

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybnářství a ochrany vod

Ústav komplexních systémů

Bakalářská práce

**Studium dynamiky živých lidských buněk v odezvě na běžné
kontaminanty vod s cílem vývoje citlivého specifického
analytického postupu**

Vypracoval: Jan Košek

Vedoucí práce: prof. RNDr. Dalibor Štys, CSc.

Konzultant práce: Ing. Renata Štysová Rychtáriková, Ph.D.

České Budějovice 2021

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jan KOŠEK**
Osobní číslo: **V21B052P**
Studijní program: **B0588A030002 Ochrana vod**
Téma práce: **Studium dynamiky živých lidských buněk v odezvě na běžné kontaminanty vod s cílem vývoje citlivého analytického postupu**
Zadávací katedra: **Ústav komplexních systémů**

Zásady pro vypracování

Živé linie lidských buněk je možné izolovat prakticky ze všech tkání exponovaných kontaminací. Nejčastěji se odezva lidských buněk na toxické látky studuje na jaterních buňkách (hepatocytech), kde se většina xenobiotik transformuje, aby je bylo možno bezpečně vyloučit z organismu.

Laboratoř experimentálních komplexních systémů v Nových Hradech vyvinula nový mikroskop a několik metod analýzy mikroskopického obrazu živé neznačené buňky, které umožňují sledovat vnitrobuněčnou dynamiku. Tyto metody chceme využít ke zvýšení rychlosti, citlivosti analýzy specifity odezvy vůči hlavním herbicidům, pesticidům a dalším látkám kontaminujícím vodu.

Očekávaným výstupem práce bude pokrok ve vývoji metody rychlé detekce kontaminantů a rozšíření znalostí o působení pesticidů na lidské hepatocyty. Obsahem práce bude (a) kultivace živých buněk v/bez přítomnosti pesticidů (zejména terbuthylazinu-2-hydroxy), (b) sběr mikroskopických dat, (c) automatická analýza obrazu s využitím originálních software, testování těchto software a (d) komunikace s vývojáři software a mikroskopu.

Rozsah pracovní zprávy: **25-50 stran**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby (do 20 stran)**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Lonhus K., Rychtáriková R., Ghaznavi A., Štys D. (2021) Estimation of Rheological Parameters for Unstained Living Cells. *Eur Phys J Spec Top* 230(4), 1105–1112.

Rychtáriková R., Štys D. (2017) Observation of Dynamics Inside an Unlabeled Live Cell Using a Bright-Field Photon Microscopy: Evaluation of Organelles' Trajectories. *Lect Notes Comp Sci* 10209, 700-711, Springer, Cham.

Platonova G., Štys D., Souček P., Lonhus K., Valenta J., Rychtáriková R. (2021) Spectroscopic Approach to Correction and Visualization of Bright-Field Light Transmission Microscopy Biological Data. *Photonics* 8(8), 333.

Slivoně M. (2020) Vliv pesticidů na živé buňky. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

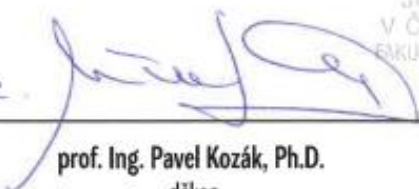
Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Renata Štysová Rychtáriková, Ph.D.**
Ústav komplexních systémů

Konzultant bakalářské práce: **MSc. Kirill Lonhus, Ph.D.**

Datum zadání bakalářské práce: 21. ledna 2022

Termín odevzdání bakalářské práce: 2. května 2023

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBAŘSTVÍ A OCHRANY
ZÁTIŠÍ 28/II
379 01, Vodňany

02. 
prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan


Ing. Petr Císař, Ph.D.
ředitel

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne: 2.5. 2023



Jan Košek

Poděkování:

Tímto bych rád poděkoval vedoucí mé bakalářské práce Ing. Bc. Renatě Štysové Rychtárikové, Ph.D. za její metodické vedení, odborné konzultace, cenné připomínky a vstřícnost při zpracování této práce. Dále chci poděkovat prof. RNDr. Daliboru Štysovi, CSc. za jeho rady spojené se zpracováním mikroskopických snímků a MSc. Kirillu Lonhusovi Ph.D. za jeho konzultace v oblasti reologie a zpracování dat. Šárce Beranové a Pavlíně Tláskalové za poskytnuté materiály o používaných chemických látkách, rady a pomoc při samotném provedení experimentu.

Obsah:

1	Úvod.....	8
2	Literární rešerše.....	9
2.1	Antropogenní polutanty vod.....	9
2.1.1	Terbutylazine-2-hydroxy (HTBA).....	10
2.2	Toxicita a její testování.....	10
2.2.1	Validace nových metod testování toxicity.....	13
2.3	In vitro testování.....	14
2.3.1	Současné přístupy ve vývoji in vitro testování.....	15
2.4	Buněčné kultury.....	19
2.4.1	Princip buněčné kultivace.....	19
2.4.2	Nové metody v buněčné kultivaci.....	20
2.4.3	Buněčná linie Hep G2.....	21
2.5	HCI na principu vícenásobného sledování částic a mikrореologie (MPT)....	21
2.5.1	Použití pasivní mikrореologie v MPT.....	22
2.5.2	MPT algoritmy.....	25
3	Cíle Práce.....	27
4	Metodika práce.....	28
4.1	Soupis použitých chemikálií, nástrojů a programů.....	29
4.2	Kultivace a příprava vzorku buněčné linie Hep G2.....	29
4.2.1	Příprava živného séra EMEM pro kultivaci Hep G2.....	29
4.2.2	Kultivace linie Hep G2.....	30
4.2.3	Příprava vzorků Hep G2.....	31
4.2.4	Příprava roztoku HTBA.....	31

4.3	Sběr mikroskopických dat.....	33
4.3.1	Technické parametry mikroskopu-superskopu.....	33
4.3.2	Snímání vzorků	34
4.3.3	Kalibrace snímků	35
4.4	Algoritmus a vyhodnocení dat	36
4.4.1	Detekce částic v obraze	37
4.4.2	Tvorba vektorového pole intracelulárních pohybů.....	38
4.4.3	Výpočet průměrného vektoru pohybu hmoty.....	39
4.4.4	Analýza dat	42
5	Výsledky.....	43
5.1	Porovnání distribucí na základě statistických charakteristik	44
5.2	Výsledky multifraktální analýzy.....	49
6	Diskuze	50
7	Závěr.....	54
8	Seznam citované literatury	56
9	Seznam použitých zkratk	65
10	Seznam obrázků a tabulek.....	68
10.1	Seznam Obrázků:.....	68
10.2	Seznam tabulek:.....	69
	Abstrakt (český).....	70
	Abstract (English)	71

1 Úvod

Současný chemický a farmaceutický průmysl produkuje tisíce nových látek za rok. Pro zajištění bezpečnosti spotřebitelů a ochrany životního prostředí je třeba co nejvíce informací o těchto látkách. I přes zajištění bezpečnosti pro spotřebitele se mohou látky či jejich rezidua dostávat prostřednictvím vody, vzduchu, či nedbalosti do přírody. V životním prostředí pak mohou vykazovat různé toxické účinky. Právě vodou a vzduchem se látky mohou rychle přenášet na vzdálená místa, prosakovat do půdy a může se zvyšovat i jejich obecná a také specifická toxicita. Látky v životním prostředí a jejich osud studuje vědní obor ekotoxikologie (Kašpar, 2015). Abychom zjistili vlastnosti chemických látek a jejich účinky na lidský organismus a životní prostředí, používají se tzv. testy toxicity. Ty se provádí na zvířatech pomocí chemických analýz, simulování účinků za pomoci výpočetní techniky či v laboratorních podmínkách na eukaryotických buňkách a bakteriích. Právě zmiňované testování na buňkách a bakteriích náleží do skupiny testování nazývané testování toxicity *in vitro*, nebo ve volném překladu testování ve zkumavce (Stodůlková, 2016; Kašpar, 2015).

V současné době se stále více uplatňují metody *in vitro* pro testování toxicity látek. Tento přístup částečně nahrazuje počet použitých zvířat a umožňuje zmírnit jejich stres a utrpení. Testování *in vitro* je podporováno mnoha státními i nestátními institucemi v čele s Evropskou unií a mezinárodní Organizací pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (Kubincová a kol., 2016). Řada současných specifických testů toxicity látek *in vitro* využívá různých markerů cytotoxicity. K využití markerů je zapotřebí zjistit mechanismy účinku sledovaných látek, nebo využít již známých mechanismů (Stodůlková, 2016). Společně s rozvojem testování *in vitro* však také vzniká množství nových přístupů, které by mohly přinést nové hloubkové informace pro regulaci rizik (Rehberger a kol., 2018).

Tato práce je zaměřená na ověření teoretických základů a navrženého algoritmu pro studium dynamiky buněk a jeho možné budoucí aplikaci v testování *in vitro*. Experimentální metoda využívaná v této práci je založená na rekonstrukci vnitrobuněčného toku. Využívá principů mikrореologie pro stanovení intenzity metabolismu buněk. Algoritmus je založen na sledování zrychlených robustních příznaků (zkratka SURF, speeded-up robust features) ve světelně mikroskopickém obraze. Z nich jsou vypočítány vektory pohybu vnitrobuněčné hmoty. Algoritmus dále odděluje dva hlavní komponenty pohybů uvnitř buněk. Přímý (řízený) pohyb

samotných organel s většími částicemi (může být např. RNA, bílkovinné struktury) a Brownův (náhodný) pohyb. Výhodou této metody je využití pouze několika běžně dostupných přístrojů a programů. Je potřeba pouze ideově jednoduchý světelný mikroskop se schopností snímat video živé buňky a počítač schopný zpracovat taková data. Algoritmus použitý v této práci byl vyvinut Kirillem Lonhusem z ÚKS FROV (Lonhus a kol., 2021).

2 Literární rešerše

2.1 Antropogenní polutanty vod

Voda je základním zdrojem pro život a díky jejímu hydrologickému cyklu nás ovlivňuje na globální úrovni. Její místní znečištění může mít vliv i na jiná vzdálená místa. Na 3. světovém fóru o vodě v Kyotu roku 2003 bylo uvedeno, že od roku 2002 se do vody dostane každý den přes 2 miliony tun polutantů různého původu (ze zemědělství, průmyslu, komunálního odpadu). Antropogenní polutanty jsou chemické látky pocházející z lidské činnosti, které mají závažné dopady na environmentální prostředí v důsledku své akutní a chronické toxicity. Polutanty charakterizuje několik kategorií, které jsou děleny na anorganické (zejména těžké kovy) a organické (pesticidy, léčiva, plasty, ropné látky, nadbytečný dusík, fosfor a další). Kromě dopadů na životní prostředí se toxické polutanty mohou dostávat přímo k člověku skrze samotnou vodu, či prostřednictvím fauny, flory a mikroorganismů (Catalina a kol., 2021; Kopáček a kol., 2021).

Polutanty v životním prostředí degradují a mění svoji chemickou strukturu. Dochází k oxidaci a redukci díky biologickým, fyzikálním a chemickým činitelům. Tato rezidua polutantů mohou vykazovat vyšší toxicitu pro prostředí, či dokonce člověka. Kromě možné vyšší toxicity, mohou být rezidua hůře detekovatelná a odstranitelná, kvůli změně struktury a vlastností vůči původní látce (Catalina a kol., 2021; Kushniarou a kol., 2019).

Mezi největší zdroje znečištění se řadí zemědělství. Organizace OECD (Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj) označuje kvalitu vody ze zemědělství mezi hlavní problémy životního prostředí. Zemědělský sektor je primárně zodpovědný za

znečištění živinami (fosfor, dusík), zasolení, biologické znečištění vod a výskyt pesticidů v životním prostředí (Parris, 2011). V moderní době je snaha zemědělská znečištění redukovat správnými zemědělskými postupy a testováním toxických účinků pesticidů před uvedením na trh. Zhruba 35% množství pesticidů skončí při postřiku v půdě, vodě nebo se při postřiku vypaří do atmosféry (Stehlíková, 2010). Pesticidy se infiltrací a splachem dostávají do podzemních a povrchových vod. V povrchových vodách mohou negativně ovlivňovat systémy společenstev a způsobit disturbance. To vede k ničení habitatů a přírodního prostředí. Z těchto důvodů je třeba dbát na správné používání pesticidů a je zapotřebí dostatečné kontroly nových přípravků (Parris, 2011; Kushniarou a kol., 2011).

2.1.1 Terbutylazine-2-hydroxy (HTBA)

Jako testovaná látka byl zvolen metabolit pesticidu TBA terbutylazin-2-hydroxy (HTBA). HTBA je sloučenina patřící do třídy triazinů. Pesticid se používá k ochraně zemědělských plodin jako je kukuřice, řepka olejná, píceiny i obiloviny. Jde o selektivní pesticid. Terbutylazin je široce využívaný herbicid. V České republice je jeho koncentrace v přírodních vodách jedna z nejvyšších v porovnání s ostatními typy pesticidů (Stehlíková 2010). Účinky polutantů v životním prostředí nebyly doposud dostatečně prozkoumány. U části polutantů z TBA byl prokázán toxický účinek na environmentální prostředí. Jmenovitě jde o desethylterbutylazin (DETA), desisopropylterbutylazin (HTB) a podezřelý z toxicity je zde použitý terbutylazin-2-hydroxy (HTBA). Co se toxicity člověka týče, účinky pesticidů, ani polutantů zde plně prokázány nebyli. Problematika polutantů také spočívá v rozpustnosti ve vodě. Vodou se může pesticid a jeho polutanty prosakovat hluboko do půd, až k podzemním vodám, resp. se rychleji šířit v životním prostředí (Velíšek a kol, 2015; Kushniarou a kol., 2018)

2.2 Toxicita a její testování

Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj definuje toxicitu jako schopnost látky způsobit negativní účinky vedoucí k vážnému biologickému poškození nebo smrti po expozici, či kontaminaci touto látkou (OECD). V ekotoxikologii je obecně definována jako účinek cizorodých látek na vodní společenstva organismů (Kašpar, 2015). Pojem toxicita je relativní. Tento pojem porovnává účinky chemikálií mezi sebou a definice je tak podmíněna údaji o vlastnostech látek, jejich mechanismu účinku a dalších faktorech. Látka, která vyvolává nepříznivé účinky (otravu) již v malých dávkách, je označována jako jed, nebo toxická látka. Toxické látky jsou podle dávky a účinku

děleny do několika kategorií (Horák a kol., 2004). Tyto kategorie jsou určeny Směrnicí Rady 67/548/EHS a jejími právními úpravami. V České republice je Směrnice Rady 67/548/EHS uplatněna zákonem č. 350/2011 Sb, o chemických látkách a chemických směsích. (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008; zákon č. 350/2011 Sb.)

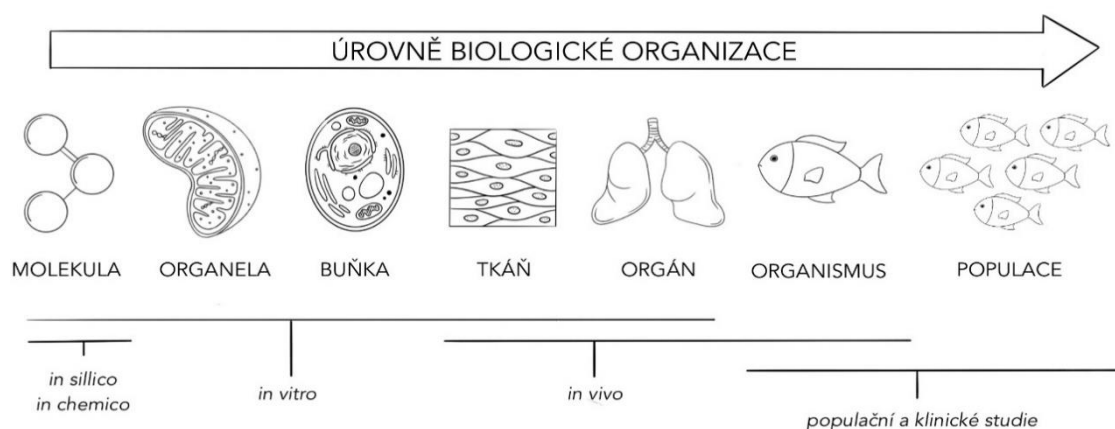
Každá chemická látka je před uvedením na trh testována. Je ověřena její bezpečnost pro člověka, životní prostředí a v rámci EU je registrována do systému pro registraci, hodnocení, povolování a evaluaci chemických látek (REACH) (Albrechtová, 2013).

Ve 20. století byla toxicita testována zejména tradiční metodou *in vivo*. Touto normovanou metodou byly stanovovány zejména hodnoty akutní toxicity LD50 a LC50. Hodnoty LD50 a LC50 určují dávku, či koncentraci látky, která způsobí úmrtí u 50 % testovaných zvířat (KUBINCOVÁ a kol., 2016). Kromě hodnot akutní toxicity LD50 a LC50, se dnes běžně stanovuje i mnoho dalších srovnávacích hodnot (např. TD50, NOAEL, LOAEL) a typů toxicity (např. teratogenita, mutagenita, chronická toxicita). Všechny srovnávací hodnoty jsou určovány chemickým zákonem (zákon č. 350/2011 Sb.). S přibývajícimi novými chemickými látkami a zpřísněním norem byl tradiční přístup testování kritizován eticky i vědecky. Důvodem bylo nadměrné využívání zvířat, které přestávalo být udržitelné při tak velkém počtu testování. Z tohoto důvodu byl pro testování toxicity integrován koncept 3R, jehož účelem je snížení počtu testovaných zvířat (Kubincová a kol., 2016). Principy 3R testování toxicity mají snížit (reduction) počet zvířat v testovaném vzorku, nahradit je (replacement) a zejména zmírnit (refinement) jejich utrpení. Koncepce 3R byla poprvé publikována v práci Russella a Burche „The Principles of Humane Experimental Technique“ v roce 1959 (Tannenbaum a Bennett, 2015). Pro dodržení konceptu 3R se zvířata začala nahrazovat testy *in vitro* a *in silico*. Testování *in vitro* (= ve zkumavce) testuje chemické látky na buněčných kulturách živočišného nebo rostlinného původu. Testy *in silico* jsou založené na úplném nahrazení a k testování využívají výpočetní techniku (Albrechtová, 2013).

Díky požadavkům 3R došlo v posledních 20 letech k velkému rozvoji nových toxikologických a ekotoxikologických metod. Na druhé straně tyto alternativní metody jsou často aplikovatelné pouze na specifické toxikologické mechanismy účinku. Mechanismy účinků se často odlišují v závislosti na typu buňky, membrány, či živočišném druhu (Caloni a kol., 2022). Pro zjištění relevantnějších toxikologických a

ekotoxikologických procesů se používají tzv. sady (baterie) testů, které dávají více informací o zkoumaných chemických látkách (Kubincová a kol., 2016). Baterie testů jsou stále rozvíjeny a kombinují všechny druhy testování *in vitro*, *in chemico*, *in silico* a *in vivo*. Pro dosažení komplexních informací se využívají kromě baterií testů i jednotlivé testy a veškeré alternativní metody, které již byly validovány (Rovida a kol., 2015).

Tyto nové flexibilní přístupy k hodnocení chemické bezpečnosti, založené na odvozování z různých metod a zdrojů, se označují jako integrované přístupy k testování a hodnocení (IATA). Program IATA (z angl. „Integrated Approaches to Testing and Assessment“) byl spuštěn v roce 2015 Organizací pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD). Účelem programu je rychlejší odstranění rozdílu mezi počtem používaných a dosud hodnocených chemikálií. Systém IATA funguje na stupňovitém systému zvaném „cesta nepříznivého výsledku“ (z angl. „Adverse outcome pathway“ = AOP). Při postupu podle AOP se začíná od rešerše a postupnými kroky od nejnižších struktur po organismy a živé systémy se látka testuje *in chemico*, *in silico*, *in vitro*, a nakonec ekotoxikologickými testy *in vivo* (Obr. 1). Pokud je látka v kterémkoli kroku vyhodnocena jako vysoce toxická, testování je ukončeno s tímto výsledkem (OECD).



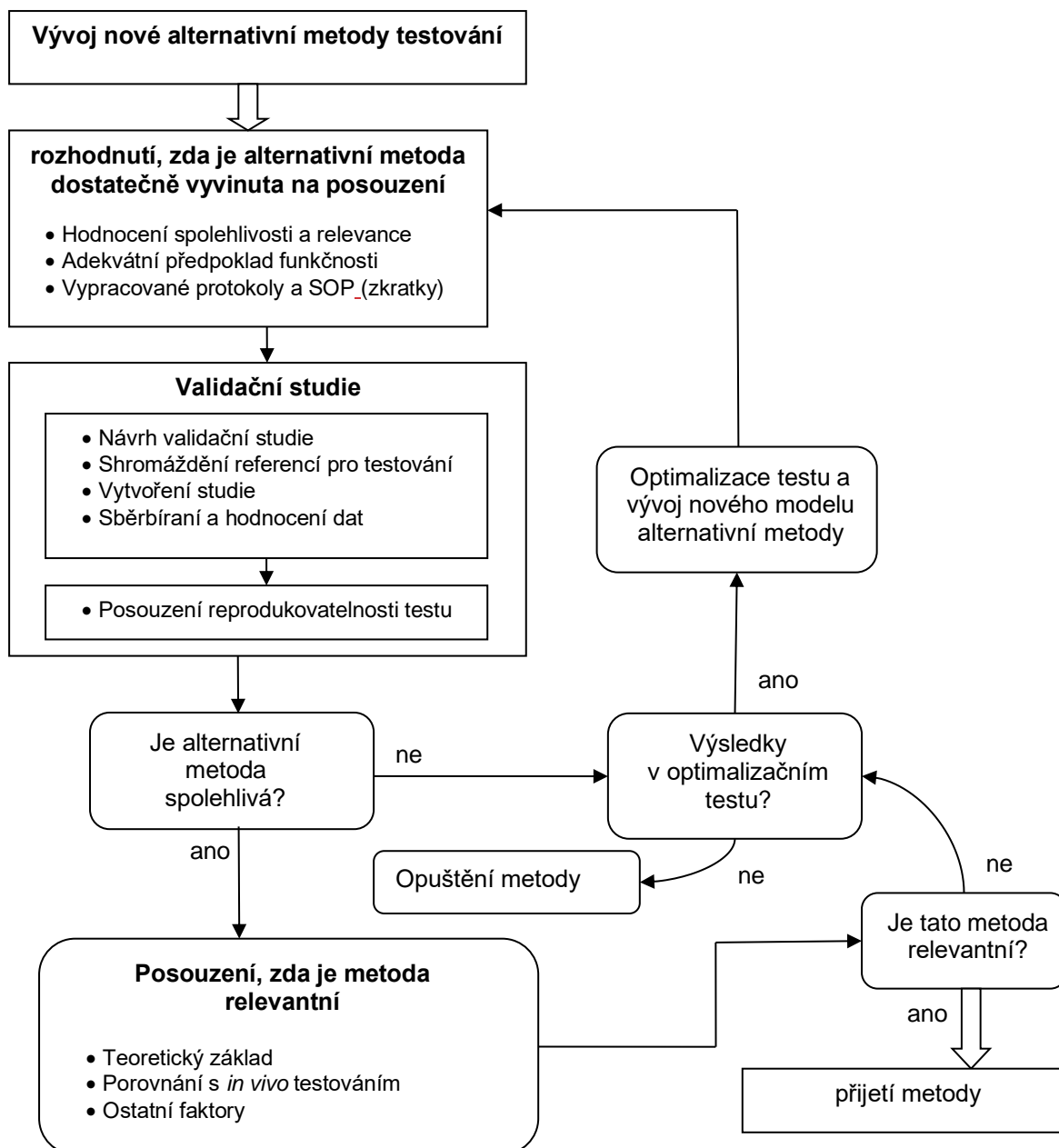
Obrázek 1: Schématické zobrazení AOP (= „Adverse outcome pathway“) systému od nejnižších trofických úrovní po složitější a typy testů, které se v jednotlivých trofických úrovních nejčastěji využívají

2.2.1 Validace nových metod testování toxicity

Rozvoj nových alternativních metod k testování *in vivo* nastal s úpravou legislativy. První změnou bylo v roce 1986 nařízení Evropské komise 86/609/EEC, které reguluje počet použitých zvířat při experimentech. Druhá významná změna proběhla v roce 2010 nařízením 2010/63/EU (EURL ECVAM). Tato směrnice stanovuje přímé požadavky zaručující vysokou ochranu zvířat ve všech členských státech EU. Určuje, jaká zvířata a za jakých přesných podmínek je možné využít k testování. Apeluje na alternativní metody. Jmenuje a popisuje principy 3R konceptu testování. Zavazuje státy k určení kontrolních orgánů nad danou problematikou (2010/63/EU). Jedním z bodů nařízení 2010/63/EU je také pověření evropského kontrolního orgánu Laboratoře Evropské unie pro alternativy k testování na zvířatech (EURL ECVAM).

EURL ECVAM je výzkumné středisko a referenční laboratoř Evropské komise. Podílí se na validaci alternativních metod, podporuje a koordinuje jejich rozvoj a správu informačních systémů (2010/63/EU). Příkladem alternativních metod validovaných EURL ECVAM jsou testy dráždivosti, poleptání a citlivosti kůže, testy genotoxicity, karcinogenity. Tyto alternativní metody využívají místo zvířat buněčné kultury (EURL ECVAM).

Při procesu validace (Obr. 2) je nejdříve nutné posouzení předložené zkušební metody (EURL ECVAM). V tomto kroku se také kontrolují zúčastněné strany. V druhé fázi se provádí ověřovací studie. Ty mohou probíhat za spolupráce jiných evropských laboratoří. Dalším krokem je kontrola a vědecké hodnocení EURL ECVAM. EURL ECVAM vypracuje doporučení o stavu platnosti zkušební metody a ověřovacích studií (EURL ECVAM). Nakonec může být nová metoda zapsána do seznamů organizací, jako např. organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD), mezinárodní organizací pro standardizaci (ISO), Evropská agentura pro léčivé přípravky (EMA), apod. (Bruner a kol., 1998).



Obrázek 2: Schéma vývoje a validace alternativních metod *in vitro*

2.3 *In vitro* testování

In vitro testování je alternativou k testům na zvířatech. Význam slova znamená ve skle nebo ve zkumavce. Jde o testování, při kterém se využívají kultury bakterií, sinic, řas, prvoků, semena rostlin, červi atd. Kromě nich se ve studiích *in vitro* široce používají buněčné či tkáňové kultury získané z vyšších organismů včetně rostlin a člověka. *In vitro* testování se stalo důležitým nástrojem při studiu buněk a jejich expozici

cizorodými látkami (Klusoň, 2014; Albrechtová, 2013). V případě buněčných preparátů jako např. jaterní buňky nebo leukocyty je výzkum převážně ve fázi studia (cytotoxicity, biochemických procesů, mechanismu účinků atd.) než rutinního testování. Většina validních dat pro toxicitu a mechanismy účinku stále pochází z testování *in vivo* na živých zvířatech (Klusoň, 2014). Díky nutnosti alternativních metod k testování *in vivo* se však za poslední dekády výrazně zvýšila dostupnost a výzkum testování *in vitro*. Pro plný potenciál metod *in vitro* jako klíčového nástroje toxikologie je třeba vyvíjet je způsobem, který zaručí vědeckou integritu a kvalitu (OECD, No. 286). Za tímto účelem je výzkum *in vitro* podporován a normován řadou organizací zejména OECD, ISO („International Organisation for Standardisation“), EURL ECVAM, FRAME („Fund for Replacement for Animals in medical Experiments“) a dalších (Albrechtová, 2013).

Od vývoje metody *in vitro* po její ověření a implementaci je potřeba použití osvědčených vědeckých, technických a kvalitativních postupů. Pro tuto potřebu vydala OECD dokument GIVIMP („Guidance Document on Good *In Vitro* Method Practices“) s pokyny pro správné postupy metod *in vitro*. Dokument je zaměřen převážně na implementaci nových metod *in vitro* do praxe. GIVIMP také poskytuje informace pro jejich vývoj a ověřování. Mezi důležité body pro vývoj jmenuje standardní operační postupy (SOP), bezpečnost metod v regulačním kontextu, klíčové aspekty pro relevantnost a spolehlivost, důležitosti správného designu metody založeného na vědeckých důkazech a datech (OECD, No. 286). Kromě OECD vydává informace také Evropská agentura pro chemické látky (ECHA). Jedním z dokumentů ECHA je také průvodce, jak používat alternativy ke zkouškám na zvířatech. V tomto dokumentu jsou popsány požadavky a informace pro registraci podle nařízení REACH (ECHA-16-B-25-CS, 2016).

2.3.1 Současné přístupy ve vývoji *in vitro* testování

Testování *in vitro* má dlouhou historii, která sahá na začátek 20. století. K největšímu rozšíření testování *in vitro* však dochází zejména v současném 21. století. Vývoj nových metod a přístupů začal být široce podporován vládními agenturami a dalšími subjekty. To umožnilo značný posun mnoha metod a směrů v testování *in vitro* (Krewski, 2020). I přes rozsáhlý vývoj v posledních dekáдах oblast toxikologie čelí několika hlavním problémům, které by v budoucnu měly být řešeny. Mezi tyto problémy se například řadí (Hartung, 2017)

- nesourodost testování a přijímání rizik pro různé typy látek a zeměpisné oblasti,
- rozdíl v potřebě testování a nákladech na ně vynaložených,
- tradiční testy nevhodné pro nové produkty,
- problém při testování směsí toxických látek,
- omezená predikce toxikantů pro lidi a environmentální prostředí.

Pro obor jako takový existují mezinárodní harmonizované metody a zajištění bezpečnosti. Ty ale nemusí být plně vhodné pro nové výzvy a problémy v toxikologii. Proto je stále důležitý i vývoj nových metod, či rozvoj stávajících. Za účelem přehlednosti vznikají metaanalýzy a zprávy jako například *Toxicity Testing for the 21st Century: A Vision and a Strategy* (Hartung, 2017), navazující *Toxicity Testing in the 21st Century: Progress in the Past Decade and Future Perspectives* (Krewski, 2020), *Assay Development Guidelines for Image-Based High Content Screening, High Content Analysis and High Content Imaging* (Buchser a kol., 2014), nebo dříve jmenovaná dokumentace GIVIMP (OECD, No. 286).

Výzkum *in vitro* se stále rozšiřuje a do současnosti tak vzniklo velké množství metod. Současný systém testování *in vitro* je tak do jisté míry nesourodý a segmentace metod je tak relativní. Rozdělení metod uvedené zde je založené na různých oborech a nástrojích, které jsou používány. Některé metody tedy spadají pod více směrů (Hartung, 2017; Krewski, 2020).

Metody využívající dráhy toxicity (Toxicity pathways): Metody využívající dráhy toxicity jsou definovány jako buněčná odezva v podobě sítě signálů drah, jejichž odpověď by mohla vést k nepříznivým důsledkům. U metod sledujících dráhy toxicity se využívá měření oxidativního stresu, estragonových signálů, metabotropních receptorů (GPCR) a dalších indikátorů. Tyto metody využívají znalostí molekulárních interakcí a jejich měřením zjišťují změny. Při vývoji těchto metod je potřeba plně charakterizovat tyto cesty pro získání relevantních výsledků koncentrace-odpověď. Sledování jednoho indikátoru je nedostatečné a metody tak využívají více cest a indikátorů. Pro zjednodušení mohou být řazeny do stupňovité sestavy obdobně jako postup AOP. Oproti AOP je tento přístup však v menším měřítku. Zatímco AOP je stupňovitě od buněk po společenstva. U drah toxicity se sestava zaměřuje na měřítko molekula-buňka (Whelan a Andersen, 2013; Krewski, 2020).

Toxikogenomika: Toxikogenomika je směr, který kombinuje poznatky z obecné toxikologie, genetiky, bioinformatiky a molekulární biologie. K testování a posouzení bezpečnosti jsou používány nástroje využívající genové exprese a s ní související proteinovou aktivitu v buňkách či tkáních v odpovědi na toxické látky (Oyejide a kol., 2017). Mezi základní principy se řadí zjištění pochopení vztahu mezi stresem a nemocí (např rakovinné bujení), identifikace biomarkerů a objasnění mechanismů molekulární toxicity. Metody využívající toxikogenomiku mají potenciál vyřešit určité limity současné toxikologie (Trivedi a kol., 2013). Metody genové exprese jsou dnes velice přesné a komerčně využívané. Příkladem může být metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) nebo RNA- seq (Krewski, 2020). Velký potenciál má metoda CRISPR-Cas9, za kterou byla v roce 2020 udělena Nobelova cena (Ebrahimi, 2020). Metody založené na toxikogenomice se stávají dostupnější. Jsou vyvíjeny počítačové nástroje a programy ulehčující vývoj a dostupnost informací jako např. BMDEExpress software. To umožňuje lepší automatizaci procesů, zlevnění, přesnější specifické testování a zajištění bezpečnosti chemických látek (Krewski, 2020).

Zobrazování s vysokým obsahem informací (High-content imaging = HCI): Jedná se o metody využívající mikroskopii v kombinaci s analytickými výpočetními systémy. HCI umožňuje analýzu několika morfologických a funkčních parametrů v biologickém systému současně (Vliet a kol., 2014). V ideálním případě by tato oblast měla umožnit široké pokrytí biologických reakcí a informací. Metody by měly být dostatečně jednoduché, aby byly schopné rychle zpracovat středně až vysoce objemová data a dostatečně indikovat nepříznivé účinků toxických látek (Krewski, 2020). Výhodou těchto přístupů je možnost zjednodušení postupů a automatizace. Metody spadající pod HCI mohou poskytovat základní informace v zajištění chemické bezpečnosti za nízkou cenu a krátký čas (Buchser a kol., 2014).

Kromě samotného mikroskopu lze v HCI použít jakýkoliv nástroj poskytující několik parametrických informací. Příkladem je třídíč buněk aktivovaných fluorescencí (FACS) využívající lasery nebo MALDI-TOF hmotnostní spektrometry. Nejčastěji se používá fluorescenční technologie či klasická světelná mikroskopie. Velkou výzvou HCI metod je stále výpočetní kapacita a software. Kvalitní data obsahující velké množství informací mohou být produkována i v jednotkách terabytů za den (Buchser a kol., 2014). V poslední době je koncept HCI aplikován v technologii 3D buněčné kultivace (3D a 2D kultivace je podrobněji popsána v kapitole 2.4 Buněčné kultury). 3D kultivace

umožňuje relevantnější a komplexnější informace. Je zde předpoklad eliminace limitací 2D kultur v kontextu zajištění chemické bezpečnosti (Joshi a Lee, 2015).

Studium expozice (Exposure science): Přístupy založené na kvantifikaci vlivů způsobených vystavením vnějšímu zdroji látky. Základním principem je pozorování reakcí (úmrtí, imobilizace, výrazná změna chování) ekologického druhu či buněk na testovanou látku nebo směs látek. Výsledek se nejčastěji kvantifikuje indexovými hodnotami LD50 či LC50. Jde o široce používané metody, které mají nezastupitelné použití v testování toxicity a ekotoxicity (Krewski, 2020). Poskytují popis účinků testovaných látek a směsí na konkrétní ekosystém (Kočí, 2006). Příkladem jsou některé široce používané metody v ekotoxikologii. Mezi známé standardizované metody se řadí akutní a chronický test na korýši *Daphnia magna*, test inhibice růstu kořene *Sinapis alba*, test inhibice růstu sladkovodních řas, testy na vířnících, embryonální a embryo-larvální testy toxicity na rybách atd. (Kašpar, 2015; Davoren a kol., 2005). Metody studia expozice poskytují solidní základní informace. V budoucnu je v této oblasti předpoklad širšího využití moderních technologií, což by mohlo zlepšit automatizaci a metody zjednodušit (Krewski, 2020).

Hlubková toxikokinetika (High-throughput toxicokinetics, HTTK): Toxikokinetika v kontextu obecné toxikologie popisuje absorpci, distribuci, metabolismus a vyloučení chemických látek a jejich metabolitů z těla. V *in vitro* jde především o statistickou analýzu chemikálií pomocí hloubkového screeningu. Hlubkový screening má potenciál určit koncentrace, které způsobují poruchy organismu a extrapolovat je z *in vitro* na *in vivo* (IVIVE). Výhodou HTTK je možnost rychlé predikce škodlivé koncentrace chemikálií, která by měla odpovídat reálným hodnotám *in vivo*. Predikce koncentrací *in vivo* je nejčastěji určena pomocí metody zpětné dozimetrie (Krewski, 2020). V HTTK se používá celá řada ukazatelů. Těmito ukazateli je myšlena například vazba na plazmatické proteiny, jaterní odpověď či fluoreskující enzymy. Jednotlivé ukazatele se dají využít jen u určitých chemických struktur a vlastností (Pearce a kol., 2017; Hertzberg a Pope, 2000). K testování chemické bezpečnosti těmito metodami je nutná znalost toxikokinetických modelů, fyziologická data a struktura chemických látek. Existuje několik programů jako ToxCast, Tox2 nebo htk, které takto testují chemické látky, a další se vyvíjí (Pearce a kol., 2017).

2.4 Buněčné kultury

Moderní přístupy *in vitro* jsou v biologii a toxikologii spojovány s buněčnými kulturami. Původ samotných buněčných kultur se datuje do roku 1885, kdy Wilhelm Roux dokázal po několik dní udržet živou dřeňovou destičku embryonálního kuřete v teplém solném roztoku. Začátkem 20. století bylo publikováno několik studií zabývajících se kultivací tkání, jejich udržováním a využitím v biologii (Hoffman, 2016). Významný okamžik pro moderní buněčné kultury nastal v roce 1951 s první úspěšnou kultivací lidských buněk. Tyto buňky jsou dodnes využívány v biologii, farmakologii i toxikologii. Název buněčné kultury je HeLa a je odvozen od jména jejich původce Henrietty Lacks. Henrietta přišla do nemocnice Johna Hopkinse na gynekologické vyšetření, při němž jí byla zjištěna rakovina děložního čípku. Při léčbě jí byly odebrány vzorky nádoru, které byly poslány na místní patologii. Sama Henrietta umřela po pár měsících léčby. Buňky se dostaly k testování Dr. Greyem a jeho týmem, který se zabýval buněčnými kulturami již před touto událostí. Dr. Grey v roce 1933 přišel s novou technikou kultivace buněk, tzv. technikou roller-tube. Vzorek Henrietty byl odlišný od jiných vzorků rakovin. HeLa buňky za použití techniky roller-tube stabilně rostly, což se před tím s žádnými lidskými buňkami nedařilo. V roce 1952 Dr. Grey s kolegy publikoval výsledky experimentu na buňkách HeLa, ve kterém zveřejnil, že živé lidské buňky jsou kontinuálně kultivovány téměř rok. Po zveřejnění byly HeLa buňky na žádosti rozeslány do dalších laboratoří po celém světě. To umožnilo nové pokroky při výzkumu buněčných kultur (Lucey a kol., 2009). Jedinečnost buněk HeLa spočívá v zachování délky telomer a zamezení stárnutí linie. Buňky se mohou bez omezení dělit a stávají se tzv. nesmrtelnou linií buněk (Horáčková, 2013).

2.4.1 Princip buněčné kultivace

Od izolace linie HeLa do současnosti se podařilo izolovat stovky buněčných linií. Ne všechny linie však mají vlastnost neomezeného dělení. Na základě vlastnosti dělení se mohou rozlišovat 3 typy buněčných linií: primární buňky, transformované linie a samoobnovující se buňky (Segeritz, 2017).

Primární buněčné linie jsou například hepatocyty přímo izolované z jater. Jde o kultury, které jsou izolovány ze zdravých tkání. Nejvíce se využívají buňky epitelu, cévního endotelu, fibroblasty, hepatocyty, neurony atp. Primární kultury nejlépe reprezentují vlastnosti skutečných tkání. Jejich životnost je však omezená počtem dělení buněk a

jsou citlivější na kultivaci (Sigma-Aldrich). Kromě kratší životnosti je také z etických důvodů legislativou omezeno jejich používání a držení (Horáčková, 2013).

Transformované buněčné linie mohou mít přirozený původ (často z maligního tumoru) nebo jsou tvořeny genetickou manipulací. Jde o tzv. nesmrtelné tkáňové kultury, u kterých je možné neomezené pasážování. Příkladem může být linie HeLa nebo Hep G2 (která byla použita v této práci). Transformované buněčné linie bývají odolnější, rychle se dělí a jsou dostupnější než primární a samoobnovující se kultury. Jejich použití v biologii a testování je však někdy zpochybňováno. Důvodem je, že buňky mohou ve svém fungování vykazovat abnormality od svých primárních buněk.

Mezi samoobnovující se buňky patří např. embryonální kmenové buňky. Tyto linie buněk jsou charakterizovány schopností se diferencovat do jiných typů buněk. Zároveň umožňují dlouhodobé uchování a působí jako relevantní zástupci mechanismů *in vivo* (Horáčková, 2013; Segeritz, 2017).

Pro udržení zdravé kultury a její růst je nutné dodržovat základní potřeby buněk, jejich mikroprostředí a sterilní prostředí laboratoře, aby se zabránilo jejich kontaminaci. Buňky se kultivují v kultivačních lahvičkách za kontrolované teploty, pH, CO₂ a O₂. Tyto faktory jsou specifické pro každou buněčnou linii (Segeritz, 2017). Například teplota pro savčí buňky bývá cca 36–37 °C a pro buňky poikilotermních živočichů se může lišit i v řádu několik stupňů od 15–26 °C podle živočicha a typu tkáně (thermofisher.com, 2022). Dalším důležitým požadavkem pro kultivaci je vhodné medium. Medium je roztok živin potřebných pro správnou kultivaci. Je složen zejména ze sacharidů, vitamínů, aminokyselin, minerálů a hormonů s dalšími komponenty pro kontrolu fyzikálně-chemických parametrů. V buněčné kultivaci existuje velká variabilita v mediích pro různé typy buněk a tkání (Segeritz, 2017).

2.4.2 Nové metody v buněčné kultivaci

Většina buněk je tradičně kultivována takzvanými dvoudimenzionálními (2D) metodami. Jde o metody kultivace, při kterých buňky rostou v jedné monovrstvě. Kromě 2D kultivace je v posledních 20 letech stoupající trend tzv. třídimenzionálních (3D) metod. Zatímco v roce 2005 bylo publikováno cca 200 publikací na téma 3D kultur, v roce 2020 to bylo více než 1200 studií (Jensen a Teng, 2020). Dnes tak jde o dva elementární směry, kterými se v současné době buněčná kultivace ubírá. S novými metodami se začalo diskutovat použití tradiční 2D kultivace a její limitace.

Buňky v 2D kulturách mají oproti primárním tkáním odlišnou morfologii. Každá buňka je vystavena stejnému množství kyslíku i nutrientům. S tím se od primární kultury může lišit metabolismus, odpověď na kontaminanty či syntézy proteinu. Na druhé straně 3D modely jsou relativně nové způsoby, při kterých se stále vyskytuje mnoho výzev, které je třeba vyřešit (Jensen a Teng, 2020; Duval a kol., 2017).

U 3D kultur buňky nejsou v jedné vrstvě, ale mohou růst horizontálně i vertikálně. Pro takový růst byly vyvinuty metody využívající například podpůrných polymerních materiálů, magnetické levitace, hydrogelovou podporu, či skleněná vlákna. Buňky tak tvoří uskupení, které je nejen strukturálně podobnější skutečným tkáním v živých organismech. Testování by tak mělo lépe odpovídat testování *in vivo*. V současné době jsou však tyto metody finančně, technicky i časově náročnější v porovnání s 2D kultivací. Problém je také s objektivním pozorováním a následnou analýzou. Další výzvou je zlepšení reprodukovatelnosti testování (Kapalczynska a kol., 2016; Jensen a Teng, 2020).

2.4.3 Buněčná linie Hep G2

Buněčná linie využitá v této práci je linie Hep G2. Jedná se o transformovanou linii buněk získanou z maligního tumoru jater. Od zveřejnění v roce 1979 se tato linie stala velmi populární pro studium cytotoxicity, výzkum vakcinace a metabolických drah (Javitt, 1990). Z jaterních buněk jde o nejpoužívanější linii. Popularita linie spočívá v její relativní podobnosti s primární kulturou, nízké ceně a dobré schopnosti kultivace. Játra jsou orgán s komplexními funkcemi. Uchovávají energii v podobě glykogenu, podílí se na metabolismu nutrientů, neutralizují a odstraňují metabolické produkty z těla, včetně toxických látek (Arzumanian a kol., 2021). I přesto, že vykazuje obecně dobré podobnosti s primárními kulturami, její charakter stále vykazuje od primární kultury jater určité odlišnosti. Z tohoto důvodu byla zpochybňována validita výzkumu specifických metabolických drah. Linie je vhodná ke studiu CYP induktorů (snížená aktivita proteinů CYP1A2, CYP2B6 a CYP3A4 v Hep G2 buňkách), 3D modelů či vhodně navrženým 2D testům, při kterých jsou specifické odlišnosti od primární kultury zanedbatelné (Arzumanian a kol., 2021).

2.5 HCI na principu vícenásobného sledování částic a mikrореologie (MPT)

Manuální detekce a sledování množství buněk nebo částic ve vzorku je časově náročné a ve většině případů se nevyplatí. Proto se začaly vyvíjet rychlejší

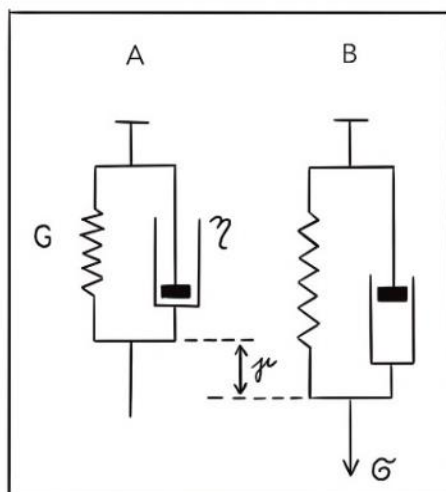
automatizované metody. Kromě urychlení odstraňují tyto metody díky výpočetní technice lidské chyby (Chenouard a kol., 2014). HCI metody umožňují automatizovanou analýzu video obrázků pořízených mikroskopem. Jsou mezi sebou porovnávány jednotlivé snímky v sekvenci. Data získaná z analýzy mohou dát informace o odpovědi buněk na vnější podněty (Vliet a kol., 2014). To ukazují i studie zaměřené na vývoj metod sledování částic. Tyto metody umožňují studium dynamiky buněčné membrány, cytoskeletu, genovou transkripci, ale např. i vnitrobuněčný transport (Chenouard a kol., 2014). Velké množství HCI metod využívá tzv. biomarkerů a barviv. Biomarker je specifický, měřitelný parametr (například v podobě molekul nukleových kyselin, organel, proteinu), jehož reakce jsou pozorovány. Obarvené biomarkery poskytují snadnější a rychlejší detekci a analýzu snímků (Buchser a kol., 2014). Získané informace však mohou být zkresleny právě použitím barevných, či jiných aktivních indikátorů. Ty totiž v buňkách sami mohou samotné působit jako stresory (Crocker a Hoffman, 2007).

Vícenásobné sledování částic za pomoci mikrореologie (multiple particle tracking microrheology = MPT microrheology) umožňuje analýzu video obrázků pořízených pouze světelným mikroskopem. Díky svým možným výhodám je MPT mikrореologie použita v této práci. Jde o pasivní mikrореologickou techniku, pomocí které se měří Brownovy pohyby a částice ve vzorku. V MPT je možná kvantifikace výsledků i při jejich menším počtu a za použití levnějších nástrojů v podobě mikroskopu a počítače (McGlynn a kol., 2020). MPT může být kompatibilní s běžně pořízenými mikroskopickými snímky (které jsou ale v dostatečné kvalitě). Lze jí extrahovat data bez předchozích informací o strukturách chemických látek a buněk (Lonhus a kol., 2020). Sledování částic může být důležitým nástrojem v analýze dynamiky buněk a jejich odpovědi na vnější prostředí a toxikanty (Chenouard a kol., 2014).

2.5.1 Použití pasivní mikrореologie v MPT

Reologie jako vědní obor fyziky se zabývá tokem hmoty (pevného, kapalného i plynného skupenství), jejich deformačních závislostí v odpovědi na napětí a v čase (Gardel a kol., 2005). Při malých deformacích těles, kdy nedochází k překročení meze kluzu se deformace tělesa řídí Hookeovým zákonem. Naopak u kapalin dochází v ideálním případě při ustáleném toku k rovnosti mezi smykovou rychlostí γ a smykovým napětím σ . Případ se tak řeší pomocí Newtonova zákona o viskozitě. Hookeův a Newtonův zákon jsou pak příklady mezního reologického chování. V realitě

se často setkáváme s kombinací elastických a viskózních projevů. Tato kombinace se nazývá viskoelastické chování. Pro zjednodušené pochopení se používá příklad prvku paralelního propojení pružiny (deformační projev) a pístu (viskózní projev). Tomuto prvku se říká Kelvinův reologický model (Obr. 3) (Meissner a Zilvar, 1987).



Obrázek 3: Kelvinův model reprezentující viskoelastické vlastnosti pomocí paralelního propojení pístu a pružin. Model A = nedeformovaný stav; model B = deformace způsobovaná napětím σ

Reálný systém reologického chování však obsahuje velké množství takových prvků a je charakterizován rovnicí napěťové odezvy:

$$\sigma(t) = \gamma_0[\sigma' \sin(\omega t) + \sigma'' \cos(\omega t)].$$

Napěťová odezva se skládá ze dvou složek. První složka je sinusová $\sigma' \sin(\omega t)$ ve fázi s deformací (soufázový modul) a druhá předcházející deformaci $\sigma'' \cos(\omega t)$ (ztrátový modul). Součet těchto dvou složek dává celkovou napěťovou odezvu $\sigma(t)$. γ_0 je tzv. fázový posun, tj. úhel, o který se vektor $\sigma(t)$ posouvá (Meissner a Zilvar, 1987; Gardel a kol., 2005). Alternativně je možné použít napětí a měřit deformaci. Tím se získají informace o vlastnosti materiálu (Meissner a Zilvar, 1987; Gardel a kol., 2005).

Reologická měření poskytují pohled na mechanickou odezvu široké škály materiálů, zvláště při charakterizaci měkkých materiálů, suspenzí, polymerních roztoků apod.

V případě mililitrových vzorků je však kvůli velikosti částic měření konvenčními reometry téměř nemožné. Pro měření těchto vzorků se tak začaly vyvíjet metody mikroeologie. V zásadě existují dva přístupy: pasivní a aktivní mikroeologie. Aktivní funguje na principu aplikace lokálního napětí pomocí elektrických, magnetických, či mikromechanických sil a odpovědí materiálu na vzniklé napětí. Druhý přístup používá napětí vzniklé Brownovým pohybem a tepelnou energií (Gardel a kol., 2005).

Začátkem 21. století se mikroeologie začala dostávat i do zájmu biologie atestování *in vitro*. Pro zkoumání dynamiky buněk a jejich deformačních a elastických vlastností existovalo několik metod. Většinou těchto metod bylo obtížné oddělit povrch buňky a její objemové vlastnosti. To neumožňovalo měřit konkrétní specifická místa na buňce a uvnitř buňky. Pro kvantifikaci specifických míst uvnitř buňky, jejich viskozitu, či odpor vůči proudění tekutin se mikroeologie ukázala být vhodným nástrojem (Weis a kol., 2006; Tseng, 2002). Buňky a další živé systémy jsou uvnitř heterogenní. Struktura a charakteristika tekutin se lokálně odlišuje (Mao a kol., 2022).

Při studiu mechanických odpovědí buněk na stresor je třeba oddělit působení stresu způsobené stresorem od stresu vyvolaného používanou technikou. Používání pasivní mikroeologie tento problém teoreticky odstraňuje. Pasivní mikroeologie využívá Brownových pohybů. Matematická interpretace Brownových pohybů vychází Stokesovy-Einsteinovy rovnice:

$$\eta = \frac{K_B T}{(\Delta r(\tau)^2) \pi \alpha} \tau,$$

kde η je viskozita tekutiny, K_B je Boltzmanova konstanta, T je absolutní teplota, $\Delta r(\tau)^2$ představuje posun částic v časovém intervalu (tzv. střední kvadratický posun = MSD), α je poloměr částice a τ charakterizuje prodlevu MSD v čase (Crocer a Hoffman, 2007). Díky této rovnici lze určit Brownovy pohyby (disperzi) malých částic. Na základě toho je pak možné oddělit Brownovy pohyby částic a částice, kterými se buňka pohybuje přímo (Lonhus a kol., 2021). Informacemi získanými pasivní mikroeologií je možné charakterizovat viskoelastické chování buňky bez jejího narušení. Tím lze získat přesné strukturní a mechanické odpovědi buněk na široké množství materiálů a komplexních tekutin (Selvaggi a kol., 2009). Pasivní mikroeologie se ukázala být přesná i při odlišení hepatocytů a osteoblastů na základě vnitrobuněčné viskozity a difuze (Lonhus a kol., 2021).

2.5.2 MPT algoritmy

Algoritmus MPT je založen na postupném sledování částic v průběhu sekvencí obrázků. Výstupem jsou data viskoelastivity zahrnující například informace o difuzi, viskozitě, deformaci částic, pohybu, dynamice membrány, nebo vnitrobuněčných částic (Lonhus a kol., 2020; Selvaggi a kol., 2009; Chenouard a kol., 2014). V algoritmu MPT může částice představovat cokoli od molekuly, komplexů makromolekul, organel či celých buněk. Pojem „trackování“ částic obecně zahrnuje i postupné sledování jednotlivých částic (single particle tracking = SPT). Avšak SPT může také zahrnovat sledování velkého množství částic. Rozdíl mezi SPT a MPT je ve výstupních datech, kdy výstupem SPT jsou jednotlivé dráhy, zatímco u MPT je to například difuze (Chenouard a kol., 2014).

Vyvinutím a použitím mikrorheologie se začala objevovat možnost neinvazivně zkoumat chování buněk v čase (Weihs a kol., 2006). Metody využívající principů microrheologie však stále nejsou dokonalé a v průběhu výzkumu je možnost výskytu několika základních typů chyb. Takovými chybami mohou být systémové chyby ve výpočtech. Předpětí mezi jednotlivými pixely obrázku (specificky například pro sledované objekty menší než 1 pixel). Chyby způsobené dynamikou. Vznikají kvůli časovým prodlevám mezi snímky (fps). Náhodný pohyb může být charakterizován oscilací. Mezi snímky se tedy pozice bodu nezměnila, ale reálně ano. A poté to mohou být náhodné chyby v závislosti na zaostření, rozlišení, expozici... (Crocker a kol., 2007). Do současnosti byly v MPT vyvinuty desítky algoritmů na analýzu digitálního obrazu. Algoritmy se mezi sebou odlišují konkrétními postupy, programovacími jazyky i výstupními daty. Záleží, co je předmětem a účelem zkoumání konkrétní MPT metody (Chenouard a kol., 2014). Všechny algoritmy však zahrnují několik základních kroků, které jsou veskrze společné (Crocker a Hoffman, 2007):

Přizpůsobení snímků. Prvním krokem je přizpůsobení snímku danému algoritmu. Pro rozlišení částic mezi sebou ve druhém kroku je potřeba mít kvalitní a požadovaný formát obrázku. Počítače k analýze potřebují vědět, v jakém formátu vstupní data jsou, aby si je mohly přizpůsobit (Crocker a Hoffman, 2007). Ke správné detekci částic je potřeba vyřešit zejména oddělení částic od pozadí. Mezi nejčastější vady pozadí se řadí ty, při kterých dochází ke změně intenzity jasu pozadí. Částice tak mohou splývat s pozadím a způsobovat potíže při jejich detekci (Selvaggi a kol., 2009; Perez-Careta a kol., 2007). Jedním z možných řešení je použití kontrastní mikroskopické techniky.

Příkladem může být fluorescenční či DIC mikroskopie. Tyto techniky poskytují obrázky s vysokým kontrastem, díky čemuž lze částice lépe detekovat (Weihs a kol., 2006; Tseng a kol., 2002). V případě snímků z běžného světelného mikroskopu je problém většinou řešen aplikačním softwarem, například softwarem pracujícím na bázi vyhlazujících prostorových filtrů. Tyto filtry redukují šum v pozadí a vyhlazují ho (McGlynn a kol., 2020). Dalším možným softwarovým řešením je kvazispektrální analýza živých buněk. Ta umožňuje charakterizaci intracelulárních regionů a částic pomocí analýzy vlnových délek a následného digitálního kontrastování (Lonhus a kol., 2020).

Eliminace nechtěných částic: V závislosti na použité metodě MPT nemusí být všechny částice pro analýzu vhodné. Částice, které jsou například příliš malé nebo velké, mají nízký jas apod., by mohly způsobovat chyby v algoritmu (Crocker a Hoffman, 2007). Z tohoto důvodu je nutné mít definované a charakterizované částice. Definování částic je nutné určit v odpovědi na kvalitu obrázků. Při nízkém rozlišení obrázků by u malých částic mohlo docházet k záměnám. (McGlynn a kol., 2020).

Detekce a lokalizace částic: V tomto kroku se identifikují sledované částice tak, aby je následně bylo možné stopovat v průběhu celé sekvence (Crocker a Hoffman, 2006). Tento problém se vyskytuje v celé řadě vědních odvětví zabývajících se výpočetní technikou a robotikou. Díky tomu existuje řada technik párujících částice v jednotlivých snímcích, které lze aplikovat i pro MPT (Karami a kol., 2017). Příklady známějších metod jsou BRISK, ORB, KAZE, SURF a SIFT. Tyto metody v sobě často zahrnují jak detekci, tak následné stopování. Většina těchto technik je však pro původní účel koncipována pro rozpoznávání stejných částic z různých pohledů. V MPT se často jedná o identifikaci podobných částic ze stejného pohledu (Lonhus a kol., 2021; Karami a kol., 2017). Další možností je na míru vytvořená technika, která může vycházet z již navržených. Na míru navržená technika párující body v různých snímcích je často potřeba v případě užití specifického hardwarového řešení, například fluorescenční mikroskopie. Při fluorescenční mikroskopii je dobře oddělena částice od pozadí. Detekce je tak totiž zjednodušena na lokalizaci center s vysokou intenzitou jasu (Mao a kol., 2022). Možným obecným řešením, kdy se částice detekují na základě intenzity jasu, je charakterizace obrázku pomocí gaussovského profilu intenzity. Přes obraz je použita Gaussova maska, která obklopuje jasné částice. Částice jsou pak rozpoznávané na základě velikosti a intenzity jasu (Selvaggi a kol., 2009, Rose a kol., 2020).

Postupné sledování ("trackování") částic a určení trajektorií: „trackování“ je krokem, při kterém se spojí pozice částic v jednotlivých snímcích. Tento krok zahrnuje určení, která konkrétní částice v daném obrázku bude s největší pravděpodobností odpovídat částici v následujícím obrázku. Pro každou sledovanou částici je tak vymodelována její trajektorie v čase (Crocer a Hoffman, 2007).

Extrakce dat z trajektorií: Z trajektorií částic je možné vypočítat viskoelastické charakteristiky. U pasivní mikrореologie výpočty vychází z již zmíněného Stokes-Einsteinova vztahu pro difúzi sférických částic s nízkým Reynoldsovým číslem (McGlynn a kol., 2020). Na jeho základě lze charakterizovat Brownovy pohyby částic a oddělit je od částic pohybujících se jinými silami. Tím je možné charakterizovat dynamiku buněk a jejich odpovědi na podněty (Lonhus a kol., 2021). Jednou z dalších možností výpočtu je použití Langevinovy diferenciální rovnice pro výpočet pohybu částic ve viskózním prostředí. Langevinova rovnice se používá zejména v metodách aktivní mikrореologie, kdy použitím vnějších sil dochází k narušení ekvilibria systému (Lau a kol., 2003; Dechant a Lutz, 2013).

3 Cíle Práce

Z rešerše vyplývá potřeba nových přístupů a metod v testování toxicity. S novými poznatky v chemii a stálým rozvojem ve farmacii se vyrábí velké množství nových a neznámých látek, které mohou narušovat, či poškozovat přirozené fungování environmentálních systémů. Evropská unie a další světové organizace v čele s OECD ekonomicky i legislativně prosazují komplexní přístupy k hodnocení chemické bezpečnosti. Příkladem mohou být přístupy AOP, 3R, či studie „*Toxicity Testing for the 21st Century: A Vision and a Strategy*“ (Hartung, 2017) a „*Toxicity Testing in the 21st Century: Progress in the Past Decade and Future Perspectives*“ (Krewski, 2020) zaměřující se na progres ve vývoji.

Jedním z moderních přístupů v testování toxicity jsou tzv. HCI metody, do kterých také spadá několik metod využívajících principy mikrореologie. Jde o metody, které v živých soustavách sledují reologické parametry a z nich se pokouší zjistit informace o chování takových živých soustav (Chenouard a kol., 2014, Krewski a kol.). Do těchto metod spadá i práce Kirilla Lonhuse „*Estimation of rheological parameters for unstained living cells*“ (2021). Práce představuje algoritmus pro vyhodnocení dynamiky buněk pomocí

reologických parametrů. Popisuje algoritmus, jenž by měl mít potenciál pro použití v in vitro testování toxicity. Algoritmus dosud nebyl dostatečně ověřen.

Za tímto účelem vznikla moje práce, jež má za cíl:

1. Ověření algoritmu Lonhus a kol., 2021
2. Ověření, zda je metoda dostatečně citlivá a dokáže odlišit rozdíly v dynamice buněk i při velmi nízkých koncentracích pesticidu HTBA
3. Zjistit, zda je možné použití algoritmu i pro velkokapacitní data s využitím běžných stolních počítačů

4 Metodika práce

Experimentální část práce se skládala ze 3 hlavních kroků:

- I. Kultivace buněk a příprava vzorku
- II. Sběr a digitální úprava mikroskopických dat
 - Snímání vzorků
 - Kalibrace pořízených snímků
- III. Algoritmus a vyhodnocení dat
 - Detekce částic
 - Tvorba vektorového pole intracelulárních pohybů
 - Výpočet průměrného vektoru hmoty
 - Analýza časových řad

První částí byla samotná kultivace buněk Hep G2 a příprava vzorků pro nasnímání mikroskopem. Buňky byly kultivovány standardními kultivačními postupy. Vzorky pro focení byly připraveny pro tři paralelní měření (Kapitola 5.2). Dále byly v druhém kroku buňky snímány pomocí světelné mikroskopie po dobu 4 hodin. Na základě podobného experimentu Slivoněho (2020) se tento čas jevil jako dostatečný pro získání informativních výsledků a kompromisem mezi objemem analyzovaných dat. Po nafocení série byly snímky digitálně upraveny pro přesnější extrakci informací v procesu kalibrace. Kalibrované snímky byly ve 3 kroku analyzovány pomocí algoritmu vyvinutým Lonhusem a kol. (2021). Algoritmus se skládal ze dvou kroků. Detekce částic uvnitř buněk, jejich následné sledování v průběhu celých sérií pomocí algoritmu SURF a dále a tvorba vektorového pole intracelulárních pohybů. Posledním krokem byla analýza získaných dat a statistické vyhodnocení.

4.1 Soupis použitých chemikálií, nástrojů a programů

- Použité chemické látky a směsi: EMEM (z angl. Eagle's Minimum Essential Medium), FBS (z angl. fetal bovine serum), Antibiotikum, Glutamin, NEAA (z angl. non-essential amino acids), Gentamycin, NaHCO₃, Směs Trypsinu a EDTA (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid) 10:1, NaCl, Na₂HPO₄·12H₂O, KCl, KH₂PO₄, HTBA (Terbutylazine-2-hydroxy), HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina)
- Laboratorní nástroje: kultivační lahvičky, pinzety, automatické pipety (Witopet PL2, PL20, PL200, laboratorní sklo a nádoby (ThermoFisher, Pardubice, Česko), skleněné Petri misky (výrobce: Ibidi, Gräfelting, Německo; výrobek č. 81158)
- Laboratorní přístroje: inkubátor, Vortex, laminární box, UV sterilizační lampa, sterilizátor
- Mikroskopy a spektrometry: světelný inverzní mikroskop typ 101M (Motic, Barcelona, Španělsko), světelný mikroskop „Superscope“ se širokým zorným polem (Optax, Praha, Česko; Synchronics Engineering GmbH, Heidenreichstein, Rakousko; Ústav komplexních systémů, Nové Hrady, Česko), spektrometr USB4000-VIS-NIR-ES (Ocean optics, Ostfildern, Německo)
- Programy: Matlab (MathWorks, Praha, Česko), Matlab runtime (MathWorks, Praha, Česko), software VerCa/CamEx (ImageCode, Brloh, Česko; Ústav komplexních systémů, Nové Hrady, Česko), Microsoft excel (licence zakoupena od Microsoft s.r.o., Praha, ČR), Statistica (StatSoft CR s.r.o., Praha)

4.2 Kultivace a příprava vzorku buněčné linie Hep G2

Pro experiment byly vybrány lidské hepatocyty linie Hep G2 získané od společnosti ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures, katalogové č. 85011430). Typ buněk byl vybrán na základě vědecké studie Davor a kol., 2018 pro podobnost experimentu.

4.2.1 Příprava živného séra EMEM pro kultivaci Hep G2

Dle standardních laboratorních postupů pro kultivaci buněčných linií byla linie buněk Hep G2 kultivována v živném médiu EMEM. Neúplný roztok EMEM a ostatní

komponenty byly v laboratorní kvalitě dodány firmami Biowest a Sigma-Aldrich. Příprava plného roztoku EMEM byla provedena podle zavedených postupů a ve sterilním prostředí. Na 100 ml úplného EMEM bylo použito 87 ml neúplného EMEM roztoku. Přidalo se 10 ml FBS (Fetal Bovine Serum), 1 ml antibiotik, 1 ml glutaminu, 1 ml NEAA, 0,3 ml gentamycinu a NaHCO_3 pro stabilizaci pH (~0,15 ml, množství přidáno kolorimetricky na základě zbarvení). Výsledná barva séra EMEM by měla být masově červená a čirá.

4.2.2 Kultivace linie Hep G2

Kultivace byla provedena na základě instruktáží laborantů tkáňové laboratoře ústavu komplexních systémů na Nových Hradech (standardní laboratorní postupy pro kultivaci linie Hep G2). Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvičkách s objemem 5 ml plného EMEM. Samotná kultivace byla pravidelně prováděna 1× týdně (specifická doba pro linii Hep G2). Byla provedena trypsinizace (tzv. pasážování) a výměna média. Mezi jednotlivými pasážemi byly buňky uchovávány v inkubátoru s 85% vlhkostí, 5% CO_2 a teplotou 37°C. 20 minut před provedením trypsinizace bylo plné kultivační médium EMEM a 10× ředěný roztok trypsinu s EDTA ohříván na 37 °C. Laminární box byl předem sterilizován UV lampou po dobu 30 minut. Během celého procesu kultivace bylo dbáno na sterilní prostředí.

Po sterilním otevření kultivační lahvičky bylo vysáto staré médium EMEM a buňky byly následně opláchnuty 5 ml standardního fosfátového roztoku FBS (složení: 8,18 g NaCl , 0,201 g KCl , 2,89 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,24 g KH_2PO_4). Po odsátí PBS bylo přidáno 450 μl roztoku trypsinu-EDTA (ředěno 10×), který byl ihned odsát. Poté bylo ihned přidáno dalších 450 μl stejného roztoku trypsinu a kultivační lahvička s buňkami a trypsinem byla po zavření na cca 1–3 min odložena do inkubátoru. Po vyndání z inkubátoru bylo kontrolováno inverzním mikroskopem Motic (typ 101M), zda u buněk došlo ke kontrakci a zda byly odpojené ode dna lahvičky i od sebe. Když byly buňky separované od sebe, bylo nabráno 0,5 ml EMEM a přidáno k buňkám. Směs EMEM s trypsinem byla suspendována a 80 % objemu směsi bylo od zbylých buněk odstraněno. Část odebrané směsi EMEM s buňkami byla použita na samotný vzorek. Nakonec bylo přidáno 5 ml EMEM, kultivační lahvička byla zavřena a vrácena zpět do inkubátoru. Důležitá byla rychlost provedení trypsinizace, aby buňky byly vystaveny co nejmenšímu stresu.

4.2.3 Příprava vzorků Hep G2

Pro pozorování vzorků byla vybrána sterilizovaná Petriho miska se skleněným dnem a skleněným víčkem (Výrobce: Ibidi, Gräfelfing, Německo; výrobek č. 81158), určená pro použití v transmisní mikroskopii. Příprava vzorků byla provedena ve sterilizovaném laboratorním boxu přidáním 80 μl suspendovaného roztoku EMEM a trypsinu s buňkami. Roztok s buňkami byl poté doplněn živným roztokem EMEM do 1980 μl (buňky bez HTBA byly doplněny do 2000 μl). Vzorky buněk byly poté nechány v inkubátoru, aby adherovaly a dilatovaly (24 h). Po dilataci bylo k určitým vzorkům (kapitola 5.2.4) přidáno 20 μl směsi o předem definovaném složení. Dále bylo k buňkám přidáno 5 μl HEPES pro optimální pH. Celkem byly připraveny 3 vzorky s HTBA a DMSO (označení vzorku HTBA-DMSO), 3 vzorky s DMSO (označení vzorku DMSO) a 3 vzorky kontrolní pouze s živným médiem EMEM (označení vzorku 0).

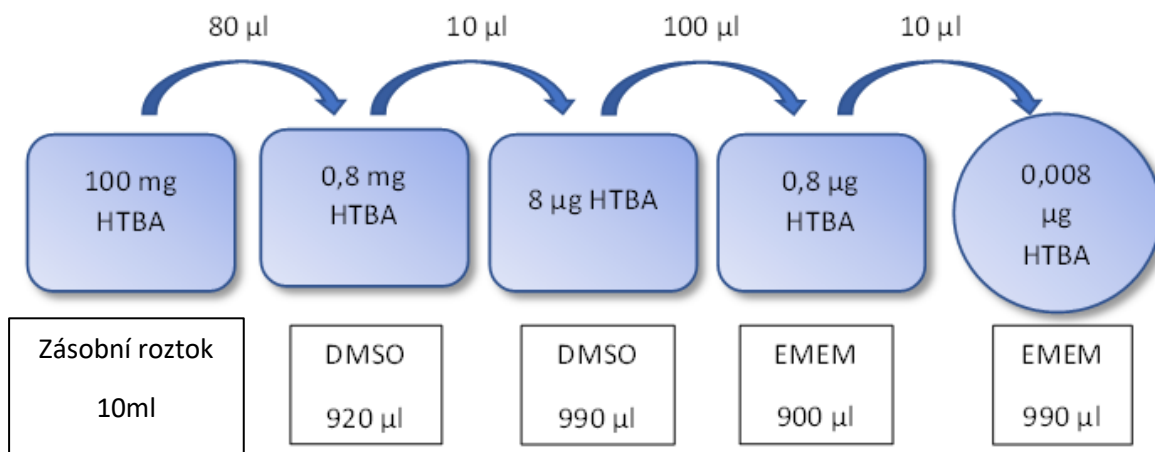
4.2.4 Příprava roztoku HTBA

Tetrabutylazine-2-hydroxy (HTBA) byl dodán formou bílého prášku v množství 100 mg: Dodavatel Sigma-Aldrich, Švýcarsko. Číslo produktu 46019, šarže BCBZ7083, datum výroby 23. listopadu 2018, datum expirace říjen 2023. Dodán v čistotě 97 % (minimální deklarovaná čistota 95 %), kontrolu kvality výrobku provedla dr. Claudia Geitner.

Pro rozpuštění HTBA byl zvolen dimethylsulfoxid (DMSO). DMSO jako rozpouštědlo bylo také použito v citované práci (Davor a kol., 2018). Výhodou DMSO je dobrá kompatibilita s živými buňkami, což dokazují i studie provedené na různých lidských buněčných liniích (Hebling a kol., 2015; Violante, 2004). DMSO má široké využití v medicíně a také se využívá při zamrazování buněčných linií (Ishizuka, 2020).

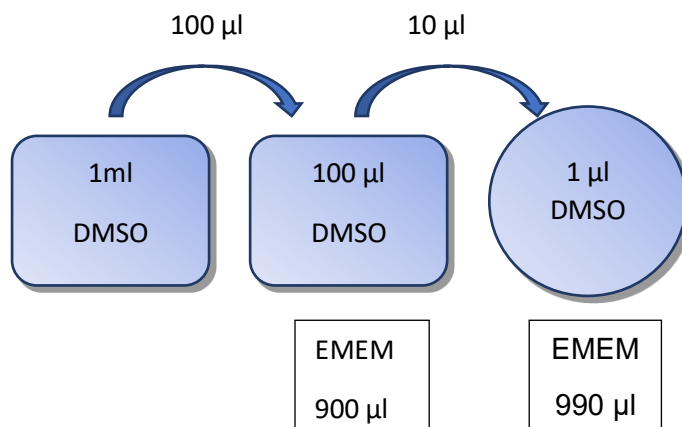
Dle zvolené koncentrace HTBA ($8 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$) bylo ředění provedeno za sterilních podmínek postupným ředěním následovně: 100 mg HTBA bylo rozpuštěno v 10 ml DMSO. Směs DMSO s HTBA byla rozdělena po 1 ml do Eppendorfových zkumavek, které sloužily jako zásobní roztok (část byla zamrazena pro případné budoucí využití). Ze zásobního roztoku bylo odebráno 80 μl směsi a přidáno k 920 μl DMSO. Z tohoto roztoku bylo odebráno 10 μl a přidáno k 990 μl DMSO. Z tohoto roztoku bylo odebráno 100 μl a přidáno k plnému roztoku EMEM (roztok A). Roztok A se poté přidával k buňkám HTBA-DMSO (Obr. 4.). Mezi jednotlivými kroky byly roztoky promíchány na Vortexu. Výsledná koncentrace DMSO přidaného k buňkám byla $1 \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$. Výpočet

ředění byl počítán na 1 ml roztoku EMEM. Objem živného média ve vzorku s buňkami byl 2 ml, proto bylo přidáno 20 μl výsledného roztoku s HTBA.



Obrázek 4: Postupné ředění DMSO s HTBA do živného média EMEM na Petriho misku

Pro kontrolu byla připravena druhá ředící řada, pouze s DMSO (Vzorkek DMSO). Koncentrace DMSO v roztoku A a B byla ekvivalentní $1 \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$. Ředění probíhalo dle schématu na obr. 5.



Obrázek 5: Postupné ředění DMSO bez HTBA do živného média EMEM na Petriho misku

4.3 Sběr mikroskopických dat

Snímání vzorku bylo provedeno videozesílenou mikroskopií v procházejícím světle. Mikroskop použitý pro experimentální analytickou metodu testovanou v této práci byl sestaven v roce 2020 Ústavem komplexních systémů v Nových Hradech ve spolupráci s firmami Optax, Praha a Synchronics Engineering, Heidenreichstein. Mikroskop byl označený názvem superskop (Rychtáriková a Nahlík, 2023). Použití světelné mikroskopie v in vitro testování nabízí několik možných výhod, jako například provozní náklady, dostupnost světelných mikroskopů a mnohdy snadnější uživatelské použití, než jiné druhy mikroskopů a dalších přístrojů (Lonhus a kol., 2021).

4.3.1 Technické parametry mikroskopu-superskopu

Mikroskop použitý v této práci (dále jen superskop) je digitální světelný mikroskop využívající vysoké rozlišení kamery (7900×6004 px). Přesné technické parametry superskopu jsou uvedeny v Tab. 1. Superskop se od běžných světelných mikroskopů odlišuje menší velikostí pixelů (23×23 nm²) a kalibrací optických drah pro jednotlivé pixely. Dalším technickým nadstandardem je sladění pulsů světelného zdroje s pořízením jednotlivých snímků. Pulzujícím osvětlením se snižuje celková expozice vzorku vůči intenzivnímu osvětlení (Rychtáriková a Nahlík, 2023). Optická dráha začíná emitující diodou, která osvětluje vzorek synchronizovanými pulzy se snímáním digitální kamerou mikroskopu. Po průchodu vzorkem světlo dosáhne objektivu Nikon. Objektiv projektuje obraz na vysokorozlišovací RGB digitální kameru Ximea. Celkové zvětšení mikroskopu dává velikost objektu promítaného na pixel kamery 23 nm. Superskop nepoužívá při snímání žádné filtry. Místo sady filtrů je pro získání podrobnější informace ze snímků použita Bayerova maska BGGR v procesu digitální úpravy (Lonhus a kol. 2021).

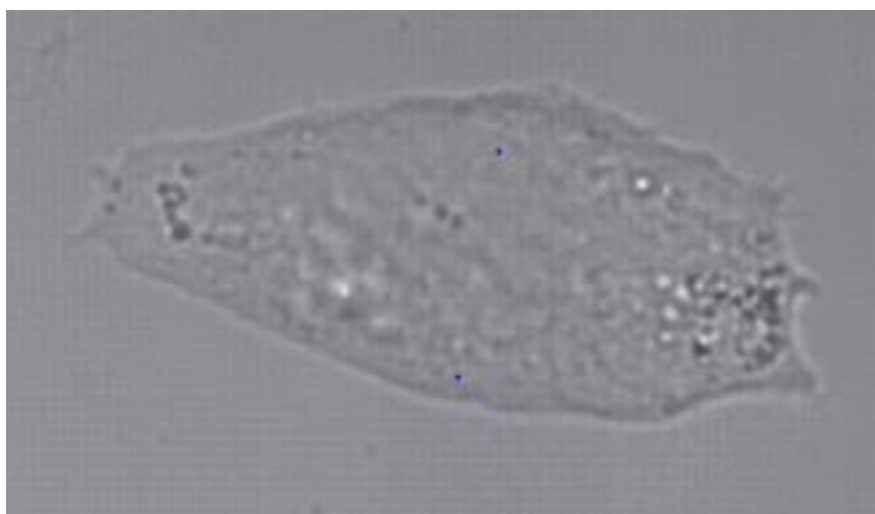
Tabulka 1: Technické parametry světelného mikroskopu-superskopu

Dioda emitující světlo	Luminus CFT-90-WDS-X11-VB500, 40% max. intenzita
Rozsah intenzity pulzujícího světla	světlo 0,2 ms-tma 199,8 ms
Objektiv	Nikon CFI Achromat 60×, N.A. 0.80, W.D. 0.30 mm

Camera	Ximea MX500-CG-CM-X4G2-FL rgb, 7920×6004 px
Expozice kamery	100 μ s
Velikost pixelu	23 nm
Senzor	CMOS
Bayerova maska	BGGR
Rozlišení (pixel)	7900x6004
Absorpční filtr	Ne
Možnosti souborů pořízených dat	RAW, TIFF, PNG, JPG, mat, fits, h5i, jp2, bmp, dng

4.3.2 Snímání vzorků

Všechny vzorky s buňkami Hep G2 se pro standardizování podmínek nechaly před samotným experimentem 24 h adherovat a dilatovat. Po 24 h byla provedena vizuální kontrola dilatace buněk. K buňkám byl před nasnímáním přidán buď roztok A (vzorek HTBA-DMSO), roztok B (vzorek DMSO), nebo byl použit vzorek obsahující pouze kultivační médium (Vzorek 0). Pro pozorování byla vždy vybrána buňka, která byla plně dilatovaná a zároveň nebyla membránou spojena s dalšími buňkami (obr. 6). Pro zachování standardních podmínek byla místnost s mikroskopem zahřívána a udržována na teplotě 37 °C. Při této teplotě se buňky Hep G2 kultivují a teplota by tak



Obrázek 6: Snímek buňky Hep G2 pořízený superskopem

u buněk neměla vyvolávat stresové reakce. Vzorek byl snímán ve speciální skleněné Petriho misce určené k použití pro světelnou mikroskopii. Obrázky v sérii byly pořízeny s rozlišením 7920×6004 px, světelnou expozicí 0,1 ms a intenzitou světelného zdroje 40 %. Frekvence snímání odpovídala 0,2 fps. Experiment s buňkami byl snímán po dobu 4 h. Čtyřhodinová doba experimentu byla určena na základě technických parametrů dat a výsledků práce Slivoně, 2020. Při snímání 0,2 fps obsahuje celá sekvence 2884 snímků o velikosti jednoho snímku cca 23 Mb. Při pozdější analýze pomocí algoritmu Lunhus a kol., 2021 by tak větší data byla se současnými běžně dostupnými počítači časově i technicky náročná. Další otázkou by byly i možnosti uchování takto velkokapacitních dat. Výsledky práce Slivoně, 2021 indikovaly rozdílnost mezi vzorky za podobného experimentu již při velmi krátké době experimentu. Hlavním záměrem tohoto *in vitro* experimentu je ověření algoritmu a jeho možnost v *in vitro* testování toxicit, které by mohlo dávat prvotní validní informace o neznámých látkách (Slivoně, 2020; Lonhus a kol., 2021)

4.3.3 Kalibrace snímků

Klasická světelná mikroskopie je omezena nízkým kontrastem slabě difraktujících, absorbujících a autofluorescenčních vzorků. Dalším omezením může být snížení kontrastu tím, že vzorek je mimo skutečné obrazové ohnisko. Tato optická zkreslení mohou být způsobena drobnými vadami snímače kamery a aberacemi v optické dráze. Z těchto důvodů byla série snímků ještě před jejich samotnou analýzou softwarově zpracována procesem kalibrace (Platonova a kol., 2021).

Pro zpracování obrazu z mikroskopu byl vyvinut software VerCa/CamEx schopný zpracovávat velkokapacitní RGB kamerová data. Software byl vyvinut Ústavem komplexních systémů na Nových Hradech ve spolupráci se společností ImageCode, Brloh. Radiometrická kalibrace spočívá v konstrukci kalibračních křivek a následné korekci obrazových zkreslení. K potlačení obrazových zkreslení byla kalibrována optická cesta světelný zdroj mikroskopu – čip kamery. Pro kalibraci optické cesty je potřeba znát přesnou skutečnou intenzitu používaného světla, která přichází na snímač kamery. K zjištění intenzit a spekter zdroje byl použitý spektrometr USB4000-VIS-NIR-ES. Díky němu byla naměřena přesná spektra světelného zdroje mikroskopu (Lonhus a kol., 2021; Slivoně, 2020). Z naměřené intenzity byly získány spektrální křivky kalibračních hodnot pro každý pixel obrazu. Kalibrační křivky byly vytvořeny snímáním o různé intenzitě světelného zdroje, kdy nejkratší intenzita světla byla

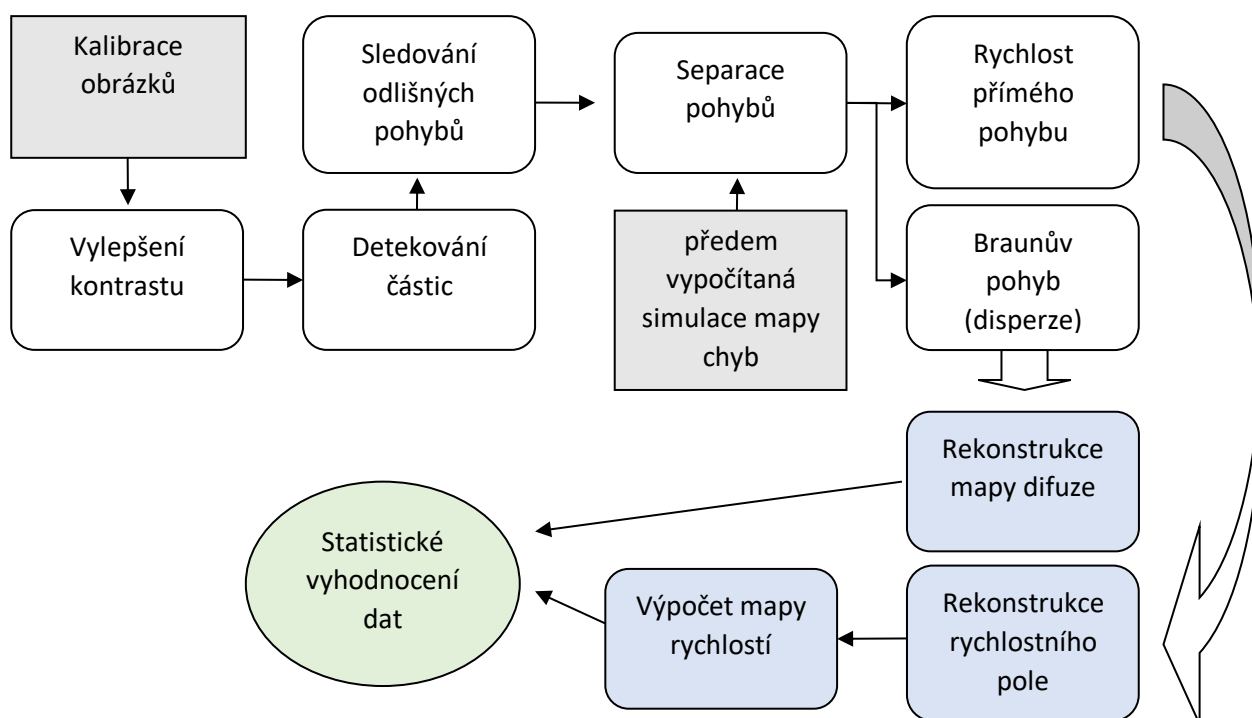
určena možností nastavení expozice kamery a nejdelší jako nejkratší čas, kdy bylo 99 % pixelů na kameře přeexponovaných. Z hodnot byla vypočítána energie dopadající na pixel kamery jako závislost na naměřené intenzitě pixelu v obraze (kalibrační křivka). Získané kalibrační křivky popisují vztah mezi skutečnou polohou objektu a jeho polohou na snímku (Lonhus a kol., 2020). Pro korekci snímků se v prvním kroku opravuje radiometrické zkreslení, vzniklé při digitálním zpracování snímků. Se snímkem je v tomto kroku pracováno jako se šedotónovým. Oprava byla provedena vynásobením každého pixelu v obraze inverzní funkcí kalibrační křivky. Tím byla každému pixelu byla přiřazena skutečná intenzita signálu odpovídající poloze objektu. Kalibrační křivky jsou použity k opravě zkreslení ve všech kanálech použité Bayerovy masky, což umožňuje obnovení barev a odstranění optických vad (Platonova a kol., 2021; Slivoně, 2021).

Kalibrace snímků způsobí, že objekty jsou homogennější, lépe viditelné a více segmentované od pozadí. Tím se snižuje pravděpodobnost výskytu chyb popsanych v teoretické části kapitoly 3.8.2 (Platonova a kol., 2021).

4.4 Algoritmus a vyhodnocení dat

Algoritmus vyhodnocení dat podle Lonhuse a kol. (2021) sleduje reologické a mikrofluidní parametry pro vyhodnocení pohybů objektů a částic uvnitř buňky (Obr. 7). Podobné metody již byly publikovány např. Crockerem a kol. (2007). Algoritmus zde použitý extrahuje částice ze snímků světelného mikroskopu a popisuje jejich dráhy pomocí vektorů rychlostí. Prvním krokem je samotná detekce částic a popisování drah v obraze. Jde o složitý problém, který však řeší několik již existujících metod, jež lze využít. Většina metod na identifikaci částic a jejich sledování v čase byla původně vyvinuta pro použití v robotice a počítačovém vidění. Pro tento typ analýzy byla vybrána metoda SURF vykazující nejlepší výsledky pro tento typ analýzy. Tato metoda je založená na sledování zrychlených robustních příznaků (zkratka SURF, speeded-up robust features) (Bay a kol., 2008, Lonhus a kol., 2021). Algoritmus Lonhuse a kol. (2021) dále analyzuje viskoelastické vlastnosti živých buněk a popisuje tak jejich mechanické vlastnosti. Pohyby částic definované SURF metodou přepočítává na vektory trajektorií. Odděluje dva hlavní komponenty pohybů uvnitř buněk. Přímý pohyb samotných organel s většími částicemi (může být RNA, bílkovinné struktury...) a Brownův pohyb. Pro mechanizaci výpočtů a použití algoritmu byly použity softwary Matlab (verze 2021B) a Matlab runtime (verze 2021B) (Lonhus a kol., 2021).

Před detekováním a sledováním částic je potřeba segmentovat sledované buňky, či objekty od jejich pozadí. To bylo provedeno ručním značením několika obrázků sekvence. Konkrétně byly chronologicky vybrány 3 snímky z průběhu sekvence. Ze snímků byly označeny okraje pozorované buňky a vytvořila se maska přes buňku. Následně byla umožněna interpolace kontur pozorované buňky. Pro označení zbylých buněk byla aplikována neparametrická registrace deformace obrazu. Výsledkem bylo označení kontur všech buněk v sekvenci (Lonhus a kol., 2021)



Obrázek 7: Algoritmus stanovení mikoreologických parametrů (Lonhus a kol., 2021)

4.4.1 Detekce částic v obraze

K detekci a sledování částic byla použita SURF metoda. Správná detekce částic je klíčovým aspektem ke správné aproximaci mikoreologických parametrů buněk. Detekce je zde založena na výpočtu Hessovy matice pro každý pixel vyhlazeného obrazu. Přes obraz byl aplikován mřížkový (boxový) filtr s jádrem 9×9 px a $\sigma = 1,2$. Hodnota σ je parametr Gaussovského filtru vyjadřující šířku základní gaussovské funkce, kterou byla určena jádra filtru. Čím větší je hodnota σ , tím širší jádro je použito

při vyhlazení obrazu. Hodnota $\sigma = 1,2$ byla pro optimální vyhlazení obrazu vybrána na základě experimentů a empirických pozorování. Velká hodnota σ způsobuje ztrátu detailů částic a příliš malá hodnota σ zase chyby při detekci. Aplikací Hessiany matice byl získán obraz, který zvýrazňuje místa s vysokou změnou intenzity mezi sousedními pixely. Pixely s maximálním determinanem matice byli označeny jako částice, které mohou být sledovány (tracking) (Bay a kol., 2008; Lonhus a kol., 2021).

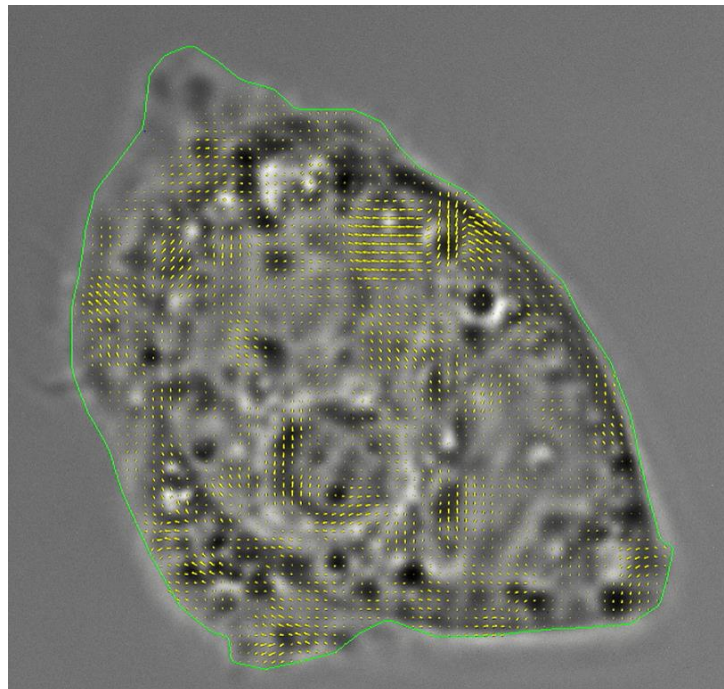
V dalším kroku byly relevantní částice sledovány v po sobě jdoucích snímcích v rámci celé série. Párování obrazů částic a tvorba trajektorií v po sobě jdoucích snímcích bylo založeno na heuristickém přístupu předpokládajícím, že stejné body v po sobě jdoucích snímcích by se měly vyskytovat blízko sebe. Byla vybrána náhodná podmnožina (~ 10) dvojic snímků a zní byl odhadnut maximální a minimální posun částic mezi dvěma snímky. Výsledný medián určuje efektivní posun částic (EP). Předpokládá se, že o stejnou částici se jedná, pokud je vzdálenost mezi částicemi menší než 3 EP. Tím se sníží počet možných částic zhruba na 15 kandidátů. Dalším postupem je iterativní přiřazování částic k sobě, dokud na základě kritérií uvedených v Lonhus a kol., 2021 nejsou páry k sobě přiřazeny. Sledy, které nesplňovaly kritéria, byly z výpočtu odebrány (Lonhus a kol., 2021).

4.4.2 Tvorba vektorového pole intracelulárních pohybů

Získané trajektorie částic byly rozděleny na dva druhy pohybů. Prvním pohybem je přímý pohyb částic, které tvoří buňka vlastními aktivními mechanismy a druhým pohybem jsou Brownovy pohyby. Možnost oddělení vychází ze Stokesovy-Einsteinovy rovnice. Princip je podrobněji popsán v literární rešerši 2.5, či například v práci Crocer a Hoffman, 2007.

Rekonstrukce vektorového pole byla provedena pomocí kvazi-stacionární analýzy oken. Mnoho částic o různých rychlostech může procházet stejnými body (ze kterých se určují velikosti vektorů) a může tak docházet k chybám a jejich záměně. Proto je nutné správně tyto rychlosti částic oddělit. Toho se docílilo výpočtem rychlostí pro každý pixel v časovém okně. V této práci se rychlosti sestavovaly konkrétně s oknem 100 snímků. Tedy 1. snímek vektorů se sestavoval na základě analýzy snímků 1 až 100, druhý 2 až 101, třetí 3 až 102 a takto až do konečných ($n-99$) až n snímků. V každém časovém okně byly získány odhady rychlostí částic, pomocí nichž bylo možné následně přiřazovat správné vektory rychlostí k částicím. Vektory rychlostí byly

zaznamenány v celém obrazu buňky (Obr. 8). Výstupem algoritmu byla data ve formě vektorového pole vnitrobuněčných toků (PPF), ze kterých lze dále extrahovat například informace o intracelulární viskozitě (cSt) a mapě difuzního koeficientu ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) (Lonhus a kol, 2021). Data vektorových polí byla velikostně zkomprimována a uložena v souborech typu HDF5 (datový formát vyvinutý pro ÚKS FROV).



Obrázek 8: Vektorové pole vnitrobuněčných toků

4.4.3 Výpočet průměrného vektoru pohybu hmoty

Obrazová data získaná z algoritmu obsahují všechny potřebné informace o dynamice buněk. Tato data jsou však obtížně interpretovatelná. Proto z obrázku byla extrahována číselná data vyjadřující hodnoty délek a úhlů vektorů v čase. K extrahování číselných dat z dat obrazových byl použit software Matlab. Vytvořené skripty využívají existujících funkcí Matlabu.

Obrazová data ve formátu HDF5 byla přepočítána na číselné charakteristiky. Byly vypočteny délky a úhly vektorů, které reprezentují pohyby částic. Výstupem byly matice o rozměrech, které odpovídají počtu pixelů v jednom snímku. Z jednoho obrázku vznikla matice flows.h5 obsahující x -, y -ové souřadnice vektorů. Z nich byly vypočítány délky a úhly vektorů. Tyto výstupy byly uloženy v matici *.mat.

Matice délek a úhlů byly dále redukovány. Byla vypočtena průměrná hodnota délky posunu a úhlu posunu mezi jednotlivými snímky. Tím byly získány dvě číselné hodnoty pro každý snímek. Postup pro získání průměrných charakteristik vektorů je uveden zde:

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
input = ('G:\HepG2(SC)\210726(8mg)\'); % Výstup ze softwaru FlowRec
NoOfFlds = 4; % počet podadresářů
% Výstup - uložen v adresáři "input"; Plots.m (vektory LENGTH a ANGLE obsahuje
průměrné hodnoty délek vektorů, respektive úhlů pro každý obrázek
% podadresáře "LengthImg" a "AngleImg" obsahují obrázky distribuovaných vektorů a
úhlů.
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
addpath(genpath('szat-SmithWatermanMorphing-a34dc20'));

LENGTH = [];

for j = 1:NoOfFlds
    data = h5read([input, num2str(j), '\workdir' '\flows.h5'], '/data');
    LENGTH = vertcat(LENGTH, zeros(size(data, 1), 1));
end

ANGLE = LENGTH;
idx = 1;

for j = 1:NoOfFlds % number of subfolders
    data = h5read([input, num2str(j), '\workdir' '\flows.h5'], '/data');
    load([input, num2str(j), '\workdir' '\masks.mat']);

    for i = 1:size(data, 1)
        BM = mask.getMask(i);

        VERT = squeeze(data(i, :, :, 1)) .* BM;
        HORZ = squeeze(data(i, :, :, 2)) .* BM;

        Length = sqrt(VERT.^2 + HORZ.^2);

        if i == 1
            minL = min(min(nonzeros(Length)));
            maxL = max(max(nonzeros(Length)));
        end

        if min(min(nonzeros(Length))) < minL
            minL = min(min(nonzeros(Length)));
        end

        if max(max(Length)) > maxL
            maxL = max(max(nonzeros(Length)));
        end

        LENGTH(idx) = mean(Length, 'all');

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
        Angle = atan(HORZ./VERT);

        Angle_PP = (VERT > 0) .* (HORZ > 0) .* Angle;
        Angle_NPaNN = (VERT < 0) .* (Angle + pi);
    end
end

```



```

Angle_PN = (VERT > 0) .* (HORZ < 0) .* (Angle + 2*pi);

Angle = Angle_PP + Angle_NPaNN + Angle_PN;
Angle = Angle - min(min(Angle)); % normalize to angle = 0

Angle(isnan(Angle) == 1) = 0;
ANGLE(idx) = mean(Angle, 'all');
fig = figure; imagesc(Angle), axis equal; axis off; colormap(vertcat([1 1
1], jet)); colorbar; caxis([0 2*pi]);

if ~exist([input, '\AngleImg\'], 'dir')
    mkdir([input, '\AngleImg\']);
end

hgexport(fig, [input, '\AngleImg\', num2str(j, '%02d'), '-', num2str(i,
'%04d')], hgexport('factorystyle'), 'Format', 'png');
close all;
idx = idx + 1;
end
end

% % % [dhL,hL,cpL,tauqL] = dwtleader(LENGTH);
% % % dhL = dhL'; hL = hL'; cpL = cpL'; tauqL = tauqL';
% % % [dhA,hA,cpA,tauqA] = dwtleader(ANGLE);
% % % dhA = dhA'; hA = hA'; cpA = cpA'; tauqA = tauqA';

degANG = ANGLE/pi*180;
nmLEN = LENGTH*78;

save([input, 'Plots.mat'], 'nmLEN', 'degANG'); % uhel ve stupnich, delku v nm

for j = 1:NoOfflds
    for i = 1:size(data, 1)
        BM = mask.getMask(i);

        VERT = squeeze(data(i,:,:),1) .* BM;
        HORZ = squeeze(data(i,:,:),2) .* BM;
        Length = sqrt(VERT.^2 + HORZ.^2);

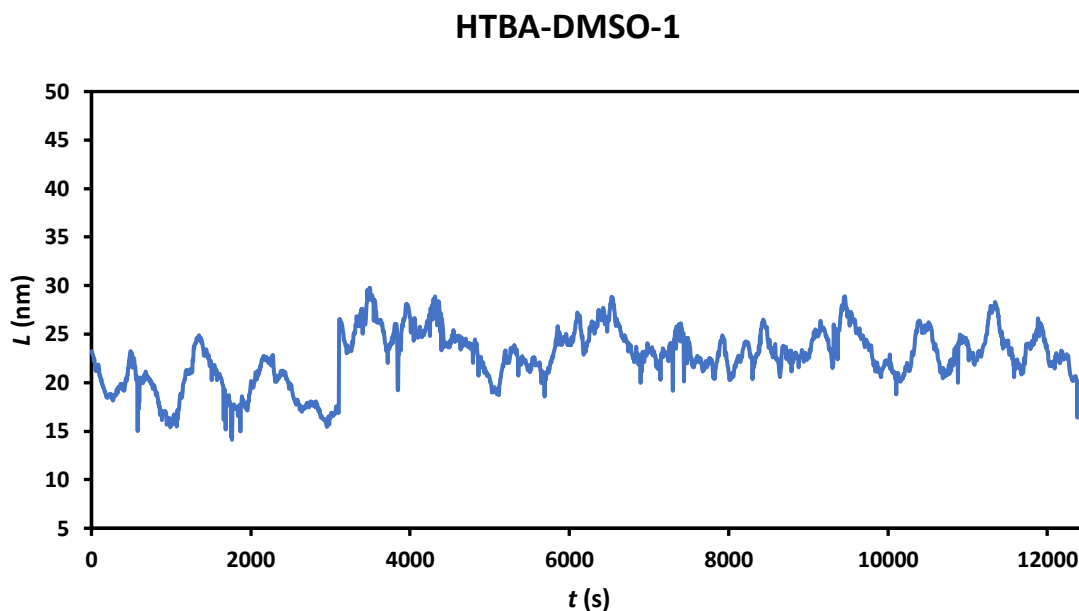
        fig = figure; imagesc(Length), axis equal; axis off; colormap(vertcat([1 1
1], jet)); colorbar; caxis([minL maxL]);

        if ~exist([input, '\LengthImg\'], 'dir')
            mkdir([input, '\LengthImg\']);
        end

        hgexport(fig, [input, '\LengthImg\', num2str(j, '%02d'), '-', num2str(i,
'%04d')], hgexport('factorystyle'), 'Format', 'png');
        close all;
    end
end
end

```

Výsledkem této části byly časové závislosti průměrných délek (nm) a úhlů ($^{\circ}$) pohybů (Obr. 9). Takto redukováná data jsou lépe interpretovatelná a je možné je statisticky mezi sebou porovnávat.

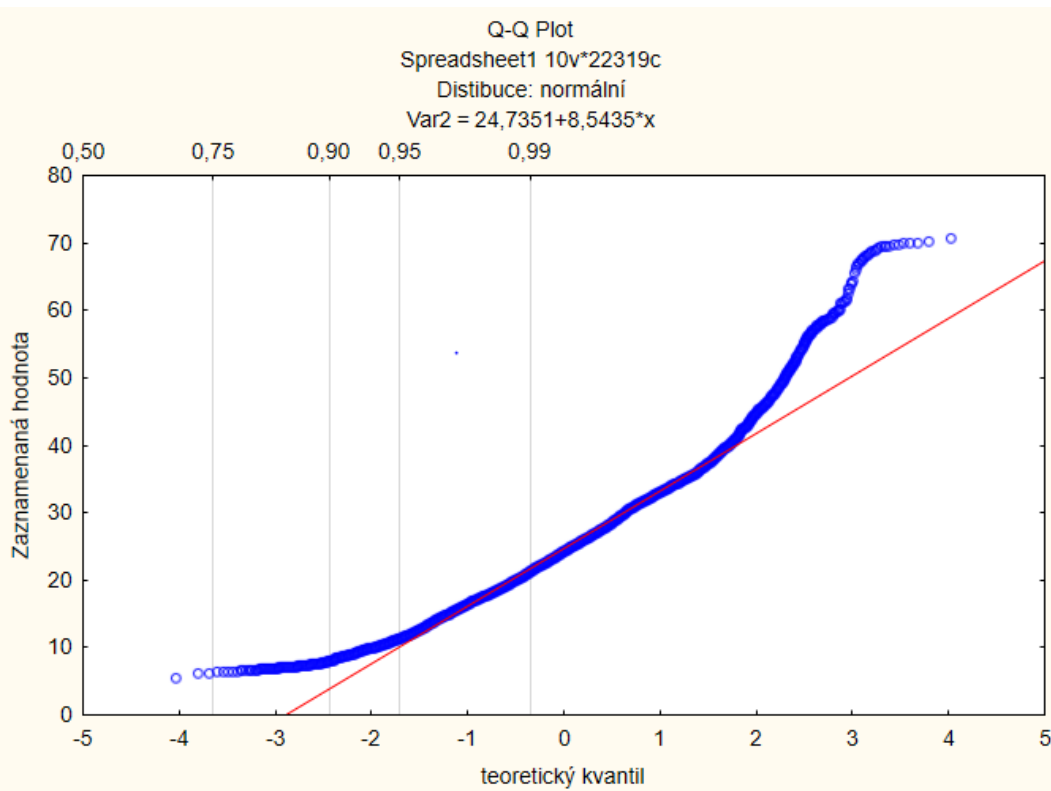


Obrázek 9: Časová řada průměrných délek vektorů pohybů hmoty vzorku HTBA-DMSO-1

4.4.4 Analýza dat

K vyhodnocení časových řad průměrných vektorů pohybu vnitrobuněčné hmoty v obraze byly použity programy Matlab a Microsoft Excel. Porovnání bylo provedeno s cílem zjistit, zda existují nějaké významné rozdíly v chování částic mezi jednotlivými typy vzorků.

Pomocí Q-Q grafu (Obr. 10) v programu Statistica 12 bylo určeno, že nejde o Gaussovo rozdělení a nelze tak použít běžné parametrické metody vyhodnocení. V první fázi (kap. 5.1) byly mezi sebou porovnávány frekvenční distribuce jednotlivých časových závislostí průměrných vektorových posunů hmoty na základě statistických charakteristik: 1) rozsah hodnot, pozice 2. a 4. kvantilu, průměr a medián a 2) šikmost a špičatost.



Obrázek 10: Q-Q graf indikující nelineární rozložení dat

Druhou fází analýzy vzorků (kap. 5.2) byla tzv multifraktální analýza pomocí funkce dwtleader v programu Matlab. Multifraktální analýza umožňuje vyhodnotit fraktální signály s komplexní a proměnlivou strukturou. Takové rozložení grafu je typické právě pro charakterizaci buněčných a biologických pochodů. U vzorků byla multifraktální analýzou vyhodnocena a porovnána složitost struktury distribuce. Čím více se struktura v různých úrovních pohledu mění, tím funkce bude mít více různých fraktálních struktur. Výsledky multifraktální analýzy by dle předpokladů mělo poskytnout validnější informace o chování vnitrobuněčné hmoty a rozdílech mezi buňkami (Wendt a kol., 2007).

5 Výsledky

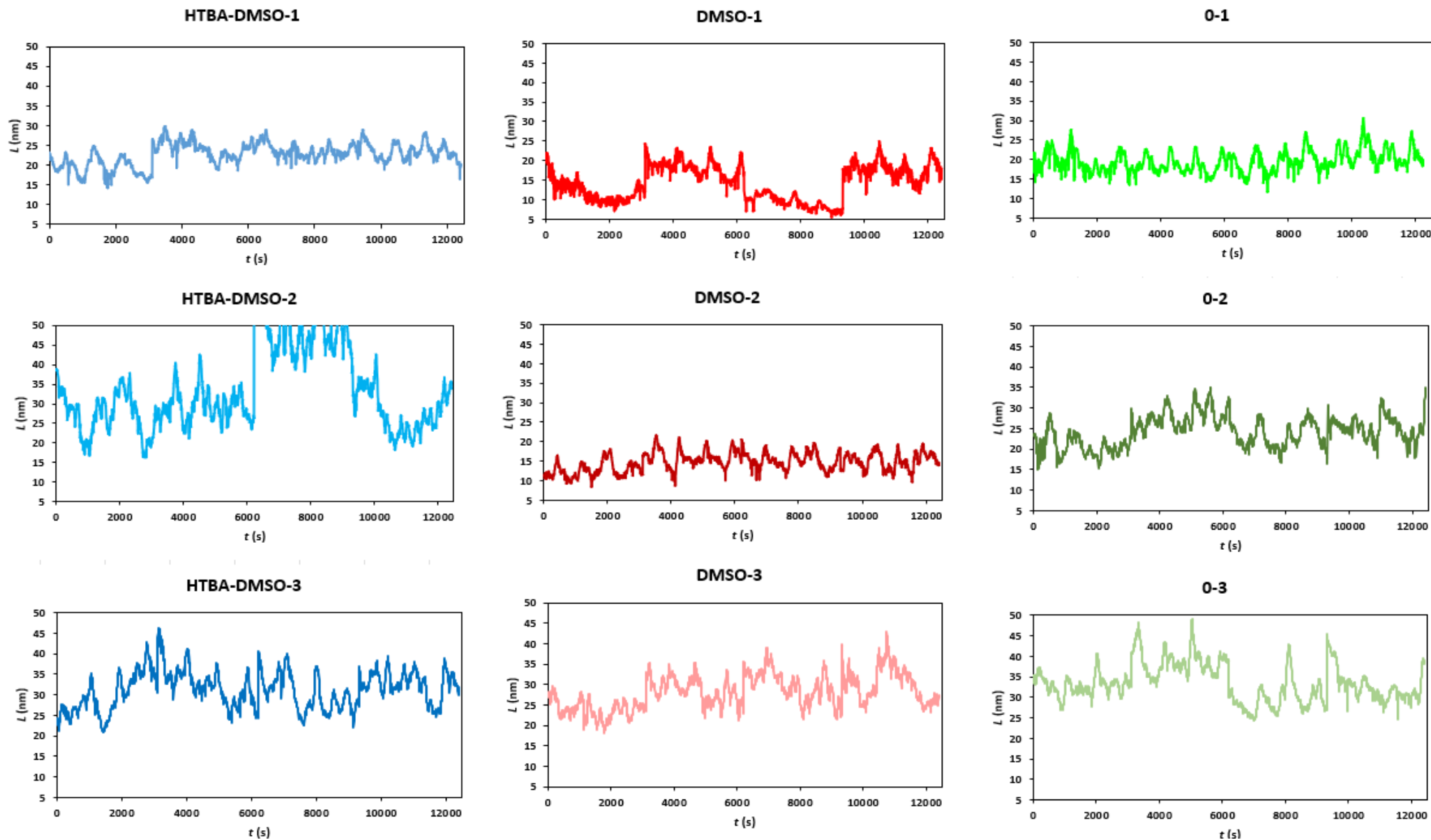
Výstupem kapitoly 4.4.3 byly průměrné číselné charakteristiky vektorů (průměrné délky a úhly vektorů pro každý obrázek). Po vynesení těchto charakteristik do grafu byly vytvořeny časové distribuce průměrných délek a úhlů vektorů (Obr. 11 a 12). Osa x zobrazuje časové rozložení v sekundách a osa y délku vektorů (nm)/velikost úhlů (°). Při snímání bylo zaostření snímků průběžně kontrolováno a opraveno. Přesto došlo k rozostření snímků u HTBA-DMSO-2, DMSO-1 a 0-3 a algoritmus tak nemohl správně

určit pohyb hmoty. Z hlediska času skoky odpovídají opravě rozostření, kdy vzorky při snímání byly kontrolovány v hodinových intervalech. Na časových distribucích se tato chyba projevila skokem v hodnotách úhlů i délek vektorů. Z výsledků časových distribucí úhlů a délky vektorů byly zjištěny tři chybné vzorky, které byly v multifraktální analýze (kap. 5.2) dále vyřazeny. Jde o vzorky HTBA-DMSO-2, DMSO-1 a 0-3.

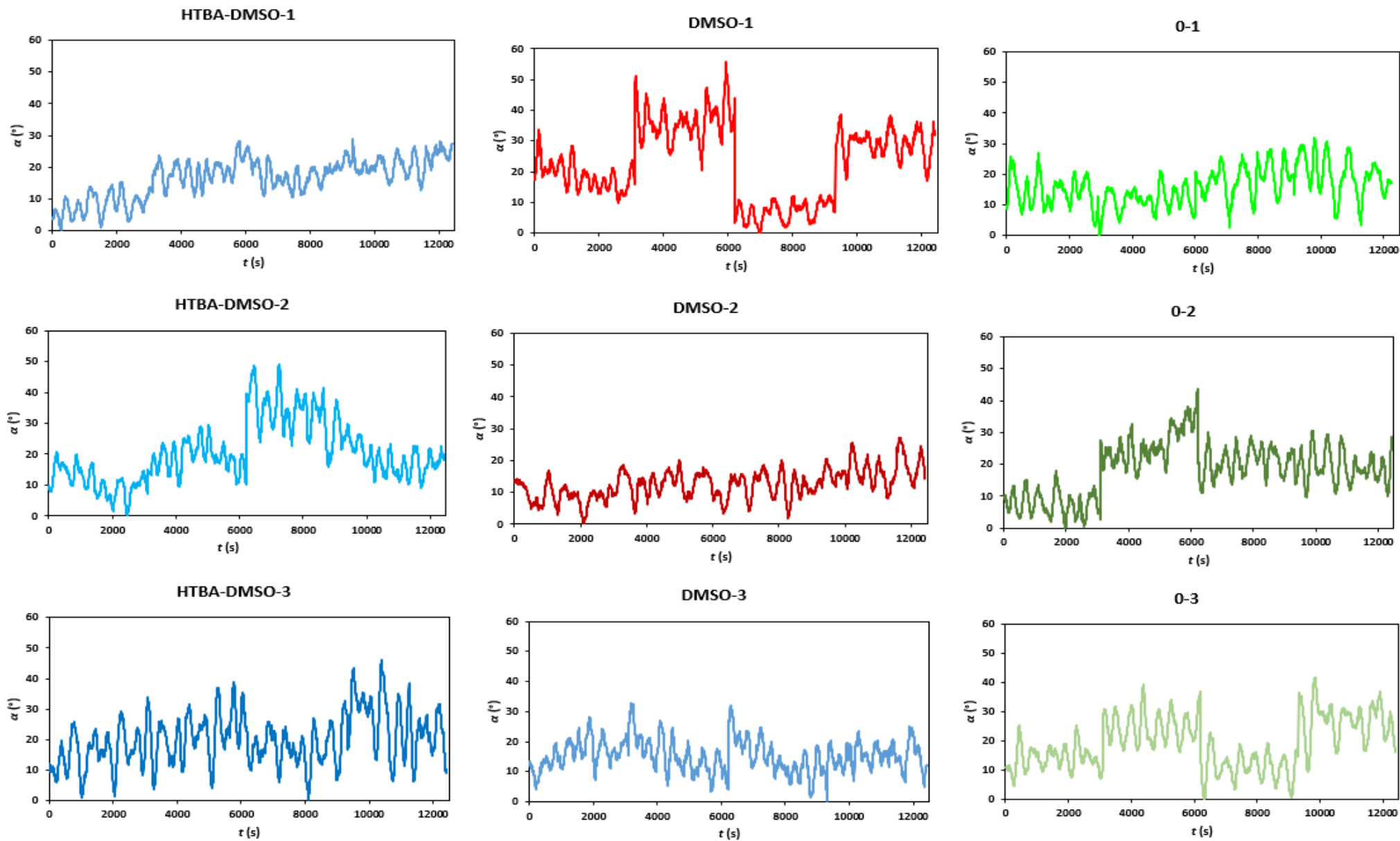
5.1 Porovnání distribucí na základě statistických charakteristik

První částí analýzy bylo porovnání základních statistických charakteristik. Krabicový graf na Obr. 13 zobrazuje porovnání základních statistických údajů mezi vzorky pro frekvenční distribuce vektorů délky. Na tomto grafu jsou vyobrazena všechna paralelní měření, tedy i chybné vzorky HTBA-DMSO-2, DMSO-3 a 0-1. Z grafu je patrné, že vzorky mohou vybočovat z měření. U správně naměřených vzorků HTBA-DMSO jsou hodnoty v rozmezí 15–45 nm, zatímco vadný vzorek dosahuje hodnot až 70 nm. U vzorku DMSO se rozsah dobře pořízených dat DMSO-2 a DMSO-3 pohybuje od 5 nm do 42 nm, přičemž vadný vzorek DMSO 1 odlišuje pouze větší 2. a 3. kvartil. Vzorky, které byly pouze v živném médiu vykazují hodnoty od 15 nm do 50 nm. Chybný vzorek má od zbylých dvou nižší hodnoty délky. Mezi vzorky je možné rozeznat rozdíly zejména v průměrné délce vektorů. Vzorky s HTBA mají největší rozsahy hodnot. Průměr i medián je podobný se vzorky buněk, které byly pouze v živném médiu. Kontrolní vzorky DMSO vykazují spíše utlumení pohybů. Délky vektorů jsou obecně kratší. Obecně lze mezi vzorky po vyřazení chybných vzorků vizuálně rozlišit rozdíly v hodnotách délky vektorů. Jde však o statisticky neprůkazný rozdíl.

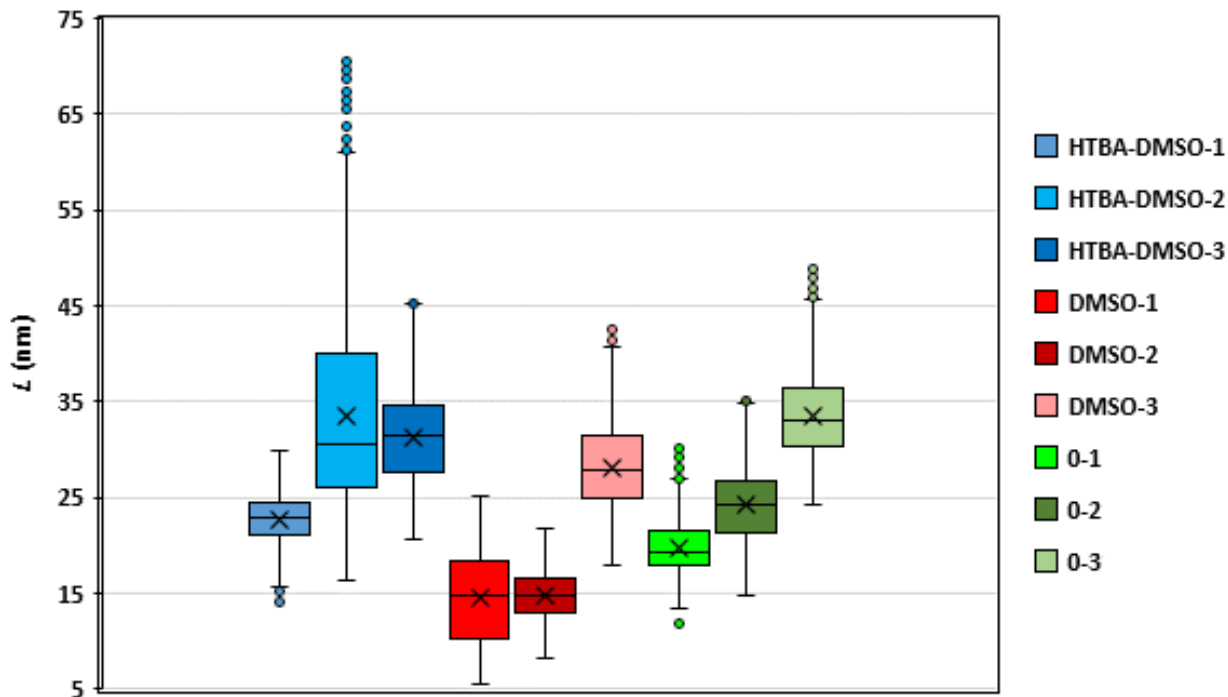
Na Obr. 14 je zobrazeno porovnání distribucí rotačních úhlů vektorů. Rotace částic u vzorků DMSO je nižší v porovnání s rotací u vzorků s terbutylazinem a pouze živným médiem. Mezi vzorky HTBA a živným médiem není pozorovatelný rozdíl. Vzorky DMSO mají také menší rozsah kvartilů než vzorky ostatní (vybočuje vadný vzorek). Statisticky je rozdíl mezi vzorky zanedbatelný.



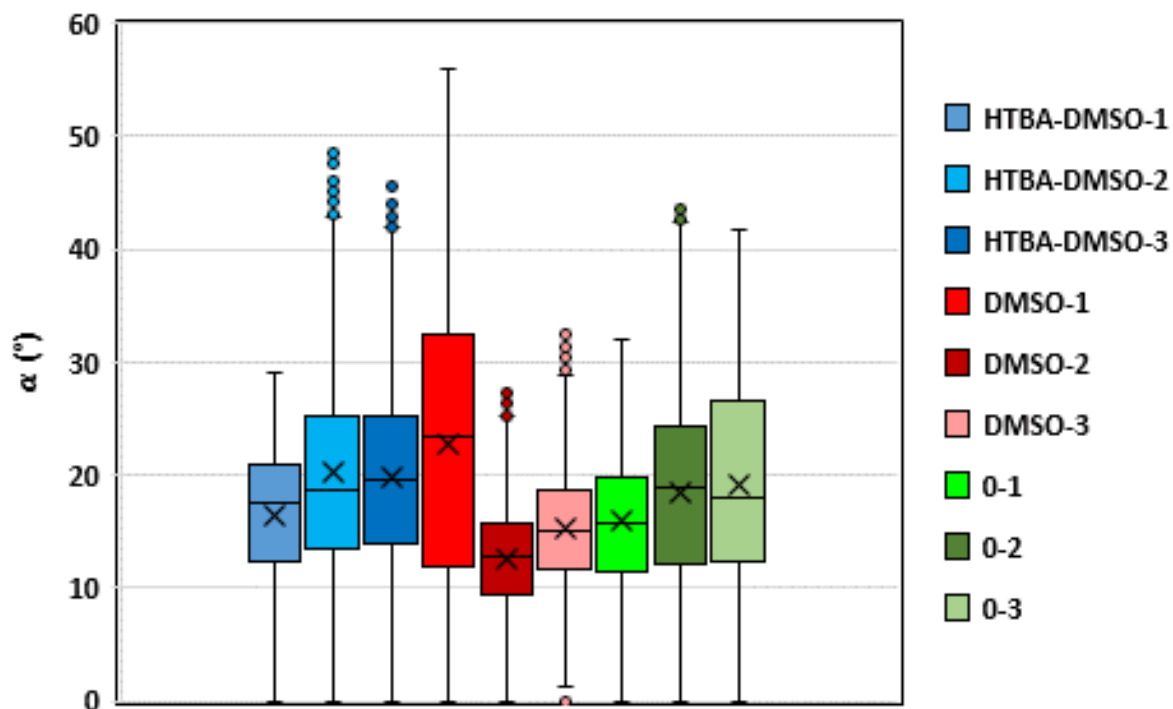
Obrázek 11: Porovnání časových řad průměrných délek vektorů (chybné vzorky HTBA-DMSO-2, DMSO-1, O-3)



Obrázek 12: Porovnání časových řad průměrných úhlů vektorů (chybné distribuce HTBA-DMSO-2, DMSO-1, 0-3)



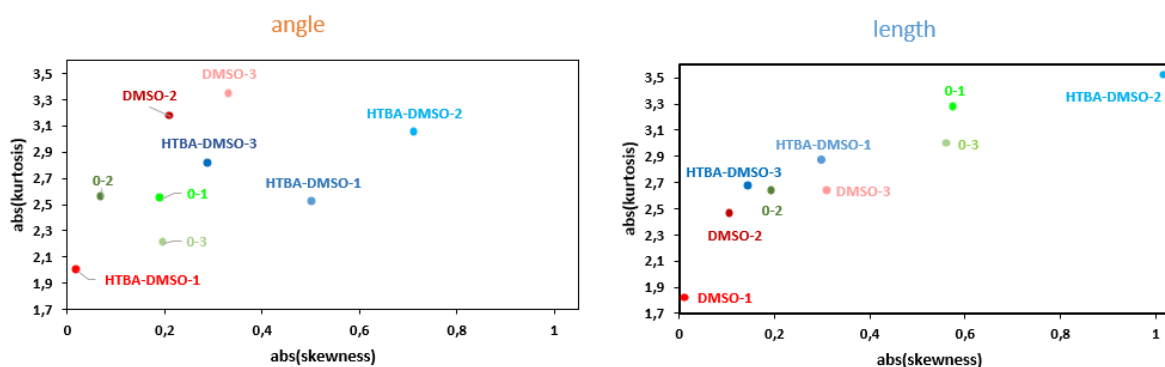
Obrázek 13: Boxový graf reprezentující distribuce úhlů ($^{\circ}$) vektorů s kvartily, rozsahy, mediány a průměry



Obrázek 14: Boxový graf reprezentující distribuce úhly ($^{\circ}$) vektorů zobrazující kvartily, rozsahy, medián a průměr mezi skupinami

Součástí základních statistických charakteristik bylo vyhodnocení šikmostí (skewness) a špičatostí (kurtosis) frekvenčních funkcí. Šikmostí se vyhodnocuje asymetričností funkce. Pokud je hodnota šikmosti kladná, většina hodnot distribuce je menší než střední hodnota (tj. distribuce má “ocas” vlevo od střední hodnoty). Pokud je hodnota šikmosti záporná, většina hodnot je větší než střední hodnota. Absolutní hodnota šikmosti nám říká, jaká vzdálenost tvaru distribuce od ideálně symetrické křivky. Špičatost určuje, jak je distribuce široká. Pokud jsou hodnoty špičatosti kladné, distribuce je úzká, hodnoty jsou nahuštěny ke střední hodnotě. V případě záporných hodnot špičatosti, je distribuce široká. Absolutní hodnota špičatosti nám říká, jak je tvar distribuce vzdálen od šíře ideální (Gaussovy) křivky. Hodnoty šikmostí a špičatostí rovny 0 odpovídají Gaussově křivce.

Vyhodnocení šikmostí a špičatostí (Obr. 15) dopadlo obdobně jako porovnání časových distribucí. Vzorky v rámci jednoho typu si jsou podobné, ale rozptyly hodnot mezi typy vzorků se navzájem překrývají. Pro distribuce úhlů (angle) nabývají dobře naměřené vzorky HTBA-DMSO absolutní hodnotu špičatosti 2,5–2,8. Nejvyšší šikmost vykazují vzorky DMSO, kde oba překračují hodnotu 3. Vzorky 0 mají shodnou šikmost 2,5. Ve špičatosti distribuce úhlů nelze hodnoty u typů vzorků odlišit. Z hodnot distribuce délky (Length) špičatosti lze vyvodit stejný závěr. Hodnoty mezi typy vzorků jsou blízko u sebe, zejména ve špičatosti. Nicméně nelze jednoznačně odlišit typ vzorku na základě společných hodnot šikmosti a špičatosti, kterou nabývají. Obecně lze shrnout, že většina hodnot byla u šikmosti posunuta doleva, to znamená, že většina hodnot byla menší než střední hodnota. U špičatosti naopak hodnoty inklinovaly ke střední hodnotě, tedy, že funkce vykazuje vyšší špičatost než teoretická Gaussova křivka.



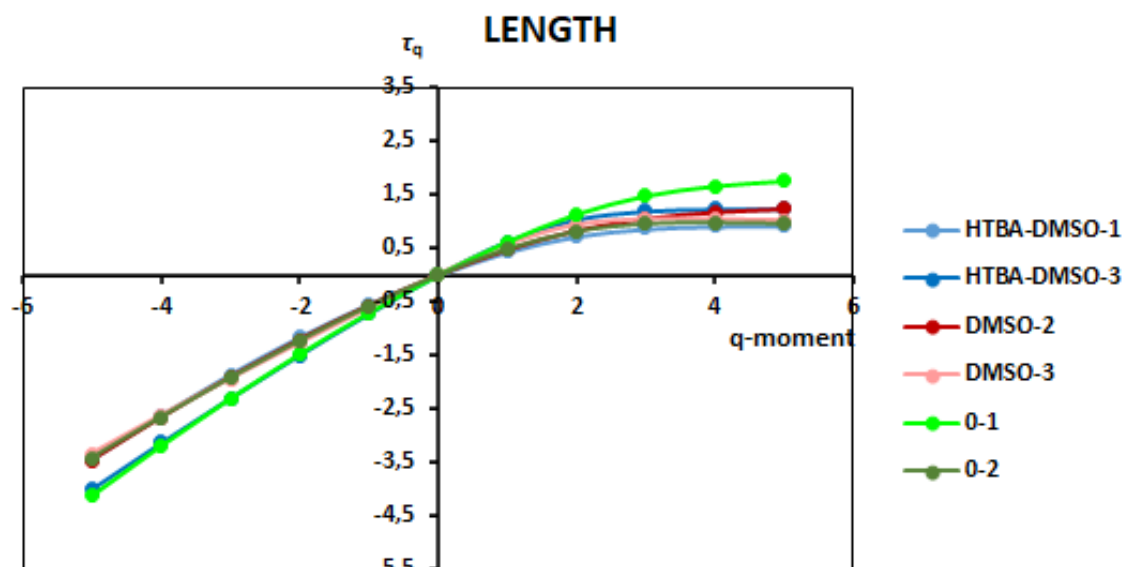
Obrázek 15: Porovnání špičatostí (skewness) a šikmostí (kurtosis) distribucí pro délky a úhly vektorů

5.2 Výsledky multifraktální analýzy

Druhou částí analýzy bylo vyhodnocení multifraktality časových řad na Obr. 11 a 12. Graf multifraktální analýzy popisuje závislost multifraktálního exponentu na použité škále. Vizualizuje, jak se složitost fraktálního signálu mění v úrovních detailu grafů. Čím více je závislost škálovacího exponentu τ_q na lineárně rozložených momentech -5 až 5 (Obr. 16 a 17) lineární, tím více jsou grafy na Obr. 11 a 12 monofraktální. Tedy, že se změnou detailu grafu je signál stále podobný. Naopak působení více fraktálů se projevuje změnou směru křivky, zde pak lze předpokládat složitější struktura signálu (Wendt a kol., 2007).

V Obr. 16 multifraktální analýzy pro délku vektorů data obecně vykazují multifraktalitu. Rozdíly mezi typy vzorků nejsou patrné. Nejnižší fraktalitu vykazuje vzorek 0-1

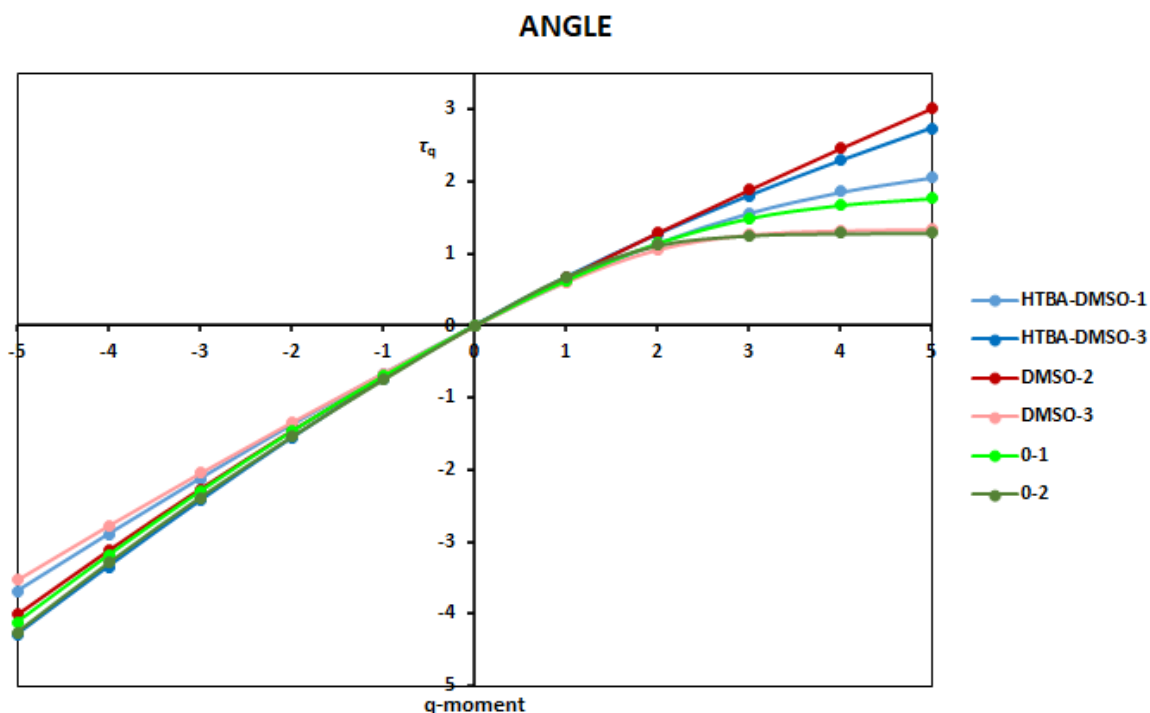
Obr. 17 vyobrazuje fraktalitu dat pro časové řady vektorových úhlů. Vzorky s DMSO



Obrázek 16: Graf zobrazující fraktalitu distribucí délek

vykazují nižší fraktalitu signálu. Oba vzorky mají nižší zakřivení než vzorky bez pesticidu 0. Vzorek DMSO-2 vykazuje nejvyšší monofraktalitu ze vzorků. U DMSO-3 je rozdíl od ostatních vzorků méně patrný, zakřivení je však stále nižší než u vzorků bez pesticidu. Nejsložitější fraktalita odpovídá vzorkům 0. Křivky vzorků 0, které byly jen v živném médiu, mají rozptyl škálovacích exponentů τ_q nejnižší při nejvyšší heterogenitě signálu. Signály časových řad změřených u neovlivněných buněk jakožto živých systémů by měly vykazovat větší multifraktalitu. Výsledky v tomto grafu nejvíce odpovídají předpokládaným výsledkům. Chování buněk v intoxikovaném a čistém

médiu je odlišné, ale v rámci jednoho prostředí se navzájem podobají. Ovšem vzorky v DMSO vykazují v tomto případě největší rozptyl hodnot škálovacích exponentů τ_q .



Obrázek 17: Graf zobrazující fraktalitu distribucí úhlů

6 Diskuze

Práce se zabývá možnou aplikací pasivní mikoreologické metody pro *in vitro* testování. Mikoreologické metody zahrnují širokou oblast výzkumu v biologii a přírodních vědách. Přestože je mikoreologie relativně nová metoda, existuje kolem 6300 studií s touto tematikou. Je však nutné vzít v potaz, že naprostá většina metod se nezabývá její aplikací pro testování toxicity, ani v obecné biologii. Co se aplikace metod pro testování toxicity a kompatibility týče, lze nalézt okolo 500 studií, přičemž velká část pouze představuje možné postupy, které nebyly dosud dostatečně prakticky ověřené. Další studie jsou zaměřeny například na kompatibilitu mezi buňkami a odlišnými typy materiálů. V kontextu možných porovnání s jinými studiemi jsou zdroje kvůli unikátnosti zde použité metody pro porovnání velmi omezené (databáze Web of Science).

Z výsledků této práce nelze jednoznačně konstatovat, že koncentrace HTBA má pozorovatelný vliv na fungování lidských hepatocytů Hep G2. Tento výsledek koresponduje s informacemi ze studie Davora a kol. (2018) i bakalářskou prací Slivoněho (2020). V práci Davor a kol. (2018) byl zkoumán vliv triazinů na buňky Hep G2 a myší lymfocyty. V práci byly buňky vystaveny několika koncentracím triazinů, mimo jiné i o stejné koncentraci, jaká byla použita v této práci ($8 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$). Z výsledků vyplynulo podobně jako zde, že HTBA nemá prokazatelný účinek akutní toxicity na buňky. Výsledky práce Slivoněho (2020) na mikroskopu Nikon Biostation taktéž ukazují podobná data. V práci Slivoněho (2020) bylo jednou z použitých metod také vyhodnocení pomocí optického toku, což je metoda blízké té od Lonhuse a kol. (2021). Výsledek ukazoval mírný rozdíl mezi buňkami s a bez HTBA. Data z této metody však nemusí být pro nedostatek dat zcela validní. Práce diskutuje i možnost opačného výsledku. Tedy, že i zde nakonec koncentrace HTBA nemusí vykazovat odlišnost. Z dostupných výsledků této práce, které korespondují se studii Davora a kol. (2018) a Slivoněho (2020), lze uvažovat nad funkčností a spolehlivostí algoritmu Lonhuse a kol. (2021). Pro dokázání je však třeba test algoritmu opakovat a zvolit jinou metodu při jejím ověření. Pro prokázání funkčnosti je algoritmus třeba otestovat na koncentracích, které se rovnají jejich hodnotám LC50, NOAEL, LOAEL atd. Pokud totiž známe hodnoty toxicity, lépe lze test navrhnout. Mohli bychom tak odhadnout, zda výsledky algoritmu skutečně korespondují se známými hodnotami pro testy akutní toxicity.

Druhou tezí bylo ověření citlivosti metody. Ta však nelze na základě získaných výsledků stanovit.

Při porovnání grafů a výsledků v kap. 5 je zřejmé, že nejsou významné rozdíly mezi chováním buněk v intoxikovaném a neovlivněném prostředí. Nejvíce odlišné jsou vzorky s DMSO, kde délka vektorů i úhly měly obecně nižší hodnoty. To může znamenat, že DMSO působí na buňky sedativně a buňky jsou méně aktivní. Studie zabývající se kompatibilitou DMSO a buněčných kultur jsou do značné míry rozporuplné. Vysoké koncentrace ($>1 \%$) DMSO působí prokazatelně negativně, tzn. inhibují dělení buněk či přímo buňky usmrcují (Jacob a Herschler, 1985). U nízkých koncentrací, které byly použity zde, se zdroje včetně současných studií odlišují. Naprostá většina studií se shoduje ve faktu, že DMSO může ovlivnit fungování buněk.

Podle studií je však ovlivnění při nízkých koncentracích neprokazatelné. Příkladem jsou například studie Verheijena a kol. (2019), Kloverprise a kol. (2010), Tuncera a Gurbanova (2023). Studie, která by zkoumala inhibici celkové aktivity buněk obdobnou metodou, se dohledat nepodařilo. Z toho, co víme, výsledky odpovídají tvrzení, že DMSO ovlivňuje dynamiku buněk již v nižších koncentracích, a to inhibicí intracelulárních pohybů. Tento fakt dává také smysl v kontextu, za jakým účelem se DMSO používá. DMSO se běžně používá v testování léčiv jako jejich rozpouštědlo a pro kryokonzervaci buněk. Při zmrazení chrání buňky před poškozením a úmrtím. DMSO zabraňuje tvorbě ledových krystalků v buňkách v průběhu zmrazování a spolu s tím i stabilizuje membrány a snižuje oxidační stres buněk (Anchordoguy a kol., 1992; Seo a kol., 2011). Tato zjištění by také mohla indikovat, že buňky a jejich intracelulární pohyby by použitím DMSO mohly být inhibovány.

Otázka nastává při porovnání vzorků DMSO se vzorky HTBA-DMSO. Z grafů v kap. 5 vyplývá, že chování buněk v prostředí HTBA-DMSO se podobá chování buněk v čistém živném médiu. Koncentrace DMSO je v obou typech vzorků stejná. Rozdíl je zde tedy s největší pravděpodobností způsoben přítomností HTBA. Pokud by platila hypotéza, že HTBA by měl minimálně dočasně zvýšit intracelulární pohyby v buňce (hypotéza stanovena například v práci Slivoněho, 2020), znamenalo by to, že DMSO a HTBA působí na buňky antagonickým účinkem. Pokud by tato hypotéza platila, je třeba si položit otázku, zda jsou podobné hodnoty mezi typy vzorků HTBA-DMSO a neovlivněných buněk zapříčiněny přítomností DMSO ve vzorku s HTBA. Bohužel nebyly nalezeny žádné studie, které by tuto otázku mohly vysvětlit. V případě platnosti této hypotézy by však platilo, že algoritmus Lonhuse a kol. (2021) je vysoce citlivá metoda a chování buněk odpovídá reálnému stresu buňky.

Co se zpracování velkokapacitních dat týče, práce se potýkala s určitými limitacemi. Na výpočty byl použit počítač s 16jádrovým procesorem Intel core i9, operační paměť 32 GB a grafickou kartou RTX 3090. Samotná data ze všech sérií pořízená mikroskopem zabírala velikost cca 4 TB. Počítač zpracovával data přibližnou rychlostí jedna série za dva týdny. Výpočty všech devíti sérií trvaly čtyři a půl měsíce čistého času. Takto dlouhá doba zpracování dat by v testování toxicity znamenala příliš velkou časovou náročnost celého procesu testování toxicity a nepraktičnost. Omezením bylo také použití běžných kancelářských počítačů s operační pamětí 4 GB. Výpočty padaly v průběhu rekonstrukce vektorové mapy, protože velikost RAM nebyla dostačující.

Značná část výpočtů v biologii však využívá super rychlé počítače (zvané Clustry) a bylo by tedy vhodné zvážení, zda je potřeba aby metoda mohla být vypočtena běžnými počítači? Rozvoj hardware, výpočetních systémů i kapacita úložišť jde stále dopředu. Je tedy otázkou času, za jak dlouho budou počítače natolik výkonné, že zpracování takto velkých dat nebude v budoucnu představovat značnou výzvu (Wei a kol., 2018).

Diskutabilním prvkem v práci by také mohlo být snímání samotných buněk. Značné množství studií ukazuje, že buňky mohou fungovat jako tkáň jinak než samostatné buňky, které byly snímány právě v této práci. Chování buněk tedy v této metodě nemuselo zcela odpovídat tomu, jak se buňky chovají v tkáňové struktuře živočichů (Jensen a Teng, 2019; Arzumian a kol., 2021). Validitu výsledků by to však zdiskreditovat nemělo. Testování mělo za účel zjistit, zda buňky reagují odlišně na různé, ale podobné složení jejich média a jak se změny projevují v jejich chování. Standardní podmínky byly v práci dodrženy, tedy teplota, stejný čas snímání, stejný typ buněk, snímání vždy samotné buňky mimo tkáňovou strukturu atd. Vzorky se lišily pouze složením média (kap. 4.2). V případně budoucího opakování experimentu by bylo dobré zvážit použití tkáňových kultur, ve kterých mohou buňky mezi sebou interagovat. Experiment by tak lépe simuloval skutečné živé tkáně (Jensen a Teng, 2019).

Pokud shrneme výsledky této práce a diskuzi, tak se cíle práce nepodařilo plně dodržet a prokázat. Výsledky neukazují statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými typy vzorků. I tak ale s určitou pravděpodobností indikují správné fungování použité experimentální metody. Práce přináší nové poznatky k in vitro testům pomocí mikroeologických parametrů a otevírá tak možnosti dalšího zkoumání. Z dosavadní diskuze vyplývá, že algoritmus má potenciál a měl by být dále testován, avšak zcela odlišnou cestou a přístupem. Prvním bodem v návrhu odlišného způsobu testování touto metodou by mělo být zvážení použití buněk, které jsou vzájemně propojené a mohou spolu interagovat. Test by tak měl lépe odpovídat reálným podmínkám. Mezi další body by mělo patřit testování dobře prozkoumané látky, aby výsledky byly lépe porovnatelné s referencemi. Látka by také měla být rozpustná přímo v živném médiu. Zkreslení výsledků mohou na základě této práce způsobovat i jinak teoreticky neškodné látky, které při nízkých koncentracích a za použití odlišných metod nevykazují na buňky vliv. Z těchto zkušeností by v dalším testování algoritmu bylo

dobré zjistit kompromis mezi velikostí zorného pole, počtem pozorovaných buněk, prostorovým rozlišením dat (tj. počet pixelů na snímek) a výpočetní rychlostí.

7 Závěr

Studium biochemických a fyziologických procesů buněk je již dlouho objektem zkoumání buněčných biologů. Přesto však v oblasti dynamiky buněk a jejich odpovědi na stres v čase nemáme dostatečné informace k jejich plné charakteristice. Vyvinutím a použitím mikroeologie se začala objevovat možnost neinvazivně zkoumat chování buněk v čase (Weihs a kol., 2006).

Cílem práce bylo testování metody podle studie Lonhuse a kol., 2021 zaměřující se na vyhodnocení vnitrobuněčných pohybů a jejich odpovědi na přítomnost cizorodých látek. Hlavními body testování bylo ověření funkčnosti metody, její citlivosti a možnosti zpracování velkokapacitních dat touto metodou. Jako cizorodá látka bylo vybráno reziduum pesticidu terbuthylazinu, konkrétně terbuthylazin-2-hydroxy (HTBA). Jedná se o látku, která vzniká přeměnou triazinů při jejich výrobě a v přírodním prostředí (Stehlíková, 2010; Kushniarou a kol., 2018). HTBA byla vybrána, jelikož se jedná o látku, která by měla být relativně bezpečná (tj. běžné testy neukazují toxicitu), ale bylo by zajímavé zjistit, zda je tato experimentální metoda citlivější.

Metoda použitá k vyhodnocení vlivů HTBA je založená na principech již zmíněné mikroeologie a sledování pohybu částic uvnitř buněk. Jde o novou experimentální metodu, jež by mohla mít potenciál v testování *in vitro*. Metoda je složena z několika po sobě jdoucích kroků. V první fázi se buněčné kultury snímaly světelným mikroskopem po stanovený čas. Série snímků byly digitálně upraveny pro přesnější fungování algoritmu metody. Dalším krokem byl algoritmus, který identifikoval částice uvnitř buněk a rozdělil pohyby částic podle Stokesovy-Einsteinovy rovnice na Brownovy pohyby a přímé pohyby částic vykonanými buňkami. Z těchto pohybů bylo sestaveno vektorové pole pohybů. Na základě rozdílné intenzity pohybů byl předpoklad odlišného chování buněk v přítomnosti HTBA o koncentraci $8 \mu\text{g. l}^{-1}$ (Lonhus a kol., 2021). Testovaná látka HTBA byla k buňkám přidána společně s DMSO jakožto jeho rozpouštědlem. (Anchodoguy a kol., 1992). Pro kontrolu a porovnání byly také snímány vzorky, které obsahovaly stejné množství DMSO jako

vzorky s HTBA a buňky které obsahovaly pouze živné médium. Celkově tak byly testovány tři typy vzorků ve třech paralelních měření.

Výsledky experimentu neprokázaly statisticky odlišnost vzorků mezi sebou. Jedním z důvodů mohlo být použití právě DMSO. Z grafů získaných použitou analýzou je pozorovatelný rozdíl mezi buňkami pouze s DMSO a ostatními typy. Výsledky této práce opřené o studie zabývající se DMSO (Anchordoguy a kol., 1992; Seo a kol., 2011) tak naznačují, že by DMSO mohlo aktivitu buněk inhibovat, zatímco zkoumané reziduum HTBA naopak stimulovat. V tomto ohledu tak nelze jednoznačně určit citlivost použité metody. Nicméně i na základě malé odlišnosti mezi typy vzorků a vzájemné podobnosti v rámci jednoho typu vzorků lze konstatovat správné fungování algoritmu. Co se zpracování velkokapacitních dat týče, je potřeba proces optimalizovat. Při použití běžně dostupného stolního počítače trvaly výpočty pro praktické použití příliš dlouho. To se však dá vylepšit použitím vysokorychlostních výpočetních clusterů, nebo použitím jiného počítačového jazyka. Se zvyšováním výpočetní rychlosti současných počítačů by však tento problém měl postupně odpadnout (Wei a kol., 2018).

I přes nejistý výsledek, práce přispívá novými informacemi a ukazuje možnosti dalšího postupu v oblasti používání mikrereologických parametrů pro studium buněk a jejich odpověďmi na cizorodé látky. Závěrem tak nadále zůstává otázka použití této metody v testování *in vitro*. Odpověď na základě této práce a získaných výsledků nelze stanovit a je tak třeba dalšího testování a návrhu nového testu. Pro další výzkum je vhodné algoritmus testovat na již dobře prozkoumané látce či skupině látek, tak aby výsledky bylo možné lépe ověřit i jinými studiemi.

8 Seznam citované literatury

- ALBRECHTOVÁ, Barbara. *In vitro metody a jejich relevance vůči situaci in vivo – nové trendy v experimentech s tkáňovými kulturami*. Brno, 2013. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Přírodovědecká fakulta. RECETOX. Vedoucí práce Mgr. Jiří Novák, Ph.D. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/q4j6c/BPHDIS.pdf>.
- ANCHORDOGUY, T.J., J.F. CARPENTER, J.H. CROWE a L.M. CROWE. *Temperature-dependent perturbation of phospholipid bilayers by dimethylsulfoxide. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1992. **1104**(1). 117-122. doi:10.1016/0005-2736(92)90139-D
- 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*, 2021, **22**(23), 13135, doi:10.3390/ijms222313135
- BAY, Herbert, Andreas ESS, Tinne TUYTELAARS a Luc VAN GOOL. Speeded-Up Robust Features (SURF). *Computer Vision and Image Understanding*. 2008, **110**(3), 346-359. ISSN 10773142. doi:10.1016/j.cviu.2007.09.014
- BRUNER, Leon H., Greg J. CARR, Rodger D. CURREN a Mare CHAMBERLAIN. Validation of alternative methods for toxicity testing. *Environmental Health Perspectives*, 1998, **106**(suppl 2), 477–484, doi:10.1289/ehp.98106477
- BUCHSER, William, Mark COLLINS, Tina GARYANTES a kol. Assay Development Guidelines for Image-Based High Content Screening, High Content Analysis and High Content Imaging. In: Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda, MD, USA, 2014. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. ISBN NBK100913.
- CALONI, Francesca, Isabella DE ANGELIS a Thomas HARTUNG. Replacement of animal testing by integrated approaches to testing and assessment (IATA): a call for in vivitrosi. *Archives of Toxicology*, 2022, **96**(7), 1935–1950, doi:10.1007/s00204-022-03299-x
- CROCKER, John C. a Brenton D. HOFFMAN. Multiple-particle tracking and two-point microrheology in cells. *Methods in Cell Biology*, 2007, **83**, 141–178, doi:10.1016/S0091-679X(07)83007-X

- DAVOR, Želježić, Suzana ŽUNEC, Marija BJELIŠ, et al. *Effects of the chloro-s-triazine herbicide terbuthylazine on DNA integrity in human and mouse cells*. *Environ Sci Pollut Res*, 2018, 02 May, 1-17. doi:10.1007/s11356-018-2046-7
- DAVOREN, Maria, S. NÍ SHÚILLEABHÁIN, John O'HALLORAN a kol. A test battery approach for the ecotoxicological evaluation of estuarine sediments. *Ecotoxicology*, 2005, **14**(7), 741–755, doi:10.1007/s10646-005-0022-8
- DECHANT, Andreas a Eric LUTZ. Connecting active and passive microrheology in living cells. *ArXiv*, 2013, 1307.6466, doi:10.48550/arXiv.1307.6466
- DUVAL, Kayla, Hannah GROVER, Li-Hsin HAN, Yongchao MOU, Adrian F. PEGORARO, Jeffery FREDBERG a Zi CHEN. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*, 2017, **32**(4), 266–277, doi:10.1152/physiol.00036.2016
- EBRAHIMI, Vida a Atieh HASHEMI. Challenges of in vitro genome editing with CRISPR/Cas9 and possible solutions: A review. *Gene*, 2020, **753**, 144813, doi:10.1016/j.gene.2020.144813
- GARDEL, Margaret L., Megan T. VALENTINE a David A. WEITZ. Microrheology. In: BREUER, Kenneth S., ed. *Microscale Diagnostic Techniques*. Berlin/Heidelberg, Springer-Verlag, 2005, s. 1–49. ISBN 3-540-23099-8, doi:10.1007/3-540-26449-3_1
- Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP)*. OECD, 2018. OECD Series on Testing and Assessment. ISBN 9789264311008, doi:10.1787/9789264304796-en
- HARTUNG, Thomas. Evolution of toxicological science: The need for change. *International Journal of Risk Assessment and Management*, 2017, **25**(20), 21–45, doi:10.1504/IJRAM.2017.082570
- HEBLING, J., L. BIANCHI, F.G. BASSO, et al. Cytotoxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) in direct contact with odontoblast-like cells. *Dental Materials*. 2015, **31**(4), 399-405. ISSN 01095641. doi:10.1016/j.dental.2015.01.007

- HERTZBERG, Robert P. a Andrew J. POPE. High-throughput screening: new technology for the 21st century. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2000, **4**(4), 445–451, doi:10.1016/S1367-5931(00)00110-1
- HORÁČKOVÁ, Pavlína. *Testování cytotoxicity in vitro*. Pardubice, 2013. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra biologických a biochemických věd. Vedoucí práce RNDr. Karel Královec, Ph.D.
- CHENOUIARD, Nicolas, Ihor SMAL, Fabrice DE CHAUMONT a kol. Objective comparison of particle tracking methods. *Nature Methods*, 2014, **11**(3), 281–289, doi:10.1038/nmeth.2808
- CHENOUIARD, Nicolas, Ihor SMAL, Fabrice DE CHAUMONT, et al. Objective comparison of particle tracking methods. *Nature Methods*. 2014, **11**(3), 281-289, ISSN 1548-7091, doi:10.1038/nmeth.2808
- ISHIZUKA, Yuta a Clive R. BRAMHAM. A simple DMSO-based method for cryopreservation of primary hippocampal and cortical neurons. *Journal of Neuroscience Methods*. 2020, **333**. ISSN 01650270. doi:10.1016/j.jneumeth.2019.108578Pla
- JACOB, Stanley W. a Robert HERSCHLER. Pharmacology of DMSO. *Cryobiology*. 1986, **23**(1), 14-27, ISSN 00112240, doi:10.1016/0011-2240(86)90014-3
- JAFFARD, Stéphane, Bruno LASHERMES a Patrice ABRY. Wavelet Leaders in Multifractal Analysis. In: QIAN, Tao, Mang I VAI a Yuesheng XU, ed. *Wavelet Analysis and Applications*, Birkhäuser Basel, 2007, s. 201-246, Applied and Numerical Harmonic Analysis. ISBN 978-3-7643-7777-9, doi:10.1007/978-3-7643-7778-6_17
- JAVITT, Norman B. Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *The FASEB Journal*, 1990, **4**(2), 161–168.
- JENSEN, Caleb a Yong TENG. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2020, **7**, 33, doi:10.3389/fmolb.2020.00033

- JOSHI, Pranav a Moo-Yeal LEE. High content imaging (HCI) on miniaturized three-dimensional (3D) cell cultures. *Biosensors*, 2015, **5**(4), 768–790, doi:10.3390/bios5040768
- KAPAŁCZYŃSKA, Marta, Tomasz KOLENDA, Weronika PRZYBYŁA a kol. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, 2018, **14**(4), 910–919, doi:10.5114/aoms.2016.63743
- KARAMI, Ebrahim, Siva PRASAD a Mahomed SHEHATA. Image Matching Using SIFT, SURF, BRIEF and ORB: Performance Comparison for Distorted Images. *Memorial University, St. Johns*, 2017, Dostupné z: doi:10.48550/arXiv.1710.02726
- KAŠPAR, Otakar. *Ekotoxikologické hodnocení polymerů a biologicky aktivních látek v akvatickém prostředí*. Brno, 2015. Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Milada Vávrová. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/64173>.
- KLOVERPRIS, Henrik, Anders FOMSGAARD, Amanda HANDLEY, Jim ACKLAND, Mark SULLIVAN a Philip GOULDER. Dimethyl sulfoxide (DMSO) exposure to human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) abolish T cell responses only in high concentrations and following cocubation for more than two hours. *Journal of Immunological Methods*. 2010, **356**(1-2), 70-78. ISSN 00221759, doi:10.1016/j.jim.2010.01.014
- KLOVERPRIS, Henrik, Anders FOMSGAARD, Amanda HANDLEY, Jim ACKLAND, Mark SULLIVAN a Philip GOULDER. Dimethyl sulfoxide (DMSO) exposure to human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) abolish T cell responses only in high concentrations and following cocubation for more than two hours. *Journal of Immunological Methods*. 2010, **356**(1-2), 70-78. ISSN 00221759. doi:10.1016/j.jim.2010.01.014
- KOČÍ, Vladimír. Význam testů toxicity pro hodnocení vlivů látek na životní prostředí. *Chemické Listy*, 2006, **100**(10), 882–888, ISSN 0009-2770. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_10_882-888.pdf
- KREWSKI, Daniel, Melvin E. ANDERSEN, Michael G. TYSHENKO a kol. Toxicity testing in the 21st century: progress in the past decade and future

- perspectives. *Archives of Toxicology*, 2020, **94**(1), 1–58, doi:10.1007/s00204-019-02613-4
- KUBINCOVÁ, Petra, Jiří NOVÁK a Iva SOVADINOVÁ. Nový přístup při stanovení akutní systémové toxicity. *Chemické Listy*, 2016, **110**(2), 118–125, Dostupné z <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/232>
- KUSHNIAROU, Aliaksandr, Isabel GARRIDO, José FENOLL, Nuria VELA, Pilar FLORES, Ginés NAVARRO, Pilar HELLÍN a Simón NAVARRO. Solar photocatalytic reclamation of agro-waste water polluted with twelve pesticides for agricultural reuse. *Chemosphere*. 2019, **214**, 839–845, doi:10.1016/j.chemosphere.2018.09.180
- LAU, Amy Wiebe C., Brendan D. HOFFMAN, A. DAVIES, John C. CROCKER a Tom C. LUBENSKY. Microrheology, stress fluctuations, and active behavior of living cells. *Physical Review Letters*, 2003, **91**(19), 198101, doi:10.48550/arXiv.1307.6466
- LONHUS, Kirill, Renata RYCHTÁRIKOVÁ, Ali GHAZNAVI a Dalibor ŠTYS. Estimation of rheological parameters for unstained living cells. *The European Physical Journal Special Topics*, 2021, **230**(4), 1105–1112, doi:10.1140/epjs/s11734-021-00084-2
- LONHUS, Kirill, Renata RYCHTÁRIKOVÁ, Ganna PLATONOVA a Dalibor ŠTYS. Quasi-spectral characterization of intracellular regions in bright-field light microscopy images. *Scientific Reports*, 2020, **10**(1), 18346.
- LUCEY, Brendan P., Walter A. NELSON-REES a Grover M. HUTCHINS. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2009, **133**(9), 1463–1467, doi:10.5858/133.9.1463
- MAO, Yating, Paige NIELSEN a Jamel ALI. Passive and active microrheology for biomedical systems. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, **10**, 916354, doi:10.3389/fbioe.2022.916354
- McGLYNN, John A., Nan WU a Kelly M. SCHULTZ. Multiple particle tracking microrheological characterization: Fundamentals, emerging techniques and applications. *Journal of Applied Physics*, 2020, **127**(20), 201101, doi:10.1063/5.0006122

- MEISSNER, Bohumil a Václav ZILVAR. Fyzika polymerů. Praha: SNTL v Praze, 1987. Dostupné z: <https://pol.vscht.cz/studium/studmat/fyzikapolymeruva>
- OYEJIDE, Lekan, Odete R. MENDES a Igor MIKAELIAN. Molecular Pathology. In: *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development*. Elsevier, 2017, s. 407–445. ISBN 9780128036204, doi:10.1016/B978-0-12-803620-4.00016-5
- PAN, Wei, Zhanhuai LI, Yansong ZHANG a Chuliang WENG. The New Hardware Development Trend and the Challenges in Data Management and Analysis. *Data Science and Engineering*. 2018, **3**(3), 263-276, ISSN 2364-1185, doi:10.1007/s41019-018-0072-6, doi:10.1080/07900627.2010.531898
- PARRIS, Kevin. Impact of agriculture on water pollution in OECD countries: recent trends and future prospects. *International Journal of Water Resources Development*. 2011, **27**(1), 33–52.
- PEARCE, Robert G., R. Woodrow SETZER, Cory L. STROPE, Nisha S. SIPES a John F. WAMBAUGH. Httk: R package for high-throughput toxicokinetics. *Journal of Statistical Software*, 2017, **79**(4), 1–26, doi:10.18637/jss.v079.i04
- PEREZ-CARETA, Eduardo, J. Gabriel AVIÑA-CERVANTES, Olivier DEBEIR, Jose J. SÁNCHEZ-MONDRAGÓN, Daniel A. MAY-ARRIOJA a Miguel TORRES-CISNEROS. Image processing for in vitro cell tracking. In: MÜLLER-KARGER, Carmen, Sara WONG a Alexandra LA CRUZ, eds. *IV Latin American Congress on Biomedical Engineering 2007, Bioengineering Solutions for Latin America Health. IFMBE Proceedings, vol. 18*. Berlin/Heidelberg: Springer, 2007, s. 1148–1151, doi:10.1007/978-3-540-74471-9_266
- PLATONOVA, Ganna, Dalibor ŠTYS, Pavel SOUČEK, Kirill LONHUS, Jan VALENTA a Renata RYCHTÁRIKOVÁ. Spectroscopic Approach to Correction and Visualisation of Bright-Field Light Transmission Microscopy Biological Data. *Photonics*. 2021, **8**(8). ISSN 2304-6732. doi:10.3390/photonics8080333
- Praktický průvodce: Jak používat alternativy ke zkouškám na zvířatech za účelem splnění požadavků na informace pro registraci podle nařízení REACH. *ECHA: Evropská agentura pro chemické látky*. Helsinky, 2016. Dostupné z: doi:10.2823/440619

- REHBERGER, Kristina, Inge WERNER, Bettina HITZFELD, Helmut SEGNER a Lisa BAUMANN. 20 Years of fish immunotoxicology – what we know and where we are. *Critical Reviews in Toxicology*. 2017, **47**(6), 516-542. ISSN 1040-8444. Dostupné z: doi:10.1080/10408444.2017.1288024
- ROSE, Katie A., Mehdi MOLAEI, Michael J. BOYLE, Daeyeon LEE, John C. CROCKER a Russell J. COMPOSTO. Particle tracking of nanoparticles in soft matter. *Journal of Applied Physics*, 2020, **127**(19), 19110, doi:10.1063/5.0003322
- ROVIDA, Costanza, Nathalie ALÉPÉE, Anne M. API a kol. Integrated testing strategies (ITS) for safety assessment. *ALTEX*, 2015, **32**(1), 25–40, doi:10.14573/altex.1411011
- SEGERITZ, Charis-P. a Ludovic VALLIER. Cell culture. In: JALALI, Morteza, Francesca Y. L. SALDANHA, Mahdi JALALI, eds. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Elsevier, 2017, s. 151–172, doi: 10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6
- SELVAGGI, Lara, Marinella SALEMME, Carmen VACCARO a kol. Multiple-Particle-Tracking to investigate viscoelastic properties in living cells. *Methods*. 2010, **51**(1), 20–26, doi:10.1016/j.ymeth.2009.12.008
- SEO, Ji Min, Mi Yeung SOHN, Jang Soo SUH, Anthony ATALA, James J. YOO a Yun-Hee SHON. Cryopreservation of amniotic fluid-derived stem cells using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide. *Cryobiology*. 2011, **62**(3), 167-173, ISSN 00112240, doi:10.1016/j.cryobiol.2011.02.003
- STEHLÍKOVÁ, Kateřina. *Stanovení polárních pesticidů v environmentálních matricích*. Brno, 2010. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, RECETOX. Vedoucí práce Mgr. Jiří Kohoutek, Ph.D., Dostupné z: https://is.muni.cz/th/zu7yt/bakalarska_prace.pdf. Bakalářská práce. Stehlíková, 2010. Vedoucí práce Mgr. Jiří Kohoutek.
- STODŮLKOVÁ, Iveta. *In vitro testování látek s potenciálním terapeutickým účinkem*. Bakalářská práce. Pardubice, 2016. Univerzita pardubice. Vedoucí práce Lenka Brůčková.
- TANNENBAUM, Jerrold a Taylor B. BENNETT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *Journal of the American*

Association for Laboratory Animal Science, 2015, **54**(2), 120–132, ISSN 2769-6677

TRIVEDI, Mahesh S., Yash P. SAHNI, Nitesh KUMAR, Anjana PANICKER a Swatantra K. SINGH. Toxicogenomics: An overview. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Research*, 2013, **4**(5), 1746–1750, ISSN 2230–7583

TSENG, Yiider, Thomas P. KOLE a Denis WIRTZ. Micromechanical mapping of live cells by multiple-particle-tracking microrheology. *Biophysical Journal*, 2002, **83**(6), 3162–3176, doi:10.1016/S0006-3495(02)75319-8

TUNÇER, Sinem a Rafiq GURBANOV. Non-growth inhibitory doses of dimethyl sulfoxide alter gene expression and epigenetic pattern of bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2023, 107(1), 299-312, ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-022-12296-0

van VLIET, Erwin, Mardas DANESHIAN, Mario BEILMANN a kol. Current approaches and future role of high content imaging in safety sciences and drug discovery. *ALTEX*, 2014, **31**(4), 479–493, doi:10.14573/altex.1405271

VERHEIJEN, M., M. LIENHARD, Y. SCHROODERS, et al. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Scientific Reports*. 2019, **9**(1). ISSN 2045-2322. doi:10.1038/s41598-019-40660-0

VIOLANTE, Georges Da, Naima ZERROUK, Isabelle RICHARD, et al. Short Term Caco-2/TC7 Cell Culture: Comparison between of Conventional 21-d and a Commercially Available 3-d System. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2004, **27**(12), 1986-1992. ISSN 0918-6158. doi:10.1248/bpb.27.1986

WEI, Yifei, F. Richard YU, Mei SONG a Zhu HAN. Joint Optimization of Caching, Computing, and Radio Resources for Fog-Enabled IoT Using Natural Actor–Critic Deep Reinforcement Learning. *IEEE Internet of Things Journal*. 2019, **6**(2), 2061-2073. ISSN 2327-4662. doi:10.1109/JIOT.2018.2878435

WEIHS, Daphne, Thomas G. MASON a Michael A. TEITELL. Bio-microrheology: A frontier in microrheology. *Biophysical Journal*, 2006, **91**(11), 4296–4305, doi:10.1529/biophysj.106.081109

WENDT, Herwig a Patrice ABRY. Multifractality Tests Using Bootstrapped Wavelet Leaders. *IEEE Transactions on Signal Processing*. 2007, **55**(10), 4811-4820. ISSN 1053-587X. doi:10.1109/TSP.2007.896269

WHELAN, Maurice a Melvin ANDERSEN. Toxicity Pathways – from concepts to application in chemical safety assessment. *JRC Scientific and Policy Report*. Luxembourg. Publications Office of the European Union, 2013. ISSN 1831-9424. Dostupné z: doi:10.2788/49626, doi:10.2788/49626

Knižní zdroje:

KOPÁČEK, Jiří, Josef HEJZLAR a Martin RULÍK. *Voda na Zemi*. České Budějovice: Nakladatelství Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 2020. ISBN 978-80-7394-834-4

RYCHTÁRIKOVÁ, Renata, Tomáš NÁHLÍK. *Systémově informační přístup k digitální světelné mikroskopii*. Budějovice: Nakladatelství Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 2023

HORÁK, Josef, Igor LINHART a Petr KLUSOŇ. *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. Praha: VŠCHT, 2004. ISBN 978-80-7080-548-0.

KLUSOŇ, Petr. *Toxikologie*. Ústí nad Labem, 2014. Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí. ISBN 978-80-7414-811-7.

Webové stránky:

EURL ECVAM *Validation and Submission Process*. Brusel: EU Science Hub. Dostupné z: https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eu-reference-laboratory-alternatives-animal-testing-eurl-ecvam/alternative-methods-toxicity-testing/validation-and-submission-process_en

HOFFMAN, R. M. The beginning of tissue culture. 2016. Dostupné z: <https://scitechconnect.elsevier.com/the-beginning-of-tissue-culture/>

OECD Glossary of Statistical Terms - Toxicity Definition. OECD Statistics. Dostupné z:

<https://stats.oecd.org/glossary/detail.asp?ID=2734#:~:text=Toxicity%20is%20the%20ability%20of,or%20contamination%20with%2C%20that%20substance.>

The culture environment affects cell growth. <https://www.thermofisher.com/>. Waltham, Massachusetts: Thermo Fisher Scientific, 2022. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-environment.html>

Legislativní zdroje:

Zákon č. 350/2011 Sb. Zákon o chemických látkách a chemických směsích a o změně některých zákonů (chemický zákon), částka 122/2011

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006

Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely Text s významem pro EHP

9 Seznam použitých zkratk

2D kultivace = Metody pěstování buněk na rovném povrchu v monovrstvě

3D kultivace = Metody pěstování buněk ve třech rozměrech ve formě volného agregátu, nebo pomocí podpůrného prostředí využívající hydrogel, kolagen atd.

3R = Nový koncept v testování toxicity, jehož účelem je redukce počtu používaných zvířat (Tannenbaum a Bennett, 2015).

AOP = Cesta nepříznivého výsledku; stupňovitý systém testování (z angl. „Adverse outcome pathway“)

BRISK = Počítačový algoritmus pro detekci a trackování klíčových bodů (z angl. „Binary Robust Invariant Scalable Keypoints“)

CRISPR-Cas9 = Technologie pro úpravu genomu umožňující přesné změny v DNA živých organismů

cSt = jednotka pro měření viskozity tekutin (z angl. „centistokes“)

CYP1A2 = Forma cytochromu P450 vyskytující se zejména v játrech. Patří mezi nejvýznamnější enzymy, které se podílejí na metabolismu léčiv a některých karcinogenních látek (Brejcha, 2015).

CYP2B6 = Forma cytochromu P450 podílející se na metabolismu léčiv a xenobiotik v játrech (Kalousová, 2003).

CYP3A4 = Nejrozšířenější forma cytochromu P450 v játrech, tvořící zde zhruba 30% podíl veškerých cytochromů. Podílí se na většině známých přeměnách léčiv a xenobiotik v játrech (Kalousová, 2003).

DIC mikroskopie = metoda optické mikroskopie, která umožňuje pozorování neobarvených objektů s vysokým kontrastem (z angl. Differential Interference Contrast microscopy)

EDTA = ethylendiamintetraoctová kyselina (z angl. „ethylenediaminetetraacetic acid“)

ECHA = Evropská agentura pro chemické látky (z angl. „European Chemicals Agency“)

EMEM = Standardní živné médium používané v buněčné kultivaci (z angl. Eagle's Minimum Essential Medium)

EU = Evropská unie

EURL ECVAM = Výzkumné středisko a referenční laboratoř Evropské komise

FACS = Třídič buněk aktivovaných fluorescencí; Laboratorní technika, která se používá k rozdělení specifických populací buněk (z angl. „Fluorescence-activated Cell Sorting“)

FBS = Sérum z telecího plodu (z angl. fetal bovine serum)

FRAME = Fond pro náhradu zvířat v lékařských experimentech (z angl. „Fund for Replacement of Animals in Medical Experiments“)

GIVIMP = Pokyny pro správné postupy *in vitro* metod (z angl. „Guidance Document on Good In Vitro Method Practices“)

GPCR = Typ receptoru spřažený s G-proteiny na membráně buňky sloužící k přenosu signálů z vnějšího prostředí (z angl. „G Protein-Coupled Receptor“)

HCI = Přístup *in vitro* založený na zobrazování s vysokým obsahem informací (z angl. „High-content imaging“)

HeLa = Nesmrtelná buněčná linie pojmenovaná po její původkyni Henriette Lacks

Hep G2 = Nesmrtelná buněčná linie získaná z lidských rakovinových buněk jater

HEPES = N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina

HTBA = Terbutylazin-2-hydroxy

HTTK = Hlubková toxikokinetika (z angl. „High-throughput toxicokinetics“)

IATA = integrované přístupy k testování a hodnocení (z angl. „Integrated Approaches to Testing and Assessment“)

In chemico = Z lat. v chemikáliích; Vědecké experimenty, nebo analýzy, které se provádějí pomocí chemických reakcí, nebo látek. Často jde o analýzy biomolekul, či identifikaci různých látek.

In silico = Označení pro experimenty, nebo analýzy pomocí počítačových programů a simulací. Využívají se pro predikci a simulaci chování různých systémů.

In vitro = Z lat. ve skle; Vědecké experimenty, nebo postupy, které se provádějí mimo tělo zvířat či člověka. Příkladem může být testování na buněčných kulturách.

In vivo = Z lat. v živém organismu; Vědecké experimenty, nebo studie, které se provádějí na živých organismech.

ISO = Mezinárodní organizace pro standardizaci (z angl. „International Organisation for Standardisation“)

KAZE = Počítačový algoritmus pro detekci částic v obrázcích využívající nelineární difuzní proces (z jap. vítr)

LC50 = Koncentrace látky, při které zemře 50 % testovaných živočichů (z angl. „Lethal Concentration 50“)

LD50 = Toxická dávka, při které zemře 50 % testovaných živočichů (z angl. „Lethal Dose 50“)

LOAEL = Nejnižší dávka, při které byl pozorován škodlivý účinek (z angl. „Lowest Observed Adverse Effect Level“)

MPT = Metoda sledování pohybu více částic najednou, která umožňuje analýzu pohybových vztahů mezi nimi. (z angl. „Random Multiple Particle Tracking“)

NEAA = Neesenciální aminokyseliny (z angl. non-essential amino acids)

NOAEL = Úroveň expozice, při které ještě nejsou pozorovány žádné nepříznivé účinky látky na testovaný organismus (z angl. „No Observable Adverse Effect Level“)

OECD = Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (z angl. „The Organisation for Economic Co-operation and Development“)

ORB = Počítačový algoritmus pro detekci a popis lokální bodů v obrázcích (z angl. „Oriented Fast and Rotated Brief“)

PCR = Polymerázová řetězová reakce (z angl. „Polymerase Chain Reaction“); Biochemická metoda umožňující kopírování fragmentů DNA.

PPF= Pohyb v pixelech za snímek (z angl. „Pixels Per Frame“)

RAM = Typ počítačové paměti (z angl. „Random Access Memory“)

REACH = Nařízení evropské unie o registraci, evaluaci, autorizaci a omezení chemických látek (z angl. „Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals“)

RGB = standardní model digitálního zpracování barev (z angl. Red, Green, Blue)

RNA-seq. = Laboratorní technika používaná k identifikaci a kvantifikaci množství RNA molekul v biologickém vzorku

SIFT = Počítačový algoritmus pro detekci lokálních klíčových bodů, jejich popis a identifikace při analýze obrázků (z angl. „Scale-invariant feature transform“)

SOP = Jednotně psané podrobné postupy (z angl. „Standard Operating Procedures“)

SPT = Metoda sledování pohybu jednotlivých částic, která umožňuje získat informace o dynamice částic v různých biologických a fyzikálních systémech (z angl. „Single Particle Tracking“)

SURF = Počítačový algoritmus pro detekci lokálních klíčových bodů a jejich popis při analýze obrázků (z angl. „Speeded Up Robust Features“)

TBA = Terbutylazin

TD50 = Toxická dávka, při které dojde k projevu toxických vlastností u 50 % testovaných zvířat (z angl. „Toxic Dose 50“)

10 Seznam obrázků a tabulek

10.1 Seznam Obrázků:

Obrázek 1: Schématické zobrazení AOP (= „Adverse outcome pathway“) systému od nejnižších trofických úrovní po složitější a typy testů, které se v jednotlivých trofických úrovních nejčastěji využívají	12
Obrázek 2: Schéma vývoje a validace alternativních metod in vitro	14

Obrázek 3: Kelvinův model reprezentující viskoelastické vlastnosti pomocí paralelního propojení pístu a pružin. Model A = nedeformovaný stav; model B = deformace způsobovaná napětím σ	23
Obrázek 4: Postupné ředění DMSO s HTBA do živného média EMEM na Petriho misku	32
Obrázek 5: Postupné ředění DMSO bez HTBA do živného média EMEM na Petriho misku	32
Obrázek 6: Snímek buňky Hep G2 pořízený superskopem	34
Obrázek 7: Algoritmus stanovení mikroeologických parametrů (Lonhus a kol., 2021)	37
Obrázek 8: Vektorové pole vnitrobuněčných toků	39
Obrázek 9: Časová řada průměrných délek vektorů pohybů hmoty vzorku HTBA-DMSO-1.....	42
Obrázek 10: Q-Q graf indikující nelineární rozložení dat	43
Obrázek 11: Porovnání časových řad průměrných délek vektorů (chybné vzorky HTBA-DMSO-2, DMSO-1, 0-3).....	45
Obrázek 12: Porovnání časových řad průměrných úhlů vektorů (chybné distribuce HTBA-DMSO-2, DMSO-1, 0-3).....	46
Obrázek 13: Boxový graf reprezentující distribuce úhlů ($^{\circ}$) vektorů s kvartily, rozsahy, mediány a průměry	47
Obrázek 14: Boxový graf reprezentující distribuce úhly ($^{\circ}$) vektorů zobrazující kvartily, rozsahy, medián a průměr mezi skupinami	47
Obrázek 15: Porovnání špičatostí (skewness) a šikmostí (kurtosis) distribucí pro délky a úhly vektorů	48
Obrázek 16: Graf zobrazující fraktalitu distribucí délek.....	49
Obrázek 17: Graf zobrazující fraktalitu distribucí úhlů	50

10.2 Seznam tabulek:

Tabulka 1: Technické parametry světelného mikroskopu-superskopu	33
---	----

Abstrakt

Bakalářská práce se věnuje problematice testování toxicity chemických látek. V současném chemickém a farmaceutickém průmyslu se produkuje tisíce nových látek ročně, což přináší potřebu dostatečného zajištění bezpečnosti spotřebitelů a ochrany životního prostředí. *In vitro* testování se v této problematice stává stále důležitějším výzkumným nástrojem.

Tato práce ověřuje teoretické základy a navržený algoritmus vyvinutý Lonhusem a kol. laboratoře experimentálních komplexních systémů v Nových Hradech a jeho možné budoucí aplikace v *in vitro* testování. Tento nový přístup využívá principů mikrореologie a sleduje zrychlené robustní příznaky v digitálním obraze, které přepočítává na vektory trajektorií částic vnitrobuněčné hmoty. Mikrореologie je relativně nová oblast výzkumu v biologii a přírodních vědách, která se zabývá studiem toku a deformace materiálů na mikroskopické úrovni. Algoritmus odděluje dvě hlavní komponenty pohybů uvnitř buněk: přímý pohyb organel s většími částicemi a náhodný Brownův pohyb. Výhodou této metody je potenciál jednoduchého použití a její citlivosti. Metoda umožňuje získání důležitých prvotních informací o účinku chemických látek na buněčné kultury.

Testování bylo provedeno na buňkách linie Hep G2 a testovanou látkou byl polutant pesticid terbutylazin-2-hydroxy. Výsledkem práce bylo ověření funkčnosti metody Lonhuse a kol. (2021), zhodnocení možných problémů, se kterými se práce potýkala, a možnosti dalšího postupu ve vývoji této metody.

Abstract

The bachelor thesis is devoted to testing the toxicity of chemical substances. In the current chemical and pharmaceutical industry, thousands of new substances are produced annually, which brings about the need to ensure sufficient consumer safety and environmental protection. In vitro testing is becoming an increasingly important research tool in this issue.

This work verifies the theoretical foundations and proposes an algorithm developed by Lonhus et al. from the Laboratory of experimental complex systems in Nové Hradky and its possible future applications in in vitro testing. This new approach uses the principles of microrheology and tracks Speed-Up Robust Features (SURF) in a digital image and converts them into vectors of trajectories of intracellular mass particles. Microrheology is a relatively new field of research in life sciences and deals with the study of flow and deformation of materials at the microscopic level. The algorithm separates two main components of the movements inside the cells: direct movement of organelles as larger particles and random Brownian motion. The advantage of this method is its potential of easy use and sensitivity. The method makes it possible to obtain important primary information about the effect of chemical substances on cell cultures.

Testing was performed on the Hep G2 cells and the tested substance was the pollutant of pesticide terbuthylazine-2-hydroxy. The result of the work was the verification of the functionality of the method by Lonhus et al. (2021), assessment of possible problems which the work can face, and possibilities of further progress in the method development.