

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**POROVNÁNÍ *IN VITRO* METOD PRO STUDIUM
CYTOTOXICITY**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jana Maixnerová, Ph.D.

Hradec Králové 2023

Pavla Eliášová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu“.

.....

Pavla Eliášová

Poděkování

Chtěla bych zde poděkovat všem, kteří mě během studia podporovali, především milovaným rodičům. Zvláštní poděkování bych chtěla věnovat mé školitelce RNDr. Janě Maixnerové Ph.D. za předání všech zkušeností v oblasti výzkumné praxe, za rady, připomínky a čas, který mi během vypracovávání diplomové práce věnovala.

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.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Pavla Eliášová

Supervisor: RNDr. Jana Maixnerová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Comparison of *in vitro* methods for the study of cytotoxicity

People are exposed to a growing number of toxic substances from the environment. Endocrine disrupting chemicals (EDCs) are a broad category of molecules that are thought to cause adverse effects on the endocrine system by interfering with the synthesis, transport, degradation or action of endogenous ligands.

One of the aims of this thesis was to determine the *in vitro* toxicity of 17 selected endocrine disruptors on the human hepatocellular carcinoma HepG2 cell line. Cell viability was determined using the CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay colorimetric method, the principle of which is the reduction of MTS to the colored product formazan by mitochondria in viable cells. The cytotoxic potential of the compounds was expressed by using the toxicological parameter IC₅₀, which was measured in three time intervals (6, 12 and 24 hours).

For 14 substances: Atrazine, DHEP, Bisphenol A, Carbofuran, 3-hydroxycarbofuran, Cypermethrin, DDE, DES, MEHP, PCB 118, PCB 153, PFOA, PFOS, Propiconazole, IC₅₀ > 100 μM (respectively > 250 μM) was determined, indicating that these substances are non-toxic to the HepG2 line. Cytotoxic substances include TBT, TPP/TPHP, TDCPP and 3-MC, which was used as a standard. The highest toxicity was shown by TBT, whose IC₅₀ was 0.1063 μM at an incubation time of 24 hours. Toxicity decreases in the order TBT > 3-MC > TPP/TPHP > TDCPP.

Cellular luciferase reporter assays are key tools for analyzing AhR interaction. In the second experimental part, we analyzed the cytotoxicity and AhR activation of selected endocrine disruptors (Bisphenol A and the substance 3-methylcholanthrene) using a new secreted Metridia luciferase (pMCS-DRE) responding to the AhR on the HepG2 cell line. The method used was the Dual-Luciferase® Reporter Assay System.

The possibility of measuring luminescence from the medium using cells transfected with the pMCS-DRE construct was experimentally confirmed, which for future research means that the experiment can be continued without cell lysis.

Obsah

1	Seznam zkratek.....	1
2	Úvod	4
3	Teoretická část.....	5
3.1	Definice endokrinní disrupce	5
3.2	Nejznámější endokrinní disruptory	6
3.3	Nejznámější mechanismy zásahu do endokrinní regulace.....	6
3.3.1	Nukleární receptory začleněné do endokrinní disrupce.....	8
3.4	Aryl hydrokarbonový receptor (AhR).....	11
3.4.1	Struktura AhR	11
3.4.2	Funkce AhR v toxikologii.....	11
3.4.3	Endokrinní disrupce způsobená AhR.....	12
3.4.3.1	Vliv aktivace AhR na hormonální regulaci.....	12
3.4.3.2	Vliv aktivace AhR na imunitní reakce	12
3.4.3.3	Vliv aktivace AhR na nervovou soustavu	13
3.4.3.4	Vliv aktivace AhR na reprodukční zdraví mužů	14
3.5	Popis vybraných endokrinních disruptorů	14
3.6	Metody studia interakce látek s AhR	16
3.7	Interakce vybraných endokrinních disruptorů s AhR	17
3.8	Test stanovení toxicity (CTA).....	18
3.8.1	MTS test (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay)	18
3.8.2	Dual-Luciferase® Reporter Assay System	19
3.9	Buněčné linie.....	21
3.9.1	HepG2	22
4	Cíl práce.....	23

5	Experimentální část	24
5.1	Použitý materiál	24
5.1.1	Chemikálie	24
5.1.2	Laboratorní vybavení	24
5.1.3	Přístrojové vybavení	25
5.1.4	Buněčná linie HepG2	25
5.1.5	Endokrinní disruptory	26
5.2	Použité metody	29
5.2.1	Příprava fosfátového pufru (PBS).....	29
5.2.2	Příprava testovaných endokrinních disruptorů a 3-MC	29
5.2.3	Příprava buněk HepG2 před pokusem	29
5.2.4	Stanovení cytotoxicity metodou CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	30
5.2.5	Dual-Luciferase® Reporter Assay System	31
6	Výsledky	34
6.1	CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay na buněčné linii HepG2	34
6.2	Dual-Luciferase® Reporter Assay System na buněčné linii HepG2	40
7	Diskuze	43
8	Závěr.....	47
9	Literatura	48

1 Seznam zkratek

3-MC	3-methylcholanthren
AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky (aryl hydrocarbon receptor)
AR	androgenní receptor
AIP	AhR-interacting protein
ARNT	nukleární translokátor AhR
ATP	adenosin trifosfát
BPA	Bisphenol A
CAR	konstitutivní androstanový receptor (constitutive androstane receptor)
DC	dendritická buňka
DDE	Dichlorodifenylchloroethylen
DDT	dichlordifenyltrichlorethan
DEHP	Bis(2-ethylhexyl)ftalát
DES	Diethylstilbestrol
DP	diplomová práce
DMEM	Dulbeccovo a Eaglovo modifikované médium
DMSO	Dimethylsulfoxid
E2	17 β -estradiol
EDCs	Endokrinní disruptory
EER	estrogen-related receptor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
ER	Estrogenový receptor

FICZ	6-formylindolo-(3,2-b)-karbazol
GPER	estrogenový receptor spřažený s G-proteinem
HEB	Hematoencefalická bariéra
HPLC/MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem
HSP90	90KDa heat shock protein
MbRs	membránové receptory
MEHP	Mono-(2-ethylhexyl)ftalát
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl) -2H-tetrazolium
PBS	Fosfátový pufr
PBB	polybromovaný bifenyl
PCB	polychlorovaný bifenyl
PFOA	perfluorooktanová kyselina
PFOS	perfluorooktansulfonová kyselina
PLB	pasivní lyzační pufr
pGL 4.27-DRE	konstrukt se sekretovanou luciferázou světlušek
pMCS-DRE	konstrukt se sekretovanou Metridia luciferázou
PPAR	receptory aktivované proliferátory peroxisomů
PXR	pregnanový receptor X
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RXR	retinoidní receptor X
ROS	reaktivní formy kyslíku
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin

TPHP	trifenyl fosfát
TDCPP	tris(1,3-dichloro-2-propyl)fosfát
THR	receptor hormonů štítné žlázy

2 Úvod

In vitro testy na buněčných modelech jsou významným nástrojem v preklinickém vývoji léků. Oproti *in vivo* zvířecím modelům je testování na *in vitro* buněčných modelech rychlejší, méně finančně nákladné, dále jsou odstraněny genetické, buněčné, anatomické a fyziologické rozdíly. Z etického hlediska se především testuje na *in vitro* modelech a poté až na *in vivo* modelech (Khalil et al. 2020)

Pomocí biomonitoringu (měření přítomnosti chemických látek v tělesných tekutinách a tkáních) bylo prokázáno, že až 100 % lidské populace má v těle přítomné stopy endokrinních disruptorů. (Gore et al., 2014)

Endokrinní disrupce je závažným problémem, který zasahuje do veřejného zdraví a životního prostředí. Endokrinní disruptory lze najít v mnoha výrobcích denního života, jako jsou plasty, kosmetické přípravky či pesticidy, může mít vliv na širokou škálu patologických důsledků. Expozice lidského organismu endokrinními disruptory může mít za následek zásah do endokrinní funkce organismu a mnoho dalších patologických procesů včetně hepatotoxicity. (Yilmaz et al., 2020)

Hepatotoxicita je po kardiotoxicitě druhou nejčastější příčinou stažení léčiva z trhu. Konkordance *in vitro* toxicity s klinickou hepatotoxicitou se pohybuje v rozmezí mezi pouhými 25 % u jednoduchých testů a téměř 80 % u komplexnějších testů a analýz. (Vernetti et al., 2017)

Teoretická část diplomové práce se zabývá seznámením s endokrinní disrupcí, aryl hydrokarbonovým receptorem a použitými testy stanovení toxicity, které jsou použity v experimentální části.

Cílem experimentální části této diplomové práce je stanovit *in vitro* hepatotoxicitu vybraných endokrinních disruptorů v různých koncentracích metodou CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay a zavést test sekretované Metridia luciferázy (pMCS-DRE) pro rychlou a účinnou analýzu aktivace AhR v přechodně transfekovaných buňkách HepG2.

3 Teoretická část

3.1 Definice endokrinní disrupce

Endokrinní disruptory (EDCs) jsou přírodní nebo syntetické látky, které různými mechanismy zasahují do regulace endokrinního systému. Narušují syntézu, sekreci, metabolismus, transport, vazbu na bílkoviny nebo eliminaci hormonů přítomných v těle lidí nebo živočichů, které jsou zodpovědné za vývoj organismu, jeho homeostázu a reprodukční schopnost. Následkem takového zásahu mohou být reprodukční problémy, kancerogeneze, vývojové poruchy, onemocnění štítné žlázy a další patologické stavy. (Diamanti-Kandarakis et al., 2009)

Lidská populace je vystavena působení endokrinních disruptorů skrz konzumaci kontaminované vody a potravin, inhalaci kontaminovaného vzduchu, kontaktem s kůží nebo přenosem z matky na dítě (průchodem přes placentu, popř. laktací). EDCs mají tendenci se v těle kumulovat. (Sabuz Vidal et al., 2021)

Struktura endokrinních disruptorů je velmi heterogenní, nicméně se obecně jedná o malé molekuly (<1000 Daltonů). Ze syntetických látek jsou to průmyslová rozpouštědla a vedlejší produkty jejich syntézy [polychlorované bifenyly (PCB), polybromované bifenyly (PBB)], plasty [bisphenol A (BPA)], plastifikátory (ftaláty), pesticidy [methoxychlor, chlorpyrifos, dichlordifenyiltrichlorethan (DDT)], fungicidy, dříve užívaná léčiva [diethylstilbestrol (DES)]. Z přírodních látek řadíme mezi EDCs některé složky potravin (fytoestrogeny – genistein, kumestrol). (Diamanti-Kandarakis et al., 2009)

Mnoho EDCs napodobuje účinky tělu vlastních hormonů, účinky nemusí být totožné, protože EDCs často využívají jiné kofaktory a výsledné signalizační procesy jsou odlišné od těch fyziologických. EDCs se mohou vázat na více typů receptorů současně a tak indukovat odpovědi přisuzované vícero hormonům najednou. Endokrinním disruptorům je často přisuzován účinek již při velmi nízkých dávkách (v podobném rozmezí jako jsou fyziologické hladiny endogenních hormonů). (Vandenberg, 2014)

3.2 Nejznámější endokrinní disruptory

Bisphenol A (BPA) je základní složkou polykarbonátových plastů, které jsou hojně využívány pro výrobu obalových materiálů nápojů a potravin. Bylo prokázáno, že BPA se z těchto výrobků při kontaktu s potravinou vyextrahuje a následnou konzumací potravin se dostává do lidského organismu. BPA mimo jiné prokazuje estrogenní aktivitu podobnou estradiolu, tím se řadí mezi EDCs. (Kabir et al., 2015)

Ftaláty jsou skupinou endokrinních disruptorů, které se používají jako plastifikátory polyvinylchloridu, přidávají se do složení výrobků za účelem zvýšení poddajnosti plastu a zlepšení vůně. Jsou využívány při výrobě kosmetiky, automobilů, hraček, lékařského vybavení nebo stavebního materiálu. Bylo zjištěno, že ftaláty zasahují do produkce androgenů, což představuje riziko pro vývoj především mužů, ale i žen. S expozicí ftalátů souvisí například abnormality při vývoji pohlavních orgánů u mužů, endometrióza u žen, změna typického chování pro určité pohlaví, redukce počtu spermií či obezita. (Gore et al., 2014)

Za nejsilnější ligand aryl hydrokarbonového receptoru (AhR) se považuje 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), který zprostředkovává široké spektrum toxických účinků. Je velmi potentním induktorem cytochromu P450 1A1, který se podílí na metabolismu xenobiotik. (Corinna Singleman a Nathalia G. Holtzman 2021; Mimura a Fuji-Kuriyama, 2003) Bylo prokázáno, že TCDD má vliv na funkce endokrinního, imunitního, nervového a reprodukčního systému, nepříznivě působí na vývoj lidí a zvířat. Příznaky akutní toxicity je tzv. chlorakné a porfyrie, dále poškození jater, neurotoxicita, průjem a zvracení. S chronickou expozicí TCDD je spojována ateroskleróza, hypertenze, diabetes, kancerogeneze atd. Toxické účinky TCDD jsou známy z Vietnamské války, kdy došlo ke kontaminaci herbicidem Agent Orange. (Ogino et al., 2016)

3.3 Nejznámější mechanismy zásahu do endokrinní regulace

EDCs cílí především na jaderné receptory, které z dlouhodobého hlediska ovlivňují fenotyp buněk, ale působí i na membránové receptory, které poskytují akutnější odpověď. Například Bisphenol A se váže na jaderné estrogenní receptory i na membránový G protein-coupled estrogen receptor (GPER), ke kterému má překvapivě vyšší afinitu než estradiol. (Combarous a Nguyen, 2019)

Mezi mechanismy zásahu do endokrinní regulace patří:

- vazba na receptor a aktivace jeho signální dráhy (tyto EDCs přímo vykazují hormonální aktivitu) (Combarnous a Nguyen, 2019; Cao et al., 2019)
- vazba na receptor a inhibice jeho signální dráhy [EDCs působí antagonisticky; např. Polychlorované bifenyly (PCB), které mohou potlačit transkripci inhibicí vazby trijodtyroninu na receptor hormonů štítné žlázy (THR)] (Combarnous a Nguyen, 2019; Boas et al., 2012)
- interakce EDC se složkami hormonální signální dráhy (EDC interaguje s molekulami, které tvoří signální dráhu po vazbě endogenního hormonu na receptor. Příkladem může být herbicid Atrazin, který inhibuje cAMP-specifickou fosfodiesterázu 4, čímž dochází ke kumulaci cAMP v buňkách) (Combarnous a Nguyen, 2019; Kucka et al., 2012)
- ovlivnění biosyntézy endogenních hormonů (BPA v nízké dávce inhibuje sekreci adiponektinu v adipocytech) (Combarnous a Nguyen, 2019; Hugo et al., 2008)
- ovlivnění degradace endogenních hormonů (parabeny blokují 17β -hydroxysteroid dehydrogenasu, čímž inhibují degradaci estrogenu a potenciálně zvyšují jeho koncentraci v krvi) (Combarnous a Nguyen, 2019; Engeli et al., 2017)
- interakce s transportními proteiny vázajícími hormony (Combarnous a Nguyen, 2019; Sheikh et al., 2016)
- ovlivnění biosyntézy nebo degradace transportních proteinů vázajících hormony (ovlivnění celkové koncentrace hormonu a/nebo jeho volné frakce) (Combarnous a Nguyen, 2019; Boas et al., 2012)
- stimulace exprese hormonálních receptorů (Combarnous a Nguyen, 2019)
- inhibice exprese hormonálních receptorů (Combarnous a Nguyen, 2019)

EDCs působí mnoha výše zmíněnými mechanismy, které upravují genovou expresi aktivací jaderných receptorů, kterými jsou aryl hydrokarbonové receptory (AhR), estrogenové receptory (ER) a receptory aktivované proliferátory peroxisomů (PPAR). Následnou genovou expresí působí mimo jiné imunotoxicky a imunomodulačně skrze T-lymfocyty, B-lymfocyty a dendritické buňky. (Sabuz Vidal et al., 2021)

Většina EDCs působí hlavně skrze jaderné receptory, nicméně membránové receptory (MbRs) jsou také jejich potenciálním místem zásahu. Na ně se mohou vázat buď ortostericky, tj. přes specifické vazebné místo přirozeného ligandu, nebo alostericky s možnou změnou konformace receptoru. Byly pozorovány interakce dichlorodifenylchloroethylenu (DDE), DDT, atrazinu, PCB a dalších EDs s membránovým tyrosin-kinásovým receptorem pro epidermální růstový faktor (EGFR) a následná inhibice konstitutivního androstanového receptoru (CAR), což vede ke změnám v reprodukčních a metabolických orgánech. Dále byla popsána EDCs zprostředkovaná inzulinová rezistence v myších i lidských adipocytech redukcí exprese a stability IRS-1 (inzulin receptor pro substrát-1). (Combarous a Nguyen, 2022)

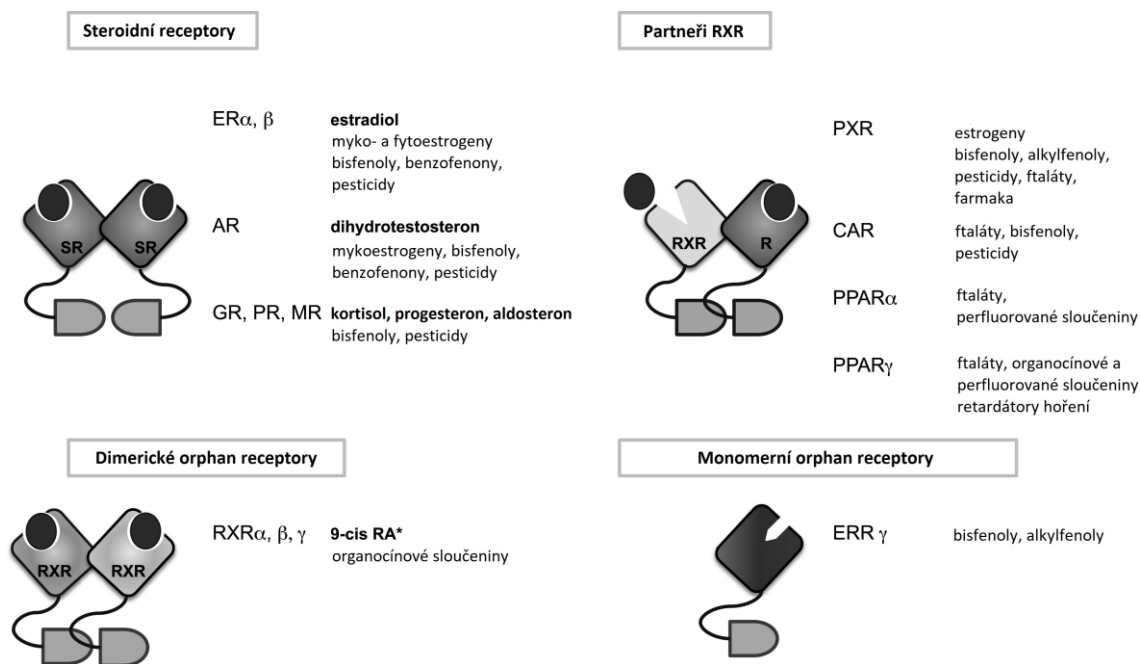
Mezi membránové receptory patří také receptory spřažené s G-proteinem. Nachází se v nervovém, endokrinním a imunitním systému a EDCs na tyto receptory mohou také cílit a doplňovat tak hlavní efekt zprostředkovaný přes jaderné receptory. Například BPA a další EDCs cílí hlavně na jaderné ER, ale jejich účinek může být modifikován vazbou na estrogení membránové receptory např. GPER. (Combarous a Nguyen, 2022)

EDCs také cílí na signalizační kaskádu, která následuje po navázání ligandu na receptor viz. výše. Příkladem může být herbicid Atrazin, který inhibuje cAMP-fosfodiesterázu-4 v hypofýze a Leidigových buňkách. Změny hladin cAMP vedou ke stimulaci uvolňování prolaktinu v hypofýze a produkci androgenů v Leydigových buňkách. Atrazin tak působí jako endokrinní disruptor jak na syntézu hormonů *de novo*, tak na uvolnění hormonů exocytózou, které jsou uloženy v zásobě. (Kucka et al., 2012)

3.3.1 Nukleární receptory začleněné do endokrinní disrupce

Jaderné receptory jsou nejznámějším cílem působení endokrinních disruptorů. (Diamanti-Kandarakis et al., 2009) Endokrinní disruptory působí prostřednictvím následujících jaderných receptorů: estrogenové receptory α a β (ER α a ER β), androgení receptory (AR), pregnanový receptor X (PXR), receptory aktivované proliferátory peroxisomů α a γ (PPAR α , PPAR γ), receptory štítné žlázy α a β (THR α a THR β), retinoidní receptory X (RXR α , RXR β a RXR γ), konstitutivní androstanový receptor (CAR) a estrogen-related receptor γ (ERR γ). Dalšími potenciálními cíli EDCs ze skupiny jaderných receptorů jsou např. mineralokortikoidní nebo glukokortikoidní receptory,

nicméně tato skutečnost byla zatím nedostatečně prozkoumána. (Toporova a Balaguer, 2020) Grafické znázornění některých z těchto receptorů je vyobrazeno na Obr. 1.



Obrázek 1 Hlavní zástupci jaderných receptorů, na které cílí EDCs. Přirozené ligandy těchto receptorů jsou vyznačeny tučně. Převzato a upraveno z: [1-s2.0-S0303720719303673-gr1_lrg.jpg \(3346x1932\) \(els-cdn.com\)](https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105911)

Do skupiny steroidních receptorů můžeme zařadit receptory estrogenní a androgenní. Estrogenní receptory mají 2 subtypy – α a β , jejichž přirozeným ligandem je 17 β -estradiol (E2). Oba typy ER jsou exprimovány v různých typech tkání jako je mléčná žláza, děloha, kosti či kardiovaskulární systém. Estrogeny jsou také klíčovými regulátory hormon-dependentních nádorů prsu, endometria a vaječnicků. (Toporova a Balaguer, 2020; Couse a Korach, 1999). Z řad EDCs mají afinitu k estrogenním receptorům fytoestrogeny genistein a daidzein, pesticidy DDE, plastifikátory Bisphenol A a ftaláty, také konzervační látky jako propyl- nebo butylparaben. Androgenní receptory hrají klíčovou roli ve fyziologických procesech týkajících se mužského reprodukčního systému (iniciace a udržení spermatogeneze), fungování neuroendokrinního systému a růstu prostaty. Přirozenými ligandy jsou dihydrotestosteron, testosteron a androstendion. Bisphenol A a DDE jsou příklady EDCs, které cílí na AR. (Toporova a Balaguer, 2020)

Retinoidní receptory se vyskytují v járech, svalech, kůži a mozku. Endogenním retinoidem je 9-cis-retinová kyselina a další metabolity vitamínu A a EDs cílicími na RXRs jsou organocínové sloučeniny. (Toporova a Balaguer, 2020)

PXR hraje klíčovou roli v regulaci enzymů, účastnících se metabolických dějů a transportu xenobiotik v organismu. Aktivovaný PXR spouští expresi cílových genů jako je cytochrom P450 3A4 a další. PXR hraje důležitou roli v ochraně endokrinního systému před EDCs tím, že detekuje jejich zvýšenou hladinu a aktivuje detoxifikační mechanismy, které brání další interakci ED s jinými nukleárními receptory. Dále byla aktivace PXR spojena s chemorezistencí a růstem a agresivitou rakoviny tlustého střeva a jater. Mezi ligandy PXR patří některé pesticidy, bisfenoly, alkylfenoly atd. (Toporova a Balaguer, 2020; Banerjee et al, 2015) CAR taktéž reguluje ochranné a detoxifikační mechanismy proti vnějším chemikáliím včetně EDCs. CAR je dále zodpovědný za regulaci metabolismu glukózy a lipidů a metabolickou homeostázu. Cílí na něj bisfenoly, ftaláty, pesticidy apod. (Toporova a Balaguer, 2020)

PPAR obecně regulují energetickou homeostázu a metabolismus. Váží se na ně mastné kyseliny a lipidy přijímané z potravy. PPAR γ je hojně exprimován v tukové tkáni a reguluje adipogenezi, metabolismus glukózy a lipidů a také zvyšuje citlivost tkáně a inzulin. Předpokládá se, že narušení regulatorních drah PPAR γ má souvislost se vznikem diabetu. Aktivace PPAR γ pomocí EDC přispívá k obezogení hypotéze, která mimo nerovnováhu mezi příjmem a výdejem kalorií udává jako příčinu obezity vystavení organismu chemikáliím zvaným ‚obezogeny‘, které přímými nebo nepřímými mechanismy zvyšují akumulaci tuku v těle. PPAR mohou být aktivovány např. mono-(2-ethylhexyl)ftalátem (MEHP) nebo perfluorooktanovou kyselinou (PFOA). (Toporova a Balaguer, 2020)

THR mají zásadní roli v normálním růstu, vývoji a metabolismu obratlovců a podílí se na neurogenezi a fungování mozku. Interagují s endogenními hormony štítné žlázy – tyroxinem a trijodtyroninem. Endokrinní disrupce zprostředkovaná bromovanými fenoly, PFOA či halogenovanými bisfenoly může způsobit poruchy vývoje mozku, potíže s reprodukcí, krevním oběhem či hypotyreózu, vzhledem k antagonistickému působení EDCs na THR. (Toporova a Balaguer, 2020; Ghassabian a Trasande, 2018; Coperchini et al., 2017)

ERR jsou homologními receptory ER, nicméně neváží estrogenu, ale hrají klíčovou roli v energetickém metabolismu buněk. ERR γ je označován jako mediátor účinků nízkých dávek EDCs jako je BPA. V mikromolárním množství se na ERR mohou

vázat další xenoestrogeny, pesticidy a fenoly. (Toporova a Balaguer, 2020; Okada et al., 2008)

3.4 Aryl hydrokarbonový receptor (AhR)

3.4.1 Struktura AhR

Aryl hydrokarbonový receptor (AhR) patří do skupiny základních transkripčních faktorů se společnou strukturou helix-smyčka-helix, které jsou zodpovědné za účinky různých chemických látek z životního prostředí. Jeho nejsilnějším ligandem je 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). (Acconcia, Pallottini a Marino, 2015)

AhR je nukleární receptor přítomný v cytosolu v komplexu s 90 KDa heat shock proteinem (HSP90), AHR-interacting proteinem (AIP), ko-chaperonem p23 a c-SRC proteinkinásou, které udržují AhR v klidovém stavu. Interakcí s ligandem se uvolňuje z komplexu AIP a dochází ke změně konformace, přičemž se AhR translokuje do jádra. Následně dojde k disociaci HSP90, nukleární translokátor AhR (ARNT) se naváže na AhR a vytváří komplex AhR/ARNT. (Sabuz Vidal et al., 2021)

3.4.2 Funkce AhR v toxikologii

Aryl hydrokarbonový receptor byl původně identifikován jako intracelulární protein, který zprostředkoval toxické účinky TCDD a podobných sloučenin. Následné studie však zjistily, že AhR hraje důležitou roli v intracelulární homeostáze a patofyziologických procesech a postupně se hromadí důkazy, že AhR může být cílem zásahu léčiv. Z endogenních ligandů AhR můžeme jmenovat 6-formylindolo-(3,2-b)-karbazol (FICZ) a tryptofanové deriváty kynurenin a leukotrieny. (Safe et al., 2020)

Pomocí myších modelů s vyřazeným genem pro expresi AhR bylo zjištěno, že AhR opravdu stojí za zprostředkováním toxicity TCDD a dalších EDCs. Studie s myšmi s vyřazeným nukleárním translokátorem AhR (ARNT) nebyly provedeny, neboť tento zásah byl pro myši embrya letální. Myší modely bez AhR vykazovaly abnormality v mnoha tkáních a orgánech, jako je jaterní fibróza, kardiální hypertrofie, hypertenze, změny v samičích reprodukčních orgánech, rozsáhlé imunitní dysfunkce či neuronální deficit. (Safe et al., 2020)

3.4.3 Endokrinní disrupce způsobená AhR

3.4.3.1 Vliv aktivace AhR na hormonální regulaci

Po expozici směsi AhR ligandů byla u potkaních mláďat pozorována redukce exprese ER v mozku. Dále byly v kůře mozkové pozorovány zvýšené hladiny cytochromu 1B1 a katechol-o-methyltransferázy, které vedou k inaktivaci estrogenů. Výsledky naznačují, že aktivací AhR dochází k postupnému snížení exprese ER a hladin estrogenů v mozku. (Desaulniers et al., 2005)

Aktivace AhR pomocí TCDD má vliv na hypotalamo-hypofyzárně-gonadální osu. Na myších samicích Long-Evans byla po perinatální expozici nízkých dávek TCDD urychlena puberta, vývoj hypotalamo-hypofyzární osy a dospívání. (Kakeyama a Tohyama, 2008) Inhibicí estrogenových drah v mozku zmíněnou výše je silně ovlivněna hypofýza, která je citlivá na změny v hladinách estradiolu (E2). Vzájemné působení AhR a ER má vliv na prolaktin-sekretující buňky a gonadotropiny (buňky sekretující folikuly-stimulující hormon a luteinizační hormon). (Juricek a Coumoul, 2018)

3.4.3.2 Vliv aktivace AhR na imunitní reakce

AhRs jsou exprimovány v různých typech buněk, jejich zvýšená přítomnost je v buňkách imunitního systému, např. v dendritických buňkách, T- a B-lymfocytech. Jejich aktivace působí v organismu imunomodulačně. (Sabuz Vidal et al., 2021)

Účinky spojené s AhR jsou ligandově specifické, což vede k rozdílným odpovědím. Příkladem může být odlišný účinek TCDD a BPA na T-lymfocyty. (Sabuz Vidal et al., 2021)

Narušení cytokinového profilu skrz AhR vede k zánětlivým nebo protizánětlivým změnám v závislosti na ligandu. Někteří autoři konstatují, že rozdíly v účinku ligandů mohou být dány dávkou a rychlostí rozpadu ligandu. BPs mají oproti TCDD výrazně kratší poločas rozpadu, což může být principem opačného účinku na imunitní systém. (Sabuz Vidal et al., 2021)

Co se týče B-lymfocytů, aktivace AhR působí imunotoxicky skrz poškození odpovědi IgM. U myší byla zjištěna inhibice B-lymfocyty indukovaného maturačního

proteinu-1 (Blimp-1), která vede k inhibici diferenciaci B lymfocytů a produkce imunoglobulinů (Ig). (Sabuz Vidal et al., 2021)

Aktivací AhR pomocí TCDD byly zjištěny nežádoucí účinky na brzlík. Většina studií se shodla, že působení TCDD snižuje počet T-lymfocytů a potlačuje vývoj a maturaci lymfocytů. AhR proto hraje významnou roli ve vývoji a diferenciaci T-buněk. Ligandy AhR však vykazují ligandově specifické účinky. Příkladem může být expozice FICZ, která podporuje diferenciaci Th17 buněk stimulací cytokinů, které souvisí s těmito T-buňkami. AhR aktivované pomocí FICZ spouští signalizační dráhy, které zabraňují rozvoji experimentální autoimunitní encefalomyelitidy na myším modelu roztroušené sklerózy. V závislosti na dávce může TCDD potlačovat zánět či autoimunitní odpovědi v myších modelech. (Merrheim, et al., 2020)

3.4.3.3 Vliv aktivace AhR na nervovou soustavu

Expresí AhR byla na myších a dalších zvířecích modelech prokázána fyziologicky v různých oblastech mozku jako je mozková kůra, hipokampus, mozeček, čichový bulbus, hypotalamus a hypofýza. Expresí AhR byla prokázána také následkem traumatu mozku či expozici xenobiotik a EDCs. Funkce aktivace AhR byla studována především za použití organického polutantu TCDD. (Juricek a Coumoul, 2018)

Expozice vysokými dávkami TCDD způsobila u potkanů snížení příjmu potravy, změnu v tělesné konstituci a zvýšení exprese beta-endorfinu (která může souviset s hypofagií) a met-enkefalinu (který reguluje příjem potravy, stejně jako tělesnou teplotu a bolest) v hypothalamu. (Juricek a Coumoul, 2018)

V prostupu EDCs do mozku hraje velkou roli hematoencefalická bariéra (HEB). U dospělých jedinců byla naměřena hladina TCDD v mozku až 100krát nižší než u myších plodů. Stupeň vývoje (ve smyslu prostupnosti HEB) má tedy velkou roli v prostupu EDCs do CNS. (Juricek a Coumoul, 2018)

TCDD dále ukázalo vliv na hladiny neurotransmiterů v mozku myši při expozici od prvního dne gravidity do 30.dne laktace – u myši byly narušeny hladiny dopaminu v mozečku, což vedlo k problémům s učením a hyperaktivní poruše; dále byly ovlivněny hladiny adrenalinu, serotoninu a GABA. Nutno zmínit, že efekt TCDD je pozorován u nízkých dávek, u vyšších dávek TCDD (od dávky 800 ng/kg) není pozorován efekt. Dále

jsou změny pozorovány spíše u mláďat než u dospělých jedinců. (Juricek a Coumoul, 2018)

3.4.3.4 Vliv aktivace AhR na reprodukční zdraví mužů

Efekt ECDs na mužský reprodukční systém lze demonstrovat na příkladech rozsáhlých expozic lidské populace dioxinům, a to v továrně na výrobu herbicidů v Itálii roku 1976, případ Yoshuo s kontaminovaným rýžovým olejem v Japonsku (1968) a Taiwanu (Yucheng 1979) a případ veteránů z amerického letectva, kteří byli vystaveni směsi herbicidu Agent Orange kontaminovanému TCDD ve Vietnamu mezi lety 1962 až 1972. Rozsáhlá exprese AhR v lidských varlatech vysvětluje nežádoucí působení dioxinů na mužskou fertilitu a spermatogenezi. Bylo zjištěno, že největší zásah do mužského zdraví měl TCDD u chlapců během fetálního období až do puberty. U chlapců vystavených TCDD ještě před pubertou dochází k trvalému snížení počtu spermií, kvůli snížené hladině androgenů v období, kdy jsou Sertoliho buňky na adrogenech nejvíce závislé. Studie zaměřené na reprodukční funkce synů matek ze Sevesa, které byly vystaveny nízkým dávkám dioxinů během gestace a laktace, ukázala sníženou kvalitu, množství a motilitu spermií těchto synů. Synové obětí incidentu v Yuchengu zase vykazovali abnormální morfologii a sníženou motilitu spermií oproti zdravé populaci. (Brokken a Giwercman, 2014)

3.5 Popis vybraných endokrinních disruptorů

Atrazin je triazinový herbicid, používá se jako postřik mimo jiné plodin používaných jako krmivo pro hospodářská zvířata. Jeho rezidua se do lidského organismu dostávají konzumací masa nebo mléka z těchto zvířat. Atrazin není pro člověka akutně toxický, nicméně dlouhodobě ovlivňuje lidské zdraví jako endokrinní disruptor. (Hong et al., 2022)

Bis(2-ethylhexyl)ftalát (DEHP) je nejběžnějším typem ftalátu, který se používá v polyvinylchloridových plastech jako změkčovadlo, aby byl plast pružný. Expozice DEHP souvisí s poruchami reprodukčního systému u mužů i žen. Jedním z metabolitů DEHP je mono-(2-ethylhexyl)ftalát (MEHP), který také řadíme mezi EDCs. (Trnka et al., 2021)

Bisphenol A byl původně navržen jako syntetický estrogen, v dnešní době se používá v podobě výstelky kovových plechovek a plastů jako jsou kojenecké lahve, nitrožilní hadičky a dialyzační obvody. (Schechter et al., 2010) Volný BPA je metabolizován v játrech a vylučován močí. (Kanno et al., 2007) Jako ECD působí BPA především prostřednictvím estrogenních receptorů. (Mclachlan, 2016)

Carbofuran je jeden z nejtoxičtějších širokospektrých systémově působících pesticidů. Je využíván v zemědělství k hubení hmyzu. Vykazuje toxicitu *in vitro* i *in vivo* inhibicí acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy. (Mishra et al., 2020)

Cypermethrin patří mezi pesticidy odvozené od pyrethrinu, který se izoluje z *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Dlouhodobá expozice cypermethrinu může vést k chronickým neurotoickým účinkům, poruchám reprodukce, imunosupresi či teratogenezi. (Ullah et al., 2018)

Diethylstilbestrol (DES) je silný syntetický nesteroidní estrogen, patří mezi EDCs svými prokázanými teratogenními a kancerogenními účinky. V minulém století byl podáván těhotným ženám jako prevence potratu, nicméně byl prokázány jeho teratogenní účinky v souvislosti se vznikem vaginálních a cervikálních adenokarcinomů u dívek a anomálií genitourinálního traktu chlapců vystavených DES *in utero*. (Titus 2021)

Perfluorooktanová kyselina (PFOA) a perfluorokotansulfonová kyselina (PFOS) patří mezi perfluoroalkylované látky. Vysoké hladiny těchto látek jsou spojovány s chronickým onemocněním ledvin. Zvýšené hladiny PFOA mají souvislost se sníženou funkcí ledvin u dětí a dospělých. (Hsu a Tain, 2021; Watkins et al., 2013; Shankar et al., 2011)

Propiconazol je azolová sloučenina běžně používaná v pesticidech a biocidech. *In vitro* studie dokázaly schopnost propiconazolu inhibovat enzym aromatázu, interagovat s AR, ER a inhibovat produkci testosteronu a estradiolu. *In vivo* byla prokázána hepatotoxicita a reprodukční toxicita u hlodavců a ryb. (Svanholm et al., 2021)

Trifenyl fosfát (TPHP) a Tris(1,3-dichloro-2-propyl)fosfát (TDCPP) se přidávají do nábytku, elektronických zařízení a stavebních materiálů jako retardéry hoření. S materiály nevytvářejí chemické vazby, a proto se snadno uvolňují do životního prostředí. Expozice TPHP a TDCPP je spojena s neurotoxicitou, vývojovou toxicitou, imunotoxicitou a dalšími endokrinně-disrupčními účinky. (Ji et al., 2022)

3.6 Metody studia interakce látek s AhR

Aktivace receptoru může být monitorována na dvou úrovních. Měří se buď hladina exprese mRNA enzymů I. a II. Fáze metabolismu pomocí běžné kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) nebo je měřena aktivita enzymů I. a II. Fáze pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s hmotnostním spektrometrem (HPLC/MS), případně pomocí fluorescence nebo luminiscence. (Steinberg, 2013)

Gene reporter assay je molekulárně biologická technika, pro studium regulace genové exprese, a to jak cis-působícími faktory (genové regulační prvky), tak trans-působícími faktory (transkripční faktory nebo exogenní regulátory). V těchto testech funguje detekovatelný reportérový gen jako náhrada za kódující oblast studovaného genu, tedy po zavedení reportérového konstruktů do buněk jsou hladiny exprese reportérového genu monitorovány přímým testem enzymatické aktivity reportérového proteinu. Mezi běžně používané reportérové geny, které se indukují vizuálně se obvykle zahrnují fluorescenční a luminiscenční proteiny (např. světlušková luciferáza). Pro studium se využívá nádorových buněčných linií, které se přechodně či trvale transfekují plasmidem. Transfekci genetické informace lze provést teplotním šokem, elektroporací či transfekčními činidly např. liposomy, která je označována jako lipofekce, tuto metodiku jsme využili i pro naše experimenty. Bylo použito transfekční činidlo Lipofectamin 3000, které vykazuje vysokou účinnost u HepG2 buněk. Plasmid je využíván pro své specifické vazebné místo ke studovanému receptoru – v našem případě AhR. (Kameníčková, 2012; Dual-Luciferase Reporter Assay Systém: Technical manual [online] Promega: Global USA, 2023 Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/BID/Handbooks/gibco-cell-culture-basics-ha>)

Příkladem gene reporter assay užívaného v praxi je CALUX (chemical-activated luciferase expression), který se používá k detekci dioxinů a látek podobných dioxinům. Tato screeningová metoda se s oblibou využívá kvůli své rychlosti, jednoduchosti a finanční dostupnosti. Citlivost metody je dostatečně vysoká, aby umožnila detekci množství dioxinů v množstvích pětikrát menších, než je limit těchto látek v potravinách a krmivech v EU. Principem metody je využití buněčné linie potkaního hepatomu H4IIE, do které je plasmidem transfekován gen světluškové luciferázy. Pokud jsou buňky vystaveny EDCs jako je TCDD dojde k expresi luciferázy v závislosti na dávce, čase a

AhR. Množství exprimované luciferázy je kvantifikováno přidáním luciferinu, který je dále metabolizován a dojde k produkci světla. Emitované světlo je detekováno pomocí luminometru. (Steinberg, 2013)

Mezi nejnovější metody pro studium interakce látek s AhR řadíme termoforézu v mikroměřítku (Stinn et al., 2021)

3.7 Interakce vybraných endokrinních disruptorů s AhR

U křepelek bylo zjištěno, že po vystavení pesticidu atrazinu se AhR podílí na detoxikační dráze, která zahrnuje atrazinem indukovanou nefrotoxicitu. (Zhang et al., 2019)

Bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) působí jako slabý agonista AhR, pravděpodobně prostřednictvím svého metabolitu MEHP. (Krüger et al, 2008)

Bisphenol A způsobuje downregulaci aktivity AhR *in vitro* tím, že působí na AhR jako antagonist. Ve studii, kde byla buněčná linie karcinomu prsu vystavena bisphenolu A, bylo prokázáno snížení hladiny proteinu ARNT2, který je partnerem aktivovaného AhR. (Rogers et al., 2013)

Cypermethrin patří mezi pyrethroidní pesticidy. Bylo zjištěno, že indukuje enzym CYP1A1 bez interakce s AhR a ve vysokých mikromolárních koncentracích antagonizuje AhR aktivaci indukovanou pomocí TCDD v buňkách myšního hepatomu. (Brander et al., 2016)

Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) je metabolitem di-(2-ethylhexyl)ftalátu (DEHP) a je slabým agonistou AHR. (Krüger et al, 2008)

PCB 153 patří mezi sloučeniny, které dokáží napodobit aktivitu ligandů AhR a tím zasahovat do metabolických drah zapojených do imunitních odpovědí a některých druhů rakovin. (Nagar et al., 2023)

Propiconazol je triazolový fungicidní pesticid, který aktivuje AHR *in silico*, *in vitro* a *in vivo*. Působí jako slabý agonista. (Knebel et al., 2018)

Mezi vzorové agonisty AhR řadíme 3-methyl cholantren (3-MC). Jeho metabolity vykazují estrogenní aktivitu skrz ER. (Swedenborg et al., 2012)

3.8 Test stanovení toxicity (CTA)

Stanovení cytotoxicity je jeden z nejdůležitějších ukazatelů biologického hodnocení *in vitro*. Chemické látky jako jsou léčiva a pesticidy mají *in vitro* různé mechanismy cytotoxicity, mezi které patří inhibice syntézy proteinů, ireverzibilní vazba na buněčné membrány nebo destrukce buněčných membrán. Testy cytotoxicity a testy viability buněk mohou být klasifikovány na (Aslantürk 2018):

- Kolorimetrické testy – např. MTT test, MTS test, XTT test, LDH test, ...
- Testy s vyloučením barviva – testy životaschopnosti buněk s využitím trypanové modři, eosinu, Kongo červení (životaschopné buňky barvivo vylučují, mrtvé nikoliv)
- Fluorometrické testy – test alamarBlue, test CFDA-AM
- Luminometrické testy – ATP test a test viability v reálném čase

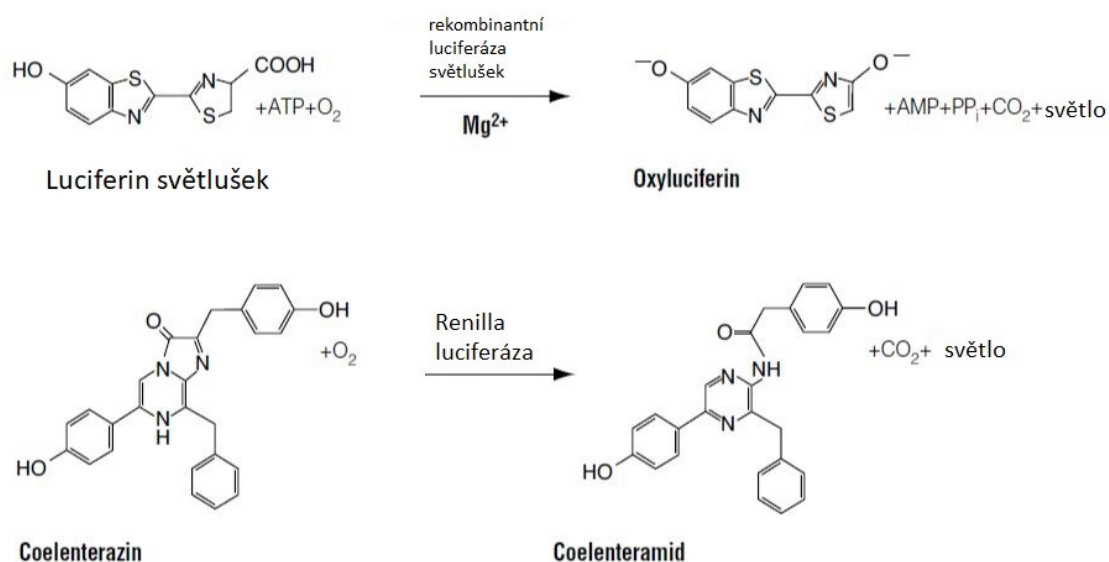
Pro účely této diplomové práce se zaměříme na testy kolorimetrické a luminometrické, které byly využity v experimentální části DP.

3.8.1 MTS test (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay)

Kit CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay se používá ke stanovení viability buněk pomocí kolorimetrického MTS testu. Principem této metody je redukce 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazoliové soli (MTS) na barevný produkt formazan, který je rozpustný v médiu buněčné kultury (viz. Obr. 2). (Anonym. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Technical Bulletin. In Promega: 2012) Tato přeměna je uskutečněna aktivitou mitochondrií v metabolicky aktivních buňkách. Množství produkovaného formazanu je přímo úměrné počtu živých buněk v kultuře, měří se pomocí absorbance při vlnové délce 490 nm. (Aslantürk 2018)

Konkrétně duální luciferázový test se provádí postupným měřením aktivit luciferázy světlušky a Renilla luciferázy stejného vzorku, přičemž výsledky jsou vyjádřeny jako poměr aktivity světlušky k aktivitě luciferázy Renilla (Fluc/Rluc). (Dual-Luciferase Reporter Assay System: Technical manual. In Promega: Global USA, 2023)

Enzym luciferáza katalyzuje reakci se svým substrátem (zde luciferinem či coelenteratinem, viz Obr. 3) za vzniku žlutozeleného nebo modrého světla, v závislosti na genu luciferázy. Vzhledem k tomu, že pro bioluminiscenci luciferázy není potřeba světelná excitace, dochází k minimální autofluorescenci a tedy fluorescenci prakticky bez pozadí. (Dual-Luciferase Reporter Assay System: Technical manual. In Promega: Global USA, 2023)



Obrázek 3 Zjednodušené reakční schéma; Luciferáza světlušek katalyzuje přeměnu luciferinu za vzniku oxyluciferinu a Renilla luciferáza katalyzuje přeměnu Coelenterazinu na Coelenteramid. Během obou reakcí dochází ke generaci světla. Převzato a upraveno z: https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-luciferase-reporter-assay-system-protocol.pdf?rev=766125b44a18445cbde88f3262864617&sc_lang=en

3.9 Buněčné linie

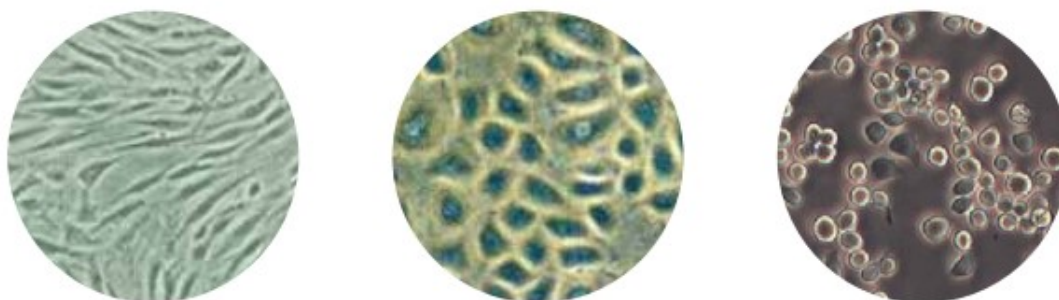
Buněčné linie vznikají prvním pasážováním primární kultury buněk. Ta se získává buď přímo odebráním buněk z živočišné nebo rostlinné tkáně a následnou mechanickou nebo enzymatickou deagregací, anebo může být odvozena od již založené buněčné linie a následně se kultivuje ve vhodné nádobě. Buněčné linie odvozené od primární kultury mají omezenou životnost.

Buněčné kultury jsou modelovými systémy užívanými ve výzkumu v oblasti buněčné a molekulární biologie. Využívají se pro studium fyziologie a biochemie buněk, účinků léčiv a toxických látek na buňky, studium mutagenese a kancerogeneze. Využívá se při vývoji léčiv, vakcín a dalších biologických sloučenin. Hlavní výhodou buněčných kultur je reprodukovatelnost výsledků. (Anonym 2020)

Buněčné linie se mohou používat k výrobě terapeutických proteinů, nejznámějšími nehumánními jsou buněčné linie vaječníků čínského křečka, buňky ledvin mláďát křečka a myší myelomové buňky. (Dumont et al., 2016)

První lidská buněčná linie HeLa byla vytvořena z karcinomu děložního čípku pacientky jménem Henrietta Lacksová. Stala se nejrozšířenější lidskou buněčnou linií v biologickém výzkumu. (Landry et al., 2013)

Morfologicky můžeme rozdělit buňky dle tvaru a vzhledu na fibroblastické (bi – nebo multipolární a podlouhlým tvarem), epiteliální (polygonální) a lymfoblastické (sférické). (viz. Obr. 4)



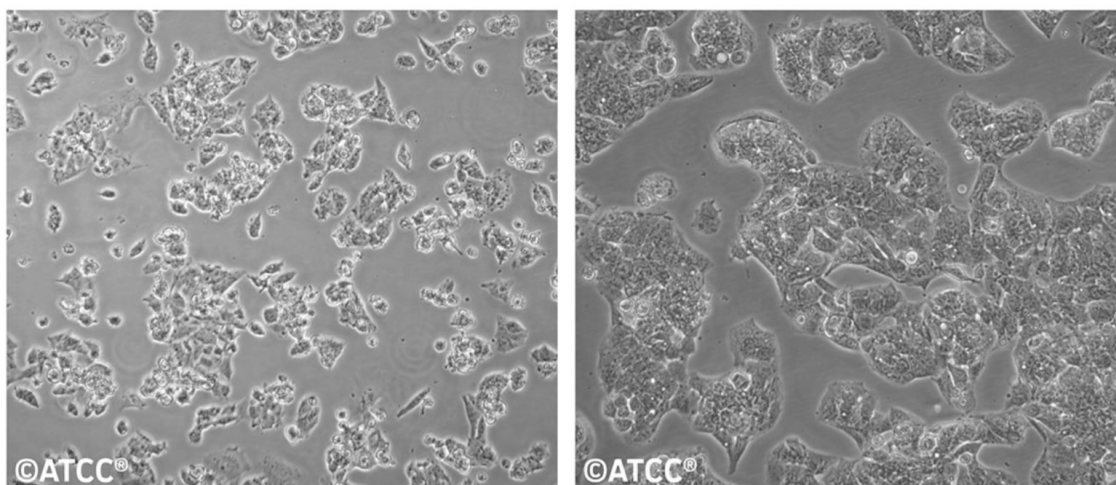
Obrázek 4 (zleva) Fibroblastické, epiteliální a lymfoblastické buňky. Převzato z: *Cell Culture Basics Handbook*. In: *Thermo Fisher Scientific* 2020. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Handbooks/gibco-cell-culture-basics-handbook.pdf>

Dle životnosti se dělí buněčné linie na kontinuální a konečné. Normální buňky mají pouze omezenou schopnost proliferace známou jako proces stárnutí – tyto buněčné

linie označujeme jako konečné. Chemickou nebo virovou transformací můžeme získat buňky nesmrtelné s neomezeným počtem dělení, které označujeme jako kontinuální buněčné linie. (Anonym 2020)

3.9.1 HepG2

Buněčná linie HepG2 (viz Obr. 5) se používá pro *in vitro* studium jaterní toxicity. Byla izolována roku 1975 z hepatocelulárního karcinomu 15letého chlapce. Původní označení hepatokarcinom je však chybné, ve skutečnosti se jedná o hepatoblastom. Na rozdíl od normálních lidských hepatocytů má linie HepG2 nižší až chybějící expresi cytochromu P450 (CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, atd.), který se podílí na 1. fázi metabolismu xenobiotik v játrech. Přesto vykazuje řadu metabolických funkcí normálních jaterních buněk, proto je využívána pro studium toxicity *in vitro*. (Arzumanian et al., 2021)



Obrázek 5 Buněčná linie HepG2, vlevo nízká hustota, vpravo vysoká hustota buněk. Převzato z: <https://www.atcc.org/products/hb-8065#detailed-product-images>

4 Cíl práce

- Stanovení *in vitro* toxicity 17 endokrinních disruptorů na buněčné linii HepG2 pomocí metody CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay
- Zavést test sekretované Metridia luciferázy (pMCS-DRE) pro rychlou a účinnou analýzu aktivace AhR v přechodně transfekovaných buňkách HepG2 a srovnání s reporterovým konstruktem pGL 4.27-DRE (luciferáza světlušek) a vybraným endokrinním disruptorem Bisphenolem A

5 Experimentální část

5.1 Použitý materiál

5.1.1 Chemikálie

- Dulbeccovo a Eaglovo modifikované médium (DMEM) (Sigma-Aldrich, USA)
- Neesenciální aminokyseliny (Merck, Německo)
- OptiMEM médium (Thermo Fisher Scientific, USA)
- PBS (Phosphate Buffer Saline; fosfátový pufr o pH = 7,4 – NaCl, KCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄) (PENTA, Česká republika)
- Trypsin (0,25 %, Trypsin-EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina)) (Sigma-Aldrich, USA)
- DMSO (dimethylsulfoxid) (Sigma-Aldrich, USA)
- Lipofectamine™ 3000 Reagent (Invitrogen™, USA)
- Lyzační pufr (Passive Lysis 5X Buffer) (Promega, USA)
- CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA)
- Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, USA)
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermofisher, USA)
- Konstrukt pMCS-DRE (luciferáza Metridia) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Konstrukt pGL 4.27-DRE (luciferáza světlušek) (Promega, USA)
- Expresní vektor pRL-TK kódující Renilla luciferázu (Promega, USA)

5.1.2 Laboratorní vybavení

- 96-jamkové mikrotitrační destičky, číré (TPP, Švýcarsko)
- 96-jamkové mikrotitrační destičky, bílé (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 48-jamkové destičky (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Automatické jednokanálové pipety Eppendorf Research® plus (Eppendorf, Německo)

- Automatická multikanálová pipeta Discovery Comfort 50 – 300 μ l (HTL, Polsko)
- Špičky Eppendorf (Eppendorf, Německo)
- Skleněné jednorázové Pasteurovy pipety (Sigm Aldrich, USA)
- Pipetor SWIFTPET (HTL, Polsko)
- Kultivační lahve 25 cm² a 75cm² (TPP, Švýcarsko)
- Plastové jednorázové pipety 2 ml, 5ml, 10 ml, 25 ml (TPP, Švýcarsko)
- Falkonky (TPP, Švýcarsko)
- Mikrozkmavky Ependorf 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf, Německo)
- Bürkerova komůrka (Meopta, Česká republika)
- Latexové nesterilní rukavice
- Analytické váhy (Kern & Sohn GmbH, Německo)

5.1.3 Přístrojové vybavení

- Inkubátor (Shel Lab, USA)
- Mikroskop OPTIKA Microscopes, XDS – 1R (OPTIKA Microscopes, Itálie)
- Laminární box: Micrological safet cabinet TOP-SAVE 1,8 (Bioair instruments, Itálie)
- Vodní lázeň, TW 12 water bath (Julabo, Německo)
- Orbitální třepačka IKA® LabDancer (IKA-Werke GmbH & Co., Německo)
- Spektrofotometr Synergy 2 (BioTek, USA)
- Mrazák
- Lednice

5.1.4 Buněčná linie HepG2

Pro celý experiment byla využívána buněčná linie HepG2, která je používána jako alternativa lidských jaterních buněk pro *in vitro* studie metabolismu léčiv a hepatotoxicity. (Donato et al., 2015)

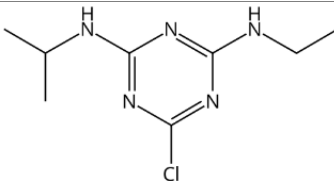
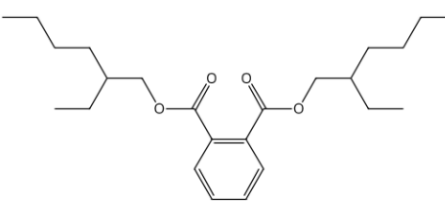
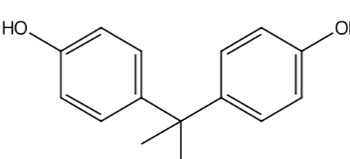
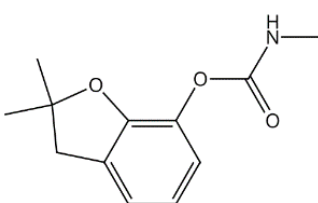
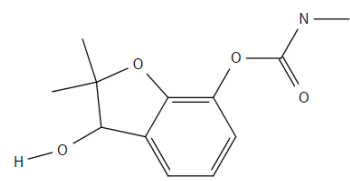
Buněčná linie HepG2 se používá pro *in vitro* studium hepatotoxicity. Byla izolována roku 1975 z hepatocelulárního karcinomu 15letého chlapce. Původní označení

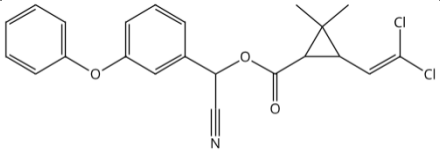
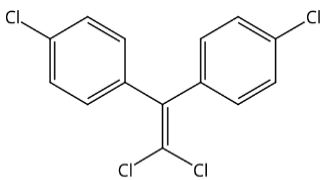
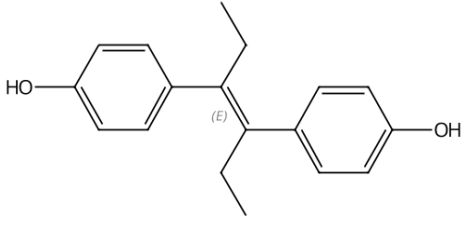
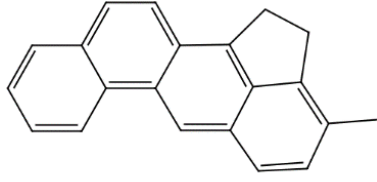
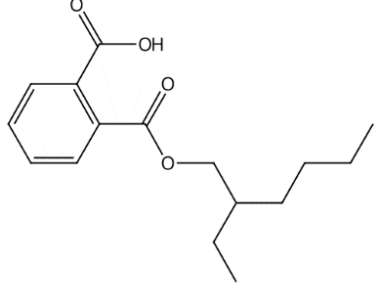
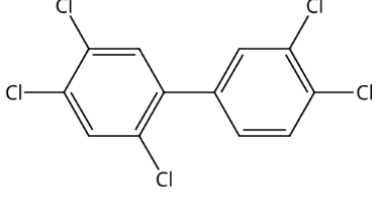
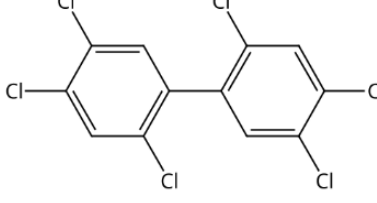
hepatokarcinom je však chybné, ve skutečnosti se jedná o hepatoblastom. (Arzumanian et al., 2021)

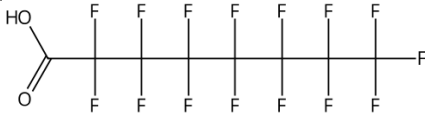
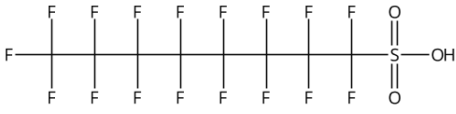
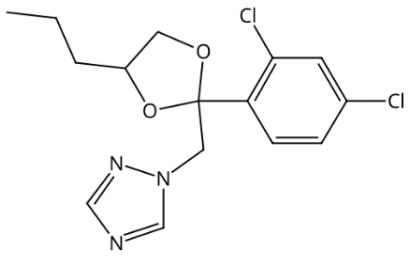
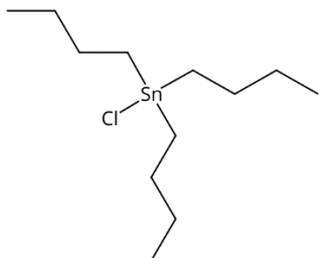
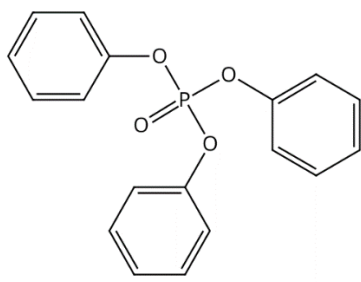
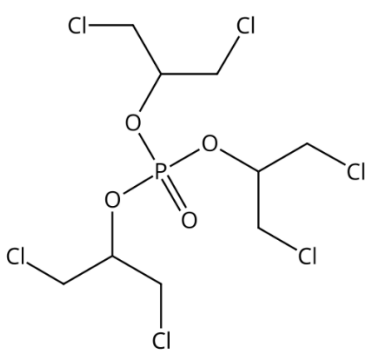
5.1.5 Endokrinní disruptory

Názvy, struktury a vzorce testovaných endokrinních disruptorů jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab. 1 Endokrinní disruptory použité v experimentu

Název	Struktura	Sumární vzorec
Atrazin		$C_8H_{14}ClN_5$
Bis(2-ethylhexyl)ftalát (DEHP)		$C_{24}H_{38}O_4$
Bisphenol A (BPA)		$C_{15}H_{16}O_2$
Carbofuran		$C_{12}H_{15}NO_3$
3-hydroxycarbofuran		$C_{12}H_{15}NO_4$

Cypermethrin		$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$
Dichlorodifenyldichloroethylen (DDE)		$C_{14}H_8Cl_4$
Diethylstilbestrol (DES)		$C_{18}H_{20}O_2$
3-methylcholanthren (3-MC)		$C_{21}H_{16}$
Mono-(2-ethylhexyl)ftalát (MEHP)		$C_{16}H_{22}O_4$
PCB 118		$C_{12}H_5Cl_5$
PCB 153		$C_{12}H_4Cl_6$

Perfluorooktanová kyselina (PFOA)		$C_8HF_{15}O_2$
Perfluorooktansulfonová kyselina (PFOS)		$C_8HF_{17}O_3S$
Propiconazol		$C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$
Tributyltin chlorid (TBT)		$C_{12}H_{27}ClSn$
Trifenyl fosfát (TPP/TPHP)		$C_{18}H_{15}O_4P$
Tris(1,3-dichloro-2-propyl) fosfát (TDCPP)		$C_9H_{15}Cl_6O_4P$

5.2 Použité metody

5.2.1 Příprava fosfátového pufru (PBS)

Fosfátový pufr (PBS) se připravoval navážením jednotlivých složek viz. tabulka 2 a jejich následným rozpuštěním v destilované vodě o objemu 1000 ml a fyziologickém pH a poté se sterilizoval. Fosfátový pufr se používal k oplachování buněk HepG2 během jejich pasážování.

Tab. 2 Složení pufru PBS o objemu 1000 ml

Sloučenina	Molární hmotnost [g/mol]	Koncentrace [g/l]
NaCl	58,44	8,010
KCl	77,55	0,21
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	156,01	1,56
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	358,14	3,58

5.2.2 Příprava testovaných endokrinních disruptorů a 3-MC

Testované látky byly naředěny do zásobních roztoků o koncentracích 1 μM, 1 mM, 5 mM a 10 mM. Jako rozpouštědlo byl použit dimethylsulfoxid (DMSO) a to z důvodu špatné rozpustnosti látek ve vodě. DMSO byl použit v koncentraci maximálně do 1%, důvodem je poměrně vysoká toxicita již při nízkých koncentracích. Před každým zahájením pokusu byly naředěny zásobní roztoky látek, které byly v daném pokusu testovány, na požadované koncentrace. Pokud se stanovovala cytotoxicita pomocí metody CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, pro pokus se připravily roztoky o koncentracích 1 μM, 10 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM, 250 μM. V případě testů pomocí metody Dual-luciferase® reporter assay system byly naředěny roztoky endokrinních disruptorů o nižších koncentracích, a to 0,001 μM, 0,003 μM, 0,1 μM, 0,3 μM, 1 μM, 5 μM, 10 μM a 30 μM.

5.2.3 Příprava buněk HepG2 před pokusem

Buněčná linie HepG2 buněk byla pro tyto pokusy dodána prostřednictvím European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). Buněčná linie byla kultivována v kultivačních lahvích o kultivační ploše 75 cm² v buněčném médiu DMEM

s přidavkem 1 % neesenciálních aminokyselin a 10 % fetálního bovinního séra. HepG2 buňky byly inkubovány v inkubátoru při 37 °C a v atmosféře 5 % CO₂. Den před zahájením pokusu byly buňky zpasážovány. V průběhu pasáže bylo odebráno automatickou pipetou 10 µl suspenze, která byla vložena do Bürkerovy komůrky, a pod mikroskopem byl spočítán počet buněk. Po zprůměrování počtu buněk na jeden čtverec jsme dostali hodnotu, která se vynásobila 10.000 a tím byla získána informace o tom, kolik buněk se nachází v 1 ml suspenze. Výpočet je znázorněn následujícím vzorcem:

$$x = \frac{a \times 10^4}{n}$$

x vyjadřuje počet buněk v 1 ml suspenze, a vyjadřuje celkový počet buněk v započtených čtvercích Bürkerovy komůrky a n počet čtverců, ve kterých jsme buňky počítali.

Poté byla část suspenze použita pro přípravu nové lahve z důvodu zachování buněčné linie. Pak jsme připravili buněčnou suspenzi dle požadované koncentrace do 48-jamkových nebo 96-jamkových destiček, Pro metodu CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay se nasazovalo 20.000 buněk na jamku o objemu 100 µl/jamka (96 jamková destička). Pro metodu Dual-luciferase® reporter assay system jsme nasazovali 110.000 buněk na jamku o objemu 250 µl/jamka (48 jamková destička). Destičky byly poté vloženy do inkubátoru při 37 °C a v atmosféře 5 % CO₂ se inkubovaly 24 hodin. Těsně před zahájením pokusu byl zkontrolován stav a konfluence buněk okometricky a mikroskopicky.

5.2.4 Stanovení cytotoxicity metodou CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

Pokus byl zahájen odsátím média a následným napipetováním předem naředěných látek o koncentracích 1, 10, 25, 50, 100, 250 µM do destičky v triplikátech. Dále jsme v triplikátech napipetovali kontrolu 1 (DMEM s 1% DMSO), která představovala negativní kontrolu, a kontrolu 2 (DMEM s 10% DMSO), která představovala pozitivní kontrolu. Takto napipetované destičky se inkubovaly 6, 12 a 24 hodin v inkubátoru při 37 °C a v atmosféře CO₂ 5 %. Také jsme připravili kontrolu pozadí (DMEM s danou koncentrací látky bez buněk), jehož hodnotu absorbance jsme odečetli od naměřených výsledků u testovaných látek.

Po uplynutí doby inkubace se do každé jamky napipetovalo 20 μ l CellTiter 96® AQueous One Solution Assay (Promega, USA) a destička se vložila zpět do inkubátoru na dalších 90 minut. Následovalo měření absorbance při 490 nm v destičkovém spektrofotometru Synergy 2.

Výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Excel 2020 a GraphPad Prism 9. V excelu jsme zpracovali hodnoty tak, že jsme nejdříve zprůměrovali hodnoty absorbance jednotlivých jamek o shodné koncentraci testované látky triplikátu, dále jsme vypočítali relativní a směrodatnou odchylku. Výpočet viability buněk pro jednotlivé látky a koncentrace jsme vypočítali dle následujícího vzorce:

$$\% \text{ viability} = \frac{(A_b - A_k) \times 100}{A_{v100} - A_m}$$

A_b = průměr tří hodnot absorbance jamek s buňkami a s roztoky látek o stejné koncentraci

A_k = průměr tří hodnot absorbance jamek bez buněk s roztoky látek o příslušné koncentraci

A_m = průměr tří hodnot absorbance kultivačního média

A_{v100} = průměr tří hodnot absorbance kontroly 100 % životaschopnosti

(Anonym. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Assay, Technical Bulletin, Promega. In: Promega. 2012)

5.2.5 Dual-Luciferase® Reporter Assay System

Pokus se zahajuje transfekcí buněk pomocí plasmidů. Den předem jsme si připravili HepG2 buňky na 48 jamkové destičky o koncentraci (110 000 buněk/jamka). Nejprve bylo vyměněno médium v každé jamce destičky – staré médium se odsálo a napipetovalo se 150 μ l DMEM čerstvého média. Dále bylo připraveno transfekční médium:

1. Příprava 2 mikrozkušavek, jedna byla pro přípravu roztoků DNA konstruktů a druhá pro přípravu roztoku Lipofectaminu, do obou mikrozkušavek bylo dáno Opti-MEM médium (15 μ l/jamka).

2. V první mikrozkušavce, kde byl již napipetovaný Opti-MEM, se přidal Lipofectamin 3000 (0,45 μ l/ jamka).

3. Do druhé mikrozkušavky s Opti-MEM médiem se přidal reagent P3000 (0,6 μ l/jamka) a dále reportérový konstrukt pGL 4.27-DRE (150 ng/ jamka) a pRL-TK (vektor kódující Renilla luciferázu) (30 ng/ jamka), nebo v případě použití konstruktů pMCS-DRE (150 ng/ jamka) se nepřidával pRL-TK.

4. Zkušavka s obsahem plasmidu se přepipetovala do zkušavky s Lipofectaminem, byla jemně promíchána a inkubována po dobu 5 minut při pokojové teplotě

5. Následně bylo pipetováno 30 μ l na jamku vzniklého transfekčního média k buňkám HepG2. Buňky se inkubovaly 24 hodin při 37 °C a v atmosféře CO₂ 5 %.

Po 24 h inkubaci, bylo odstraněno transfekční médium a bylo přidáno médium s látkou o dané koncentraci (0,001, 0,003, 0,1, 0,3, 1, 3, 5, 10, 30 μ M pro 3-MC a s koncentrační řadou 0,1, 1, 3, 10, 30 μ m pro bisphenol A) (250 μ l/jamka) vždy v kvadruplikátu. Dále byl napipetován kvadruplikát DMSO 1‰, a kvadruplikát 3-methylcholanthrenu o koncentraci 10 μ M. Poté destičky byly vloženy do inkubátoru.

Po uplynutí doby inkubace jsme uplatňovali 2 postupy – v případě využití konstruktů pGL 4.27-DRE bylo z destičky odsáto médium a jamky se dvakrát propláchly destilovanou vodou. Následně bylo přidáno 100 μ l/jamka pasivního lyzačního pufru (PLB), který je obsažen v kitu Dual-Luciferase® Reporter Assay System a destička byla vložena do mrazáku o teplotě -20 °C. Pokud jsme k transfekci použili konstrukt pMCS-DRE, bylo po uplynutí doby inkubace odebráno 30 μ l média z každé jamky do bílé 96-jamkové destičky. Následně se destička dvakrát propláchla destilovanou vodou a přidalo se 100 μ l/jamka PLB a destička byla vložena do mrazáku o teplotě -20 °C.

Stanovení aktivity Renilly luciferázy z média se dělalo ihned po odebrání, z lyzátu až po rozmražení destičky, seškrábání a odebrání 30 μ l lyzátu do bílé 96-jamkové destičky. Z lyzátu se dále odebíralo 25 μ l do čiré 96-jamkové destičky v případě transfekce pomocí pMCS-DRE konstruktů k měření bílkovin.

K měření aktivity světluškové luciferázy v podobě luminiscence z lyzátu byl následně přidán Luciferase Assay Reagent II připravený podle pokynů výrobce, a to

pouze u konstruktů pGL 4.27-DRE a změnila se luminiscence a následně připravil Stop&Glo Reagent a bylo přidáno 30 μ l/jamka. Po napipetování se opět měřila luminiscence pomocí destičkového analyzátoru Synergy 2.

Bílkoviny jsme měřili pomocí kitu Pierce BCA Protein Assay. Do číré destičky bylo napipetováno 25 μ l lyzátu z každé měřené jamky, jak bylo popsáno výše, a k tomu se napipetovalo 200 μ l WR pufru do každé jamky. WR pufr jsme si připravili smísením reagentu B a reagentu A v poměru 1:50. Následně se destička přikryla víčkem jemně zamíchala a vložila do Major Science inkubátoru a shakeru na 30 min při 37°C. Potom se změřila absorbance při 562 nm pomocí destičkového analyzátoru Synergy 2 (BioTek).

Získané výsledky ze spektrofotometru byly zpracovány s využitím softwaru MS Excel. K následnému grafickému a statistickému zpracování dat byl využit GraphPad Prism verze 9.5.0 (GraphPad Software Inc., USA).

6 Výsledky

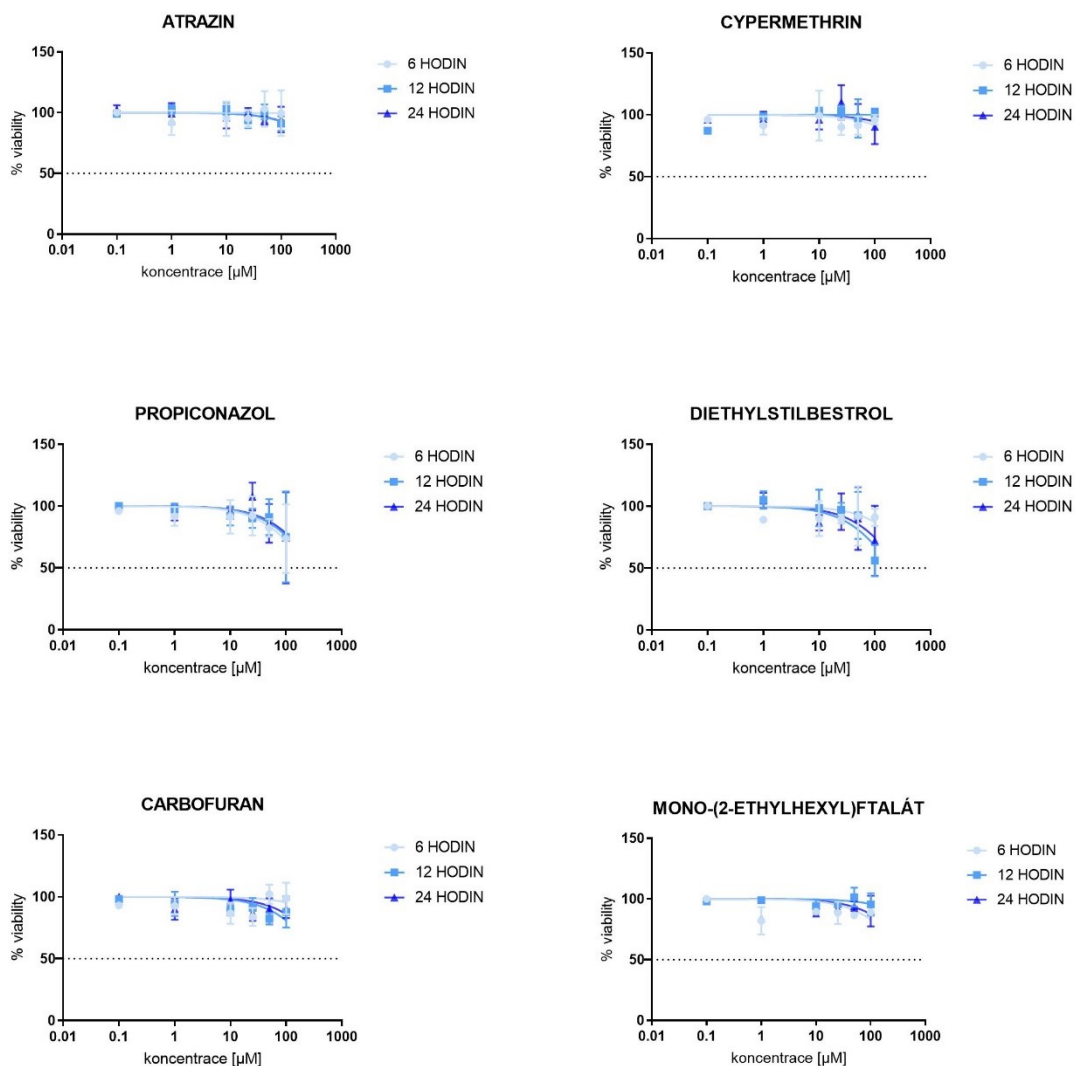
6.1 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay na buněčné linii HepG2

V tabulce 3 je souhrnný přehled testovaných látek a jejich hodnota IC_{50} ve třech časových intervalech (6h, 12h a 24h) a koncentrační rozmezí bylo 0,1 – 250 μM . Parametr IC_{50} byl použit k posouzení cytotoxického potenciálu testovaných látek, výsledky zde jsou prezentovány jako % viability a průměru \pm SD naměřených hodnot. Parametr IC_{50} je poloviční maximální inhibiční koncentrace, což je koncentrace látky, při které polovina kultivovaných buněk ztrácí svou životaschopnost. Grafické znázornění je na obrázcích 6.-8.

Tab.3 Hodnoty IC_{50} testovaných látek buněčné linii HepG2

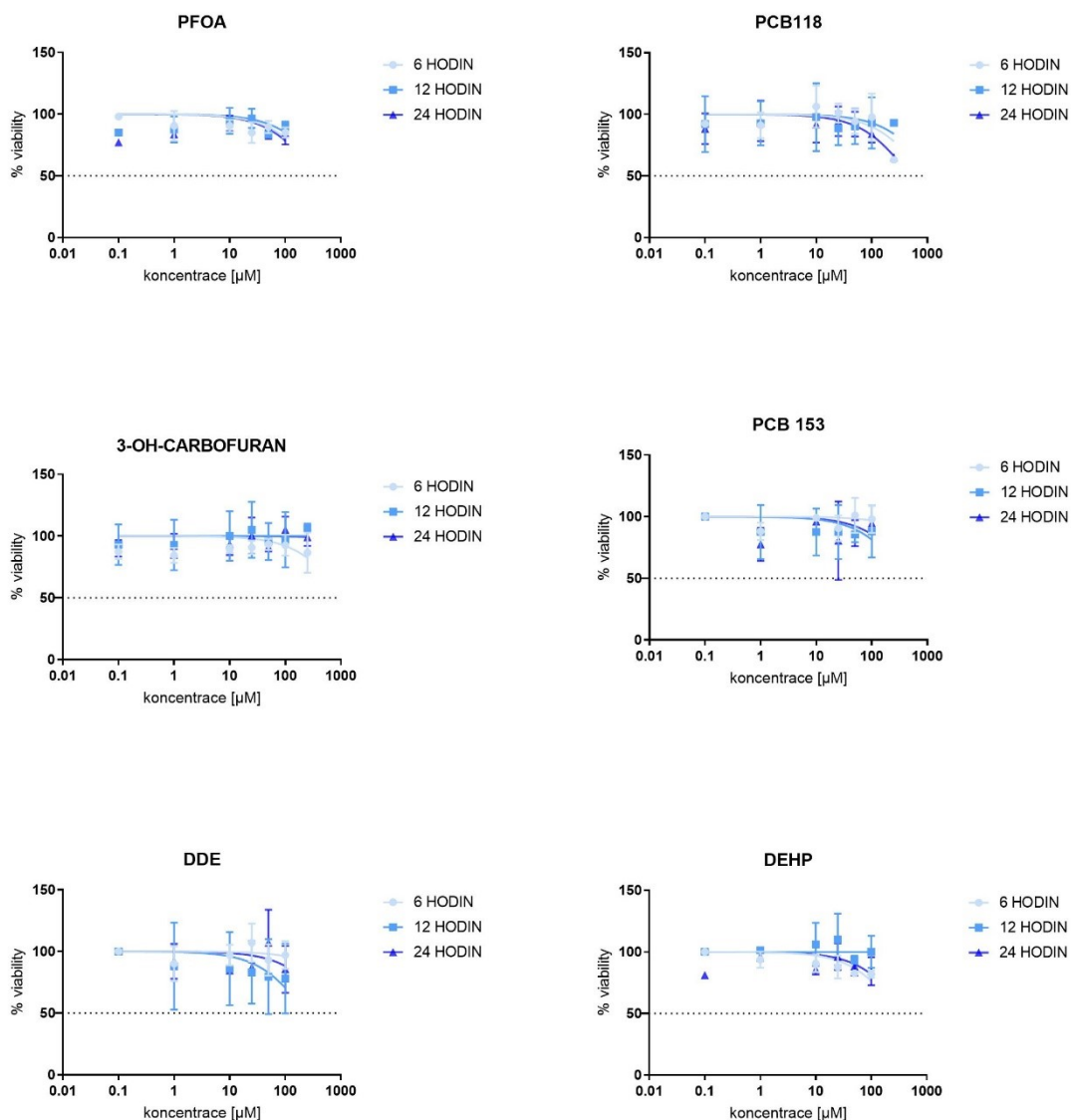
Testovaná látka	IC_{50} [μM]	IC_{50} [μM]	IC_{50} [μM]
	(6h)	(12h)	(24h)
Atrazin	> 100	> 100	> 100
Bis(2-ethylhexyl)ftalát (DEHP)	> 100	> 100	> 100
Bisphenol A (BPA)	> 100	> 100	> 100
Carbofuran	> 100	> 100	> 100
3-hydroxycarbofuran	> 250	> 250	> 250
Cypermethrin	> 100	> 100	> 100
Dichlorordifenylidichloroethylen (DDE)	> 100	> 100	> 100
Diethylstilbestrol (DES)	> 100	> 100	> 100
3- methylcholanthren (3-MC)	149,20	82,80	45,72
Mono-(2-ethylhexyl)ftalát (MEHP)	> 100	> 100	> 100

PCB 118	> 250	> 250	> 250
PCB 153	> 100	> 100	> 100
Perfluorookanová kyselina (PFOA)	> 100	> 100	> 100
Perfluorooktansulfonová kyselina (PFOS)	> 250	> 250	> 250
Propiconazol	> 100	> 100	> 100
Tributyltin chlorid (TBT)	0,5165	0,2101	0,1064
Trifenyl fosfát (TPP/TPHP)	121,9	101,6	113,6
Tris(1,3-dichloro-2-propyl) fosfát (TDCPP)	246,4	128,7	176,5



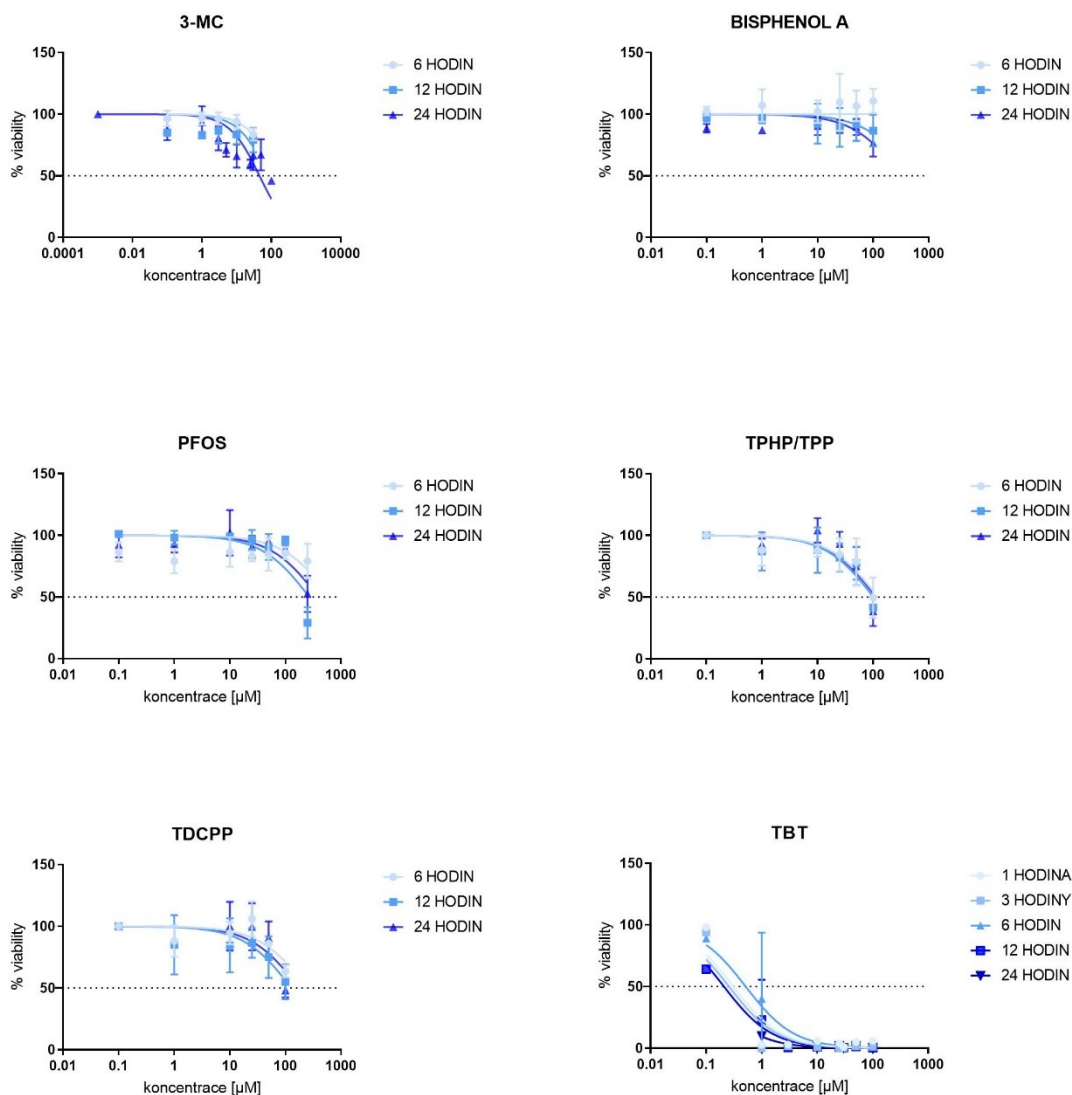
Obrázek 6 Cytotoxické působení endokrinních disruptorů: Atrazin, Cypermethrin, Propiconazol, Diethylstilbestrol, Carbofuran a Mono-(2-ethylhexyl)ftalát na buněčnou linii HepG2 při inkubaci 6h, 12h a 24h

Na Obr. 6 je graficky znázorněná závislost buněčné viability [%] na rostoucí koncentraci testovaných endokrinních disruptorů: Atrazin, Cypermethrin, Propiconazol, Diethylstilbestrol, Carbofuran a Mono-(2-ethylhexyl)ftalát, a to ve třech různých časových intervalech 6h, 12h a 24h, látky byly inkubovány za standardních podmínek (37 °C a v atmosféře 5 % CO₂). EDCs byly aplikovány v triplicátech o různých koncentracích 1, 10, 25, 50, 100 µM. Z grafů na obrázku 6 je možné odvodit, že hodnoty IC₅₀ > 100 µM, látky lze považovat za sloučeniny se zanedbatelnou cytotoxicitou, tedy jsou netoxické. Můžeme tyto látky seřadit dle klesající toxicity vůči buňkám HepG2: Cypermethrin > Atrazin > MEHP > Carbofuran > Propiconazol > Diethylstilbestrol.



Obrázek 4 Cytotoxické působení endokrinních disruptorů: PFOA, PCB 118, 3-OH Carbofuran, PCB 153, DDE, DEHP na buněčnou linii HepG2 při inkubaci 6h, 12h a 24h

Na Obr. 7 je graficky znázorněná závislost buněčné viability [%] na rostoucí koncentraci testovaných endokrinních disruptorů: PFOA, PCB118, 3-OH Carbofuran, PCB153, DDE, DEHP a to ve třech různých časových intervalech 6h, 12h a 24h, látky byly inkubovány za standardních podmínek (37 °C a v atmosféře 5 % CO₂). EDCs byly aplikovány v triplicátech o různých koncentracích 1,10, 25, 50, 100, 250µM. Z grafů na obrázku 7 je možné odvodit, že hodnoty IC₅₀ > 250 µM, látky lze považovat za sloučeniny se zanedbatelnou cytotoxicitou, tedy jsou netoxické. Můžeme tyto látky seřadit dle klesající toxicity vůči buňkám HepG2: 3-OH Carbofuran > DDE > PCB118 > DEHP > PCB153 > PFOA.



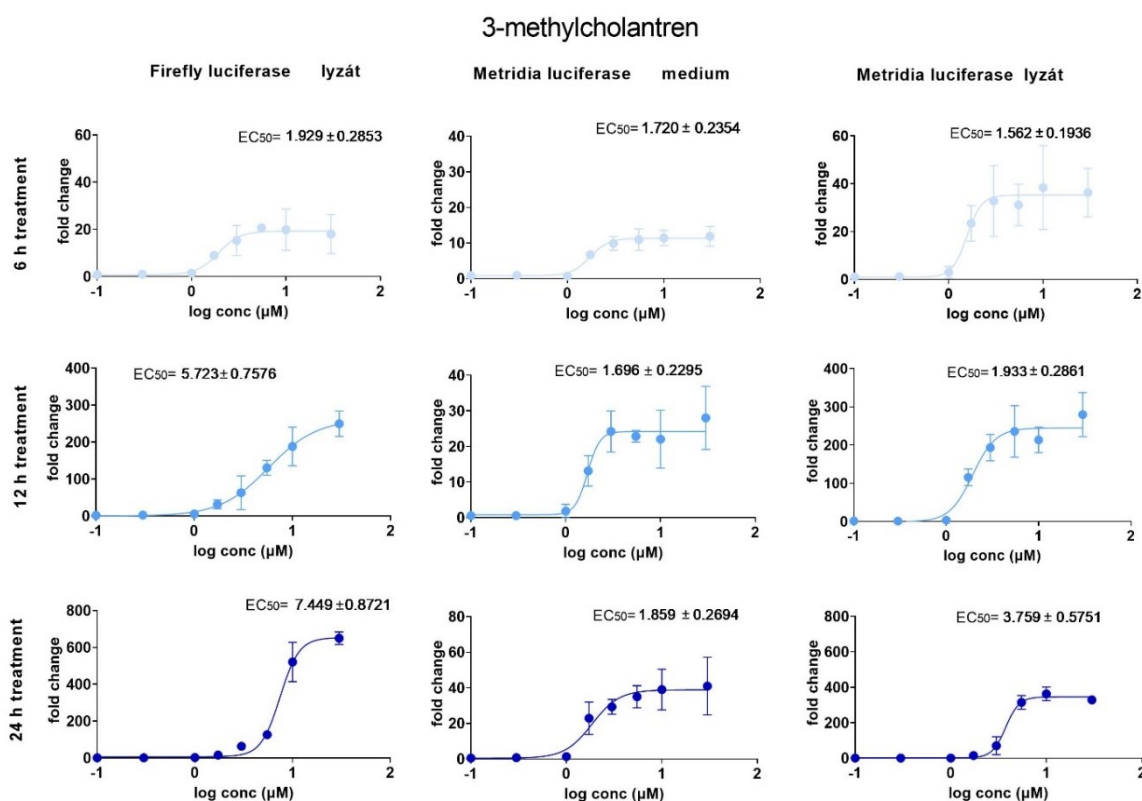
Obrázek 8 Cytotoxické působení endokrinních disruptorů: 3-MC, BPA, PFOS, TPHP/TPP, TDCPP, TBT na buněčnou linii HepG2 při inkubaci 6h, 12h a 24h

Na Obr. 8. je graficky znázorněná závislost buněčné viability [%] na rostoucí koncentraci testovaných endokrinních disruptorů: Bisphenol A, PFOS, TPHP/TPP, TDCPP a TBT a 3-MC ve třech různých časových intervalech 6h, 12h a 24h, látky byly inkubovány za standardních podmínek (37 °C a v atmosféře 5 % CO₂). EDCs a 3-MC byly aplikovány v triplicátech o různých koncentracích 0,01, 0,1, 1, 3, 5, 10, 25, 30, 50, 100 µM. Z grafů na obrázku 8 je možné odvodit, že hodnoty IC₅₀ pouze u některých látek jsou > 100 µM, látky lze považovat za sloučeniny se zanedbatelnou cytotoxicitou, tedy jsou netoxické. Naproti tomu z výsledků (viz. Tabulka 3) lze stanovit, že mezi toxické můžeme zařadit látky 3-MC, TBT, TPP/TPHP a TDCPP, přičemž nejtoxičtější je TBT s IC₅₀ 0,1064 µM v inkubační době 24h. Dále můžeme tyto látky seřadit dle klesající

toxicity vůči buňkám HepG2: TBT > 3-MC > TPHP/TPP > TDCPP > Bisphenol A > PFOS .

6.2 Dual-Luciferase® Reporter Assay System na buněčné linii HepG2

Na obrázcích 9 a 10 je grafické znázornění aktivace reportérových konstruktů pGL4.27-DRE (luciferáza světlušek) a pMCS-DRE (luciferáza Metridia), na studované buněčné linii HepG2 pomocí 3-MC a BPA ve třech časových intervalech (6, 12 a 24 hodin). Parametr EC_{50} byl použit k posouzení stability výsledků ve třech časových intervalech. Parametr EC_{50} vyjadřuje polovinu maximální efektivní koncentrace, což je koncentrace látky, při které dojde k 50% aktivitě luciferázy.

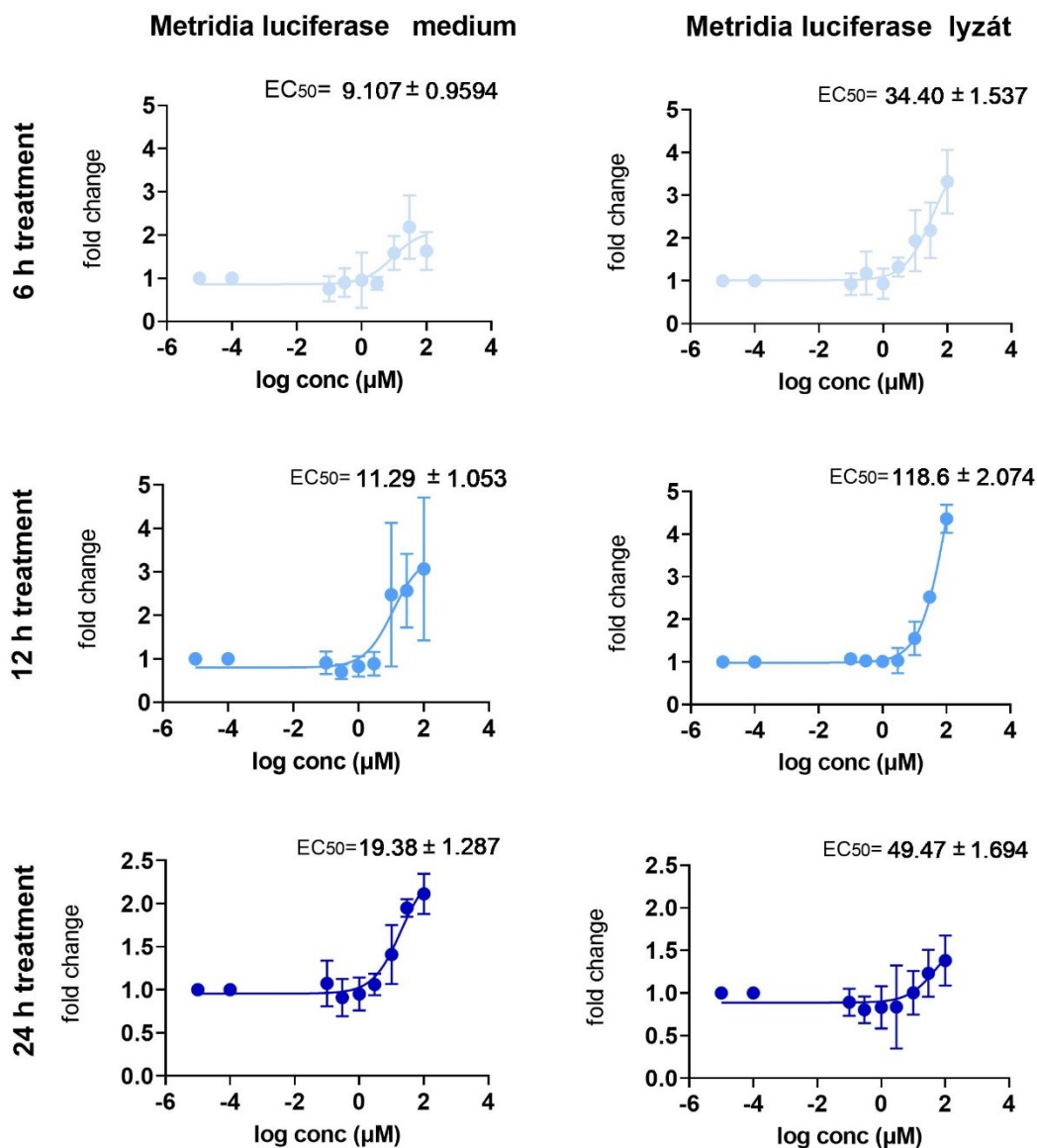


Obrázek 9 Aktivace reportérového konstruktů pGL4.27-DRE (luciferáza světlušek) a pMCS-DRE (luciferáza Metridia) pomocí 3-methylcholantrenu na buněčnou linii HepG2 po inkubaci 6h, 12h a 24h

Buňky HepG2 byly transfekovány po dobu 24 hodin po ošetření reportérovými konstrukty pGL4.27-DRE (luciferáza světlušek) a pMCS-DRE (luciferáza Metridia). Poté byly vystaveny zvyšujícím se koncentracím 3-methylcholantrenu (3-MC) po dobu 6, 12 nebo 24 hodin. V daných časových intervalech byly konstrukty luciferázy světlušek nebo Metridia analyzovány za použití luciferinu nebo coelenterazinu jako substrátů za použití komerčního testu Dual-Luciferase® Reporter Assay. Luciferázové aktivity byly normalizovány na celkovou koncentraci buněčného proteinu v lyzátu pomocí BCA testu. Data jsou vyjádřena jako relativní násobek změny aktivity luciferázy ke kontrolnímu

vzorku. Data jsou prezentována jako průměr se standardní odchylkou z alespoň tří nezávislých experimentů prováděných v triplikátech.

Bisphenol A



Obrázek 5 Aktivace reportérového konstruktů pMCS-DRE (Metridia luciferáza) pomocí Bisphenolu A na buněčné linii HepG2 po inkubaci 6, 12 a 24 hodin

Buňky HepG2 byly transfekovány 24 hodin po ošetření plasmidem pMCS-DRE (Metridia luciferáza). Poté byly vystaveny zvyšujícím se koncentracím bisphenolu A po dobu 6, 12 nebo 24 hodin. V daných časových intervalech byly konstrukty Metridia analyzovány za použití komerčního testu Dual-Luciferase® Reporter Assay System. Luciferázové aktivity byly normalizovány na celkovou koncentraci buněčného proteinu v lysátu pomocí komerčního BCA testu. Data jsou vyjádřena jako relativní násobek změny aktivity luciferázy ke kontrolnímu vzorku. Data jsou prezentována jako průměr se standardní odchylkou z alespoň tří nezávislých experimentů prováděných v triplicátech.

7 Diskuze

Pro zkoumání toxicity *in vitro* existuje široká škála metodologických přístupů. Výběr optimální metody je klíčovým aspektem, přičemž taková metoda by měla splňovat několik kritérií. Prvním kritériem je její citlivost k detekci nízkých koncentrací zkoumané látky. Důležitou vlastností je rovněž rychlost provedení, která umožňuje získat výsledky v co nejkratším čase. Zároveň by měla být metodika co nejjednodušší, aby se minimalizovala možnost vzniku manuálních chyb. Výběr vhodné metody pro daný experimentální účel není banální záležitostí, neboť každá metoda nese své specifické výhody a nevýhody. Proto je nutné neustále zkoumat nové přístupy a postupy, které by mohly přinést vylepšení oproti stávajícím metodám. Tato snaha o inovaci je důležitou součástí výzkumu a vědeckého pokroku a věnovali jsme se jí i v rámci této práce.

První cílem této diplomové práce bylo stanovení *in vitro* toxicity vybraných 17 endokrinních disruptorů pomocí metody CellTiter 96® AQueous One Solution Proliferation Assay. Vybranými testovanými endokrinními disruptory byly: Atrazin, DEHP, BPA, carbofuran, 3-hydroxycarbofuran, cypermethrin, DDE, DES, MEHP, PCB 118, PCB 153, PFOA, PFOS, propiconazol, TBT, TPP/TPHP, TDCPP a jako standard 3-MC. Toxicita byla testována na buněčné linii HepG2. Hepatotoxický potenciál EDCs popisují ve svém článku Foulds et al. (2017), EDCs jsou zde označeny za jedny z možných iniciátorů rozvoje jaterní steatózy a dalších jaterních defektů při pokusu na hlodavcích. Jaterní poškození je globálním problémem, neboť játra jsou hlavním detoxifikačním orgánem organismu, podílí se na metabolismu jak tělu potřebných živin, tak xenobiotik, dále se podílí na regulaci objemu krve a mnoha dalších fyziologických funkcích. (Trefts et al., 2017; Apte a Krishnamurthy, 2011)

Stanovení toxicity látek bylo provedeno pomocí kolorimetrického MTS testu, konkrétně s použitím kitu CellTiter 96® AQueous One Solution Proliferation Assay. Metoda je založena na redukci MTS na barevný produkt formazan v metabolicky aktivních (životaschopných) buňkách pomocí aktivity mitochondrií. Množství barevného produktu koreluje s množstvím viabilních buněk a bylo měřeno spektrofotometricky. (Anonym. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Technical Bulletin). In Promega: 2012) Testované látky byly měřeny v koncentračním rozmezí 0,1

– 100 (250) μM vždy v triplicátu. Studovaným parametrem byl IC_{50} vyjadřující cytotoxický potenciál jednotlivých látek.

Námi zjištěné hodnoty IC_{50} poukazují na to, že většina látek v testovaném rozmezí koncentrací je netoxická, jelikož jejich IC_{50} během třech testovaných intervalů (6, 12 a 24 hodin) $> 100 \mu\text{M}$ (resp. $> 250 \mu\text{M}$). Výjimku tvoří čtyři látky, u nichž byla námi potvrzena hepatotoxicita. Jedná se o látky: TBT, TPP/TPHP, TDCPP a 3-MC, který byl použitý jako standard. Nejvíce toxickou látkou se ukázal být TBT, jehož IC_{50} bylo $0,1063 \mu\text{M}$ v inkubační době 24 hodin. Že se jedná o velice toxickou látku potvrzují ve svém článku také Zeng et al. (2018), kteří zmiňují snížení viability HepG2 buněk až na 80% po inkubaci s $0,2 \mu\text{M}$ TBT již po 6 hodinách. Mechanismem toxicity TBT je oxidativní stres, produkce volných kyslíkových radikálů a malonaldehydu v HepG2 buňkách. (Zeng et al., 2018)

Hepatotoxicitu TPHP vedle dalších orgánových toxicit ve svém článku zmiňují An et al. (2023). Na modelu zebrafish způsobuje expozice TPHP nerovnováhu v metabolismu lipidů, vede ke zvětšení objemu jater a jaterní steatóze. (An et al., 2023; Reddam et al., 2019). Při pokusu na HepG2 buněčné linii byly měřeny hladiny reaktivních forem kyslíku (ROS) jako zdroj toxicity vedoucí ke snížené buněčné proliferaci a ke zvýšené apoptóze. Zvýšená produkce ROS byla potvrzena při koncentraci TPHP $80 \mu\text{M}$ ve třech časových intervalech (4, 12 a 24 hodin), při koncentraci $40 \mu\text{M}$ nikoliv. (An et al., 2023) Námi naměřené hodnoty IC_{50} v intervalech 6, 12, 24 hodin byly $121,9 \mu\text{M}$, $101,6 \mu\text{M}$ a $113,6 \mu\text{M}$. Jsou to koncentrace TPHP, při kterých dle našich výsledků klesne počet viabilních buněk na 50 %. Nicméně za toxickou koncentraci zprostředkovanou produkcí volných radikálů lze považovat již koncentraci TPHP $80 \mu\text{M}$ naměřenou kolektivem An et al. (2023).

Ve studii Saquib et al. (2022) byl potvrzen toxický a kancerogenní potenciál TDCPP na buněčnou linii HepG2. Testy byla potvrzena jaterní toxicita zprostředkovaná volnými kyslíkovými radikály a následná apoptóza buněk. Pokusy na myším modelu potvrdily akutní toxicitu na jaterní buňky po aplikaci 3-MC, který má potenciál indukovat oxidativní stres i v dalších organismech (Jin et al., 2014; Timme et al., 2009)

Druhým bodem práce bylo použití nového konstrukt se sekretovanou Metridia luciferázou (pMCS-DRE) v testech přechodně transfekovaných buněk v běžné buněčné linii HepG2, kterou používáme jako standardní buněčný model. Vzhledem k tomu, že toxicita je vážným problémem v buněčném testování endokrinních disruptorů nebo dalších toxických látek na životní prostředí, zaměřili jsme se na vývoj nové metody. Zkoušen byl nový konstrukt se sekretovanou Metridia luciferázou (pMCS-DRE). Metridia luciferáza je sekreční luciferáza z mořského copepod *Metridia longa* a katalyzuje oxidaci coelenterazinu doprovázenou emisí modrého světla ($\lambda_{\max} = 485 \text{ nm}$). Hlavní výhodou této sekretované luciferázy jako reportérového enzymu je její schopnost měřit intracelulární děje v různých časových intervalech bez lyzování buněk. (Stepanyuk et al. 2008; Marková et al. 2019). Naopak intracelulární luciferáza světlušky (pGL4.27-DRE) s molekulovou hmotností 60,8 kDa pochází ze severoamerické světlušky *Photinus pyralis*. Luciferáza světlušek katalyzuje oxidaci substrátu D-luciferinu v reakci, která vyžaduje ATP a Mg^{+2} jako kofaktory a produkuje zelené světlo s vrcholem při 566 nm. (Marková et al. 2019).

K posouzení výsledků měření jsme použili parametr EC_{50} , který vyjadřuje polovinu maximální efektivní koncentrace, což je taková koncentrace látky, která aktivuje 50% celkové luciferázy. Pomocí 3-MC aplikovaného v kvadruplikátech v koncentračním rozmezí 0,001 – 30 μM jsme aktivovali luciferázu světlušek i luciferázu Metridia, výslednou luminiscenci jsme měřili ve třech časových intervalech (6, 12 a 24 hodin). Luminiscenci jsme u luciferázy světlušek měřili z lyzátu buněk, parametr EC_{50} však postupně v jednotlivých časových intervalech rostl.

Testy založené na Metridii však poskytují reprodukovatelné a přesné hodnoty EC_{50} ve všech časových intervalech. Důležité je, že testy Metridia luciferázy založené na analýze aktivity v médiu vykazovaly stejnou EC_{50} nezávislou na časovém intervalu (1,72±0,23 μM , 1,69±0,22 μM , respektive 1,85±0,26 μM) (viz. obrázek 9). Můžeme tedy předpokládat, že test by mohl poskytnout skutečné hodnoty EC_{50} i v cytotoxických chemikáliích, které ovlivňují životaschopnost buněk.

Aktivity luciferázy byly vztaženy na množství celkového proteinu, který byl měřen pomocí testu Pierce™ BCA Protein Assay. Z těchto výsledků EC_{50} lze usoudit, že námi nově zavedený konstrukt pMCS-DRE pro luciferázu Metridia je pro tuto metodu

využitelný, a navíc je možno výsledky měřit z odebraného média a předejít tak lýze buněk, což poskytuje možnost s buňkami po měření pracovat dále bez jejich smrti.

Další testovanou látkou aktivující Metridia luciferázu byl Bisphenol A. Přestože předchozí měření pomocí MTS testu nepotvrdilo v testovaných koncentracích toxicitu BPA, byl pro měření luciferázové aktivity vybrán z důvodu jeho potvrzené interakce s AhR. (Merii et al., 2022; Nishizawa et al., 2005) BPA byl na buňky aplikován v koncentračním rozmezí 0,1 – 30 μM v kvadruplikátech. Luminiscence byla měřena z média a lyzátu ve třech časových intervalech (6, 12 a 24 hod). Aktivity luciferázy byly vztaženy na množství celkového proteinu, který byl měřen pomocí testu Pierce™ BCA Protein Assay. Hodnoceným parametrem byl EC_{50} . Výsledky měřené z lyzátu ukazují proměnlivou hodnotu EC_{50} ve všech třech časech. Naproti tomu výsledky měření z média v časech 6 a 12 hodin jsou porovnatelné, luminiscenční signál poskytnutý luciferázou se zdá být ustálený, nicméně v inkubační době 24 hodin můžeme pozorovat opět zvýšení hodnoty EC_{50} .

Tato hypotéza však vyžaduje ověření v jiných buněčných liniích a s mnohem více cytotoxickými ligandy AhR. Navíc validace konstruktů Metridia ve stabilně transfekovaných reportérových buňkách je náročná.

8 Závěr

Vypracování této práce mělo jeden z cílů stanovit cytotoxický potenciál vybraných 17 endokrinních disruptorů pomocí testu MTS. Byl vybrán komerční test CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. Testovanou buněčnou linií byla zvolena standardní buněčná linie HepG2. Ukazatelem toxicity byl zvolen parametr IC_{50} . Látky Atrazin, DEHP, Bisphenol A, Carbofuran, Cypermethrin, DDE, DES, MEHP, PCB 153, PFOA a Propiconazol měli naměřené IC_{50} ve všech třech inkubačních časech (6, 12 a 24 hodin) $> 100 \mu\text{M}$, tudíž je můžeme označit za látky netoxické. Stejně tak látky 3-hydroxycarbofuran, PCB 118 a PFOS, u kterých byla nejvyšší testovaná koncentrace $250 \mu\text{M}$, můžeme označit za netoxické, neboť IC_{50} bylo ve všech časových intervalech $> 250 \mu\text{M}$. Naopak mezi látky toxické zařadíme TBT, TPP/TPHP, TDCPP a 3-MC, který byl využit jako standard. Podle klesající toxicity vůči HepG2 můžeme tyto látky seřadit: TBT $>$ 3-MC $>$ TPP/TPHP $>$ TDCPP. Nejtoxičtější látkou byl TBT s IC_{50} $0,01064 \mu\text{M}$ v inkubačním čase 24 hodin.

Druhým cílem této práce bylo zavést test sekretované Metridia luciferázy pro rychlou a účinnou analýzu aktivace AhR v experimentech přechodné transfekce. Podařilo se nám otestovat známé endokrinní disruptory narušující endokrinní systém. Aktivace byla provedena pomocí látek 3-MC a BPA. Aktivace v případě obou konstruktů byla úspěšná, výsledkem byla měřitelná luminiscence. Ke zjištění porovnatelnosti výsledků byl využit parametr EC_{50} měřený ve třech inkubačních časech (6, 12 a 24 hodin). V případě porovnání výsledků získaných aktivací luciferázy světlušek a luciferázy Metridia pomocí 3-MC a měření z média a lyzátu buněk vykazovala stálejší výsledky luciferáza Metridia. Tím bylo dokázáno, že existuje možnost měření luminiscence z média bez nutnosti lýzy buněk a je možno v pokusu na buňkách dále pokračovat.

9 Literatura

1. ACCONCIA, Filippo, Valentina PALLOTTINI a Maria MARINO. Molecular Mechanisms of Action of BPA. *Dose-Response* [online]. 2015, **13**(4) [cit. 2023-03-21]. ISSN 1559-3258. Dostupné z: doi:10.1177/1559325815610582
2. APTE, Udayan a Partha KRISHNAMURTHY. Detoxification Functions of the Liver. In: MONGA, Satdarshan P. S., ed. *Molecular Pathology of Liver Diseases* [online]. Boston, MA: Springer US, 2011, s. 147-163 [cit. 2023-09-07]. *Molecular Pathology Library*. ISBN 978-1-4419-7106-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4419-7107-4_11
3. ARZUMANIAN, Viktoriia A., Olga I. KISELEVA a Ekaterina V. POVERENNAYA. The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(23) [cit. 2023-03-23]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms222313135
4. ASLANTÜRK, Özlem Sultan. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In: LARRAMENDY, Marcelo L. a Sonia SOLONESKI, ed. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World* [online]. InTech, 2018, 2018-07-11 [cit. 2023-03-24]. ISBN 978-1-78923-418-3. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.71923
5. BANERJEE, Monimoy, Delira ROBBINS a Taosheng CHEN. Targeting xenobiotic receptors PXR and CAR in human diseases. *Drug Discovery Today* [online]. 2015, **20**(5), 618-628 [cit. 2023-03-27]. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2014.11.011
6. BOAS, Malene, Ulla FELDT-RASMUSSEN a Katharina M. MAIN. Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. 2012, **355**(2), 240-248 [cit. 2023-09-11]. ISSN 03037207. Dostupné z: doi:10.1016/j.mce.2011.09.005
7. BRANDER, Susanne M., Molly K. GABLER, Nicholas L. FOWLER, Richard E. CONNON a Daniel SCHLENK. Pyrethroid Pesticides as Endocrine Disruptors: Molecular Mechanisms in Vertebrates with a Focus on Fishes. *Environmental Science & Technology* [online]. 2016, **50**(17), 8977-8992 [cit. 2023-07-08]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.6b02253

8. BROKKEN, Leon J S a Yvonne Lundberg GIWERCMAN. Gene-environment interactions in male reproductive health: special reference to the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *Asian Journal of Andrology* [online]. 2014, **16**(1) [cit. 2023-03-27]. ISSN 1008-682X. Dostupné z: doi:10.4103/1008-682X.122193
9. CAO, Huiming, Ling WANG, Mengxi CAO, Tong YE a Yuzhen SUN. Computational insights on agonist and antagonist mechanisms of estrogen receptor α induced by bisphenol A analogues. *Environmental Pollution* [online]. 2019, **248**, 536-545 [cit. 2023-09-11]. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.02.058
10. COMBARNOUS, Yves a Thi Mong Diep NGUYEN. Comparative Overview of the Mechanisms of Action of Hormones and Endocrine Disruptor Compounds. *Toxics* [online]. 2019, **7**(1) [cit. 2023-03-20]. ISSN 2305-6304. Dostupné z: doi:10.3390/toxics7010005
11. COMBARNOUS, Yves a Thi Mong Diep NGUYEN. Membrane Hormone Receptors and Their Signaling Pathways as Targets for Endocrine Disruptors. *Journal of Xenobiotics* [online]. 2022, **12**(2), 64-73 [cit. 2023-03-26]. ISSN 2039-4713. Dostupné z: doi:10.3390/jox12020007
12. COPERCHINI, F., O. AWWAD, M. ROTONDI, F. SANTINI, M. IMBRIANI a L. CHIOVATO. Thyroid disruption by perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA). *Journal of Endocrinological Investigation* [online]. 2017, **40**(2), 105-121 [cit. 2023-03-27]. ISSN 1720-8386. Dostupné z: doi:10.1007/s40618-016-0572-z
13. COUSE, John F. a Kenneth S. KORACH. Estrogen Receptor Null Mice: What Have We Learned and Where Will They Lead Us?. *Endocrine Reviews* [online]. 1999, **20**(3), 358-417 [cit. 2023-03-27]. ISSN 0163-769X. Dostupné z: doi:10.1210/edrv.20.3.0370
14. DESAULNIERS, D., G.-H. XIAO, K. LEINGARTNER, I. CHU, B. MUSICKI a B. K. TSANG. Comparisons of Brain, Uterus, and Liver mRNA Expression for Cytochrome P450s, DNA Methyltransferase-1, and Catechol-O-Methyltransferase in Prepubertal Female Sprague-Dawley Rats Exposed to a Mixture of Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists. *Toxicological Sciences* [online]. 2005, **86**(1), 175-184 [cit. 2023-03-23]. ISSN 1096-0929. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/kfi178

15. DIAMANTI-KANDARAKIS, Evanthia, Jean-Pierre BOURGUIGNON, Linda C. GIUDICE, Russ HAUSER, Gail S. PRINS, Ana M. SOTO, R. Thomas ZOELLER a Andrea C. GORE. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews* [online]. 2009, **30**(4), 293-342 [cit. 2023-03-18]. ISSN 0163-769X. Dostupné z: doi:10.1210/er.2009-0002
16. DONATO, María Teresa, Laia TOLOSA a María José GÓMEZ-LECHÓN. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. In: VINKEN, Mathieu a Vera ROGIERS, ed. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research* [online]. New York, NY: Springer New York, 2015, 2015-11-3, s. 77-93 [cit. 2022-12-10]. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-4939-2073-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-2074-7_5
17. DUMONT, Jennifer, Don EUWART, Baisong MEI, Scott ESTES a Rashmi KSHIRSAGAR. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2016, **36**(6), 1110-1122 [cit. 2023-03-24]. ISSN 0738-8551. Dostupné z: doi:10.3109/07388551.2015.1084266
18. ENGELI, Roger, Simona ROHRER, Anna VUORINEN, Sonja HERDLINGER, Teresa KASERER, Susanne LEUGGER, Daniela SCHUSTER a Alex ODERMATT. Interference of Paraben Compounds with Estrogen Metabolism by Inhibition of 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, 18(9) [cit. 2023-09-11]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms18092007
19. FOULDS, Charles E., Lindsey S. TREVIÑO, Brian YORK a Cheryl L. WALKER. Endocrine-disrupting chemicals and fatty liver disease. *Nature Reviews Endocrinology* [online]. 2017, **13**(8), 445-457 [cit. 2023-09-07]. ISSN 1759-5029. Dostupné z: doi:10.1038/nrendo.2017.42
20. GHASSABIAN, Akhgar a Leonardo TRASANDE. Disruption in Thyroid Signaling Pathway: A Mechanism for the Effect of Endocrine-Disrupting Chemicals on Child Neurodevelopment. *Frontiers in Endocrinology* [online]. 2018, **9** [cit. 2023-03-27]. ISSN 1664-2392. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2018.00204
21. HONG, Junting, Nadia BOUSSETTA, Gérald ENDERLIN, Franck MERLIER a Nabil GRIMI. Degradation of Residual Herbicide Atrazine in Agri-Food and

- Washing Water. *Foods* [online]. 2022, 11(16) [cit. 2023-03-28]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods11162416
22. HSU, Chien-Ning a You-Lin TAIN. Adverse Impact of Environmental Chemicals on Developmental Origins of Kidney Disease and Hypertension. *Frontiers in Endocrinology* [online]. 2021, 12 [cit. 2023-03-28]. ISSN 1664-2392. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2021.745716
23. HUGO, Eric R., Terry D. BRANDEBOURG, Jessica G. WOO, Jean LOFTUS, J. Wesley ALEXANDER a Nira BEN-JONATHAN. Bisphenol A at Environmentally Relevant Doses Inhibits Adiponectin Release from Human Adipose Tissue Explants and Adipocytes. *Environmental Health Perspectives* [online]. 2008, 116(12), 1642-1647 [cit. 2023-09-11]. ISSN 0091-6765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.11537
24. JI, Xiaoya, Na LI, Mei MA, et al. Comparison of the mechanisms of estrogen disrupting effects between triphenyl phosphate (TPhP) and tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCIPP). *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2022, 229 [cit. 2023-03-28]. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2021.113069
25. JURICEK, Ludmila a Xavier COUMOUL. The Aryl Hydrocarbon Receptor and the Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, 19(9) [cit. 2023-03-23]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19092504
26. KABIR, Eva Rahman, Monica Sharfin RAHMAN a Imon RAHMAN. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2015, 40(1), 241-258 [cit. 2023-03-18]. ISSN 13826689. Dostupné z: doi:10.1016/j.etap.2015.06.009
27. KAKEYAMA, Masaki, Hideko SONE a Chiharu TOHYAMA. Perinatal exposure of female rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces central precocious puberty in the offspring. *Journal of Endocrinology* [online]. 2008, 197(2), 351-358 [cit. 2023-03-23]. ISSN 0022-0795. Dostupné z: doi:10.1677/JOE-08-0062
28. KANNO, Yoshihiko, Hirokazu OKADA, Tatsuya KOBAYASHI, Tsuneo TAKENAKA a Hiromichi SUZUKI. Effects of Endocrine Disrupting Substance on Estrogen Receptor Gene Transcription in Dialysis Patients. *Therapeutic*

- Apheresis and Dialysis [online]. 2007, 11(4), 262-265 [cit. 2023-03-28]. ISSN 1744-9979. Dostupné z: doi:10.1111/j.1744-9987.2007.00472.x
29. KHALIL, Andrew S., Rudolf JAENISCH a David J. MOONEY. Engineered tissues and strategies to overcome challenges in drug development. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2020, 158, 116-139 [cit. 2023-07-03]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2020.09.012
30. KNEBEL, Constanze, Juliane KEBBEN, Ivano EBERINI, et al. Propiconazole is an activator of AHR and causes concentration additive effects with an established AHR ligand. *Archives of Toxicology* [online]. 2018, 92(12), 3471-3486 [cit. 2023-07-06]. ISSN 0340-5761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-018-2321
31. KRÜGER, Tanja, Manhaj LONG a Eva C. BONEFELD-JØRGENSEN. Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. *Toxicology* [online]. 2008, 246(2-3), 112-123 [cit. 2023-07-07]. ISSN 0300483X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tox.2007.12.028
32. KUCKA, Marek, Kristina POGRMIC-MAJKIC, Svetlana FA, Stanko S. STOJILKOVIĆ a Radmila KOVACEVIĆ. Atrazine acts as an endocrine disrupter by inhibiting cAMP-specific phosphodiesterase-4. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2012, 265(1), 19-26 [cit. 2023-03-26]. ISSN 0041008X. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2012.09.019
33. LANDRY, Jonathan J M, Paul Theodor PYL, Tobias RAUSCH, et al. The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line. *G3 Genes|Genomes|Genetics* [online]. 2013, 3(8), 1213-1224 [cit. 2023-03-24]. ISSN 2160-1836. Dostupné z: doi:10.1534/g3.113.005777
34. MARKOVA, Svetlana V., Marina D. LARIONOVA a Eugene S. VYSOTSKI. Shining Light on the Secreted Luciferases of Marine Copepods: Current Knowledge and Applications. *Photochemistry and Photobiology* [online]. 2019, 95(3), 705-721 [cit. 2023-08-28]. ISSN 0031-8655. Dostupné z: doi:10.1111/php.13077
35. MCLACHLAN, J. A. Environmental signaling: from environmental estrogens to endocrine-disrupting chemicals and beyond. *Andrology* [online]. 2016, 4(4), 684-694 [cit. 2023-03-28]. ISSN 2047-2919. Dostupné z: doi:10.1111/andr.12206
36. MERII, Mohammad H., Manal M. FARDOUN, Khalil EL ASMAR, Mahmoud I. KHALIL, Ali H. EID a Hassan R. DHAINI. Effect of BPA on CYP450s expression, and nicotine modulation, in fetal rat brain. *Neurotoxicology and*

- Teratology [online]. 2022, 92 [cit. 2023-09-08]. ISSN 08920362. Dostupné z: doi:10.1016/j.ntt.2022.107095
37. MERRHEIM, Judith, José VILLEGAS, Jérôme VAN WASSENHOVE, Rémi KHANSA, Sonia BERRIH-AKNIN, Rozen LE PANSE a Nadine DRAGIN. Estrogen, estrogen-like molecules and autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews* [online]. 2020, 19(3) [cit. 2023-03-28]. ISSN 15689972. Dostupné z: doi:10.1016/j.autrev.2020.102468
38. MIMURA, Junsei a Yoshiaki FUJII-KURIYAMA. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2003, **1619**(3), 263-268 [cit. 2023-03-23]. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/S0304-4165(02)00485-3
39. MISHRA, Sandhya, Wenping ZHANG, Ziqiu LIN, Shimei PANG, Yaohua HUANG, Pankaj BHATT a Shaohua CHEN. Carbofuran toxicity and its microbial degradation in contaminated environments. *Chemosphere* [online]. 2020, 259 [cit. 2023-03-28]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2020.127419
40. NAGAR, Nupur, Harshi SAXENA, Aakanksha PATHAK, Amit MISHRA a Krishna Mohan POLURI. A review on structural mechanisms of protein-persistent organic pollutant (POP) interactions. *Chemosphere* [online]. 2023, 332 [cit. 2023-07-17]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2023.138877
41. NISHIZAWA, Hanako, Satoshi IMANISHI a Noboru MANABE. Effects of Exposure In Utero to Bisphenol A on the Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor, Related Factors, and Xenobiotic Metabolizing Enzymes in Murine Embryos. *Journal of Reproduction and Development* [online]. 2005, 51(5), 593-605 [cit. 2023-09-08]. ISSN 0916-8818. Dostupné z: doi:10.1262/jrd.17026
42. OGINO, Yukiko, Shinichi MIYAGAWA a Taisen IGUCHI. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin/Polychlorinated Biphenyls. In: *Handbook of Hormones* [online]. Elsevier, 2016, 2016, 583-e101G-1 [cit. 2023-03-23]. ISBN 9780128010280. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801028-0.00245-2
43. OKADA, Hiroyuki, Takatoshi TOKUNAGA, Xiaohui LIU, Sayaka TAKAYANAGI, Ayami MATSUSHIMA a Yasuyuki SHIMOHIGASHI. Direct Evidence Revealing Structural Elements Essential for the High Binding Ability of Bisphenol A to Human Estrogen-Related Receptor- γ . *Environmental Health*

- Perspectives* [online]. 2008, **116**(1), 32-38 [cit. 2023-03-27]. ISSN 0091-6765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.10587
44. RANNUG, Agneta. 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole, a Potent Ligand for the Aryl Hydrocarbon Receptor Produced Both Endogenously and by Microorganisms, can Either Promote or Restrain Inflammatory Responses. *Frontiers in Toxicology* [online]. 2022, 4 [cit. 2023-07-05]. ISSN 2673-3080. Dostupné z: doi:10.3389/ftox.2022.775010
45. ROGERS, James A., Luanne METZ a V. Wee YONG. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses. *Molecular Immunology* [online]. 2013, 53(4), 421-430 [cit. 2023-07-04]. ISSN 01615890. Dostupné z: doi:10.1016/j.molimm.2012.09.013
46. SABUZ VIDAL, Oscar, Deepika DEEPIKA, Marta SCHUHMACHER a Vikas KUMAR. EDC-induced mechanisms of immunotoxicity: a systematic review. *Critical Reviews in Toxicology* [online]. 2021, **51**(7), 634-652 [cit. 2023-03-20]. ISSN 1040-8444. Dostupné z: doi:10.1080/10408444.2021.2009438
47. SAFE, Stephen, Un-ho JIN, Hyejin PARK, Robert S. CHAPKIN a Arul JAYARAMAN. Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) Ligands as Selective AHR Modulators (SAhRMs). *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(18) [cit. 2023-03-28]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21186654
48. SCHECTER, Arnold, Noor MALIK, Darrah HAFFNER, Sarah SMITH, T. Robert HARRIS, Olaf PAEPKE a Linda BIRNBAUM. Bisphenol A (BPA) in U.S. Food. *Environmental Science & Technology* [online]. 2010, **44**(24), 9425-9430 [cit. 2023-03-28]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es102785d
49. SHANKAR, A., J. XIAO a A. DUCATMAN. Perfluoroalkyl Chemicals and Chronic Kidney Disease in US Adults. *American Journal of Epidemiology* [online]. 2011, 174(8), 893-900 [cit. 2023-03-28]. ISSN 0002-9262. Dostupné z: doi:10.1093/aje/kwr171
50. SHEIKH, Ishfaq A., Rola F. TURKI, Adel M. ABUZENADAH, Ghazi A. DAMANHOURI, Mohd A. BEG a Mohammad SALEEM. Endocrine Disruption: Computational Perspectives on Human Sex Hormone-Binding Globulin and Phthalate Plasticizers. *PLOS ONE* [online]. 2016, 2016-3-10, 11(3) [cit. 2023-09-11]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0151444

51. SINGLEMAN, Corinna a Nathalia G. HOLTZMAN. PCB and TCDD derived embryonic cardiac defects result from a novel AhR pathway. *Aquatic Toxicology* [online]. 2021, 233 [cit. 2023-09-12]. ISSN 0166445X. Dostupné z: doi:10.1016/j.aquatox.2021.105794
52. STEINBERG, Pablo, ed. *High-Throughput Screening Methods in Toxicity Testing* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2013 [cit. 2023-06-16]. ISBN 9781118538203. Dostupné z: doi:10.1002/9781118538203
53. STEPANYUK, Galina A., Hao XU, Chia-Kuei WU, Svetlana V. MARKOVA, John LEE, Eugene S. VYSOTSKI a Bi-Cheng WANG. Expression, purification and characterization of the secreted luciferase of the copepod *Metridia longa* from Sf9 insect cells. *Protein Expression and Purification* [online]. 2008, 61(2), 142-148 [cit. 2023-09-12]. ISSN 10465928. Dostupné z: doi:10.1016/j.pep.2008.05.013
54. STINN, Anne, Jens FURKERT, Stefan H. E. KAUFMANN, Pedro MOURA-ALVES a Michael KOLBE. Novel Method for Quantifying AhR-Ligand Binding Affinities Using Microscale Thermophoresis. *Biosensors* [online]. 2021, 11(3) [cit. 2023-06-16]. ISSN 2079-6374. Dostupné z: doi:10.3390/bios11030060
55. SVANHOLM, Sofie, Moa SÄFHOLM, Nanna BRANDE-LAVRIDSEN, Erika LARSSON a Cecilia BERG. Developmental reproductive toxicity and endocrine activity of propiconazole in the *Xenopus tropicalis* model. *Science of The Total Environment* [online]. 2021, 753 [cit. 2023-03-28]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141940
56. SWEDENBORG, Elin, Maria KOTKA, Martin SEIFERT, Jun KANNO, Ingemar PONGRATZ a Joëlle RÜEGG. The aryl hydrocarbon receptor ligands 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 3-methylcholanthrene regulate distinct genetic networks. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. 2012, 362(1-2), 39-47 [cit. 2023-07-17]. ISSN 03037207. Dostupné z: doi:10.1016/j.mce.2012.05.006
57. TITUS, Linda. Evidence of intergenerational transmission of diethylstilbestrol health effects: hindsight and insight. *Biology of Reproduction* [online]. 2021, 105(3), 681-686 [cit. 2023-03-28]. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1093/biolre/ioab153
58. TOPOROVA, Lucia a Patrick BALAGUER. Nuclear receptors are the major targets of endocrine disrupting chemicals. *Molecular and Cellular*

- Endocrinology* [online]. 2020, **502** [cit. 2023-03-27]. ISSN 03037207. Dostupné z: doi:10.1016/j.mce.2019.110665
59. TREFTS, Elijah, Maureen GANNON a David H. WASSERMAN. The liver. *Current Biology* [online]. 2017, 27(21), R1147-R1151 [cit. 2023-09-07]. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2017.09.019
60. TRNKA, Brittany, Maya POLAN a Victoria A. ZIGMONT. Exposure to Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and infertility in women, NHANES 2013-2016. *Reproductive Toxicology* [online]. 2021, **103**, 46-50 [cit. 2023-03-28]. ISSN 08906238. Dostupné z: doi:10.1016/j.reprotox.2021.05.010
61. ULLAH, Sana, Amina ZUBERI, Mahmoud ALAGAWANY, et al. Cypermethrin induced toxicities in fish and adverse health outcomes: Its prevention and control measure adaptation. *Journal of Environmental Management* [online]. 2018, 206, 863-871 [cit. 2023-03-28]. ISSN 03014797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2017.11.076
62. VANDENBERG, Laura N. Low-Dose Effects of Hormones and Endocrine Disruptors. In: *Endocrine Disruptors* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 129-165 [cit. 2023-03-25]. Vitamins & Hormones. ISBN 9780128000953. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800095-3.00005-5
63. VERNETTI, Lawrence A., Andreas VOGT, Albert GOUGH a D. Lansing TAYLOR. Evolution of Experimental Models of the Liver to Predict Human Drug Hepatotoxicity and Efficacy. *Clinics in Liver Disease* [online]. 2017, 21(1), 197-214 [cit. 2023-07-03]. ISSN 10893261. Dostupné z: doi:10.1016/j.cld.2016.08.013
64. WATKINS, Deborah J., Jyoti JOSSON, Beth ELSTON, et al. Exposure to Perfluoroalkyl Acids and Markers of Kidney Function among Children and Adolescents Living near a Chemical Plant. *Environmental Health Perspectives* [online]. 2013, 121(5), 625-630 [cit. 2023-03-28]. ISSN 0091-6765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.1205838
65. WINCENT, Emma, Akira KUBOTA, Alicia TIMME-LARAGY, Maria E. JÖNSSON, Mark E. HAHN a John J. STEGEMAN. Biological effects of 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) in vivo are enhanced by loss of CYP1A function in an Ahr2-dependent manner. *Biochemical Pharmacology* [online]. 2016, 110-111, 117-129 [cit. 2023-07-06]. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2016.04.012

66. YILMAZ, Bayram, Hakan TEREKECI, Suleyman SANDAL a Fahrettin KELESTIMUR. Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* [online]. 2020, 21(1), 127-147 [cit. 2023-07-03]. ISSN 1389-9155. Dostupné z: doi:10.1007/s11154-019-09521-z
67. ZENG, Jie, Yiping ZHANG, Jinpeng RUAN, Zhenggang YANG, Chonggang WANG, Zhuan HONG a Zhenghong ZUO. Protective effects of fucoxanthin and fucoxanthinol against tributyltin-induced oxidative stress in HepG2 cells. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2018, 25(6), 5582-5589 [cit. 2023-09-07]. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-017-0661-3
68. ZHANG, Cong, Huixin LI, Lei QIN, Jing GE, Zhang QI, Milton TALUKDER, Yan-Hua LI a Jin-Long LI. Nuclear receptor AHR-mediated xenobiotic detoxification pathway involves in atrazine-induced nephrotoxicity in quail (*Coturnix C. coturnix*). *Environmental Pollution* [online]. 2019, 253, 889-898 [cit. 2023-07-05]. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.07.058

Internetové zdroje

1. Anonym. Cell Culture Basics Handbook. In: Thermo Fisher Scientific 2020. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Handbooks/gibco-cell-culture-basics-handbook.pdf>
2. Anonym. Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Technical Bulletin). 2023. Dostupné z: https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-luciferase-reporter-assay-system-protocol.pdf?rev=766125b44a18445cbde88f3262864617&sc_lang=en
3. Anonym. CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Technical Bulletin). 2012. In: Promega [online]. Dostupné z: https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol.pdf?rev=3c361e9a413e4bf9a6c94a3d1bfbbbd9&sc_lang=en
4. GORE Andrea C., CREWS David, DOAN Loretta L., LA MERRILL Michele, PATISAUL Heather, ZOTA Ami. Introduction to endocrine disrupting chemicals

- (EDCs) – A guide for public interest organizations and policy-makers. 2014. Endocrine Society. Dostupné z: <https://www.noharm.org/sites/default/files/documents-files/2999/Introduction%20to%20Endocrine%20Disrupting%20Chemicals.pdf>
5. Kameníčková A., Praktická cvičení z moderních technik studia buňky KBB/PCMTSB GENE REPORTER ASSAY. 2012. In: Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta UP Olomouc. Dostupné z: [PCMTS_gene_reporter_assay.pdf \(upol.cz\)](#)