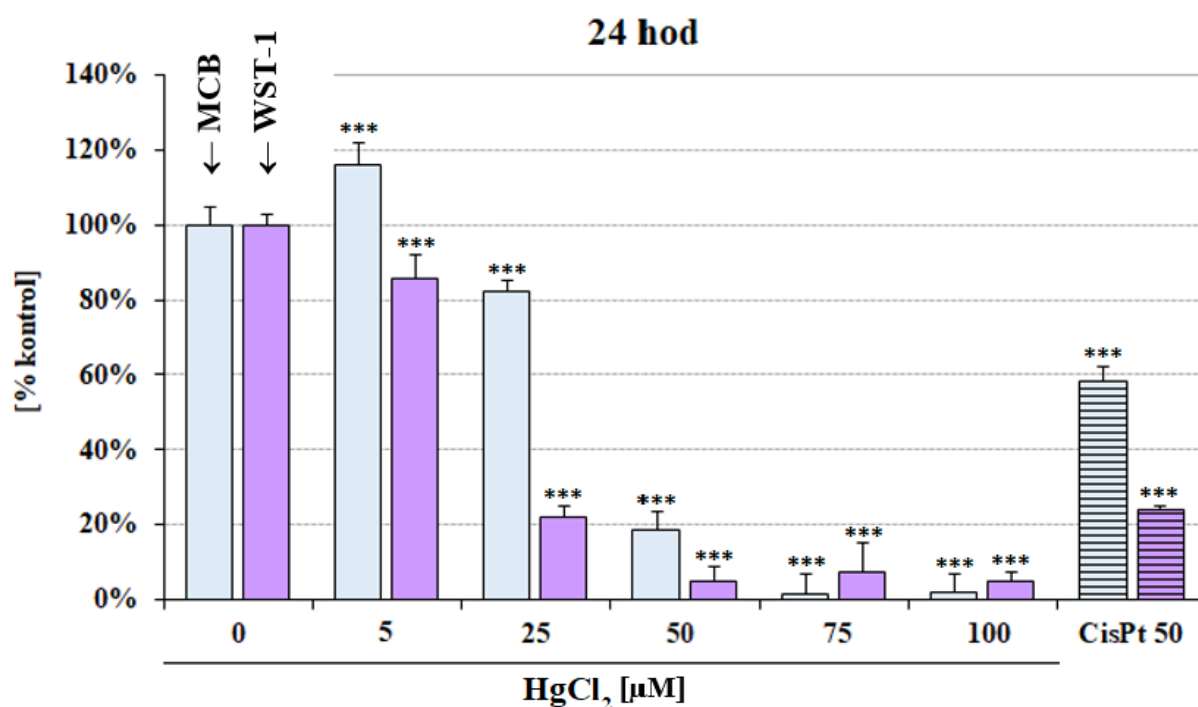
Pro optimalizaci koncentrací těžkých kovů jsme jako nejvhodnější buněčnou linii vybrali Jurkat, protože při buněčné kultivaci vykazovala nejvyšší míru proliferace buněk. Buněčná linie byla také zvolena z důvodů pozoruhodné detekce intracelulárních hladin GSH po expozici nižších koncentrací 5 a 25 μM CdCl_2 , kdy dochází k přechodnému zvýšení aktivity buněk. Následný pokles GSH naopak nastává u vyšších koncentrací 50, 75 a 100 μM CdCl_2 . Rovněž byl zajímavý trend při stanovení intracelulární dehydrogenázové aktivity po expozici CdCl_2 . Po zvolení buněčné linie Jurkat pro testování jednotlivých vlivů vybraných látek je nezbytná optimalizace koncentrací, které jsou nejzajímavější pro charakterizaci průběhu změn koncentrace GSH a dehydrogenázové aktivity. Z tohoto důvodu jsme testovali vliv HgCl_2 na dehydrogenázovou aktivitu a koncentraci GSH u buněčné linie Jurkat po 24hod inkubaci (Graf 3). Pro testování bylo využito široké rozmezí koncentrací HgCl_2 (5-100 μM) a pozitivní kontrola CisPt o koncentraci 50 μM .

V porovnání s kontrolními buňkami a využitím metody založené na MCB jsme detekovali zvýšení koncentrace GSH po expozici 5 μM HgCl_2 o 16 %. Signifikantní snížení koncentrace GSH pozorujeme po expozici buněk 50 μM HgCl_2 o 81 % v porovnání s kontrolními buňkami. Po inkubaci buněk Jurkat se 75 μM HgCl_2 došlo k poklesu hladiny GSH o 99 % v porovnání s kontrolními buňkami. Po expozici buněk se 100 μM HgCl_2 bylo naměřeno výrazné snížení GSH o 98 %. U buněk Jurkat po expozici 5 μM HgCl_2 jsme nedetekovali snížení dehydrogenázové aktivity s využitím metody založené na WST-1. V porovnání s kontrolními buňkami vidíme signifikantní snížení dehydrogenázové aktivity u buněk inkubovaných s 25 μM o 78 %. Po inkubaci buněk Jurkat s 50 μM HgCl_2 bylo detekováno snížení dehydrogenázové aktivity o 95 %, naopak po inkubaci buněk se 75 μM došlo k poklesu dehydrogenázové aktivity o 93 %. Při expozici nejvyšší vybranou koncentrací došlo ke snížení aktivity buněk Jurkat o 95 % v porovnání s kontrolními buňkami. Z naměřených dat vidíme, že jsme detekovali srovnatelnou depleci GSH u koncentrace 50 a 100 μM HgCl_2 u testované buněčné linie Jurkat.

Po 24hod inkubaci buněčné linie Jurkat s testovanými koncentracemi HgCl_2 sledujeme přechodné zvýšení koncentrace GSH, které je koncentračně závislé. U buněk Jurkat inkubovaných se 75 μM HgCl_2 byla detekovaná takřka úplná deplece GSH stejně tak jako u buněk inkubovaných s 100 μM HgCl_2 . Naopak po 24hod inkubaci buněčné linie Jurkat s HgCl_2 pozorujeme rovnou klesající trend dehydrogenázové aktivity. Po inkubaci buněk Jurkat s koncentracemi 50, 75 a 100 μM HgCl_2 jsme naměřili téměř shodné hodnoty

dehydrogenázové aktivity. Pokles koncentrace GSH pozorujeme u buněčné linie Jurkat inkubované s 50 μM CisPt, a to o 42 % v porovnání s kontrolními buňkami. K výraznějšímu snížení dehydrogenázové aktivity u buněk Jurkat došlo po expozici 50 μM CisPt, hodnota odpovídá přibližně polovině koncentrace GSH.

Z výše uvedených a popsáných dat jsme vybrali pro další experiment koncentrace 25, 50 a 100 μM HgCl_2 , které se nejlépe hodí pro sledování toxických vlivů vybraných testovaných látek.



Graf 3: Dehydrogenázová aktivita a hladina glutathionu po expozici HgCl_2 u buněčné linie Jurkat. Vliv toxinu na hladinu GSH a dehydrogenázovou aktivitu u buněk Jurkat exponovaných HgCl_2 (5–100 μM), cisplatině (CisPt; 50 μM) po 24 hod s využitím metody MCB ($\lambda_{\text{Ex}}/\lambda_{\text{Em}} = 394/490$ nm) a WST-1. Intracelulární koncentrace GSH a dehydrogenázová aktivita byla vztažena ke kontrolním buňkám (= 100 %) a vyjádřena jako průměr \pm SD (***, $p < 0,001$; vs. kontroly v daném časovém intervalu).

4.3 Stanovení dehydrogenázové aktivity buněčné linie Jurkat

Pro stanovení dehydrogenázové aktivity jsme použili námi vybranou buněčnou linii Jurkat a koncentrační rozmezí 25–100 μM CdCl_2 a HgCl_2 v dalších časových intervalech. Pro tento experiment jsme vybrali krátké časové intervaly 1–6 hod, z důvodu detailního sledování změn dehydrogenázové aktivity v buňkách Jurkat po inkubaci s CdCl_2 a HgCl_2 (Tab. 3). Jako pozitivní kontrola byla použita CisPt o koncentraci 50 μM . Detekované hodnoty dehydrogenázové aktivity byly porovnány s hodnotami kontrolních buněk.

Po 2 a 6hod inkubaci buněčné linie Jurkat s 25 μM CdCl_2 bylo pozorováno signifikantní navýšení dehydrogenázové aktivity. Po 4hod inkubaci buněk s 50 μM CdCl_2 nejsou pozorovány velké změny, avšak od 5 hod inkubace dochází k pozvolnému snižování dehydrogenázové aktivity těchto buněk. Naopak po 24hod inkubaci buněk Jurkat byl detekovatelný signifikantní pokles dehydrogenázové aktivity. Po expozici buněk Jurkat se 100 μM CdCl_2 došlo k pozvolnému snižování dehydrogenázové aktivity již po 4 hod inkubace, avšak ve srovnání s kontrolními buňkami došlo k nejvýznamnější změně po 24hod inkubaci. Po expozici buněk s 25 μM HgCl_2 vidíme zvýšení dehydrogenázové aktivity od 4 hod, ale signifikantní zvýšení lze sledovat až po 24hod inkubaci. Ve všech sledovaných časových intervalech 1–6 hod byla detekována úplná deplece dehydrogenázové aktivity po inkubaci buněčné linie Jurkat s koncentracemi 50 a 100 μM HgCl_2 . To znamená, že hladiny dehydrogenázové aktivity byly pod detekovatelnou mezí. Pouze po 24hod inkubaci buněk Jurkat nebyla detekována 100% deplece dehydrogenázové aktivity, po expozici buněk s 50 a 100 μM HgCl_2 bylo detekováno snížení dehydrogenázové aktivity o 95 % v porovnání s kontrolními buňkami. U buněk inkubovaných s CisPt byla detekována srovnatelná deplece dehydrogenázové aktivity ve všech časových intervalech kromě intervalu 24 hod, kdy došlo k poklesu o 76 %.

Tabulka 3: Dehydrogenázová aktivita po expozici CdCl₂ a HgCl₂ u bunečné linie Jurkat. Vliv toxinů na dehydrogenázovou aktivitu u buněk Jurkat exponovaných CdCl₂ a HgCl₂ (25–100 μM), cisplatině (CisPt; 50 μM) po 1–6 hod s využitím metody WST-1. Intracelulární dehydrogenázová aktivita buněk byla vztažena ke kontrolním buňkám (= 100 %) a vyjádřena jako průměr ± SD (***, *p* < 0,001; vs. kontroly v daném časovém intervalu).

Testovaná látka	Čas [hod]					
	1	2	3	4	5	6
Kontrolní buňky	100 ± 5 %	100 ± 4 %	100 ± 4 %	100 ± 3 %	100 ± 5 %	100 ± 3 %
50 μM CisPt	95 ± 7 %	98 ± 9 %	91 ± 3 %	92 ± 7 %	87 ± 4 %	83 ± 3 % *
25 μM CdCl ₂	97 ± 11 %	107 ± 10 %	106 ± 7 %	104 ± 14 %	100 ± 8 %	108 ± 13 %
50 μM CdCl ₂	106 ± 11 %	111 ± 10 %	102 ± 15 %	100 ± 7 %	89 ± 7 %	97 ± 14 %
100 μM CdCl ₂	102 ± 6 %	111 ± 14 %	104 ± 19 %	91 ± 9 %	73 ± 10 %***	59 ± 10 %***
25 μM HgCl ₂	6 ± 7 % ***	13 ± 7 % ***	12 ± 4 % ***	16 ± 6 % ***	17 ± 7 % ***	17 ± 9 % ***
50 μM HgCl ₂	0 ± 3 % ***	0 ± 3 % ***	0 ± 4 % ***	0 ± 4 % ***	0 ± 3 % ***	0 ± 2 % ***
100 μM HgCl ₂	0 ± 2 % ***	0 ± 3 % ***	0 ± 3 % ***	0 ± 5 % ***	0 ± 2 % ***	0 ± 4 % ***

4.4 Stanovení hladiny glutathionu buněčné linie Jurkat

V další části práce jsme stanovovali hladinu GSH na buněčné linii Jurkat, kterou jsme vybrali jako optimální buněčný model. Stejně jako u předešlého experimentu se sledováním dehydrogenázové aktivity jsme použili koncentrační rozmezí 25–100 μM CdCl_2 a HgCl_2 pro testování v kratších časových intervalech. Zvolili jsme časové intervaly 1–6 hod, z důvodu přesnějšího sledování jednotlivých změn hladin GSH v buňkách Jurkat po inkubaci s CdCl_2 a HgCl_2 (Tab. 4). Jako pozitivní kontrola byla použita CisPt o koncentraci 50 μM . Detekované hodnoty hladiny GSH byly vztaženy ke kontrolním buňkám.

Po expozici buněk 25 μM CdCl_2 pozorujeme výrazné ovlivnění buněk a pozoruhodný trend detekované koncentrace GSH. Po 1 hod inkubace došlo k výraznému zvýšení hladiny GSH na $131 \pm 8 \%$ v porovnání s kontrolními buňkami, naopak po inkubačním intervalu 2 hod bylo detekováno snížení intracelulární hladiny GSH. Následně po 3-5 hod bylo stanoveno opětovné navýšení hodnot, a po 6 hod ovlivnění buněk Jurkat s CdCl_2 pozorujeme náhlý pokles hladiny GSH. V porovnání s kontrolními buňkami signifikantní zvýšení hladiny GSH bylo detekováno po 5 hod inkubace buněk s 25 μM CdCl_2 o 52 %. Naopak k navýšení koncentrace GSH o 20 % došlo po 24 hod. Po ovlivnění buněk s 50 μM CdCl_2 pozorujeme srovnatelný trend jako u předešlé koncentrace 25 μM . Po 2hod inkubaci buněk Jurkat s 50 μM CdCl_2 byl detekován pokles intracelulární hladiny GSH o 11 %, následně došlo k pozvolnému navýšování GSH až do časového intervalu 5 hod, kde sledujeme signifikantní zvýšení koncentrace GSH. Dále dochází k postupnému snížení hladiny GSH o 15 % po 24hod inkubaci. Po inkubaci buněk se 100 μM CdCl_2 byl detekován srovnatelný průběh, kdy nejprve došlo ke snížení koncentrace GSH již po 1hod inkubaci o 15 % v porovnání s kontrolními buňkami. Následně při pozorování ovlivněných buněk Jurkat se 100 μM CdCl_2 po 2-3 hod intervalu byl stanoven pokles koncentrace GSH, po 4-5 hod inkubace došlo ke zvýšení koncentrace GSH, od časového intervalu 6 hod opětovný pokles intracelulární koncentrace GSH o 83 % (po 24 hod). K signifikantnímu snížení GSH v porovnání s kontrolními buňkami došlo po 2-3 hod inkubaci buněk s 25 μM HgCl_2 , po 24hod inkubačním intervalu koncentrace GSH klesla o 18 %. Po inkubaci buněk s 50 μM HgCl_2 hladina GSH byla snížena o 66 %, a se zvyšujícím inkubačním intervalem se dále snižovala až pod detekční mez (po 4 hod). U buněčné linie Jurkat byl stanovený pokles koncentrace GSH o 81 % v porovnání s kontrolními buňkami po 24hod inkubaci a expozici 50 μM HgCl_2 . Ve všech sledovaných časových intervalech 1-6 hod byla detekována úplná deplece koncentrace GSH po inkubaci buněčné linie Jurkat s koncentrací 100 μM HgCl_2 . To znamená, že hladiny GSH byly pod detekovatelnou mezí. Pouze po 24hod

inkubaci buněk Jurkat nebyla detekována 100% deplece koncentrace GSH, po expozici buněk se 100 μM HgCl_2 bylo snížení koncentrace GSH o 98 % v porovnání s kontrolními buňkami. U buněk inkubovaných s CisPt byla detekována srovnatelná deplece GSH ve všech časových intervalech kromě intervalu 5 hod, kdy bylo naměřeno nejvyšší zvýšení o 45 %.

Tabulka 4: Hladina glutathionu po expozici CdCl_2 a HgCl_2 u buněčné linie Jurkat. Vliv toxinů na hladinu glutathionu u buněk Jurkat exponovaných CdCl_2 a HgCl_2 (25–100 μM), cisplatině (CisPt; 50 μM) po 1–6 hod s využitím metody MCB. Intracelulární hladina GSH buněk byla vztažena ke kontrolním buňkám (= 100 %) a vyjádřena jako průměr \pm SD (***, $p < 0,001$; vs. kontroly v daném časovém intervalu).

Testovaná látka	Čas [hod]					
	1	2	3	4	5	6
Kontrolní buňky	100 \pm 8 %	100 \pm 6 %	100 \pm 4 %	100 \pm 6 %	100 \pm 12 %	100 \pm 13 %
50 μM CisPt	98 \pm 5 %	85 \pm 12 %	96 \pm 11 %	93 \pm 9 %	145 \pm 10 % ^{***}	83 \pm 4 %
25 μM CdCl_2	131 \pm 8 % ^{***}	113 \pm 17 %	131 \pm 6 % ^{***}	133 \pm 7 % ^{***}	152 \pm 14 % ^{***}	149 \pm 10 % ^{***}
50 μM CdCl_2	106 \pm 8 %	89 \pm 7 %	102 \pm 12 %	111 \pm 16 %	127 \pm 6 % ^{***}	106 \pm 5 %
100 μM CdCl_2	85 \pm 6 % [*]	81 \pm 11 %	63 \pm 8 % ^{***}	67 \pm 14 % ^{***}	90 \pm 7 %	71 \pm 9 % ^{***}
25 μM HgCl_2	57 \pm 8 % ^{***}	52 \pm 5 % ^{***}	54 \pm 10 % ^{***}	64 \pm 10 % ^{***}	67 \pm 9 % ^{***}	76 \pm 17 % ^{**}
50 μM HgCl_2	34 \pm 8 % ^{***}	21 \pm 6 % ^{***}	8 \pm 12 % ^{***}	0 \pm 12 % ^{***}	0 \pm 9 % ^{***}	0 \pm 14 % ^{***}
100 μM HgCl_2	0 \pm 10 % ^{***}	0 \pm 14 % ^{***}	0 \pm 7 % ^{***}	0 \pm 9 % ^{***}	0 \pm 11 % ^{***}	0 \pm 8 % ^{***}

5 DISKUZE

Charakteristickým znakem těžkých kovů je vysoká hustota a jejich toxicita pro životní prostředí a lidský organismus. Téměř všechny těžké kovy mají karcinogenní účinky (Sall, 2020). Lze je rozdělit na neesenciální a esenciální. Esenciální jsou tělu přirozené a mají důležité biologické a fyzikální funkce. Mezi esenciální těžké kovy patří například měď, která je podstatná například pro metabolismus sacharidů, ale ve vysoké koncentraci se stává toxickou. Do skupiny neesenciálních kovů spadá například kadmium, rtuť, olovo, a také baryum (Al Osman, 2019).

V současnosti se vědecká komunita zabývá problematikou veřejného zdraví a problémy životního prostředí. V souvislosti s těmito problémy je velice často zmiňován i významný negativní podíl těžkých kovů. V poslední době rovněž narůstá lidská expozice těžkým kovům, a to zejména jejich využíváním v technologické a průmyslové výrobě (Al Osman, 2019). Toxicita indukovaná těžkými kovy může být navozena chemickými látkami vyskytujícími se buď v přírodě nebo v pracovním či průmyslovém prostředí (Renu, 2021). Všeobecný nárůst těžkých kovů může být také zapříčiněn sopečnou aktivitou nebo zvětráváním hornin (Al Osman, 2019). Po expozici těžkých kovů dochází v lidském organismu ke vzniku závažných zdravotních problémů zasahujících důležité orgány, zejména mozek, srdce, játra a ledviny. Těžké kovy ovlivňují základní biologické mechanismy probíhající v organismu, kde se dlouhodobě akumulují a představují tak závažná zdravotní rizika. Jejich biologická eliminace z těla je totiž naprosto minimální (Renu, 2021).

Již několik desítek let jsou využívány buněčné modely *in vitro* ke stanovení škodlivých vlivů těžkých kovů na organismus člověka. Buněčné modely, které jsou nejhojněji používány, pocházejí především od hlodavců a lidí (Branca, 2018; Olivieri, 2001). Dále jsou při sledování toxických vlivů využívány buněčné systémy odvozené od kmenových buněk a imortalizované buněčné linie (Jiang, 2002; L'Azou, 2007; Patnaik, 2017; Shen, 2018). Z důvodu spojitosti růstu nádoru a exprese genů při vystavení chemickým sloučeninám mohou tyto buněčné linie ovlivnit reakci buněk (Bal-Price, 2018). Pro hodnocení cytotoxicity těžkých kovů jsou mimo jiné hojně využívány lidské suspenzní buněčné linie Jurkat, HL-60 a Raji. Linie Jurkat je využívána jako modelový systém T-buněčného lymfomu ke sledování apoptotických změn a jiných buněčných mechanismů. Rovněž jsou buňky Jurkat využívány k popisu imunologických vlivů látek (Nemmiche, 2011). Linie HL-60 bývá často vybrána k testování apoptotického potenciálu sledovaných kovových iontů, kaspázy-3 nebo kaspázy-9, která je závislá na mitochondriích

(Bagchi, 1999; Kondoh, 2002; Araragi, 2003). Buněčná linie Raji je například využívána k určování apoptózy indukované kadmiem (Tsangaris, 1998; Xie, 2010).

Pro testování cytotoxicity těžkých kovů jsme nejdříve v naší práci vybírali nejvhodnější buněčnou linii pro samotné testování vlivů vybraných látek, která nejlépe demonstruje jejich působení. Rovněž bylo testováno široké rozmezí koncentrací 5-100 μM CdCl_2 . Testovali jsme tři buněčné linie po expozici CdCl_2 , konkrétně HL-60, Jurkat a Raji. U všech tří buněčných linií jsme testovali široké rozmezí koncentrací 5-100 μM CdCl_2 , následně byla stanovována dehydrogenázová aktivita a koncentrace GSH u jednotlivých vybraných buněčných linií. Při porovnání buněčných linií HL-60 a Raji byl pozorován srovnatelný klesající trend koncentrace GSH po expozici 5-100 μM CdCl_2 při 24 hod inkubaci, u buněčné linie Raji byly detekovány nižší hodnoty GSH než u linie HL-60. Detekované hodnoty dehydrogenázové aktivity u buněk Raji po expozici 5 μM CdCl_2 byly zvýšené v porovnání s kontrolními buňkami. K následnému poklesu dehydrogenázové aktivity došlo po inkubaci buněk s vyššími koncentracemi CdCl_2 . Ve srovnání s kontrolními buňkami byla detekována obdobná hodnota dehydrogenázové aktivity po expozici buněk HL-60 s 5 μM CdCl_2 , a poté došlo k pozvolnému snižování dehydrogenázové aktivity po vystavení buněk 25-100 μM CdCl_2 .

Na základě detekovaných hodnot byla zvolena jako nejvhodnější buněčná linie Jurkat. Zároveň s volbou buněčné linie byly zvoleny i koncentrace CdCl_2 , které byly dále využity k podrobnějšímu testování v krátkých časových intervalech. Následně bylo testováno široké rozmezí koncentrací 5-100 μM HgCl_2 již na zvolené buněčné linii Jurkat, kde jsme rovněž vybrali užší koncentrační rozmezí pro další sledování ovlivnění buněk po expozici vybraných toxinů. Z detekovaných hodnot byly dále vybrány koncentrace 25, 50 a 100 μM CdCl_2 a HgCl_2 pro testování krátkých časových intervalů a byly měřeny v časovém rozmezí 1-6 hod opět s využitím testu WST-1 a MCB. Testované toxiny byly vybrány na základě čteného využívání ve výzkumných činnostech (Branca, 2018; Wälchli, 2006; Guzzi, 2012; Olivieri, 2001). Buněčná linie Jurkat byla zvolena z důvodu pozoruhodné detekce hladin GSH po expozici nižších koncentrací 5 a 25 μM CdCl_2 , kdy docházelo k přechodnému zvýšení aktivity buněk. Podobné výsledky byly ve zvolených koncentracích 10 a 20 μM CdCl_2 zaznamenány ve studii Bovio et al 2021 na buněčné linii SH-SY5Y po 24hod inkubaci, kde bylo detekováno zvýšení celkového GSH více než o dvojnásobnou hodnotu v porovnání s kontrolními buňkami (Bovio, 2021). Pokles GSH u buněčné linie Jurkat naopak nastal u vyšších koncentrací 50, 75 a 100 μM CdCl_2 .

Prvními výsledky, kterými se v naší práci zabýváme, a následně diskutujeme jsou změny dehydrogenázové aktivity po působení 5-100 CdCl₂ na buněčné linii Jurkat po 1-6 a 24 hod inkubace. Podle naměřených výsledků po 24hod inkubaci buněk s 5-50 μM CdCl₂ nedochází k výrazným změnám dehydrogenázové aktivity a detekované hladiny jsou srovnatelné s hodnotami dehydrogenázových aktivit kontrolních buněk. Podobné výsledky v porovnání s našimi detekovanými hodnotami byly dosaženy ve studii Glinski et al 2021, kde testovali oproti nám cytotoxicitu po působení 10 μM Cd na buněčné linii myších makrofágů RAW 264.7 při 24hod inkubaci. Životaschopnost buněk RAW 264.7 byla detekována pomocí metody založené na redukci MTT (Glinksi, 2021). Po inkubaci buněk Jurkat s 50 μM CdCl₂ došlo k signifikantnímu poklesu dehydrogenázové aktivity vůči aktivitě kontrolních neovlivněných buněk po 5hod inkubaci na 89 ± 7 %, a také po 24hod inkubaci na hodnotu 51 ± 11 %. Detekované hladiny dehydrogenázové aktivity po expozici buněk se 100 μM CdCl₂ byly sníženy v porovnání s kontrolními buňkami již po 4 hod. V porovnání s kontrolními buňkami byl nejvýznamnější pokles zaznamenán po 24hod inkubaci, a to na hodnotu 3 ± 1 %.

Naše výsledky byly porovnány s celou řadou aktuálních vědeckých studií (Branca, 2018; Guzzi, 2012; Lee, 2001; Lohren, 2015; Nemmiche, 2011; Olivieri, 2001; Wälchli, 2006). Větší pozornost si zaslouží zejména studie Wälchli et al 2006, která se zabývala homeopatickým testováním vlivů CdCl₂ na buněčné linii Jurkat a lidských primárních lymfocytech. K homeopatickému léčebnému postupu jsou převážně využívány zředěné látky k vyvolání vlastní autoregulační nebo obranné reakce organismu. Buňky byly nejdříve předběžně vystaveny nízkým anebo vysokým koncentracím CdCl₂ a inkubovány po dobu 120 hod. Následně byly buňky Jurkat exponovány 24 hod toxickému působení koncentračnímu rozmezí 8–64 μM CdCl₂. K hodnocení viability buněk byl použit kolorimetrický test MTS a činidlo fenazin etosulfát (PES). Životaschopnost buněk byla zvýšena po prvotním vystavení nízkých koncentrací na jednotlivé buňky, ale konkrétně u buněčné linie Jurkat tento účinek nebyl tolik významný (pouze o 4 %), na rozdíl od primárních lymfocytů (o 16 %). Předběžné vystavení buněk vysokým koncentracím CdCl₂ nemělo téměř žádný vliv na viabilitu buněk Jurkat. Následně po expozici buněk Jurkat s 8-16 μM CdCl₂ nedošlo k významné změně buněčné viability (Wälchli, 2006). Tyto výsledky odpovídají námi detekovaným hodnotám dehydrogenázové aktivity, kdy rovněž nedošlo k významnému poklesu po 24hod inkubaci buněk s 5-25 μM CdCl₂. Ve studii Wälchli et al 2006 k signifikantnímu poklesu životaschopnosti buněk došlo po 24hod inkubaci buněk se 32-64 μM CdCl₂. Po ovlivnění buněk se 64 μM CdCl₂ byla detekována velmi nízká životaschopnost buněk Jurkat (Wälchli,

2006). V další studii Branca et al 2018 se zaměřili na testování ochranné funkce stopových prvků Se a Zn potřebných pro správnou mozkovou funkci před exitotoxicitou indukovanou Cd. K tomuto stanovení byla využita katecholaminergní neuroblastomová buněčná linie SH-SY5Y a 24hod inkubace s CdCl₂ s přítomností nebo v nepřítomnosti 50 μM ZnCl₂ anebo 100 μM Na₂SeO₃. Hodnocení životaschopnosti bylo prováděno testem založeným na redukci MTT. Po expozici nediferencovaných buněk SH-SY5Y s 10 μM CdCl₂ došlo k významnému snížení viability buněk přibližně na 60 %, což odpovídá námi srovnatelně detekované hodnotě dehydrogenázové aktivity po expozici buněk Jurkat s 50 μM CdCl₂. Pokud byly sloučeniny ZnCl₂ a Na₂SeO₃ využity 24 hod před expozicí CdCl₂, byl detekován nepatrný pokles živých buněk SH-SY5Y ve srovnání s kontrolou. Tímto byla prokázána účinnost prvků Se a Zn při eliminaci neurotoxicity a oxidačního stresu indukovaného Cd (Branca, 2018). Získané naměřené výsledky z těchto studií příliš nekorelují s našimi detekovanými hladinami dehydrogenázové aktivity. Proto je důležité se zamyslet, zda odlišné podmínky kultivace, nasazení rozdílné denzity buněk do mikrotitrační destičky, využití jiných postupů přípravy a metod může být příčinou těchto rozdílných účinků.

V závislosti na sledování dehydrogenázové aktivity na buňkách Jurkat bylo následným krokem naší práce testování koncentrace GSH, který se účastní řady biologických procesů, a také disponuje ochrannou funkcí před chemickým a oxidačním porušením buněk. Víme, že těžké kovy interagují právě s antioxidantem GSH, proto jsme zvolili metodu založenou na MCB ke stanovení hladiny GSH na vybrané buněčné linie Jurkat. Nejdříve pro hodnocení toxicity byla vybrána sloučenina CdCl₂, u které jsme detekovali zajímavý trend koncentrace GSH. Po 5hod inkubaci buněk s 25 a 50 μM CdCl₂ došlo k signifikantnímu zvýšení hladiny GSH na hodnotu 152 ± 14 % (25 μM) a 127 ± 6 % (50 μM). Po expozici buněk s 25 μM CdCl₂ a 24 hod inkubace bylo detekováno zvýšení hladiny GSH na 120 ± 4 %, a po vystavení buněk koncentraci 50 μM CdCl₂ klesla hladina GSH na 85 ± 11 % po 24hod inkubaci. Po ovlivnění buněk Jurkat se 100 μM CdCl₂ byl stanoven obdobný jev, kdy významný pokles hladiny GSH byl detekován po 3-4 hod inkubace, a k nejnižší koncentraci GSH došlo po 24hod inkubaci buněk na hodnotu 17 ± 4 %.

Ve studii Nemmiche et al 2011 popisující buněčnou toxicitu CdCl₂ na buněčné linii Jurkat byl použit spektrofotometrický test s tetrazoliovou solí MTT, byly testovány koncentrace 5, 25 a 50 μM po 24hod inkubaci. Výsledkem vystavení buněk byl detekován pokles hladiny GSH po expozici 50 μM CdCl₂, což koreluje s našimi výsledky. Kromě jiného Nemmiche et al 2011 sledovali nárůst koncentrací stopových prvků, zejména mědi, zinku, selenu a manganu

v ovlivňovaných buňkách, kdy k navýšení došlo již po expozici 5 μM CdCl_2 . Významný nárůst železa nastal pouze po ovlivnění buněk Jurkat s 50 μM CdCl_2 . Tyto prvky disponují důležitou funkcí v různých biologických procesech, do kterých patří například transport kyslíku, podpora přenosu elektronů a signálů (Nemmiche, 2011). V další studii Ogasawara et al 2014 prokázali zvýšení hladiny GSH po působení CdCl_2 na krevní buňky Jurkat, HL-60, MOLT4 a K562. Zvýšené hodnoty GSH odpovídaly expoziční koncentraci CdCl_2 a znázorňovaly schopnost buněk o detoxikační mechanismus. Důležitý účinek byl detekován po expozici 10 μM CdCl_2 na buňky Jurkat po 6hod inkubaci. Naměřené hodnoty GSH naznačovaly, že v buňkách je přítomna ve větším množství redukovaná forma GSH. Po nárůstu hladiny GSH, dochází také ke zvýšení metalothioneinu. Studie poukazuje, že ochranná reakce buněčné linie Jurkat na oxidační stres indukovaný Cd je závislá na signální dráze Nrf2-Keap1. Mechanismy působení Cd a aktivace Nrf2 (nukleární faktor erytroidní 2) nejsou prozatím úplně jasné. Ale výsledky studie vykazují, že rychlejší vznik GSH je právě po aktivaci transkripčního faktoru Nrf2 (Ogasawara, 2014). Ve studii Nzengue et al 2012 testovali účinek po působení 0-30 μM Cd a 24hod inkubaci na krysí gliální buněčnou linii C6. Hodnocení viability buněk bylo prováděno prostřednictvím testu MTT, kde se stanovoval celkový GSH. Mechanismy, které jsou součástí toxicity indukované Cd nejsou prozatím zcela jasné. Jejich pochopení je velmi důležité pro prevenci, předpověď toxických vlivů, a také pro zajištění léčebných postupů po intoxikaci právě Cd. Tento výzkum byl zaměřen na studium působení Cd vzhledem k produkci samotného ROS nebo pomocí změny homeostázy jednotlivých kovů způsobenou Cd, zejména se jedná o Zn a Cu. Oxidační stres může být způsoben zvýšením hladin esenciálních kovů jako je Zn a Cu. Letální dávka pro snížení 50% životaschopnosti buněk byla stanovena na 20 μM Cd, při této testované koncentraci došlo k poklesu GSH na $22,86 \pm 1,01 \mu\text{mol/g}$ proteinu. Po expozici 25 μM Cd na buňky C6 došlo k poklesu viability buněk na přibližně 30 %. Studie prokázala, že vystavením buněk C6 s 20 μM Cd může dojít ke změně redoxního stavu buněk a následně k vytvoření oxidačního stresu probíhající buď pomocí Zn, Cu nebo samostatně (Nzengue, 2012).

Druhým hlavním bodem našeho testování, na které jsme se v práci zaměřili, je sledování dehydrogenázové aktivity na buněčné linii Jurkat po expozici HgCl_2 . V porovnání s kontrolními buňkami nebyly nalezeny významnější změny dehydrogenázové aktivity po 24hod inkubaci buněk Jurkat po působení 5 μM HgCl_2 . Po 4hod inkubaci buněk s 25 μM HgCl_2 bylo možno sledovat navýšení hodnot dehydrogenázové aktivity, naopak po 24hod inkubaci došlo k významnému poklesu dehydrogenázové aktivity na hodnotu $82 \pm 3 \%$. Při sledování působení

50 a 100 μM HgCl_2 na buňky Jurkat po dobu 1-6 hod došlo ke 100% úbytku dehydrogenázové aktivity. To vyjadřuje skutečnost, že hodnoty dehydrogenázové aktivity nedosáhly detekovatelné meze. Pouze po 24hod inkubaci buněk s testovanými koncentracemi 50 a 100 μM HgCl_2 nedošlo k detekci 100 % deplece dehydrogenázové aktivity ve spojitosti s kontrolními buňkami. Po expozici buněk Jurkat s 50 μM HgCl_2 hodnota dehydrogenázové aktivity klesla na $5 \pm 4 \%$ a po vystavení 100 μM HgCl_2 na $5 \pm 2 \%$.

Ve studii Guzzi et al 2012 byla buněčná linie Jurkat vystavena EtHg, MeHg a HgCl_2 . Pozorovali viabilitu buněk Jurkat po expozici 20-100 μM HgCl_2 prostřednictvím metody založené na MTT po 48hod inkubaci. Všechny testované koncentrace HgCl_2 významně nezměnily buněčnou viabilitu, naopak po expozici 1 μM EtHg na buňky Jurkat bylo detekováno signifikantní snížení na 25 % v porovnání s kontrolními buňkami. Významný pokles buněk Jurkat byl stanoven po expozici 50 μM MeHg na hodnotu 33 % (Guzzi, 2012). Pro náš experiment byl vybrán test WST-1, proto se detekované hodnoty mohly lišit. Dehydrogenázová aktivita byla detekována redukcí resazurinu u diferenciovaných buněk primárních lidských neurálních buněk (LUHMES), a také u buněčné linie lidských astrocytů (CCF-STTG1). V této studii byly porovnávány účinky HgCl_2 , MeHgCl a thiomersalu. Buněčná linie LUHMES byla inkubována s koncentrací 5-35 μM HgCl_2 na 24 hod, naopak buňky CCF-STTG1 byly testovány s 50-200 μM HgCl_2 po dobu 48 hod. Po 24hod inkubaci buněk LUHMES s MeHgCl a thiomersalem došlo ke snížení dehydrogenázové aktivity v 26-30krát nižších koncentracích ve srovnání s anorganickým HgCl_2 . Podobné výsledky byly detekovány i u buněk CCF-STTG1. Signifikantní pokles byl detekován u buněčné linie LUHMES po expozici s 25-35 μM HgCl_2 , kdy po působení koncentrace 25 μM HgCl_2 klesla hodnota GSH přibližně na 50 % ve srovnání s kontrolními buňkami. Tato hodnota se blíží k naší detekované koncentraci GSH u buněk Jurkat odpovídající hodnotě $82 \pm 3 \%$. U buněčné linie CCF-STTG1 byl stanoven signifikantní pokles koncentrace GSH po 48hod inkubaci se 125-200 μM HgCl_2 . Po expozici buněk CCF-STTG1 se 100 μM HgCl_2 nedošlo téměř k žádnému ovlivnění koncentrace GSH, což nekoreluje s našimi výsledky. Studie ukazuje, že cytotoxické poškození indukované nižšími koncentracemi Hg je náchylnější více u buněk LUHMES než u buněčné linie CCF-STTG1 po působení všech forem Hg. V astrocytech se běžně nachází větší množství GSH než v neuronech, nejspíš proto u buněčné linie LUHMES probíhá ve větším množství oxidativní stres způsobený Hg. Následně dochází k poruše lysozomů, a po dlouhodobém vystavení HgCl_2 dochází k nárůstu toxicity, ale toxin HgCl_2 nezapříčinil apoptózu u obou typů buněk (Lohren, 2015).

Dále jsme se v práci zaměřili na sledování koncentrace GSH na buněčné linii Jurkat po expozici HgCl₂. Po expozici 25 μM HgCl₂ nastalo významné snížení GSH po 2hod inkubaci na hodnotu 52 ± 5 %, následně došlo k navýšení koncentrace, kdy nejvyšší hodnota byla detekována po 24 hod na 82 ± 3 %. Po inkubaci buněk s 50 μM HgCl₂ hladina GSH byla snížena po 24 hod na hodnotu 19 ± 5 % vzhledem ke kontrolním buňkám. Při inkubaci buněčné linie Jurkat se 100 μM HgCl₂ byly všechny časové intervaly detekovány jako 100% deplece koncentrace GSH, pouze po 24hod inkubaci nedošlo ke 100 % depleci hladiny GSH (2 ± 5 %).

Z důvodu nedostačujícího množství studií zaměřených na buněčnou linii Jurkat jsme k porovnání detekovaných koncentrací GSH zvolili studii Olivieri et al 2001, která se zajímala o testování patofyziologických mechanismů v souvislosti s Alzheimerovou chorobou. Stanovovali toxické vlivy HgCl₂ na vznik oxidačního stresu, produkci β-amyloidu nebo buněčnou cytotoxicitu s využitím buněčného modelu SH-SY5Y. Koncentrace GSH byla detekována prostřednictvím kapilární elektroforézy, buňky SH-SY5Y byly ošetřeny 1-5000 μg/L HgCl₂. Byla detekována cytotoxicita již po expozici 10 μg/L (36 nM) HgCl₂ až po testovanou koncentraci 5 000 μg/L (18 μM) HgCl₂. Hned po 30 min inkubace buněk SH-SY5Y s 50 μg/L (180 nM) HgCl₂ došlo ke snížení intracelulární hladiny GSH o 30 % v porovnání s kontrolními buňkami. Následně bylo detekováno navýšení koncentrace GSH v buňkách neuroblastomu na srovnatelnou úroveň s kontrolními buňkami po 60-180 min inkubaci (Olivieri, 2001). V našem experimentu došlo k významnému snížení GSH po 2hod inkubaci buněk Jurkat s 25 μM HgCl₂ a následně bylo detekováno rovněž navýšení koncentrace GSH, kdy nejvyšší hodnota byla detekována po 24 hod. Účinnost zvolené koncentrace HgCl₂ má závislost na úbytek hladiny GSH, rostoucí koncentrace HgCl₂ indikuje zvýšený pokles hladiny GSH. Signifikantní snížení hladiny GSH bylo detekováno po vystavení buněk SH-SY5Y s 60 a 120 μg/L HgCl₂ (Olivieri, 2001). V další studii Lee et al 2001 sledovali působení vzniklých ROS a hladiny GSH v lidské gliomové linii A172. Kromě jiného také zkoumali, jestli antioxidanty mohou zamezit apoptóze indukované HgCl₂, z důvodu spojitosti peroxidace lipidů a poklesu viability buněk po vystavení HgCl₂. K hodnocení životaschopnosti buněk byla použita metoda založená na redukci tetrazoliové soli MTT. Při nižším množství redukovaného MTT byla pozorována skutečnost, kdy došlo k poklesu viability buněk v závislosti na zvolené koncentraci HgCl₂. Po dobu 1 hod byly buňky A172 inkubovány po přidání 0-50 μM HgCl₂, konkrétně po expozici 20, 30 a 50 μM HgCl₂ bylo detekováno snížení životaschopnosti těchto buněk. Ve srovnání s kontrolními buňkami byl pozorován pokles životaschopnosti buněk o 59 % a hladiny GSH o 34 %, a to po dokončení

inkubace buněk s 10 mM HgCl₂. Díky detekovaným výsledkům nebyla prokázána spojitost mezi deplecí koncentrace GSH a viabilitou buněk A172. Z této studie vyplývá, že spotřebovaný endogenní GSH sám o sobě nezpůsobí pokles viability buněk po působení HgCl₂ u buněčné linie A172 (Lee, 2001).

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo stanovení cytotoxicity CdCl_2 a HgCl_2 *in vitro* na suspenzní buněčné linii Jurkat. Pro testování cytotoxicity těžkých kovů jsme nejdříve vybrali nejvhodnější buněčnou linii, která nejlépe charakterizuje jejich toxické působení. Testovali jsme tři buněčné linie HL-60, Jurkat a Raji po 24hod inkubaci s CdCl_2 . Jako nejvhodnější linie byla vybrána buněčná linie Jurkat, a to z důvodu pozoruhodných změn hladin GSH a dehydrogenázové aktivity. Dále jsme zjišťovali nejvhodnější koncentrace CdCl_2 a HgCl_2 pro sledování jejich cytotoxického působení. K tomu byla využita zvolená buněčná linie Jurkat. Jako nejzajímavější koncentrace pro sledování cytotoxicity CdCl_2 a HgCl_2 byly zvoleny hodnoty koncentrací 25, 50 a 100 μM , a to v případě obou sledovaných těžkých kovů. Pro detailnější hodnocení cytotoxicity vybraných těžkých kovů jsme stanovili hladinu dehydrogenázové aktivity a následně intracelulární koncentraci glutathionu u buněčné linie Jurkat v kratších časových intervalech 1-6 hod.

V závěru diplomové práce můžeme shrnout nejvýznamnější naměřené výsledky. Po 24hod inkubaci buněk Jurkat s 5-25 μM CdCl_2 a HgCl_2 nedochází k signifikantním změnám dehydrogenázové aktivity. Po 24hod expozici buněk se 100 μM CdCl_2 došlo k nejvýznamnějšímu poklesu dehydrogenázové aktivity indukované kadmíem. Po 5hod inkubaci buněk Jurkat s 25 a 50 μM CdCl_2 došlo k signifikantnímu zvýšení hladiny GSH na hodnotu $152 \pm 14 \%$ (u 25 μM) a $127 \pm 6 \%$ (u 50 μM). Při testování buněčné linie Jurkat s koncentracemi 50 a 100 μM HgCl_2 byla detekována úplná deplece dehydrogenázové aktivity v časových intervalech 1-6 hod, pouze po 24hod inkubaci buněk s 50 a 100 μM HgCl_2 hodnota dehydrogenázové aktivity klesla u obou koncentrací HgCl_2 o 95 % v porovnání s kontrolními buňkami. Při inkubaci buněčné linie Jurkat se 100 μM HgCl_2 byly všechny časové intervaly detekovány jako 100% deplece intracelulární hladiny GSH.

Kromě toho jsme zjistili, že těžký kov HgCl_2 je ve stejně zvolených koncentracích zřetelně toxičtější než CdCl_2 . Rovněž jsme sledovali pozoruhodný jev, kdy po inkubaci buněk Jurkat s CdCl_2 a HgCl_2 došlo k dočasnému zvýšení dehydrogenázové aktivity a koncentrace glutathionu. Nejspíše nastala buněčná reakce na rostoucí oxidační stres. K následnému potvrzení je nutné tuto problematiku dále studovat.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ABRAHAM, Robert T., Arthur WEISS, Steven R. HEAD, Daniel R. SALOMON, et al **Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm.** Nature Reviews Immunology. **2004**, 4(4), 301-308. ISSN 1474-1733. *Doi:10.1038/nri1330*
2. ACHANZAR, William E., Karen B. ACHANZAR, James G. LEWIS, Mukta M. WEBBER, et al **Cadmium Induces c-myc, p53, and c-jun Expression in Normal Human Prostate Epithelial Cells as a Prelude to Apoptosis.** Toxicology and Applied Pharmacology. **2000**, 164(3), 291-300. ISSN 0041008X. *Doi:10.1006/taap.1999.8907*
3. ACHANZAR, William E., Mukta M. WEBBER, Michael P. WAALKES. **Altered apoptotic gene expression and acquired apoptotic resistance in cadmium-transformed human prostate epithelial cells.** The Prostate. **2002**, 52(3), 236-244. ISSN 0270-4137. *Doi:10.1002/pros.10106*
4. AL OSMAN, Muwaffak, Fei YANG, Isaac Yaw MASSEY. **Exposure routes and health effects of heavy metals on children.** BioMetals. **2019**, 32(4), 563-573. ISSN 0966-0844. *Doi:10.1007/s10534-019-00193-5*
5. ARARAGI, Saeko, Masuo KONDOH, Masaki KAWASE, Sayaka SAITO, et al **Mercuric chloride induces apoptosis via a mitochondrial-dependent pathway in human leukemia cells.** Toxicology. **2003**, 184(1), 1-9. ISSN 0300483X. *Doi:10.1016/S0300-483X(02)00443-2*
6. BAGCHI D., S. S. JOSHI, M. BAGCHI, J. BALMOORI , et al **Cadmium and chromium induced oxidative stress, DNA damage, and apoptotic cell death in cultured human chronic myelogenous leukemic K562 cells, promyelocytic leukemic HL-60 cells, and normal human peripheral blood mononuclear cells.** J Biochem Mol Toxicol. **2000**; 14(1), 33-41. PMID: 10561080. *Doi: 10.1002/(sici)1099-0461(2000)14:1<33::aid-jbt5>3.0.co;2-y*
7. BAL-PRICE, Anna, Francesca PISTOLLATO, Magdalini SACHANA, Stephanie K. BOPP, et al **Strategies to improve the regulatory assessment of developmental neurotoxicity (DNT) using in vitro methods.** Toxicology and Applied Pharmacology. **2018**, 354(4), 7-18. ISSN 0041008X. *Doi:10.1016/j.taap.2018.02.008*
8. BARRETINA, Jordi, Giordano CAPONIGRO, Nicolas STRANSKY, Kavitha VENKATESAN, et al **The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity.** Nature. **2012**, 483(7391), 603-607. ISSN 0028-0836. *Doi:10.1038/nature11003*
9. BAUST, John M., Gertrude Case BUEHRING, Lia CAMPBELL, Eugene ELMORE, et al **Best practices in cell culture: an overview.** International Journal of Cancer. **2017**, 53(8), 669-672. ISSN 1071-2690. *Doi:10.1007/s11626-017-0177-7*
10. BENSEFA-COLAS, L., P. ANDUJAR, A. DESCATHA. **Intoxication par le mercure.** La Revue de Médecine Interne. **2011**, 32(7), 416-424. ISSN 02488663. *Doi:10.1016/j.revmed.2009.08.024*
11. BERNHOFT, Robin A. **Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature.** Journal of Environmental and Public Health. **2012**, 2012, 1-10. ISSN 1687-9805. *Doi:10.1155/2012/460508*
12. BHATIA, Saurabh, Tanveer NAVED, Satish SARDANA. **Introduction to animal tissue culture science.** Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, Volume 3. IOP Publishing, **2019**, 2019. ISBN 978-0-7503-1347-6. *Doi:10.1088/2053-2563/aafac0ch1*

13. BINDU A., Hima, B. SRILATHA, Sunil C. KAUL. **Potency of Various Types of Stem Cells and their Transplantation.** Biogerontology. **2011**, 01(03), 103-121. ISSN 21577633. *Doi:10.4172/2157-7633.1000115*
14. BLANUSA, Maja, Veda M. VARNAI, Martina PIASEK, Krista KOSTIAL. **Chelators as Antidotes of Metal Toxicity: Therapeutic and Experimental Aspects.** Current Medicinal Chemistry. **2005**, 12(23), 2771-2794. ISSN 09298673. *Doi:10.2174/092986705774462987*
15. BORGMANN, Kathleen, Howard E. GENDELMAN, Anuja GHORPADE. **Isolation and HIV-1 Infection of Primary Human Microglia From Fetal and Adult Tissue.** Human Retrovirus Protocols. New Jersey: Humana Press, **2005**, 049-070. ISBN 1-59259-907-9. *Doi:10.1385/1-59259-907-9:049*
16. BOVIO, Federica, Pasquale MELCHIORETTO, Matilde FORCELLA, Paola FUSI et al **Cadmium promotes glycolysis upregulation and glutamine dependency in human neuronal cells: An in vitro approach.** Neurochemistry International. **2021**, 149(4), 267-278. ISSN 01970186. *Doi:10.1016/j.neuint.2021.105144*
17. BRANCA, Jacopo J.V., Gabriele MORUCCI, Mario MARESCA, Barbara TENCI et al **Selenium and zinc: Two key players against cadmium-induced neuronal toxicity.** Toxicology in Vitro. **2018**, 48, 159-169. ISSN 08872333. *Doi:10.1016/j.tiv.2018.01.007*
18. CAPES-DAVIS, Amanda, George THEODOSOPOULOS, Isobel ATKIN, Hans G. DREXLER, et al **Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines.** International Journal of Cancer. **2010**, 127(1), 1-8. ISSN 00207136. *Doi:10.1002/ijc.25242*
19. CUI, Zheng-Guo, Kanwal AHMED, Syed Faisal ZAIDI, Jibrán Sualeh MUHAMMAD. **Ins and outs of cadmium-induced carcinogenesis: Mechanism and prevention.** Cancer Treatment and Research Communications. **2021**, 27(3), 236-244. ISSN 24682942. *Doi:10.1016/j.ctarc.2021.100372*
20. ČAPEK, Jan, Martina HAUSCHKE, Lenka BRŮČKOVÁ, Tomáš ROUŠAR. **Comparison of glutathione levels measured using optimized monochlorobimane assay with those from ortho-phthalaldehyde assay in intact cells.** Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. **2017**, 88, 40-45. ISSN 10568719. *Doi:10.1016/j.vascn.2017.06.001*
21. DIRKS, Wilhelm G., Hans G. DREXLER, Kanami YAMAZAKI, Tomoki NAKAMURA, et al **STR DNA Typing of Human Cell Lines: Detection of Intra- and Interspecies Cross-Contamination.** Basic Cell Culture Protocols. Totowa, NJ: Humana Press, **2013**, 2013-10-11, 4(3), 27-38. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-62703-127-1. ISSN 1535-7163. *Doi:10.1007/978-1-62703-128-8_3*
22. DREXLER, Hans G. **Guide to Leukemia-Lymphoma Cell Lines**, 2nd ed.; eBook: Braunschweig, Germany, **2010**.
23. DREXLER, Hans G., Hilmar QUENTMEIER. **The LL-100 Cell Lines Panel: Tool for Molecular Leukemia–Lymphoma Research.** International Journal of Molecular Sciences. **2020**, 21(16). ISSN 1422-0067. *Doi:10.3390/ijms21165800*
24. DREXLER, Hans G., Roderick A.F. MACLEOD. **History of leukemia-lymphoma cell lines.** Human Cell. **2010**, 23(3), 75-82. ISSN 09147470. *Doi:10.1111/j.1749-0774.2010.00087.x*

25. DREXLER, Hans G., Roderick A.F. MACLEOD. **Leukemia-lymphoma cell lines as model systems for hematopoietic research: Tool for Molecular Leukemia–Lymphoma Research.** *Annals of Medicine.* **2013**, 35(6), 404-412. ISSN 0785-3890. *Doi:10.1080/07853890310012094*
26. DREXLER Hans G., S.M. GIGNAC, J. MINOWADA. **Hematopoietic cell lines.** In: Hay RJ, Gazdar R, Park JG, eds. *Atlas of Human Tumor Cell Lines.* Orlando, FL: Academic Press, **1994**; 213–50.
27. DU, Lin, Fakhri MAHDI, Mika B. JEKABSONS, Dale G. NAGLE, et al **Mammea E/BB, an Isoprenylated Dihydroxycoumarin Protonophore That Potently Uncouples Mitochondrial Electron Transport, Disrupts Hypoxic Signaling in Tumor Cells.** *Journal of Natural Products.* **2010**, 73(11), 1868-1872. ISSN 0163-3864. *Doi:10.1021/np100501n*
28. DUNCAN, Emma L., Renu WADHWA, Sunil C. KAUL, Zidie LUO, et al **Toxicity of mercury: Molecular evidence.** *Biogerontology.* **2020**, 1(2), 103-121. ISSN 13895729. *Doi:10.1023/A:1010000132671*
29. FENG, Yuan, Yanwu LI, Di ZHOU, Bingxin LI, et al **Glycyrrhetic acid reverses antibiotic-induced intestinal epithelial injury through RNA-binding protein human antigen R (HuR): a review.** *Phytomedicine.* **2022**, 94(3), 344-350. ISSN 09447113. *Doi:10.1016/j.phymed.2021.153836*
30. GARNETT, Mathew J., Elena J. EDELMAN, Sonja J. HEIDORN, Chris D. GREENMAN, et al **Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells.** *Nature.* **2012**, 483(7391), 570-575. ISSN 0028-0836. *Doi:10.1038/nature11005*
31. GARTLER S.M. **Genetic markers as tracers in cell culture.** *Natl Cancer Inst Monogr.* **1967** Sep;26:167-95. PMID: 4864103.
32. GENCHI, Giuseppe, Maria Stefania SINICROPI, Graziantonio LAURIA, Alessia CAROCCI, et al **The Effects of Cadmium Toxicity.** *International Journal of Environmental Research and Public Health.* **2020**, 17(11). ISSN 1660-4601. *Doi:10.3390/ijerph17113782*
33. GIOIA, Louis, Azeem SIDDIQUE, Steven R. HEAD, Daniel R. SALOMON, et al **A genome-wide survey of mutations in the Jurkat cell line.** *BMC Genomics.* **2018**, 19(1). ISSN 1471-2164. *Doi:10.1186/s12864-018-4718-6*
34. GLINSKI, Andressa, Tugstênio LIMA DE SOUZA, Jessica ZABLOCKI DA LUZ, Arandi Ginane BEZERRA JUNIOR et al **Toxicological effects of silver nanoparticles and cadmium chloride in macrophage cell line (RAW 264.7): An in vitro approach.** *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* **2021**, 68(4), 267-278. ISSN 0946672X. *Doi:10.1016/j.jtemb.2021.126854*
35. GUZZI, Gianpaolo, Paolo D. PIGATTO, Francesco SPADARI, Caterina A.M. LA PORTA. **Effect of thimerosal, methylmercury, and mercuric chloride in Jurkat T Cell Line.** *Interdisciplinary Toxicology.* **2012**, 5(3), 159-161. ISSN 1337-9569. *Doi:10.2478/v10102-012-0026-1*
36. HAO, Changfu, Weidong HAO, Xuetao WEI, Lina XING, et al **The role of MAPK in the biphasic dose-response phenomenon induced by cadmium and mercury in HEK293 cells.** *Toxicology in Vitro.* **2009**, 23(4), 660-666. ISSN 08872333. *Doi:10.1016/j.tiv.2009.03.005*
37. HARADA, Masazumi. **Congenital Minamata disease: Intrauterine methylmercury poisoning.** *Teratology.* **1978**, 18(2), 285-288. ISSN 0040-3709. *Doi:10.1002/tera.1420180216*

38. HARADA, Masazumi, Junko NAKANISHI, Eiichi YASODA, Maria da CONCEIÇÃO N PINHEIRO, et al **Mercury pollution in the Tapajos River basin, Amazon: Mercury level of head hair and health effects.** *Environment International*. **2001**, 27(4), 285-290. ISSN 01604120. *Doi:10.1016/S0160-4120(01)00059-9*
39. HAYFLICK, L. **The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains.** *Experimental Cell Research*. **1965**, 37(3), 614-636. ISSN 00144827. *Doi:10.1016/0014-4827(65)90211-9*
40. HELM, M., S. A. B. RIEDL, K. GOLLNER, U. GOLLNER, et al **Isolation of primary human B lymphocytes from tonsils compared to blood as alternative source for ex vivo application: primary human glial cells.** *Journal of Chromatography B. Elsevier*, **2021**, 2018, 1179, 273-283. *Handbook of Clinical Neurology*. ISBN 9780444636393. ISSN 15700232. *Doi:10.1385/1-59259-907-9:049*
41. HUANG, Xiao-Chao, Le JIN, Meng WANG, Dong LIANG, Zhen-Feng CHEN, et al **Design, synthesis and in vitro evaluation of novel dehydroabiatic acid derivatives containing a dipeptide moiety as potential anticancer agents.** *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2015**, 89, 370-385. ISSN 02235234. *Doi:10.1016/j.ejmech.2014.10.060*
42. JIANG, Jing, Brian A. MCCOOL, Alan R. PARRISH. **Cadmium- and Mercury-Induced Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression in Immortalized Proximal Tubule Cells: Evidence for a Role of Decreased Transforming Growth Factor- β 1.** *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2002**, 179(1), 13-20. ISSN 0041008X. *Doi:10.1006/taap.2001.9345*
43. JOO, Kyung-Mi, Seolyeong KIM, Ye Ji KOO, Miri LEE. **Development and validation of UPLC method for WST-1 cell viability assay and its application to MCTT HCE™ eye irritation test for colorful substances.** *Toxicology in Vitro*. **2019**, 60, 412-419. ISSN 08872333. *Doi:10.1016/j.tiv.2019.06.017*
44. KARPOVA, M. B., J. SCHOUmans, I. ERNBERG, J.-I. HENTER, et al **Raji revisited: cytogenetics of the original Burkitt's lymphoma cell line.** *Leukemia*. **2005**, 19(1), 159-161. ISSN 0887-6924. *Doi:10.1038/sj.leu.2403534*
45. KASPER, Cornelia, Verena CHARWAT, Antonina LAVRENTIEVA. **Cell Culture Technology.** Cham: Springer International Publishing, **2018**. Learning Materials in Biosciences. ISBN 978-3-319-74853-5. *Doi:10.1007/978-3-319-74854-2*
46. KLAASSEN, Curtis D., Jie LIU. **Role of Metallothionein in Cadmium-Induced Hepatotoxicity and Nephrotoxicity.** *Drug Metabolism Reviews*. **2010**, 29(1-2), 79-102. ISSN 0360-2532. *Doi:10.3109/03602539709037574*
47. KOEFFLER, H.P., D.W. GOLDE. **Human myeloid leukemia cell lines: a review.** *Blood*. **1980**, 56(3), 344-350. ISSN 0006-4971. *Doi:10.1182/blood.V56.3.344.344*
48. KOLIPINSKI, Mietek, Mani SUBRAMANIAN, Kristina KRISTEN, Steven BORISH et al **Sources and Toxicity of Mercury in the San Francisco Bay Area, Spanning California and Beyond.** *Journal of Environmental and Public Health*. **2020**, 2020, 1-17. ISSN 1687-9805. *Doi:10.1155/2020/8184614*
49. KONDOH, Masuo, Saeko ARARAGI, Katsuya SATO, Minoru HIGASHIMOTO, et al **Cadmium induces apoptosis partly via caspase-9 activation in HL-60 cells.** *Toxicology*. **2002**, 170(1-2), 111-117. ISSN 0300483X. *Doi:10.1016/S0300-483X(01)00536-4*

50. LAWAL, Akeem O., Elizabeth M. ELLIS. **Phospholipase C Mediates Cadmium-Dependent Apoptosis in HEK 293 Cells.** *2012*, 110(6), 510-517. ISSN 17427835. *Doi:10.1111/j.1742-7843.2011.00843.x*
51. LAWAL, Akeem Olalekan, Elizabeth ELLIS, Zheng-Bing GUAN, Jie-Ming ZHAO, et al **Differential sensitivity and responsiveness of three human cell lines HepG2, 1321N1 and HEK 293 to cadmium.** *The Journal of Toxicological Sciences.* **2010**, 35(4), 465-478. ISSN 0388-1350. *Doi:10.2131/jts.35.465*
52. L'AZOU, B., I. DUBUS, C. OHAYON-COURTÈS, J. CAMBAR, Ling TANG et al **Human glomerular mesangial IP15 cell line as a suitable model for in vitro cadmium cytotoxicity studies.** *Cell Biology and Toxicology.* **2007**, 23(4), 267-278. ISSN 0742-2091. *Doi:10.1007/s10565-006-0888-0*
53. LEE, Young Woo, Mi Suk HA, Yong Keun KIM. **Role of reactive oxygen species and glutathione in inorganic mercury-induced injury in human glioma cells.** *Neurochemical Research.* **2001**, 26(11), 1187-1193. ISSN 03643190. PMID: 11874199. *Doi:10.1023/A:1013955020515*
54. LIU, Qiling, Rongqiang ZHANG, Xiang WANG, Xiangli SHEN, et al **Effects of sub-chronic, low-dose cadmium exposure on kidney damage and potential mechanisms.** *Annals of Translational Medicine.* **2019**, 7(8), 177-177. ISSN 23055839. *Doi:10.21037/atm.2019.03.66*
55. LLOBET, Laura, Julio MONTOYA, Ester LÓPEZ-GALLARDO, Eduardo RUIZ-PESINI, et al **Side Effects of Culture Media Antibiotics on Cell Differentiation.** *Tissue Engineering Part C: Methods.* Elsevier, **2015**, 2017, 21(11), 1143-1147. ISBN 9780128030776. ISSN 1937-3384. *Doi:10.1089/ten.tec.2015.0062*
56. LOHREN, Hanna, Lara BLAGOJEVIC, Romy FITKAU, Franziska EBERT, et al **Toxicity of organic and inorganic mercury species in differentiated human neurons and human astrocytes.** *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* **2015**, 32, 200-208. ISSN 0946672X. *Doi:10.1016/j.jtemb.2015.06.008*
57. LORENZI, Philip L., William C. REINHOLD, Sudhir VARMA, Amy A. HUTCHINSON, et al **WEINSTEIN. DNA fingerprinting of the NCI-60 cell line panel.** *Molecular Cancer Therapeutics.* **2009**, 8(4), 713-724. ISSN 1535-7163. *Doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0921*
58. LUIZON, Marcelo R., Walter L. ECKALBAR, Yao WANG, Stacy L. JONES, et al **Genomic Characterization of Metformin Hepatic Response.** *PLOS Genetics.* Elsevier, **2016**, 2017, 12(11), 151-172. ISBN 9780128030776. ISSN 1553-7404. *Doi:10.1371/journal.pgen.1006449*
59. LUNDBERG, Ante S, Scott H. RANDELL, Sheila A. STEWART, Brian ELENBAAS, et al **Immortalization and transformation of primary human airway epithelial cells by gene transfer.** *Oncogene.* **2002**, 21(29), 4577-4586. ISSN 0950-9232. *Doi:10.1038/sj.onc.1205550*
60. MAO, Wei-Ping, Ji-Lin YE, Zheng-Bing GUAN, Jie-Ming ZHAO, et al **Cadmium induces apoptosis in human embryonic kidney (HEK) 293 cells by caspase-dependent and -independent pathways acting on mitochondria.** *Toxicology in Vitro.* **2007**, 21(3), 343-354. ISSN 08872333. *Doi:10.1016/j.tiv.2006.09.004*

61. MARTINEZ-LIARTE, JOSE H., FRANCISCO SOLANO, JOSE A. LOZANO. **Effect of Penicillin-Streptomycin and Other Antibiotics on Melanogenic Parameters in Cultured B16/F10 Melanoma Cells.** *Pigment Cell Research.* Elsevier, **1995**, 2017, 8(2), 83-88. ISBN 9780128030776. ISSN 0893-5785. *Doi:10.1111/j.1600-0749.1995.tb00646.x*
62. MASTERS, John R., Jim A. THOMSON, Bernadette DALY-BURNS, Yvonne A. REID, et al **Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **2001**, 98(14), 8012-8017. ISSN 0027-8424. *Doi:10.1073/pnas.121616198*
63. MATSUO Y, MINOWADA J. **Human leukemia cell lines.** Clinical and theoretical significances. *Hum Cell* **1988**; 1: 263–74. PMID: 2856501.
64. MEZYNSKA, Magdalena, Malgorzata M. BRZÓSKA, Olga P. AJSUVAKOVA. **Environmental exposure to cadmium—a risk for health of the general population in industrialized countries and preventive strategies: A review of toxicological mechanisms and a meta-analysis of epidemiologic studies.** *Environmental Science and Pollution Research.* **2018**, 25(4), 3211-3232. ISSN 0944-1344. *Doi:10.1007/s11356-017-0827-z*
65. MIZEE, Mark Ronald, Marlijn van der POEL, Inge HUITINGA. **Purification of cells from fresh human brain tissue: primary human glial cells.** *Brain Banking.* Elsevier, **2018**, 2018, 273-283. *Handbook of Clinical Neurology.* ISBN 9780444636393. *Doi:10.1016/B978-0-444-63639-3.00019-0*
66. MURAGLIA, Anita, Van Thi NGUYEN, Marta NARDINI, Massimo MOGNI, et al **Culture Medium Supplements Derived from Human Platelet and Plasma: Cell Commitment and Proliferation Support.** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* **2017**, 5. ISSN 2296-4185. *Doi:10.3389/fbioe.2017.00066*
67. NAKATSU, Noriyuki, Yoko YOSHIDA, Kanami YAMAZAKI, Tomoki NAKAMURA, et al **Chemosensitivity profile of cancer cell lines and identification of genes determining chemosensitivity by an integrated bioinformatical approach using cDNA arrays.** *Molecular Cancer Therapeutics.* **2005**, 4(3), 399-412. ISSN 1535-7163. *Doi:10.1158/1535-7163.MCT-04-0234*
68. NAUEN, Ralf, Natascha STUMPF. **Fluorometric Microplate Assay to Measure Glutathione S-Transferase Activity in Insects and Mites Using Monochlorobimane.** *Analytical Biochemistry.* **2002**, 303(2), 194-198. ISSN 00032697. *Doi:10.1006/abio.2002.5578*
69. NELSON-REES, Walter A., Robert R. FLANDERMEYER. **HeLa Cultures Defined.** *Science.* **1976**, 191(4222), 96-98. ISSN 0036-8075. *Doi:10.1126/science.1246601*
70. NEMMICHE, Saïd, Daoudi CHABANE-SARI, Malika KADRI, Pascale GUIRAUD, et al **Cadmium chloride-induced oxidative stress and DNA damage in the human Jurkat T cell line is not linked to intracellular trace elements depletion.** *Toxicology in Vitro.* **2011**, 25(1), 191-198. ISSN 08872333. *Doi:10.1016/j.tiv.2010.10.018*
71. NZENGUE, Yves, Régine STEIMAN, Walid RACHIDI, Alain FAVIER, et al **Oxidative Stress Induced by Cadmium in the C6 Cell Line: Role of Copper and Zinc.** *Biological Trace Element Research.* **2012**, 146(3), 410-419. ISSN 0163-4984. *Doi:10.1007/s12011-011-9265-9*

72. OGASAWARA, Yuki, Yuko TAKEDA, Hazuki TAKAYAMA, Shouichi NISHIMOTO, et al **Significance of the rapid increase in GSH levels in the protective response to cadmium exposure through phosphorylated Nrf2 signaling in Jurkat T-cells.** *Free Radical Biology and Medicine.* **2014**, 69, 58-66. ISSN 08915849. *Doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.005*
73. OLIVIERI, G., Ch. BRACK, F. MÜLLER-SPAHN, H. B. STÄHELIN, et al **Mercury Induces Cell Cytotoxicity and Oxidative Stress and Increases β -Amyloid Secretion and Tau Phosphorylation in SHSY5Y Neuroblastoma Cells: An In Vitro Isopathic Study.** *Journal of Neurochemistry.* **2000**, 74(1), 231-236. ISSN 00223042. *Doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0740231.x*
74. PATNAIK, Rajashree, Rabindra Nath PADHY, Alan R. PARRISH. **Human Umbilical Cord Blood-Derived Neural Stem Cell Line as a Screening Model for Toxicity: Evidence for a Role of Decreased Transforming Growth Factor- β 1.** *Neurotoxicity Research.* **2017**, 31(3), 319-326. ISSN 1029-8428. *Doi:10.1007/s12640-016-9681-x*
75. PERKINS, Archibald S., Jonathan W. FRIEDBERG. **Burkitt Lymphoma in Adults.** *Hematology.* **2008**, 2008(1), 341-348. ISSN 1520-4391. *Doi:10.1182/asheducation-2008.1.341*
76. RENU, Kaviyarasi, Rituraj CHAKRABORTY, Haritha MYAKALA, Rajeshwari KOTI, et al **Molecular mechanism of heavy metals (Lead, Chromium, Arsenic, Mercury, Nickel and Cadmium) - induced hepatotoxicity – A review.** *Chemosphere.* **2021**, 271. ISSN 00456535. *Doi:10.1016/j.chemosphere.2021.129735*
77. RISS, T. L., R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, et al **Cell Viability Assays. Assay Guidance manual.** Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences Bethesda (MD). **2013**, 351-375. PMID: 23805433.
78. SALL, Mohamed Lamine, Abdou Karim Diagne DIAW, Diariatou GNINGUE-SALL, Snezana EFREMOVA AARON et al **Toxic heavy metals: impact on the environment and human health, and treatment with conducting organic polymers, a review.** *Environmental Science and Pollution Research.* **2020**, 27(24), 29927-29942. ISSN 0944-1344. *Doi:10.1007/s11356-020-09354-3*
79. SANDBERG, Rickard, Ingemar ERNBERG. **Assessment of tumor characteristic gene expression in cell lines using a tissue similarity index (TSI).** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **2005**, 102(6), 2052-2057. ISSN 0027-8424. *Doi:10.1073/pnas.0408105102*
80. SEGERITZ, Charis-P., Ludovic VALLIER. *Cell Culture. Basic Science Methods for Clinical Researchers.* Elsevier, **2017**, 2017, 151-172. ISBN 9780128030776. *Doi:10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6*
81. SERAFINI, Mauro, Ilaria PELUSO, Anna RAGUZZINI. **Flavonoids as anti-inflammatory agents.** *Proceedings of the Nutrition Society.* **2010**, 69(3), 273-278. ISSN 0029-6651. *Doi:10.1017/S002966511000162X*
82. SHEN, Jiayi, Xiaochen WANG, Danni ZHOU, Tongyu LI et al **Modelling cadmium-induced cardiotoxicity using human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes.** *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* **2018**, 22(9), 4221-4235. ISSN 1582-1838. *Doi:10.1111/jcmm.13702*

83. SHIN, Sang Phil, Han Chang SOHN, Chang Nam JIN, Jehhee LEE. **Evaluation of the effect of protease inhibitors on the viability of *Miamiensis avidus* using the WST-1 assay.** Parasitology International. **2020**, 76. ISSN 13835769. *Doi:10.1016/j.parint.2020.102093*
84. SCHWARZE, Per E., Per O. SEGLEN, Ester LÓPEZ-GALLARDO, et al **Effects of antibiotics on protein synthesis and degradation in primary cultures of rat hepatocytes.** In Vitro. Elsevier, **1981**, 2017, 17(1), 71-76. ISBN 9780128030776. ISSN 0073-5655. *Doi:10.1007/BF02618033*
85. SMITH, Robin P., Walter L. ECKALBAR, Kari M. MORRISSEY, Marcelo R. LUIZON, et al **Genome-Wide Discovery of Drug-Dependent Human Liver Regulatory Elements.** PLoS Genetics. Elsevier, **2014**, 2017, 10(10), 151-172. ISBN 9780128030776. ISSN 1553-7404. *Doi:10.1371/journal.pgen.1004648*
86. STEVENSON, D., D. WOKOSIN, J. GIRKIN, M.H. GRANT, et al **Measurement of the intracellular distribution of reduced glutathione in cultured rat hepatocytes using monochlorobimane and confocal laser scanning microscopy.** Toxicology in Vitro. **2002**, 16(5), 609-619. ISSN 08872333. *Doi:10.1016/S0887-2333(02)00042-5*
87. TAHA, Mona M, Heba MAHDY-ABDALLAH, Eman M SHAHY, Khadiga S IBRAHIM, et al **Impact of occupational cadmium exposure on bone in sewage workers.** International Journal of Occupational and Environmental Health. **2018**, 24(3-4), 101-108. ISSN 1077-3525. *Doi:10.1080/10773525.2018.1518745*
88. TINKOV, Alexey A., Tommaso FILIPPINI, Olga P. AJSUVAKOVA, Margarita G. SKALNAYA, et al **Cadmium and atherosclerosis: A review of toxicological mechanisms and a meta-analysis of epidemiologic studies.** Environmental Research. **2018**, 162(11), 240-260. ISSN 00139351. *Doi:10.1016/j.envres.2018.01.008*
89. TSANGARIS, George Th, Fotini TZORTZATOU-STATHOPOULOU, Malika KADRI, Pascale GUIRAUD, et al **Cadmium induces apoptosis differentially on immune system cell lines.** Toxicology. **1998**, 128(2), 143-150. ISSN 0300483X. *Doi:10.1016/S0300-483X(98)00032-8*
90. UPHOFF, Cord C., Sabine A. DENKMANN, Klaus G. STEUBE, Hans G. DREXLER, et al **Detection of EBV, HBV, HCV, HIV-1, HTLV-I and -II, and SMRV in Human and Other Primate Cell Lines: Detection of Intra- and Interspecies Cross-Contamination.** Journal of Biomedicine and Biotechnology. Totowa, NJ: Humana Press, **2010**, 2013-10-11, 2010(3), 1-23. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-62703-127-1. ISSN 1110-7243. *Doi:10.1155/2010/904767*
91. UPHOFF, Cord C., Hans G. DREXLER, Klaus G. STEUBE, Hans G. DREXLER, et al **Detection of Mycoplasma Contaminations: Detection of Intra- and Interspecies Cross-Contamination.** Basic Cell Culture Protocols. Totowa, NJ: Humana Press, **2013**, 2013-10-11, 2010(3), 1-13. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-62703-127-1. ISSN 1110-7243. *Doi:10.1007/978-1-62703-128-8_1*
92. UPHOFF, Cord C., Claudia POMMERENKE, Sabine A. DENKMANN, Hans G. DREXLER, et al **Screening human cell lines for viral infections applying RNA-Seq data analysis: Detection of Intra- and Interspecies Cross-Contamination.** PLOS ONE. Totowa, NJ: Humana Press, **2019**, 2013-10-11, 14(1), 1-13. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-62703-127-1. ISSN 1932-6203. *Doi:10.1371/journal.pone.0210404*

93. WANG, Jin, Chi-Chun FONG, Chi-Hung TZANG, Peigen XIAO, et al **Gene expression analysis of human promyelocytic leukemia HL-60 cell differentiation and cytotoxicity induced by natural and synthetic retinoids.** Life Sciences. **2009**, 84(17-18), 576-583. ISSN 00243205. *Doi:10.1016/j.lfs.2009.02.001*
94. WANG, Huixia, Shuguang HUANG, Jianyong SHOU, Eric W SU, et al **Comparative analysis and integrative classification of NCI60 cell lines and primary tumors using gene expression profiling data.** BMC Genomics. **2006**, 7(1), 2052-2057. ISSN 1471-2164. *Doi:10.1186/1471-2164-7-166*
95. WÄLCHLI, Chantal, Stephan BAUMGARTNER, Madeleine BASTIDE. **Effect of Low Doses and High Homeopathic Potencies in Normal and Cancerous Human Lymphocytes: An In Vitro Isopathic Study.** The Journal of Alternative and Complementary Medicine. **2006**, 12(5), 421-427. ISSN 1075-5535. *Doi:10.1089/acm.2006.12.421*
96. WINARSKA, Magdalena, Dominika NOWIS, Malgorzata FIRCZUK, Agnieszka ZAGOZDZOM, et al **Selection of an optimal promoter for gene transfer in normal B cells.** Molecular Medicine Reports. **2017**, 16(3), 3041-3048. ISSN 1791-2997. *Doi: 10.3892/mmr.2017.6974*
97. XIE, Zhuoyi, Yingmei ZHANG, Ailing LI, Ping LI, et al **Cd-induced apoptosis was mediated by the release of Ca² from intracellular Ca storage.** Toxicology Letters. **2010**, 192(2), 115-118. ISSN 03784274. *Doi:10.1016/j.toxlet.2009.10.011*
98. YAN, Liang-Jun, Daniel C. ALLEN. **Cadmium-Induced Kidney Injury: Oxidative Damage as a Unifying Mechanism.** Biomolecules. **2021**, 11(11), 510-517. ISSN 2218-273X. *Doi:10.3390/biom11111575*
99. YANG, Lixin, Yuanyuan ZHANG, Feifei WANG, Zidie LUO et al **Toxicity of mercury: Molecular evidence.** Chemosphere. **2020**, 245. ISSN 00456535. *Doi:10.1016/j.chemosphere.2019.125586*