

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Pavla Eliášová

Školitel: RNDr. Jana Maixnerová, Ph.D.

Název diplomové práce: Porovnání *in vitro* metod pro studium cytotoxicity

Lidé jsou vystaveni stále většímu počtu toxických látek z životního prostředí. Chemikálie narušující endokrinní systém (EDC) jsou širokou třídou molekul, u kterých se předpokládá, že způsobují nepříznivé účinky na endokrinní systém tím, že interferují se syntézou, transportem, degradací nebo působením endogenních ligandů.

Jedním z cílů této práce bylo stanovení *in vitro* toxicity 17 vybraných endokrinních disruptorů na buněčné linii lidského hepatocelulárního karcinomu HepG2. Viabilita buněk byla stanovena pomocí kolorimetrické metody CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, jejíž principem je redukce MTS na barevný produkt formazan pomocí mitochondrií v životaschopných buňkách. Cytotoxický potenciál látek byl vyjádřen pomocí toxikologického parametru IC_{50} , který byl měřen ve třech časových intervalech (6, 12 a 24 hodin).

U 14 látek: Atrazin, DHEP, Bisphenol A, Carbofuran, 3-hydroxycarbofuran, Cypermethrin, DDE, DES, MEHP, PCB 118, PCB 153, PFOA, PFOS, Propiconazol bylo stanoveno $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ (resp. $> 250 \mu\text{M}$), což znamená, že tyto látky jsou netoxické na linii HepG2. Za látky cytotoxické lze označit TBT, TPP/TPHP, TDCPP a 3-MC, který byl použit jako standard. Nejvyšší toxicitu vykazoval TBT, jehož IC_{50} bylo $0,1063 \mu\text{M}$ v inkubační době 24 hodin. Toxicita klesá v pořadí TBT > 3-MC > TPP/TPHP > TDCPP.

Buněčné luciferázové reportérové testy jsou klíčovými nástroji pro analýzu interakce s AhR. V druhé experimentální části jsme analyzovali cytotoxicitu a aktivaci AhR vybraných endokrinních disruptorů (Bisphenol A a látka 3-methylcholanthren) pomocí nového sekretovaného konstruktů Metridia luciferase (pMCS-DRE) reagujícího na AhR na HepG2 buněčné linii. Použitou metodou byla Dual-Luciferase® Reporter Assay System.

Experimentálně byla potvrzena možnost měření luminiscence z média za použití buněk transfekovaných konstruktem pMCS-DRE, což pro budoucí výzkum znamená, že je možno v experimentu pokračovat bez lýzy buněk.