

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Senzibilizace kůže in vitro: Testovací metoda za pomoci
Nrf2 ARE – luciferázy

Diplomová práce

Autor:	Bc. Bělástová Lada
Studijní program:	S16BI001NP
Studijní obor:	Systematická biologie a ekologie
Odborný konzultant:	Mgr. Petra Kubincová
Vedoucí práce:	RNDr. Martin Kuneš Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny parametry, z kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne 4. 5. 2018

Bc. Bělástová Lada

Poděkování:

Děkuji svému vedoucímu práce RNDr. Martinu Kunešovi Ph. D. za pomoc při domluvení spolupráce s Výzkumným ústavem organických syntéz, a. s. Pardubice a také za pomoc a rady při zpracování této práce.

Dále děkuji své odborné konzultantce Mgr. Petře Kubincové za odborné vedení při zpracování mé diplomové práce, za cenné rady, připomínky a podporu při prvních neúspěšných pokusech. V neposlední řadě také za ochotu a trpělivost při práci v laboratoři.

Anotace:

BĚLASTOVÁ, L. Senzibilizace kůže *in vitro*: Testovací metoda za pomoci Nrf2 ARE – luciferázy. Hradec Králové, 2018. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Hradec Králové.

Úkolem práce bylo otestovat pomocí Nrf2-ARE luciferázové zkoušky modelové chemikálie se známými účinky na organismus. Po získání zkušeností s prací s touto metodou a buněčnou linií KeratinoSensTM otestovat vzorky s neznámými účinky na lidský organismus a na základě předchozích zkušeností s modelovými látkami stanovit, zda se jedná o látky senzibilizující či ne. V neposlední řadě bylo úkolem verifikovat a zavést tuto metodu na základě provedených experimentů a jejich výsledků do laboratorní praxe pro Výzkumný ústav organických syntéz, a. s. Pardubice.

Klíčová slova:

Senzibilizace, *in vitro*, KeratinoSensTM, luciferáza

Annotation:

BĚLASTOVÁ, L. Skin sensitisation *in vitro*: Testing method using Nrf2 ARE – luciferase. Hradec Králové, 2018. Diploma thesis, Faculty of Science, University of Hradec Králové.

The aim of this thesis was to test model chemicals with known effects on the organism using Nrf2-ARE luciferase assay. After gaining experience with this method and the KeratinoSensTM cell line, test samples with unknown effects on the human organism were tested for their sensitising potential on the basis of previous experience with the model substances. Last but not least, the work aimed to introduce this method on the basis of experiments and their results into the laboratory practice for the Research Institute of Organic Syntheses Pardubice.

Keywords:

Sensitisation, *in vitro*, KeratinoSensTM, luciferase

Obsah

1	Úvod a cíle práce	9
2	Literární přehled	10
2.1	Testování toxicity	10
2.2	<i>In vivo</i> testy	10
2.3	<i>In vitro</i> testy	11
3	Metodika	13
3.1	Úvod	13
3.2	Použité chemikálie, média, séra	14
3.3	Buněčná linie KeratinoSens TM	15
3.3.1	Práce s buněčnou linií	15
3.3.2	Charakteristika buněčné linie	16
3.3.3	Doubling time	16
3.4	Test s modelovými látkami	17
3.4.1	Příprava buněk (1. den)	17
3.4.2	Expozice (2. den)	17
3.4.3	Měření luminiscence, barvení MTT (4. den)	20
3.4.4	Měření absorbance (5. den)	21
3.5	Test s neznámými chemikáliemi	21
3.5.1	Zavedení testovací metody	21
4	Analýza dat a interpretace výsledků	23
4.1	Platnost experimentu	24
4.2	Predikční model	25
5	Výsledky	26
5.1	Charakteristika buněčné linie	26
5.2	Verifikace metody	27
5.2.1	Test s modelovými látkami	27
5.2.2	Test s neznámými látkami	35
6	Diskuze	39
7	Závěr	42
8	Přílohy	43
9	Literatura	46

Použité zkratky

AOP	Dráha škodlivého účinku (Adverse Outcome Pathway)
ARE	Antioxidační responzivní element
CA	Aldehyd kyseliny skořicové
DMEM	Kultivační médium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	Rozpouštědlo pro chemikálie (Dimethylsulfoxid)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EC_{1,5}	Interpolovaná koncentrace vyvolávající 1,5 násobnou indukci luciferázy
ECETOC	Evropské centrum pro ekotoxikologii a toxikologii chemických látek (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals)
ECHA	Evropská agentura pro chemické látky (European Chemicals Agency)
ECVAM	Evropské centrum pro validaci alternativních metod (European Centre for Validation of Alternative Methods)
EDGMA	Ethylen glykol dimethakrylát
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina (Ethylen diamin-tetra-acetic acid trisodium salt)
EU	Evropská unie
FBS	Fetální bovinní sérum
FRAME	Fond pro nahrazení zvířat v medicínských pokusech (Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments)
HaCaT	Buněčná linie lidských epidermálních keratinocytů
I_{max}	Maximální indukce luciferázové aktivity
IATA	Integrovaný přístup k testování a hodnocení (Integrated Approach to Testing and Assessment)
IC₃₀	Koncentrace vedoucí ke snížení životaschopnosti o 30%
IC₅₀	Koncentrace vedoucí ke snížení životaschopnosti o 50%
ISO	Mezinárodní organizace pro standardizaci (International Organization for Standardization)
ISO	Isopropanol
Keap1	Protein-kódující gen
LLNA	Test lokálních lymfatických uzlin (Local Lymph Node Assay)
MTT	Vitální barvivo (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid)
Nrf2	Transkripční faktor
PBS	Fosfátový pufr
NK	Negativní kontrola (Dimethylsulfoxid)
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (Organisation for Economic Co-operation and Development)
PK	Pozitivní kontrola (Aldehyd kyseliny skořicové)
RK	Kontrola rozpouštědla (Dimethylsulfoxid)
3R	Replacement–nahrazování, Reduction–snižování, Refinement–zmírňování
REACH	Integrovaný systém pro registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals)
SA	Kyselina salicylová
SLP	Správná laboratorní praxe
SV40	Savčí promotor exprese ze simian viru 40

UN GHS | Globální harmonizovaný systém klasifikace a označování chemikálií
(United Nations Globally Harmonized System of Classification and
Labelling of Chemicals)

1 Úvod a cíle práce

Tato práce byla zaměřena na zavedení a využití Nrf2-ARE luciferázové zkoušky KeratinoSensTM pro klasifikaci senzibilizace. Metoda byla založena na adherentní lidské buněčné linii vyvinuté před 23 lety, proto nebylo nutné, aby v testu byla použita lidská nebo zvířecí tkáň (EURL ECVAM, 2015a). V rámci metody bylo využito 96-jamkových desek pro testování většího množství chemických látek.

K testování toxicity látek je dnes k dispozici velká škála *in vitro* testů. Důležité pro *in vitro* testy je, že je možné je provádět v malém měřítku, jsou relativně technicky a časově nenáročné a finančně dostupné. Často jsou používány pro větší studie celé řady chemikálií. K testování senzibilizace je v dnešní době též snaha o přechod k *in vitro* testům a upouštění od *in vivo* metod, pokud je to možné.

Testované chemické látky byly identifikovány jako potenciální kožní senzibilizátory, pokud indukce luciferázové aktivity vykazovala aktivaci ARE elementu. Buněčná linie s luciferázovou aktivitou vyzařovala určité stabilní pozadí způsobené základní aktivitou promotoru SV40 (EURL ECVAM, 2015). Identifikace potenciálu senzibilizace je u buněčných modelů stanovena parametrem EC_{1,5}, což je interpolovaná koncentrace 1,5 násobku indukce luciferázy (OECD, 2015).

Pro měření cytotoxicity se využívalo parametrů metabolické aktivity buněk. Například MTT (vitální barvivo 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid), které v buňce podléhá metabolické redukci, jejíž míra je indikátorem metabolického stavu buňky (Řeháčková, 2010). K posouzení cytotoxicity *in vitro* s použitím buněčných modelů je u testovaných látek stanoven toxikologický parametr IC₅₀, jedná se o inhibiční koncentraci potřebnou ke snížení životnosti buněk populace o 50% oproti kontrolní životnosti. Pro stanovení tohoto parametru musí být testy provedeny v širokém rozmezí koncentrací (OECD, 2015).

Testovací metoda ARE-Nrf2 luciferázová zkouška se používá k podpoře rozlišování mezi kožními senzibilizátory a nesenzibilizátory. Zkušební chemikálie se v testu považují za pozitivní, pokud vyvolávají statisticky významnou indukci luciferázové aktivity, v koncentracích které významně neovlivňují životaschopnost buněk (Emter *et al.*, 2010; Natsch *et al.*, 2011).

Cílem práce bylo otestovat pomocí Nrf2-ARE luciferázové zkoušky 3 modelové látky se známými účinky (kyselina salicylová, isopropanol, ethylen glykol dimethakrylát). Po získání technických zkušeností k testování touto metodou, otestovat 2 chemické látky s neznámými účinky na organismus (aldehyd aromatické struktury (28/16) a ester dikarboxylové kyseliny aromatické struktury (3/16)). Dále pak vyhodnotit jednotlivé testy dle kritérií OECD TG 442D, zda se jedná o látky ne/senzibilizující. A v neposlední řadě verifikovat a zavést tuto metodu do laboratorní praxe pro Výzkumný ústav organických syntéz a. s. Pardubice, laboratoř skupiny Genetická toxikologie/*In vitro* testy.

2 Literární přehled

2.1 Testování toxicity

Nové chemické látky a jejich směsi neustále přibývají a je potřeba každou z nich, která má být používána jakýmkoli způsobem, podrobit testování toxicity (Lapenna *et al.*, 2012). Vzhledem k náročnosti testování obrovského množství nových chemických látek byl v rámci EU zaveden systém REACH („Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals“ - Integrovaný systém pro registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek), jehož účelem je chránit lidské zdraví a životní prostředí a zároveň zachovat konkurenceschopnost průmyslu a umožnit volnou distribuci a transport chemických látek v rámci EU. Jeho cílem je do roku 2020 bezpečně vyrábět, dovážet a používat pouze chemické látky se známými vlastnostmi a identifikovanými zdravotními riziky v celém jejich existenčním cyklu způsobem, který nepoškozuje životní prostředí a zdraví člověka (REACH, 2005). Nařízení EU č. 1907/2006 vstoupilo v platnost 1. června 2007 (Davies, 2015). Proces testování toxicity chemikálií je v mnoha zemích řízen soustavou směrnic OECD („Organisation for Economic Co-operation and Development“ - Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj) (Buschmann, 2013).

2.2 *In vivo* testy

Tradičním přístupem pro hodnocení toxicity se rozumí klasické testování metodami *in vivo*. *In vivo* pochází z latiny a můžeme jej volně přeložit slovy „v živém“. Tyto testy probíhají na celých organismech. Při *in vivo* testování můžeme pozorovat přímou reakci testovaného organismu na aplikovanou cizorodou látku, zahrnující všechny toxikodynamické a toxikokinetické procesy (Bhanushali *et al.*, 2010). Právě toto je hlavním důvodem, proč jsou stále nejpoužívanější a proč většina poznatků o toxicitě chemických látek pochází právě z těchto testů (Zurlo *et al.*, 1994). Nevýhodou těchto testů je nutná extrapolace výsledků na cílový organismus, většinou člověka. Jedná se o důležitou podstatu, protože existují mezidruhové rozdíly ve vstřebávání látek, metabolismu a jejich následném vylučování (Page *et al.*, 2013). Je důležité tedy brát v úvahu, že modelový organismus může být méně či více citlivý k testované látce, než by mohl být lidský organismus. *In vivo* testy nejsou též příliš vhodné ke studiu mechanismů účinku toxických látek, neboť v sobě zahrnují příliš mnoho faktorů, které znesnadňují interpretaci výsledků. To je jedním z mnoha důvodů, proč se vědci snaží pomocí *in vitro* testů přibližovat situaci *in vivo*, ve kterých lze pracovat v kontrolovaných podmínkách s lidskými buněčnými liniemi, a tím se do jisté míry zbavit extrapolace získaných výsledků (Page *et al.*, 2013).

Každoročně je v EU použito 10,7 milionů zvířat k testování, ale „pouze“ 10% z nich je využito k testování toxicity a hodnocení rizik (Grindon & Bhogal, 2005). *In vivo* testy se i navzdory snahám o snižování počtu laboratorních zvířat používají v rámci systému REACH, neboť jsou prozatím v řadě případů nenahraditelné a jejich podoba je definována řadou norem mezinárodních institucí OECD, ISO („International

Organization for Standardization“ - Mezinárodní organizace pro standardizaci). V toxikologii a farmakologii se *in vivo* testy využívají při testování akutní a systémové toxicity, genotoxicity, reprodukční a vývojové toxicity, imunotoxicity, oční, dermální a orální toxicity. Zvířata při testech podstupují často bolestivé procedury a po ukončení testů bývají většinou usmrcena. Pokusy na zvířatech bývají širokou veřejností chápány jako nutné zlo, kterému se s ohledem na lidskou bezpečnost nelze vyhnout (Pincock, 2005). Je třeba mít ale na paměti, že pokroky ve vědě by měly přinést možnosti naplnit snahu o nahrazení testovacích organismů metodami *in vitro*, bez snížení současných bezpečnostních standardů.

Zacházení s pokusnými zvířaty v EU upravuje směrnice 2010/63/EU, v ČR zákon č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání v platném znění. V České republice lze provádět pokusy na zvířatech jen na základě získaného rozhodnutí k používání pokusných zvířat Ministerstvem zemědělství a o schválení projektu pokusů podle § 23 odst. 1 a 23a odst. 1 písm. a) zákona na ochranu zvířat od Ministerstva zdravotnictví. Každý pokus podléhá schválení odbornou komisí daného zařízení (laboratoře, která má pokus provést) a rezortní odbornou komisí Ministerstva zdravotnictví. Směrnice 2010/63/EU a Zákon č. 246/1992 Sb. kodifikují povinnosti použít alternativní metodu místo pokusu na zvířeti, vždy když je schválená a k dispozici (Česká národní rada, 1992; Evropský parlament a Rada Evropy, 2010).

2.3 *In vitro* testy

Náhradou *in vivo* metod alternativami bez nutnosti testování na zvířatech se zabývá několik organizací, např. OECD, ECVAM („European Centre for Validation of Alternative Methods“ - Evropské centrum pro validaci alternativních metod) a FRAME („Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments“ - Fond pro nahrazení zvířat v medicínských pokusech). Společným cílem těchto organizací je najít alternativy v testování toxicity chemických látek, které jsou v souladu s principy – 3R (Replacement – nahrazování, Reduction – snižování, Refinement – zmírňování). Princip 3R byl navržen v roce 1959 biologem Williamem Russellem a Rexem Burchem v knize Principy humánních experimentálních technik (Russell & Burch, 1959). Princip 3R popisuje strategii pro minimalizování použití zvířat ve výzkumu a při testování toxicity a jejich utrpení způsobené tímto použitím. Za alternativní metodu je považována jakákoli experimentální metoda, která nevyžaduje použití celého zvířete. Některé z těchto metod vedou jen k částečnému nahrazení zvířecích modelů, je nutné využít zvířata pro získání buněk, tkání nebo orgánů pro následující studie *in vitro*. Jiné metody plně nahrazují postupy *in vivo* a nevyžadují žádný biologický materiál získaný od zvířete (Bhanushali *et al.*, 2010).

V posledních letech prošel obor toxikologie vývojem, kdy začal pro výzkum využívat kromě celých organismů také jejich méně komplexní alternativy označované jako *in vitro*, které využívají buněčné, tkáňové či orgánové kultury s vhodnými vlastnostmi podobné vyšším organismům včetně člověka. *In vitro* metody využívající buněčné nebo tkáňové kultury se staly důležitým nástrojem k pochopení důsledků

expozice cizorodým látkám a pro hodnocení rizik. Došlo k rozvoji nové technologie *in vitro* metod, které jsou hodnotným nástrojem vědeckého výzkumu (Spielmann, 2013). Pojem *in vitro* můžeme volně přeložit jako „ve skle“. V *in vitro* testech se pracuje pouze s částmi organismů (buňky, tkáně, aj.). Právě tento přístup je považován za největší pozitivum v souvislosti s etickou stránkou testování chemických látek. Buňky pro *in vitro* testy jsou získány též zásahem do živého organismu, ale je zřejmé, že z hlediska etiky je mnohem humánnější pracovat v mnoha *in vitro* testech s buňkami získanými z jednoho jedince, než používat, či usmrcovat několik desítek živých organismů pro každé testování *in vivo* (Bhanushali *et al.*, 2010).

In vitro testy jsou též výhodné z hlediska časové a finanční náročnosti, ale též z hlediska snadnějšího a rychlejšího provedení. Buněčné i tkáňové kultury jsou v dnešní době poměrně snadno dostupné. V *in vitro* testech se pracuje většinou s poměrně malým množstvím buněk, jelikož působení chemických látek se dá pozorovat již v řádově na desítkách buněk (Pampaloni *et al.*, 2007). Řada vzorků v *in vitro* testech lze miniaturizovat a automatizovat. Na konkrétních buňkách se v *in vitro* testech lépe studují mechanismy účinku cizorodých látek než na celých organismech, ale bohužel zatím nezahrnují celý rozsah míst účinku a procesů, na které mohou toxikanty v organismu působit. Vyvíjejí se různé strategie *in vitro* testování, mezi něž patří např. strategie AOP (dráhy škodlivého účinku), integrované testování nebo bakteriální testování, které napomáhají predikci, jak se látka bude v organismu chovat. *In vitro* testy určují potenciál působení látky a právě na základě více *in vitro* testů, které sledují různé mechanismy, lze lépe popsat chování látky a možnou reakci organismu.

Existuje mnoho validovaných alternativních metod pro testování kožní a oční dráždivosti, ale též kožní senzibilizace, které mají poměrně jednoduché a dobře popsané mechanismy. Tyto testy jsou velmi dobře použitelné v praxi. Některé z těchto testů se objevily již v roce 2004, a to ještě před tím, než REACH vstoupil v platnost. Byla snaha o aktualizaci technických příloh, tak aby obsahovaly alternativní testy dráždivosti pokožky, očí a akutní toxicity. Evropská komise provedla konzultace o změnách požadavků týkajících se testování, přičemž *in vitro* testy senzibilizace vstoupily v platnost v roce 2016, jako alternativa či úplná náhrada *in vivo* testů. V případě senzibilizace kůže Evropská agentura pro chemické látky (ECHA) doporučuje zrušení *in vivo* testů pouze v případě, že lze pomocí *in vitro* metod generovat dostatek informací (Davies, 2015).

3 Metodika

3.1 Úvod

Kožní senzibilizátor označuje látku, která po kontaktu s pokožkou vyvolává alergickou reakci organismu, jak je definováno globálním harmonizovaným systémem klasifikace a označování chemikálií UN GHS (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (United Nations, 2013). Podle zkušební směrnice OECD se testovací metoda ARE-Nrf2-luciferáza používá k podpoře rozlišování mezi kožními senzibilizátory a nesenzibilizátory v souladu s UN GHS (United Nations, 2013).

Na základě vědeckých poznatků z poslední doby o chemických a biologických mechanismech spojených s kožní senzibilizací byla vytvořena koncepce dráhy škodlivého účinku AOP („Adverse Outcome Pathway“). Tato koncepce sleduje události vedoucí k nepříznivému zdravotnímu účinku, tj. alergické kontaktní dermatitidě lidí nebo kontaktní přecitlivělosti hlodavců (Adler *et al.*, 2011; OECD, 2012; EURL ECVAM, 2014).

Tento proces se skládá z několika fází molekulárních mechanismů. Nejprve se molekula chemické látky, která vyvolává alergickou reakci organismu, kovalentně váže na kožní proteiny, což představuje první fázi. Poté dochází k přepisu genů, které spouštějí zánětlivou reakci v buňce (druhá fáze). Po přepisu příslušných genů dochází k aktivaci dendritických buněk, tento proces je provázen vznikem chemokinů a cytokinů a představuje třetí fázi kožní senzibilizace. Nakonec dochází k proliferaci T-buněk imunitního systému (Itoh *et al.*, 1997; OECD, 2010; OECD, 2015).

Díky koncepci AOP byla navržena zkušební metoda, popsaná v této diplomové práci (ARE-Nrf2 luciferázová zkouška), která se zabývá druhou klíčovou mechanistickou událostí. Bylo zjištěno, že kožní senzibilizaci vyvolávají geny, které jsou regulovány tzv. antioxidačním responzivním elementem ARE (Emter *et al.*, 2010; Natsch, 2010; Suzuki *et al.*, 2013), což je místo na DNA, které je konkrétně řízeno transkripčním faktorem Nrf2. Malé elektrofilní substance, jako jsou kožní senzibilizátory, se mohou vázat na senzorový protein Keap1, např. kovalentní modifikací svého cysteinového zbytku, což vede k jeho disociaci z Nrf2 (Itoh *et al.*, 1999; Holland & Fishbein, 2010; Baird & Dinkova-Kistova, 2011). Faktor Nrf2 pak může aktivovat ARE dependentní geny kódující detoxikační enzymy druhé mechanistické fáze AOP (Dinkova-Kostova *et al.*, 2005; Natsch, 2010; Baird & Dinkova-Kistova, 2011; Kansanen, 2013).

Tato metoda, využívající buněčnou linii KeratinoSensTM (viz. kapitola 3.3), nemůže sama o sobě predikovat schopnost chemické látky alergizovat, musí být použita vždy ve spojení s dalšími alespoň dvěma metodami, které postihují první a třetí fázi kožní senzibilizace, dle nařízení Evropské komise (OECD, 2015).

3.2 Použité chemikálie, média, séra

Chemikálie	Výrobce, katalogické číslo
DMSO	Firma Penta Kat. č. 12640
Isopropanol	Firma Penta Kat. č. 17510
Luciferáza Steady-Glo/ ONE-Glo Ex	Firma Promega Kat. č. E2510/E8110
MTT	Firma Sigma Aldrich Kat. č. M5655 a Firma Alfa Aesar Kat. č. L11939
PBS + 0,05% EDTA	Připraveno v laboratoři
Trypsin	Firma Sigma Aldrich Kat. č. T4174
Médium	
DMEM s GlutaMAXem	Firma Gibco Kat. č. 21885
Sérum	
FBS	Firma Sigma Aldrich Kat. č. F9665

Testované látky	Zkratka/označení v testu	Výrobce, katalogické číslo
Isopropanol	ISO	Firma Penta Kat. č. 17510
Kyselina Salicylová	SA	Firma Sigma Aldrich Kat. č. 84210
Ethylen glykol dimethakrylát	EDGMA	Firma Sigma Aldrich Kat. č. 335681
Aldehyd aromatické struktury	28/16	
Ester dikarboxylové kyseliny aromatické struktury	3/16	
Kontroly kvality		
Dimethylsulfoxid	DMSO	RK, NK Firma Penta Kat. č. 12640
Aldehyd kyseliny skořicové	CA	PK Firma Sigma Aldrich Kat. č. 239968

V den testování byly připraveny zásobní roztoky zkušebních chemikálií rozpuštěných v DMSO a sériově se ředily za použití dalšího DMSO, čímž se získalo 12 hlavních koncentrací zkušebních látek v rozmezí 0,98 až 2000 μM .

Negativní (rozpuštědlovou) kontrolou použitou v testovací metodě KeratinoSensTM bylo DMSO, pro které se připravilo osmnáct jamek na desku. Negativní kontrola byla ředěna stejně, jak je popsáno pro hlavní koncentrace zkušebních chemikálií, tak aby konečná koncentrace negativní kontroly byla o koncentraci 1%, o níž se ví, že neovlivňuje životaschopnost buněk, a aby odpovídala stejným koncentracím DMSO u testovaných chemikálií a u pozitivní kontroly (EURL ECVAM, 2014; OECD, 2015).

Pozitivní kontrola použitá v této metodě byl aldehyd kyseliny skořicové, pro který se připravila série pěti hlavních koncentrací v rozmezí od 0,4 do 6,4 mM v DMSO (ze zásobního roztoku o koncentraci 6,4 mM) a ředila se stejným způsobem, jak je popsáno u zkušebních chemikálií tak, že konečná koncentrace pozitivní kontroly byla v rozmezí 4 až 64 μM .

Pro každou zkušební chemikálii i pozitivní kontrolu bylo pro zjištění předpovědi, zda je pozitivní či negativní, potřebné testovat model sestávající alespoň ze dvou nezávislých opakování obsahující tři repliky (tj. celkem 6 řádků s 12 koncentracemi na dvou 96-jamkových deskách). V případě nesouhlasných výsledků mezi dvěma nezávislými opakováními, bylo nutné udělat třetí opakování, které obsahovalo tři repliky (tj. celkem 9 řádků s 12 koncentracemi na třech 96-jamkových deskách). Každé nezávislé opakování se provádělo jiný den s čerstvými zásobními roztoky testovaných chemikálií a nezávisle odebranými buňkami. V rámci verifikace bylo ověřeno, že testy fungují stejně i při jiné pasáži buněk, ovšem pro budoucí testování bude dle směrnice OECD TG 442D nutné pracovat při nezávislých opakováních se stejnými pasážemi buněk.

3.3 Buněčná linie KeratinoSensTM

Pro tuto metodu byla použita buněčná linie KeratinoSensTM (Givaudan EURL ECVAM), což jsou imortalizované adherentní buňky odvozené od lidských keratinocytů HaCaT. Tyto buňky jsou transfekovány selektivním plazmidem, který obsahuje luciferázový gen pod transkripční kontrolou promotéru SV40 a ARE elementu z AKR1 C2 genu (Ryan *et al.*, 2004; Gildea *et al.*, 2006).

Po rozmražení buněk byly před použitím v testu provedeny minimálně 2 pasáže a byla ověřena nepřítomnost mykoplazmat. Test pro ověření nepřítomnosti mykoplazmat provádí smluvní nezávislá laboratoř Generi Biotech Hradec Králové.

3.3.1 Práce s buněčnou linií

Práce s buněčnou linií probíhala za sterilních podmínek v biohazardním boxu. Buňky se uchovávaly v kontejneru s tekutým dusíkem.

Pro rozmrazení buněk se kultivační médium nechalo vytemperovat na teplotu 37°C. Do kryozkumavky se zamraženými buňkami se přidalo malé množství vytemperovaného média. Buněčná suspenze se několikrát promíchala, tím došlo k postupnému rozmrazení. Poté se suspenze přenesla do centrifugační zkumavky, kde bylo připraveno další vytemperované médium. Buněčná suspenze se nechala centrifugovat při 125 G po dobu 5 minut. Poté se odsál supernatant a buňky se resuspendovaly v čerstvém médiu a přenesly se do kultivační nádoby. Kultivační nádoba se popsala názvem buněčné linie, datem rozmrazení a číslem pasáže.

Podobně se postupovalo u pasážování buněk, kdy se kultivační médium nechalo vytemperovat na teplotu 37°C. Před pasážováním se buňky zkontrolovaly pod mikroskopem, zda nejsou kontaminované a jsou v dobrém stavu. Buňky se pasážovaly vždy o konfluenci 80 – 90%, nikdy ne 100%. Nejdříve se z buněk odsálo staré médium, poté se buňky omyly 2x PBS s přídavkem 0,05% EDTA. K opláchnutým buňkám se přidal trypsin a buňky se nechaly inkubovat při 37°C, aby se oddělily ode dna kultivační nádoby. Po uplynutí doby pro oddělení buněk, zhruba 5-7 minut, se přidalo čerstvé kultivační médium, čímž došlo k inaktivaci trypsinu. Buňky se opakovaným pipetováním nahoru a dolů resuspendovaly (tzn. rozdělily od sebe, aby nebyly ve shlucích).

3.3.2 Charakteristika buněčné linie

K získání charakteristiky buněčné linie KeratinoSensTM byla provedena zkouška doby zdvojení buněk - doubling time (Graf. 1). Jedná se o čas, za který se počet buněk v populaci zdvojnásobí. Prakticky jde o průměr generační doby buněk a matematicky lze tento čas vyjádřit podílem doby kultivace k počtu generací. Dělení buněk probíhá za ideálních podmínek geometrickou řadou, někdy tomu tak však být nemusí, a to především z důvodů vyčerpání živin nebo inhibicí růstu způsobenou zplodinami jejich metabolismu. Klíčovou vlastností je rychlost růstu, čím větší je rychlost růstu, tím rychlejší je doba zdvojení buněk. V případě buněčné linie KeratinoSensTM bylo zjištěno, že tato doba zdvojení činí 29 hodin (přílohy Tab. 4). Jedná se o něco delší čas než u jiných buněk, např. TM3 buňky, jejichž doba zdvojení se uvádí na 18 až 22 hodin, nebo TM4 buňky, jejichž doba zdvojení činí 16 až 24 hodin (Albrechtová, 2013).

3.3.3 Doubling time

Kultivační médium se nechalo vytemperovat na teplotu 37°C. Před pasážováním se buňky zkontrolovaly pod mikroskopem, zda nejsou kontaminované a jsou v dobrém stavu. Nejdříve se z buněk odsálo staré médium, poté se buňky omyly 2x PBS s přídavkem 0,05% EDTA. K opláchnutým buňkám se přidal trypsin a buňky se nechaly inkubovat při 37°C, aby se oddělily ode dna kultivační nádoby. Po uplynutí doby pro oddělení buněk se přidalo čerstvé kultivační médium, čímž došlo k inaktivaci trypsinu. Buňky se opakovaným pipetováním nahoru a dolů resuspendovaly. Bylo nasazeno celkem 8 Petriho misek, čtyři s počáteční koncentrací 40 000 buněk a další čtyři misky s počáteční koncentrací 20 000 buněk. Následující dny se vždy buňky z 1 misky pro každou koncentraci pasážovaly a poté počítaly v Bürkerově komůrce.

3.4 Test s modelovými látkami

3.4.1 Příprava buněk (1. den)

Pro vyšetí buněk na desku bylo třeba, aby buňky v kultivační lahvi dosahovaly konfluency 80 – 90%. Buňky se spásázovaly a připravila se buněčná suspenze o koncentraci 8×10^4 buněk/ml v množství 13 ml pro jednu 96 jamkovou desku.

Z této připravené suspenze se pipetovalo 125 μ l/jamku do bílé 96 jamkové desky. Všechny koncentrace testované látky, včetně pozitivní a negativní kontroly, se pipetovaly v duplikátech na jednu desku nebo se připravily celkem tři desky. Na jednu desku byly použity 3 testované chemikálie ve 12 koncentracích. Zároveň bylo potřeba připravit vždy jednu průhlednou desku pro barvení MTT, pro kontrolu cytotoxicity testované látky.

Při nasazování buněk na desku bylo důležité zabránit sedimentaci buněk, proto se buněčná suspenze musela během pipetování míchat. Pokud se napipetovalo špatné množství buněk do jamek, docházelo k vysoké variabilitě ve výsledcích testu a byla to jedna z možných chyb v metodice.

Po vyšetí buněk se desky nechaly inkubovat po dobu 24 hodin v inkubátoru.

3.4.2 Expozice (2. den)

Před uplynutím inkubační doby se připravily zásobní roztoky modelových chemikálií, ředící deska 100 x DMSO a médium pro expozici (DMEM + 1% FBS). Množství tohoto média bylo třeba připravit dle počtu desek.

3.4.2.1 Příprava roztoků testovaných chemikálií a pozitivní kontroly

Všechny testované látky se ředily do finální koncentrace 200 mM v DMSO. Nejdříve se navážilo 20 – 40 mg testované látky a přidalo se vypočítané množství DMSO dle vzorce:

$$V = 5 \times \frac{\left(\frac{p}{100}\right) \times w}{MW} - \frac{w}{1000}$$

kde

V ... objem DMSO v ml, které se musí přidat

p ... čistota chemikálie v %

MW ... molekulární hmotnost testované látky (g/mol)

w ... přesná navážená hmotnost testované látky (mg)

Tab. 1: Navážky a ředění zásobních roztoků modelových látek

	Navážka (mg)		
	1. ex	2. ex	3. ex
SA	49,30	*	47,68
ISO	23,41	28,77	51,67
EDGMA	105,50	*	48,23
CA	50,76	*	49,32
Rozpouštědlo (ml)			
DMSO	1,72	*	1,66
DMSO	1,92	2,36	4,24
DMSO	2,50	*	1,14
DMSO	1,85	*	1,80

Ex. ... experiment

SA ... Kyselina Salicylová

ISO ... Isopropanol

EDGMA ... Ethylen glykol dimethakrylát

CA ... Aldehyd kyseliny skořicové

DMSO ... Dimethylsulfoxid

* použity roztoky z předchozího měření (po rozmražení)

Tab. 2: Navážky a ředění zásobních roztoků neznámých látek

	Navážka (mg)	
	1. ex	2. ex
3/16	23,61	*
28/16	22,65	*
Rozpouštědlo (ml)		
DMSO	5,16	*
DMSO	6,17	*

Ex. ... experiment

3/16 ... Ester dikarboxylové kyseliny aromatické struktury

28/16 ... Aldehyd aromatické struktury

DMSO ... Dimethylsulfoxid

* použity roztoky z předchozího měření (po rozmražení)

3.4.2.2 Příprava ředících desek

Z připravených zásobních roztoků testovaných chemikálií byla vytvořena ředící deska 100 x DMSO (Tab. 3). Na tuto desku byly použity 3 různé chemikálií v řádcích A

až F. Deska obsahovala kontrolní řádek G, H s negativní kontrolou, pozitivní kontrolou a blank.

Tab. 3: Schéma ředící desky 100 x DMSO

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
C	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK
H	NK	NK	NK	NK	NK	NK	PK	PK	PK	PK	PK	BL

A1 – F12 ... koncentrace testovaných látek (0,098 – 200 mM)

NK ... negativní kontrola (kontrola s rozpouštědlem)

PK ... pozitivní kontrola (0,4 – 6,4 mM)

BL ... blank, negativní kontrola bez buněk

U testovaných látek se postupovalo tak, že se napipetovalo 50 µl DMSO/ jamku do sloupce 1 až 11. Do sloupce 12 se napipetovala každá testovaná chemikálie po 100 µl/ jamku z připraveného zásobního roztoku 2000 mM. Poté se postupovalo tak, že se látka ředila: vzalo se 50 µl z jamky ve sloupci 12 a přeneslo se do jamky na stejném řádku ve sloupci 11, roztok v jamce se promíchal pipetou alespoň 3x a takto se postupovalo dále až do sloupce 1.

Do kontrolního řádku se pipetovalo 50 µl DMSO pouze do sloupců 1 až 10 a sloupce 12. Do jamky ve sloupci 11 se přidalo 100 µl zásobního roztoku pozitivní kontroly (6,4 mM). Poté se opět ředila pozitivní kontrola tak, že se z jamky 11 přeneslo 50 µl do jamky 10, stejným způsobem jako u chemikálií, až do sloupce 7.

Dalším krokem byla příprava 4 x zředěné desky DMSO. Z ředící desky 100 x DMSO se pipetovalo po 10 µl/ jamku do nové desky a poté se do každé jamky přidalo 240 µl média pro testování/ jamku.

Po přípravě 4 x zředěné DMSO desky a po uplynutí inkubační doby se odsálo kultivační médium z desky s buňkami a přidalo se 150 μ l vytemperovaného média pro expozici (DMEM + 1% FBS)/ jamku.

Ze 4 x zředěné DMSO desky se následně pipetovalo 50 μ l/ jamku do bílé desky pro luminiscenci a průhledné pro cytotoxicitu.

Takto připravené desky se překryly fólií, aby nedošlo ke kontaminaci, a nechaly se inkubovat po dobu 48 hodin \pm 30 minut v inkubátoru.

3.4.3 Měření luminiscence, barvení MTT (4. den)

Nejdříve bylo potřeba obarvit desku pro měření cytotoxicity. Před koncem expozice se připravil barvicí roztok MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) navážením barviva a rozpuštěním v PBS (Tab. 4)

Tab. 4: Navážky a ředění barvicího roztoku

	Navážka (mg)				
	1. ex	2. ex	3. ex	4. ex	5. ex
MTT	15,00	50,90	50,26	7,60	53,09
	Rozpouštědlo (ml)				
PBS	3,00	10,20	10,30	1,52	10,62

Ex. ...experiment

MTT ... ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid)

PBS ... Fosfátový pufr

Po uplynutí expoziční doby se odsálo médium s látkou z každé jamky a napipetovalo se čerstvé médium pro expozici 200 μ l/ jamku. Do tohoto média se napipetovalo 27 μ l barvicího roztoku MTT / jamku, deska se překryla fólií a nechala se v inkubátoru barvit 4 hodiny.

Z desky pro luminiscenci se odsálo médium a opatrně se přidalo 50 μ l čerstvého média pro expozici a poté 50 μ l luciferázového substrátu / jamku. Deska se nechala třepat 5-10 minut na třepačce, 500 rpm při laboratorní teplotě. Po promíchání se změřila luminiscence na luminometru Biotek Synergy HTX.

Po uplynutí 4 hodin barvení MTT se odsálo barvicí médium ze všech jamek a do každé jamky na desce se přidalo 200 μ l isopropanolu/ jamku. Deska se opět překryla fólií a nechala se třepat po dobu 15-30 minut na třepačce, poté se změřila absorbance při 580 nm na spektrofotometru Biotek epoch.

Vitální barvivo MTT je za normálních podmínek žluté barvy. Díky mitochondriálním enzymům dýchacího řetězce, umístěným na membránách buněk, redukuje živé buňky MTT na fialový formazanový derivát, který zůstává uvnitř buněk ve formě nerozpustných granulí. Po přidání silného detergentu (např. isopropanolu) se nerozpustný formazan z buněk uvolní a rozpustí, takže vznikne čirý roztok vhodný

k fotometrickému stanovení. Hodnota absorpance určuje množství živých buněk (Laboratoř experimentální medicíny, 2011).

3.4.4 Měření absorpance (5. den)

Někdy bylo nutné desku uskladnit v ledničce, přikrytou fólií a alobalem přes noc, případně i víkend. Druhý den/ po víkendu se deska nechala třepat 10 minut na třepačce a poté se změřila absorpance.

3.5 Test s neznámými chemikáliemi

Test s neznámými chemikáliemi byl proveden stejně jako s modelovými látkami včetně přípravy zásobních roztoků, ředění desek a dalších kroků popsanych v kapitole 3.4 Test s modelovými látkami.

3.5.1 Zavedení testovací metody

Před rutinním používáním metody bylo potřeba prokázat technickou způsobilost k provedení metody získáním správně očekávané reakce KeratinoSensTM na testované standardní látky (Tab. 5). Jednalo se o látky známé, které mají dobře definované senzibilizující/ nesenzibilizující vlastnosti, a na základě toho byly vybrány jako modelové, pro zavedení metody. Také byly dále sledovány hodnoty EC1,5 a IC50, které spadají do příslušného referenčního rozsahu těchto chemických látek. Na základě doporučení OECD TG 442D byly vybrány látky k prokázání technické způsobilosti tak, aby reprezentovaly rozsah odpovědí zkušebního systému (buněčné linie KeratinoSensTM). Dalšími kritérii při výběru dle směrnice OECD pro modelové látky byla komerční dostupnost, vysoce kvalitní *in vivo* reference a dostupnost *in vitro* údajů z testovací metody KeratinoSensTM (OECD, 2015).

Tab. 5: Vybrané chemikálie pro demonstraci technické způsobilosti k testovací metodě za použití linie KeratinoSensTM.

Chemikálie	Fyzikální forma	<i>In vivo</i> predikce (1)	KeratinoSens TM predikce (2)	EC1,5 (μM) referenční rozsah (3)	IC50 (μM) referenční rozsah (3)
ISO	tekutý	negativní	negativní	> 1000	> 1000
SA	pevný	negativní	negativní	> 1000	> 1000
EDGMA	tekutý	Slabě pozitivní	pozitivní	5 - 125	> 500
PK	pevný	pozitivní	pozitivní	25 – 175	> 1000

(1) Předpověď potenciálu senzibilizace a účinnosti *in vivo* založeny na datech LLNA („Local Lymph Node Assay“) (Natsch *et al.*, 2013). Účinnost *in vivo* odvozená pomocí kritérií, které navrhla skupina ECETOC („European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals“) (ECETOC, 2003).

(2) Prognóza KeratinoSensTM v porovnání s IATA („Integrated Approach to Testing and Assessment“)

(3) Na základě historicky pozorovaných hodnot (Natsch *et al.*, 2011)

4 Analýza dat a interpretace výsledků

K vyhodnocení dat bylo doporučeno směrnicí OECD TG 442D sestavit graf indukce luminiscence versus koncentrace, který má znázorňovat jasný vztah dávka-odpověď. (OECD, 2015)

Nejprve však bylo třeba z naměřených hodnot spočítat indukci luciferázové aktivity (I) a z triplikátů potom maximální průměrnou indukci luciferázové aktivity (I_{max}) každé testované koncentrace, dle vzorce:

$$I = \frac{(L_{\text{sample}} - L_{\text{blank}})}{(L_{\text{solvent}} - L_{\text{blank}})}$$

kde

L_{sample} ... naměřená luminiscence u testované chemikálie

L_{blank} ... naměřená luminiscence u blanku

L_{solvent} ... průměrná luminiscence negativní kontroly

Nejnižší z těchto koncentrací, která měla luciferázovou indukci > 1,5, byla hodnota, která určovala EC_{1,5}, počítaná na základě lineární interpolace, tedy jako geometrický průměr individuálních opakování dle vzorce:

$$EC_{1,5} = (C_b - C_a) * \frac{(1,5 - I_a)}{(I_b - I_a)} + C_a$$

kde

C_a ... nejnižší koncentrace (μM) s indukcí luciferázy > 1,5

C_b ... nejvyšší koncentrace (μM) s indukcí luciferázy < 1,5

I_a ... indukce v nejnižší koncentraci s indukcí luciferázy > 1,5 (průměr triplikátů)

I_b ... indukce v nejvyšší koncentraci s indukcí luciferázy < 1,5 (průměr triplikátů)

Dále bylo třeba z výsledků naměřené absorbance spočítat životaschopnost (V) buněk u jednotlivých koncentrací dle vzorce:

$$V = \frac{(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})}{(A_{\text{solvent}} - A_{\text{blank}})}$$

kde

A_{sample} ... naměřená absorbance u jednotlivých koncentrací testované látky

A_{blank} ... naměřená absorbance u blanku (jamka bez buněk, pouze s médiem)

A_{solvent} ... průměrná naměřená absorbance negativní kontroly

Bylo nutné zkontrolovat, zda byla tato hodnota koncentrace pod IC30, tedy jestli tato koncentrace nezpůsobila 30 % redukce životaschopnosti dle vzorce:

$$IC30 = (Cb - Ca) * \frac{[(100-x)-Va]}{(Vb-Va)} + Ca$$

kde

Ca ...nejnižší koncentrace (μM) s > 30 % redukce viability

Cb ... nejvyšší koncentrace (μM) s < 30 % redukce viability

x ... % redukce viability v počítané koncentraci

Va ... % viability v nejnižší počítané koncentraci

Vb ... % viability v nejvyšší sledované koncentraci

Zkušební chemikálie se v testu považují za pozitivní, pokud vyvolávají statisticky významnou indukci luciferázové aktivity nad danou prahovou hodnotu (tj. $>1,5$ násobek nebo 50% zvýšení) pod definovanou koncentrací, která významně neovlivňuje životaschopnost buněk (tj. pod 1000 μM) a při koncentraci, při které je buněčná životaschopnost vyšší než 70 % (Emter *et al.*, 2010; Natsch *et al.*, 2011). Pro tento účel byla stanovena indukce luciferázové aktivity nad rozpouštědlovou (negativní) kontrolou (Imax). Navíc byly buňky vystaveny sérii koncentrací testovaných chemikálií a nejnižší koncentrace potřebná ke statisticky signifikantní významnosti indukce luciferázové aktivity určující EC1,5 by měla být interpolována z křivky dávka-odpověď. Tato hodnota by měla být nižší než hodnota IC30, což naznačuje, že životaschopných buněk je méně než 70 % pro danou koncentraci. Nakonec bylo provedeno paralelní měření cytotoxicity k vyhodnocení, zda se na hladině vykazující indukci luciferázové aktivity, tj. 1,5, nestává chemická látka při daných koncentracích toxickou pro buňky (OECD, 2015).

4.1 Platnost experimentu

Experiment je metoda s cílem ověřit (verifikovat), vyvrátit (falzifikovat) a nebo stanovit platnost hypotézy, která umožňuje objev kauzálních souvislostí (Nolen-Hoeksema *et al.*, 2009). Pro platnost experimentu v rámci SLP (správné laboratorní praxe), ve které je tato metoda zaváděna, je nutné mít splněny podmínky, které postihují správnou odezvu testovaného buněčného systému. Pokud nejsou podmínky splněny, experimenty se musí zopakovat.

Variabilita v rámci třech nezávislých pokusů

Výsledky testu jsou akceptovatelné, pokud je relativní směrodatná odchylka životaschopnosti buněk z průměrů triplikátů během třech nezávislých experimentů < 20 %. Tato odchylka se vypočítá dle vzorce:

$$RSD = SD/M \times 100 (\%)$$

kde

RSD ... relativní směrodatná odchylka (%)

SD ... směrodatná odchylka

M ... průměr souběžných opakování v rámci jednoho experimentu

Experiment je dále akceptovatelný, pokud splňuje také tyto podmínky:

- Genová indukce pozitivní kontroly musí být statisticky významná nad hranici 1,5 alespoň u jedné použité koncentrace (4-64 μM)
- Hodnota $\text{EC}_{1,5}$ pozitivní kontroly v koncentraci 64 μM leží v intervalu 2 – 8 μM
- Průměrná variabilita mezi všemi naměřenými hodnotami negativní kontroly (tzn. hexaplikát v rámci třech nezávislých experimentů – tedy celkem 6x3 jamek) by měla být do 20 %. Tato variabilita se vypočítá jako relativní směrodatná odchylka.

Pokud výsledná měření nesplňují některou z podmínek, experiment musí být zopakován (OECD, 2015).

4.2 Predikční model

Dle OECD TG 442D je výsledek KeratinoSensTM testu považován za pozitivní, pokud splňuje tyto podmínky:

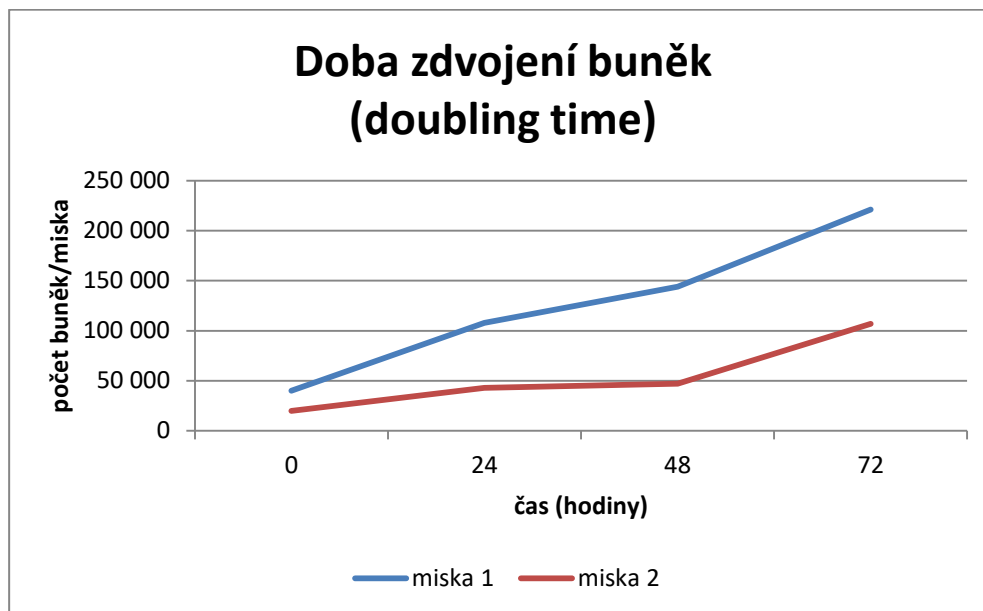
- I_{max} je vyšší než 1,5 a zároveň statisticky významný oproti negativní kontrole, na základě výsledku ze statistického nepárového Studentova t-testu.
- Buněčná viabilita je vyšší než 70 % u nejnižší koncentrace testované látky, která má indukci více než 1,5
- Hodnota $\text{EC}_{1,5}$ je nižší než 1000 μM (nebo než 200 $\mu\text{g/ml}$ v případě chemikálií s nedefinovanou molekulovou hmotností)
- Lze popsat jasný vztah dávka-odpověď pro indukci luciferázy a testované látky (nebo alespoň dvoufázovou odpověď)

Výsledek KeratinoSensTM testu je považován za negativní, pokud výše uvedené podmínky nejsou splněny (OECD, 2015).

5 Výsledky

5.1 Charakteristika buněčné linie

Pro získání charakteristiky buněčné linie KeratinoSens™ byl použit test zdvojení buněk (doubling time) kapitola 3.3.3, výchozí koncentrace buněk byly 40 000 a 20 000 buněk/ misku.



Graf. 1: Doba zdvojení buněk na misce s počáteční koncentrací 20 000 buněk (červená křivka) a 40 000 buněk (modrá křivka)

Z naměřených hodnot byl vypočten průměr na obou miskách pro každý den, dále byla vypočtena hodnota x , pro kterou platí, že se rovná podílu celkovému počtu buněk ku počtu buněk na začátku. Poté následoval krok k vypočtení růstu buněk a nakonec doba zdvojení buněk vypočtená pomocí podílu lineárního logaritmu a růstu buněk.

Tab. 6: Výpočet doby zdvojení buněk linie KeratinoSens™

Čas (hodiny)	Průměrná koncentrace (buněk/ miska)	$x = \text{počet buněk} / \text{počet buněk na začátku}$	$R = \ln(x) / \text{čas}$	$\ln(2) / R$
0	30 000	-	-	-
24	75 500	2,516	-	-
48	95 500	3,183	0,024	28,881
72	164 000	5,467	0,024	28,881

5.2 Verifikace metody

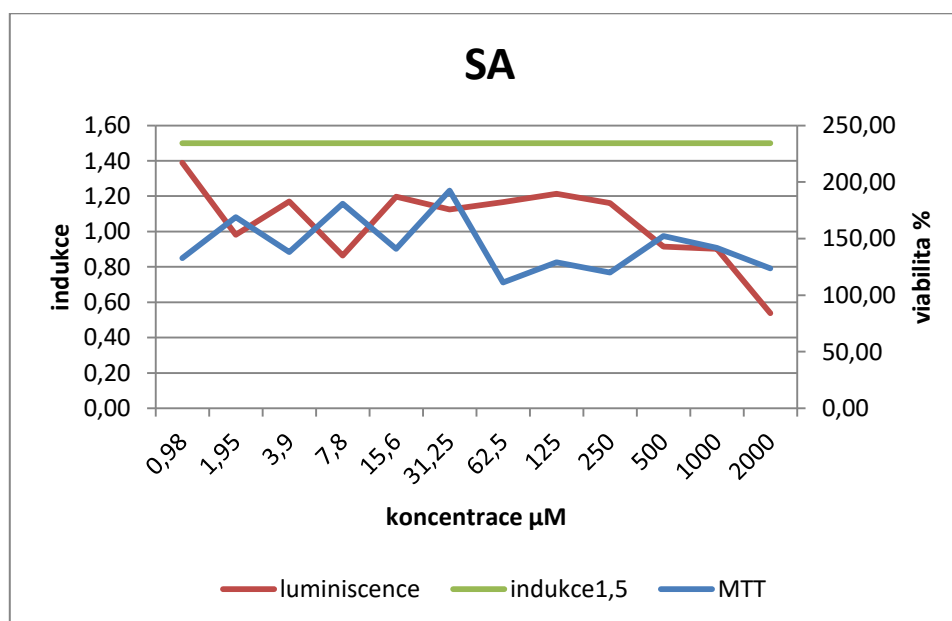
5.2.1 Test s modelovými látkami

Experiment 1

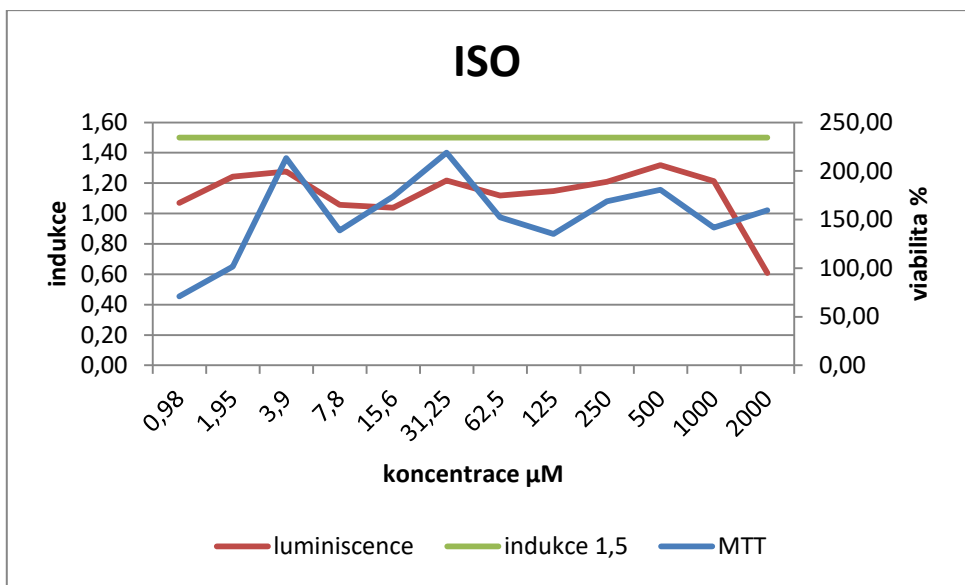
Byly provedeny testy u jednotlivých modelových látek (kyselina salicylová, isopropanol, ethylen glykol dimethakrylát) k prokázání technické způsobilosti k provádění metody KeratinoSens™. Jako pozitivní kontrola byl použit aldehyd kyseliny skořicové, negativní kontrolou bylo DMSO, ve kterém byly modelové chemické látky rozpuštěny. Modelové chemikálie byly testovány v koncentracích 0,98-2000 μM . Pozitivní kontrola byla testována v rozmezí koncentrací 4-64 μM . Dále byla vypočtena hodnota IC_{50} a $\text{EC}_{1,5}$ podle vzorců v kapitole 4. Analýza dat a interpretace výsledků je uvedena v tab. 7. Podmínka pro akceptovatelnost experimentu byla splněna, genová indukce pozitivní kontroly byla statisticky významná nad hranici 1,5 u všech použitých koncentrací 4-64 μM (Graf. 5).

Tab. 7: Shrnutí výsledků experimentu 1

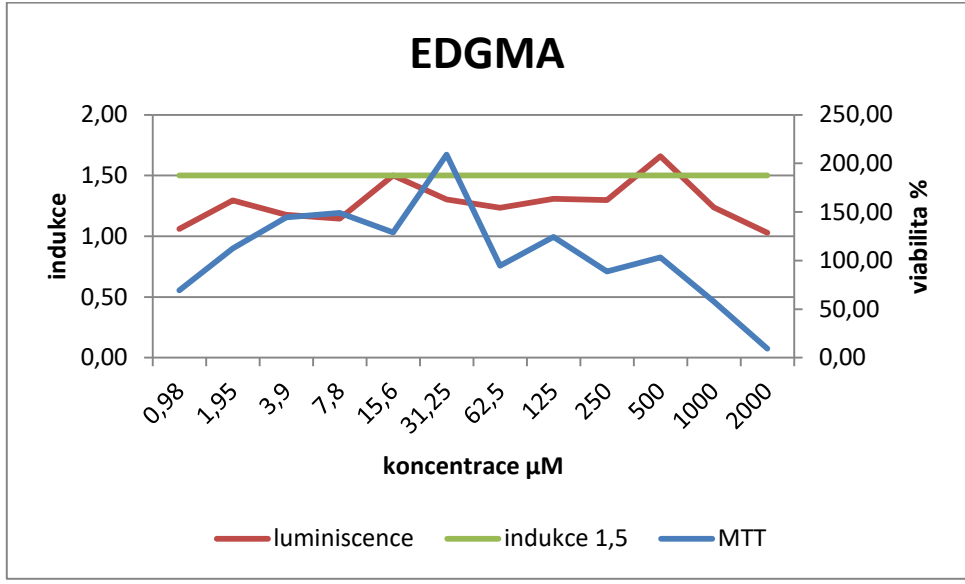
	IC_{50} (μM)	$\text{EC}_{1,5}$ (μM)	Predikce
SA	>2000	>2000	Negativní
ISO	>2000	>2000	Negativní
EDGMA	>1000	15,60	Slabě pozitivní
PK	>1000	3,07	Pozitivní



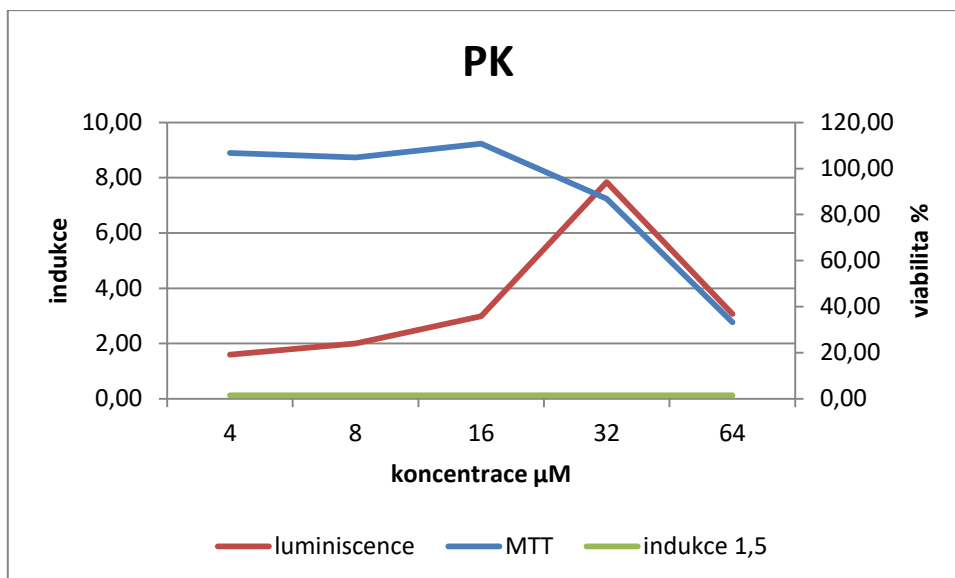
Graf 2: Kyselina salicylová



Graf 3: Isopropanol



Graf 4: Ethylen glykol dimethakrylát



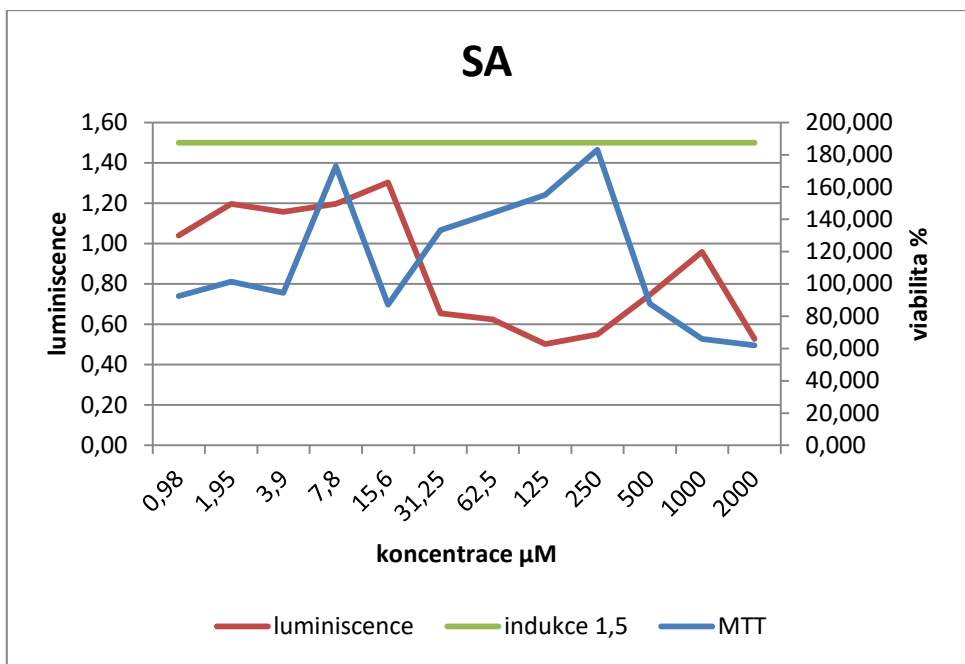
Graf 5: Pozitivní kontrola

Experiment 2

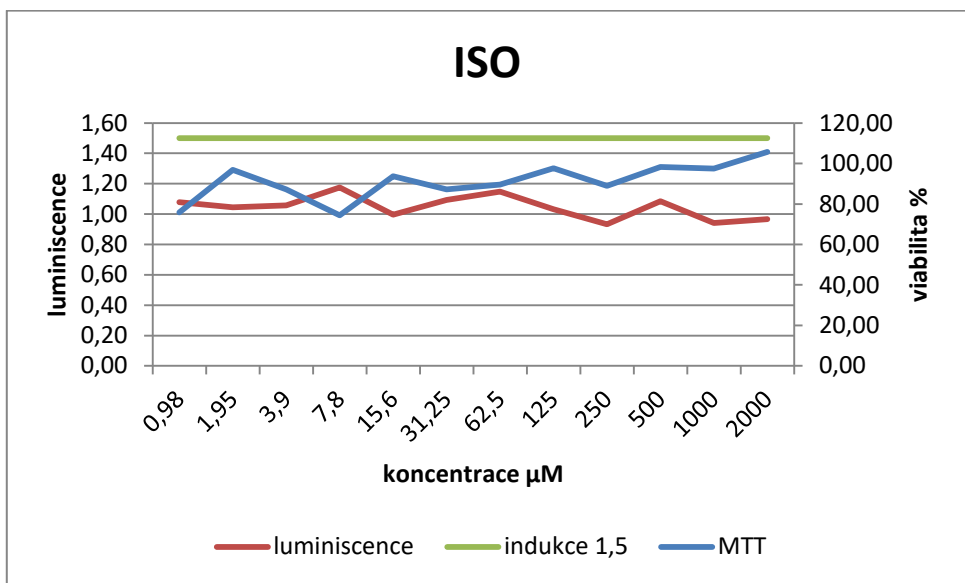
Byly provedeny testy se stejnými modelovými látkami. Pozitivní kontrolou byl stejně jako v předchozím experimentu aldehyd kyseliny skořicové. Modelové chemikálie byly testovány v koncentracích 0,98-2000 μM . Pozitivní kontrola byla testována v rozmezí koncentrací 4-64 μM . Dále byla vypočtena hodnota IC_{50} a $\text{EC}_{1,5}$ podle vzorců v části 4. Analýza dat a interpretace výsledků je uvedena v Tab. 8. Experiment v tomto případě není akceptovatelný, jelikož nebyla splněna jedna z podmínek. Hodnota $\text{EC}_{1,5}$ pozitivní kontroly v koncentraci 64 μM nebyla v intervalu 2-8 μM (Graf. 9).

Tab. 8: Shrnutí výsledků experimentu 2

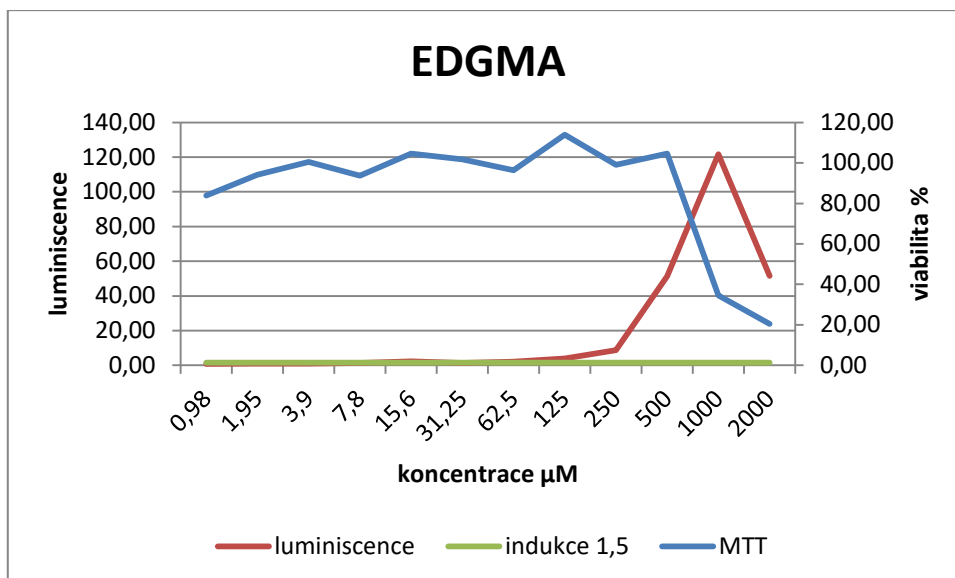
	IC_{50} (μM)	$\text{EC}_{1,5}$ (μM)	Predikce
SA	>2000	>2000	Negativní
ISO	>2000	>200	Negativní
EDGMA	>500	11,70	Slabě pozitivní
PK	>1000	10,65	Pozitivní



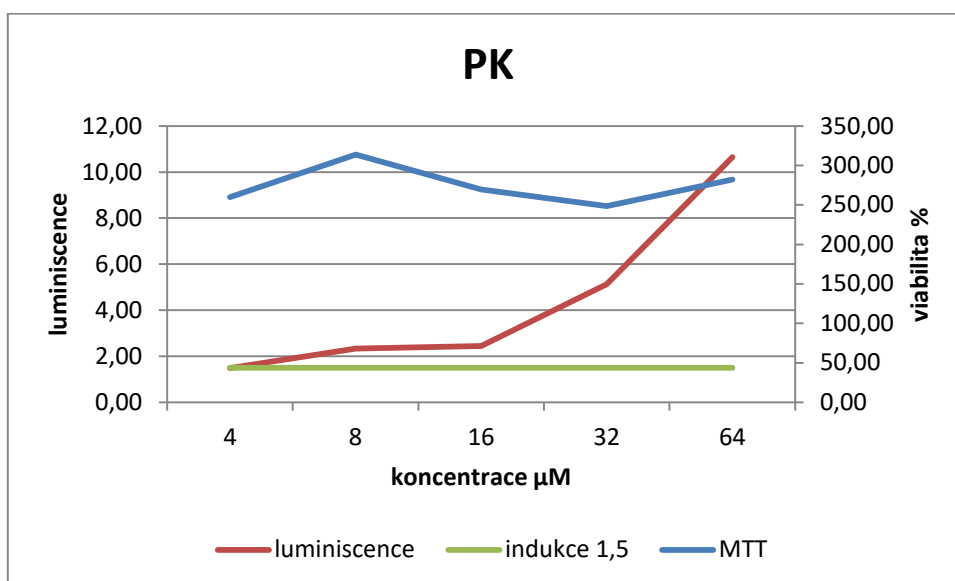
Graf 6: Kyselina salicylová



Graf. 7: Isopropanol



Graf. 8: Etylen glykol dimethakrylát



Graf. 9: Pozitivní kontrola

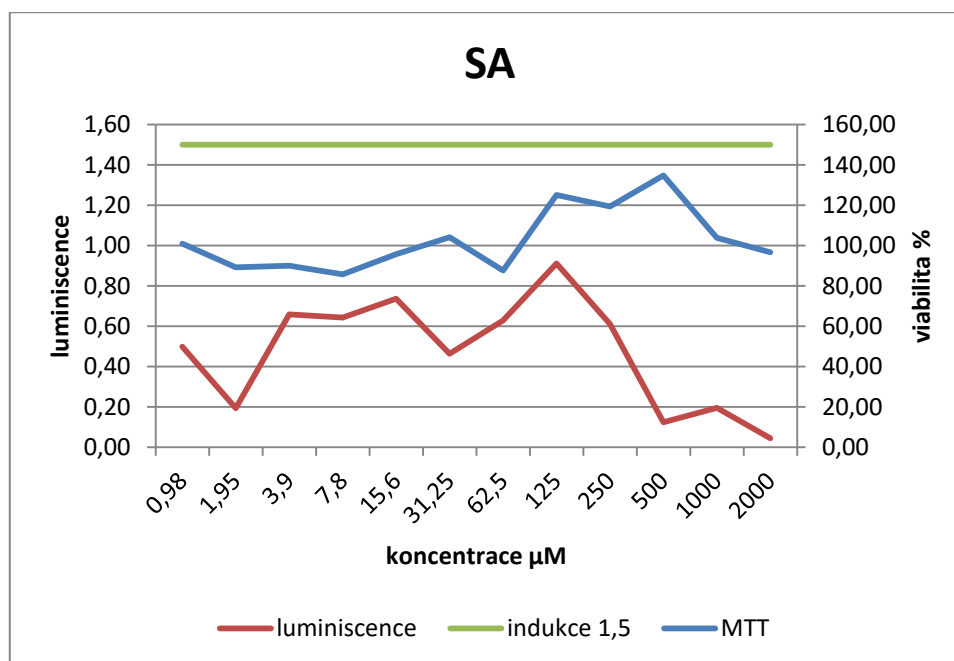
Experiment 3

Stejně jako v předchozích 2 experimentech byly testovány stejné modelové chemické látky. Test byl zopakován, k získání výsledků ze tří nezávislých experimentů, a ověření platnosti, zda je či není chemikálie EDGMA senzibilizující/ nesenzibilizující, jelikož akceptovatelnost druhého experimentu nebyla potvrzena. Negativní kontrolou bylo DMSO, ve kterém byly látky rozpuštěny. Modelové chemikálie byly stejně jako u předchozích experimentů testovány v rozmezí koncentrací 0,98-2000 μM ., rovněž pozitivní kontrola jako u předchozích experimentů v rozmezí koncentrací 4-64 μM . Dále byla vypočtena hodnota IC_{50} a $\text{EC}_{1,5}$ podle vzorců v kapitole 4. Analýza dat a

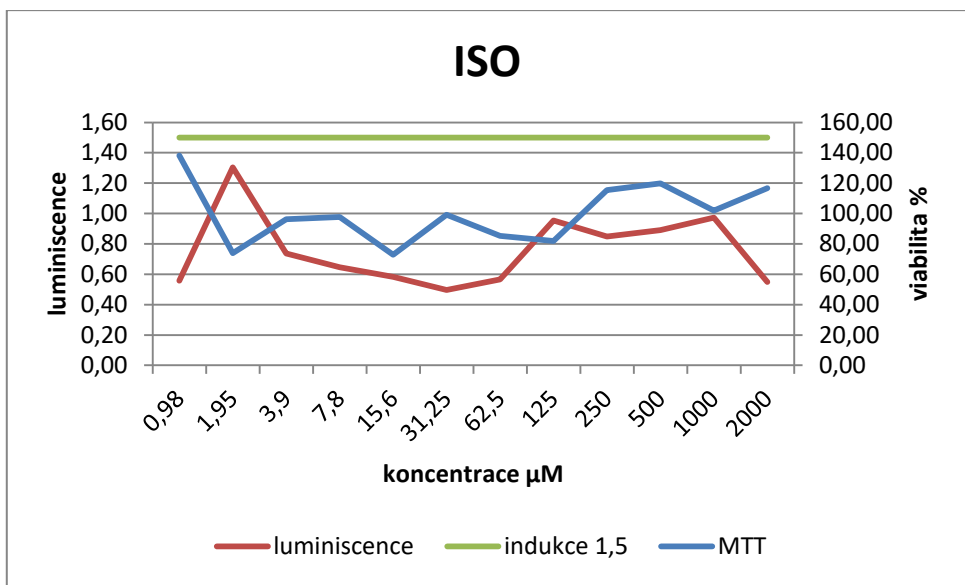
interpretace výsledků je uvedena v Tab. 9. Experiment je akceptovatelný, byla splněna podmínka pro průměrnou variabilitu mezi všemi naměřenými hodnotami negativní kontroly (relativní směrodatná odchylka hexaplikátu v rámci třech nezávislých experimentů byla do 20 %).

Tab. 9: Shrnutí výsledků experimentu 3

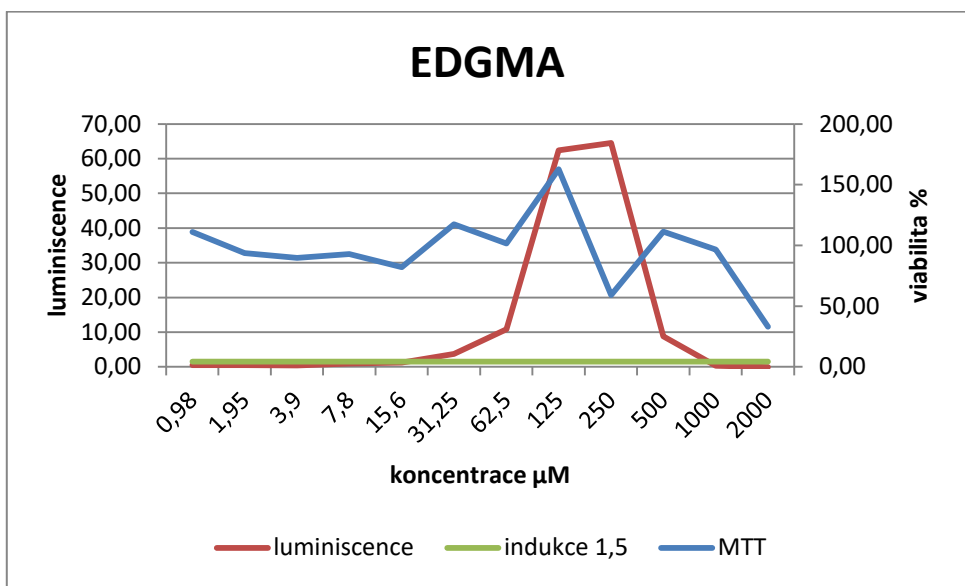
	IC50 (μM)	EC1,5 (μM)	Predikce
SA	>2000	>2000	Negativní
ISO	>2000	>2000	Negativní
EDGMA	>1000	23,43	Slabě pozitivní
PK	>1000	6,27	Pozitivní



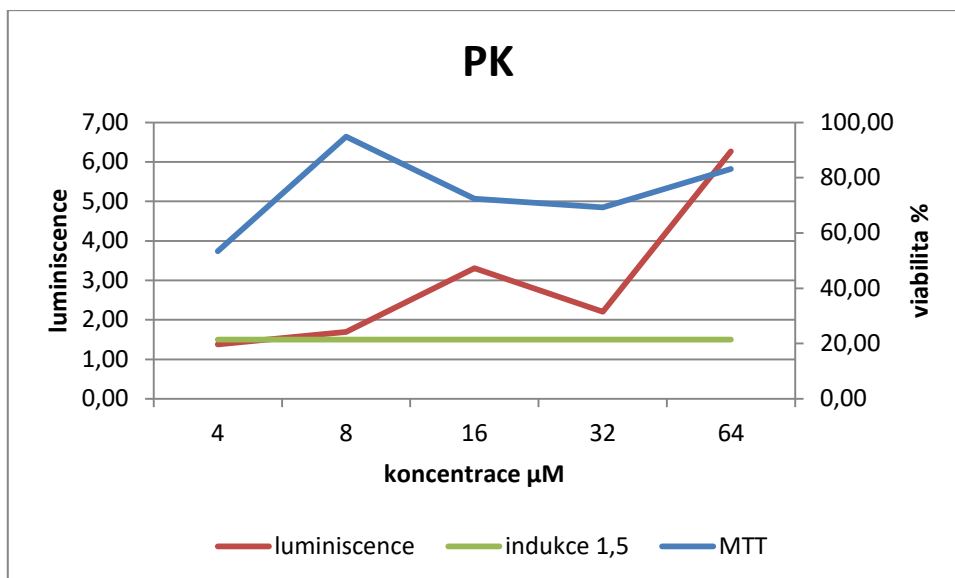
Graf 10: Kyselina salicylová



Graf 11: Isopropanol



Graf 12: Etylen glykol dimethakrylát



Graf 13: Pozitivní kontrola

5.2.1.1 Vyhodnocení experimentů se známými látkami

Při vyhodnocení se posuzují dva nezávislé experimenty. Pokud jsou obě opakování pozitivní, výsledek je pozitivní. Pokud jsou obě opakování negativní, výsledek je negativní. V případě, že se první dvě opakování neshodují, provede se třetí nezávislý experiment, na jehož základě se přistupuje k celkovému vyhodnocení. Test s modelovými chemikáliemi: kyselina salicylová, isopropanol a ethylen glykol dimethakrylát lze považovat za platný, na základě tří nezávislých experimentů (Tab. 10).

Tab. 10: Splnění podmínek platnosti experimentu – souhrn všech experimentů

	Podmínky platnosti			Ne/splnění podmínek platnosti		
	1	2	3	1	2	3
1. experiment	4-64 μM	3,07 μM	19,92 %	+	+	+
2. experiment	16-64 μM	10,65 μM	13,87 %	+	-	+
3. experiment	8-64 μM	6,27 μM	12,65 %	+	+	+

+ Splňuje podmínky, - Nesplňuje podmínky

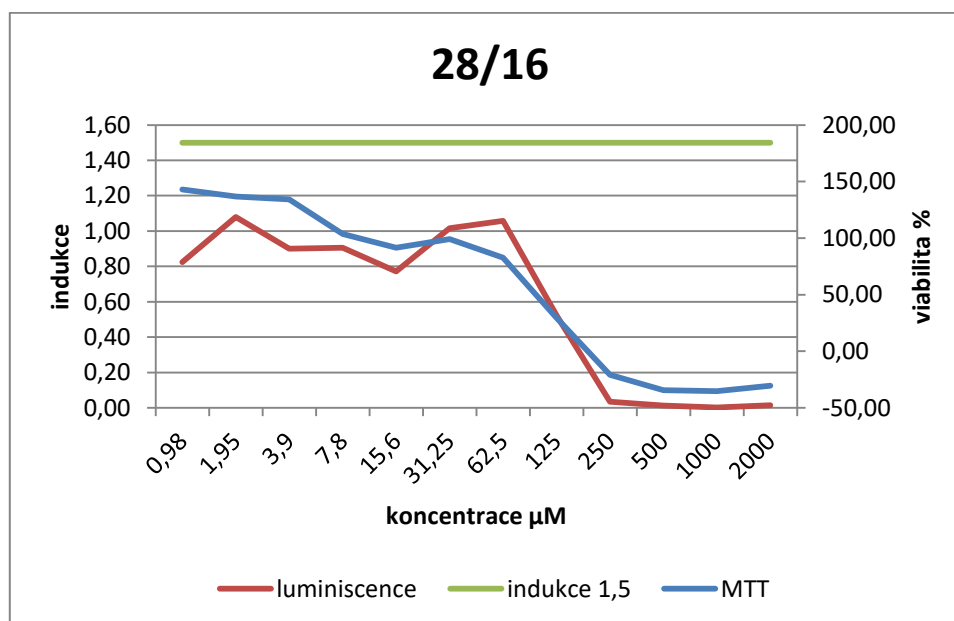
5.2.2 Test s neznámými látkami

Experiment 1

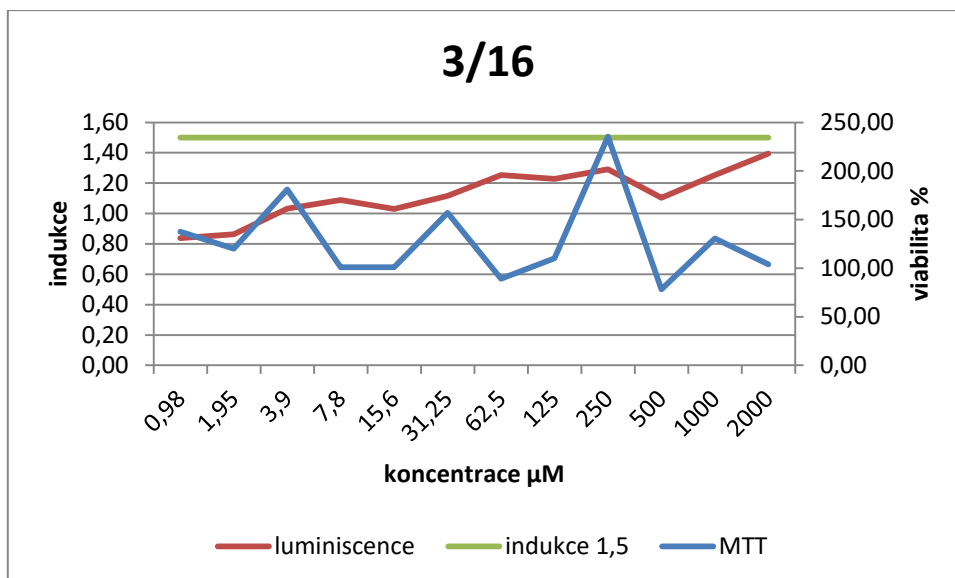
Na základě předchozích získaných zkušeností s touto metodou byly testovány neznámé vzorky pod označením 28/16 a 3/16. Vzorky musely být uvedeny pod čísly, jelikož se jednalo o testované vzorky podléhající obchodnímu tajemství. V případě neznámého vzorku pod označením 28/16 šlo o aldehyd aromatické struktury. Neznámý vzorek 3/16 byl ester dikarboxylové kyseliny aromatické struktury. Neznámé vzorky byly testovány ve stejných koncentracích jako modelové chemikálie, a to v rozmezí koncentrací 0,98-2000 μM ., stejně tak pozitivní kontrola v rozmezí koncentrací 4-64 μM . Byla vypočtena hodnota IC_{50} a $\text{EC}_{1,5}$ (Tab. 11). Indukce luciferázové aktivity ani u jednoho z neznámých vzorků nedosahovala hranice 1,5 (Graf. 14,15).

Tab. 11: Shrnutí výsledků experimentu 1 s neznámými látkami

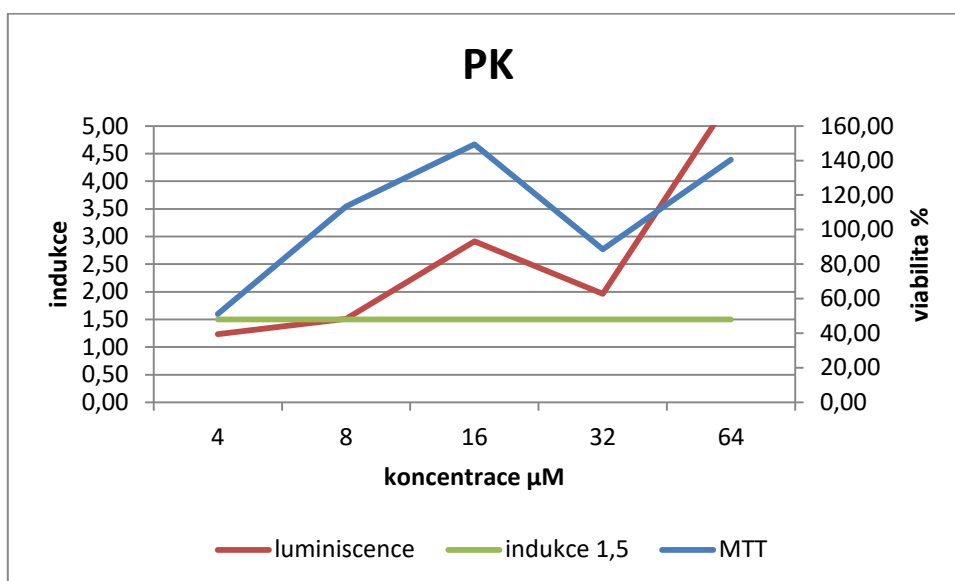
	IC_{50} (μM)	$\text{EC}_{1,5}$ (μM)	Predikce
28/16	155	>2000	Negativní
3/16	>2000	>2000	Negativní
PK	>1000	7,80	Pozitivní



Graf 14: Neznámý vzorek 28/16



Graf 15: Neznámý vzorek 3/16



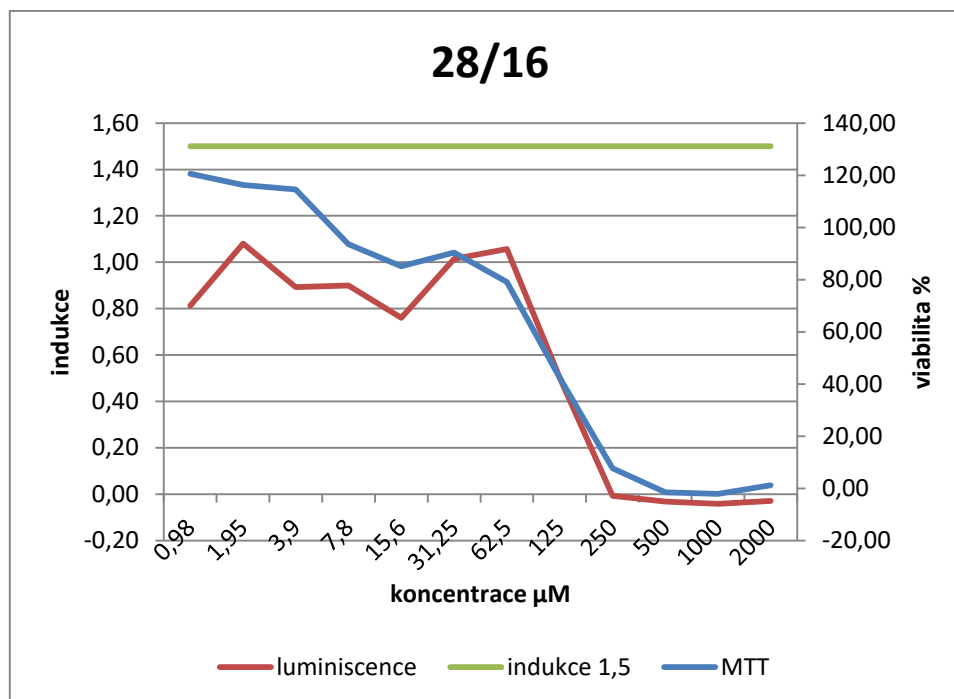
Graf 16: Pozitivní kontrola

Experiment 2

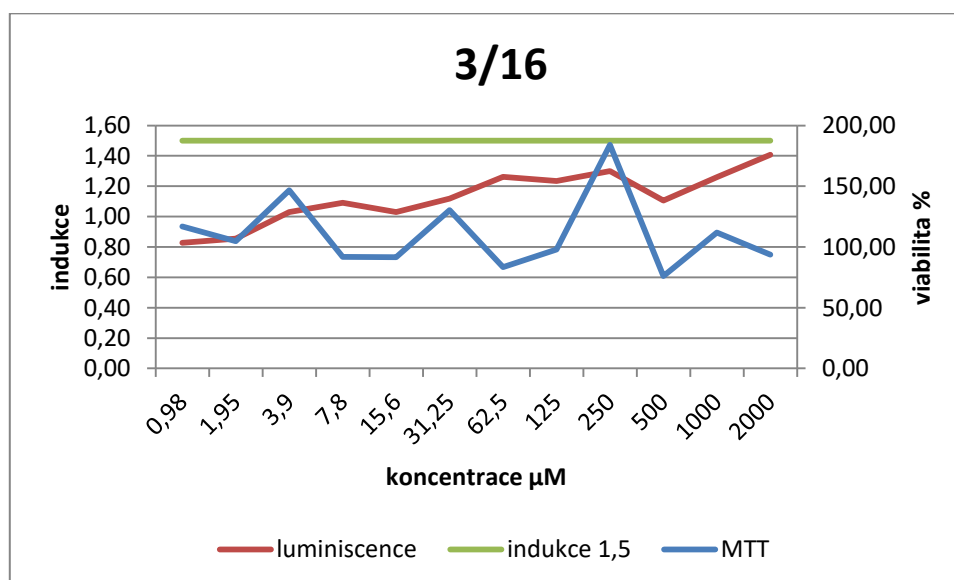
Provedením tohoto experimentu s neznámými vzorky byly ověřeny hodnoty druhým nezávislým opakováním. Neznámé vzorky byly testovány v rozmezí koncentrací 0,98-2000 μM ., pozitivní kontrola v koncentracích 4-64 μM ., stejně jako u předchozího experimentu. Byla vypočtena hodnota IC_{50} a $\text{EC}_{1,5}$ (Tab. 12). Indukce luciferázové aktivity ani u jednoho z neznámých vzorků opět nedosahovala hranice 1,5 (Graf. 17,18). Relativní odchylka negativní kontroly do 20 % byla dle požadavků na akceptovatelnost experimentu splněna.

Tab. 12: Shrnutí výsledků experimentu 2 s neznámými látkami

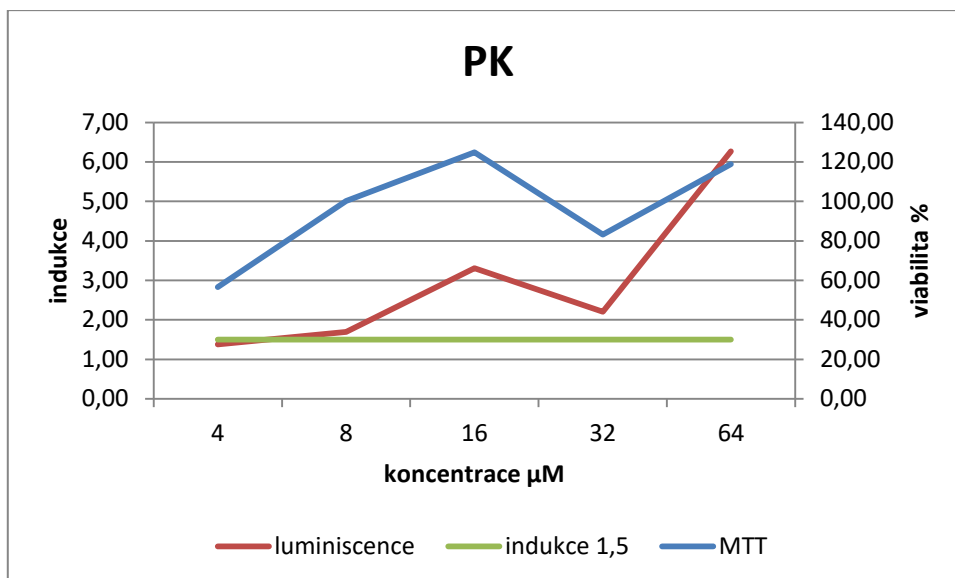
	IC50 (μM)	EC1,5 (μM)	Predikce
28/16	83	>2000	Negativní
3/16	>2000	>2000	Negativní
PK	>1000	6,27	Pozitivní



Graf 17: Neznámý vzorek 28/16



Graf 18: Neznámý vzorek 3/16



Graf 19: Pozitivní kontrola

5.2.2.1 Vyhodnocení experimentů s neznámými vzorky

Při vyhodnocení se posuzují dva nezávislé experimenty. Pokud jsou obě opakování pozitivní, výsledek je pozitivní. Pokud jsou obě opakování negativní, výsledek je negativní. Test s neznámými chemikáliemi: 28/16 a 3/16 lze považovat za platný, na základě dvou nezávislých experimentů (Tab. 12).

Tab. 12: Splnění podmínek platnosti experimentu – souhrn všech experimentů

	Podmínky platnosti			Ne/splnění podmínek platnosti		
	1	2	3	1	2	3
Experiment 1	8-64 μM	7,80 μM	16,84 %	+	+	+
Experiment 2	8-64 μM	6,27 μM	17,84 %	+	+	+

+ Splňuje podmínky

6 Diskuze

Testovanými látkami byly kyselina salicylová, isopropanol, ethylen glykol dimethakrylát, aldehyd aromatické struktury (28/16) a ester dikarboxylové kyseliny aromatické struktury (3/16). První tři látky byly testovány zejména pro své známé účinky v testech *in vitro/in vivo* na modelových organismech a buněčných kulturách pro získání dovednosti k provádění této metody. Neznámé látky pod označením 28/16 a 3/16 byly naopak testovány pro zjištění jejich účinku na buněčnou kulturu v *in vitro* testech, na základě předchozích zkušeností s modelovými látkami.

Experiment byl proveden na buněčné kultuře KeratinoSensTM, která byla pro tento test doporučena OECD Test Guideline 442D (OECD, 2015). K hodnocení cytotoxického potenciálu testovaných látek byla použita metoda MTT assay, která se zakládá na kolorimetrickém stanovení barevného formazanu, který vzniká redukcí vitálního barviva MTT a dochází k fialovému zbarvení v metabolicky aktivních buňkách (Mosmann, 1983; Berridge *et al.*, 2005).

Testované chemické látky byly identifikovány jako potenciální kožní senzibilizátory, pokud indukce luciferázové aktivity vykazovala aktivaci ARE elementu. Buněčná linie s luciferázovou aktivitou vyzařovala určité stabilní pozadí způsobené základní aktivitou promotoru SV40. Indukce luciferázové aktivity podobná tomuto pozadí byla determinovaná pro vztah křivky dávka-odpověď v rozmezí koncentrací 0,98-2000 μM . Na základě těchto dat byla hodnota $\text{EC}_{1,5}$ definována, jako hodnota, která udávala koncentraci potřebnou pro indukci genu o 50 % oproti pozadí (EURL ECVAM, 2015). Po přidání luciferázy by měla být buněčná viabilita vyšší než 70% a křivka dávka-odpověď pro luciferázovou indukci podobná mezi jednotlivými repeticemi (EURL ECVAM, 2013).

Pro porovnání toxického působení látek na buňky byl zvolen parametr IC_{50} . Tato veličina vyjadřovala koncentraci testované látky, která byla nutná k redukcí životnosti buněčné populace o 50 %. Experiment byl proveden v širokém rozmezí koncentrací testovaných látek 0,98-2000 μM , pro lepší zachycení rozmezí hodnot koncentrací s projevem toxicity. Pokud však došlo k zachycení luciferázové indukce v netoxické koncentraci, jednalo se o falešnou pozitivitu genové indukce generovanou kožními senzibilizátory (EURL ECVAM, 2015).

Zvolené látky nebyly rozpustné ve vodě, proto byl jako vhodné rozpouštědlo zvolen dimethylsulfoxid (DMSO). Jedná se o látku pro buňky obecně toxickou, ovšem v koncentraci do 1 % lze pokládat za netoxickou (Stehnová, 2011). Pro zajištění validity byly součástí experimentu pouze vzorky s obsahem 1 % DMSO (negativní kontrola).

Pro experiment bylo též nutné použít optimalizované množství buněk, a to 8×10^4 buněk/ml pro jednu 96 jamkovou desku.

V experimentu 1 při testování modelových látek si lze povšimnout dosti velké variability mezi jednotlivými jamkami, což může být způsobeno špatnou technikou

ředění nebo nedostatečným mícháním suspenze při nasazování buněk na desku, jak zmiňuje guideline v instrukcích, na co si dát pozor během testování (OECD, 2015). Kyselina salicylová a isopropanol nedosahovaly hranice indukce luciferázové aktivity 1,5 (Graf. 2,3), naopak ethylen glykol dimethakrylát dosahoval hranice indukce 1,5 již v koncentraci 15,6 μM (Graf. 4), s přihlédnutím k cytotoxicitě (přílohy Tab. 2) dochází k redukcí životaschopnosti buněk pod 70% až v koncentraci 1000 μM .

Pozitivní kontrola v experimentu 2 vykazovala správně toxický účinek (Graf. 9), ale při pohledu na životaschopnost (přílohy Tab. 4) nedošlo k očekávané odezvě buněk. Jedním z možných vysvětlení, proč nenastala redukce životaschopnosti buněk, mohlo být, že do průhledné desky nebyla přidána pozitivní kontrola. Chyba mohla vzniknout při ředění více desek najednou. Na tomto místě je vidět, jak důležité je si desky označit a nevynechat při pipetování žádnou jamku. A právě z tohoto důvodu nebyla splněna jedna z podmínek pro platnost experimentu (kapitola 3.7.2 bod 2: indukce luciferázové aktivity pozitivní kontroly v koncentraci 64 μM musí být v rozmezí 2-8 μM (OECD, 2015; EURL ECVAM, 2015). Vzhledem k těmto okolnostem bylo nutné provést další nezávislý experiment.

Variabilita mezi jamkami u vzorku 3/16 byla velmi podobná, bohužel u vzorku 28/16 se od koncentrace 250 μM hodnoty viability posouvaly do záporných čísel. Podobně tomu bylo však v dalším experimentu, kdy dosahovaly hodnoty cytotoxicity ve vyšších koncentracích u vzorku 28/16 záporných hodnot. Tato čísla mohou znamenat dvě věci: 1) v jamkách bylo napipetováno pouze malé množství buněk nebo 2) může se jednat o vlastnost testované chemikálie, jelikož jde o druhý nezávislý experiment, kdy se hodnoty viability u vzorku 28/16 posouvaly do záporných hodnot.

Chemické látky byly hodnoceny jako pozitivní nebo negativní. Látka byla pozitivní, pokud indukce luciferázové aktivity byla statisticky významná, tedy dosahovala hodnoty 1,5 alespoň dvakrát ze tří opakování. Hodnota $EC_{1,5}$ byla pod 1000 μM a variabilita ve stanovené koncentraci $EC_{1,5}$ byla vyšší než 70 %. Látky byly hodnoceny jako negativní, pokud nebyla zaznamenána žádná statisticky významná indukce, nebo pouze v jednom opakování, nebo pokud byla indukce zaznamenána v koncentraci vyšší než 1000 μM nebo pouze při cytotoxických koncentracích (EURL ECVAM, 2015).

Standardní odchylka genové indukce pozadí pro DMSO (negativní kontrola) byla počítána pro tři repetice, test byl akceptovatelný, pokud odchylky tohoto pozadí byly do 20 %. Aldehyd kyseliny skořicové (pozitivní kontrola) byl pozitivní ve všech akceptovatelných opakováních. Jelikož v experimentu 2 nebyla splněna podmínka pro hodnotu pozitivní kontroly, která dle OECD (2015), musí být v koncentraci 64 μM v intervalu 2 – 8 μM , experiment nebyl akceptován. Tato hodnota dosáhla čísla 10, 65 μM a proto proběhlo další nezávislé měření, experiment 3, kdy byly již všechny podmínky pro akceptovatelnost experimentu splněny.

V rámci celé experimentální části diplomové práce bylo zahrnuto 5 experimentů s duplikáty/ triplikáty, ve všech případech byl aldehyd kyseliny skořicové pozitivní.

Kritéria pro variabilitu do 20 % byly splněny ve všech pěti případech. Kritéria pro aldehyd kyseliny skořicové byly signifikantně pozitivní ($EC_{1,5} < 64 \mu\text{M}$) a byly splněny opět ve všech pěti případech z pěti. Kvantitativní kritéria pro indukci aldehydu kyseliny skořicové v koncentraci $64 \mu\text{M}$ byly v rozmezí $2-8 \mu\text{M}$ splněny pouze ve čtyřech případech z pěti (80 %). Dále $EC_{1,5}$ byla v rozmezí koncentrací $7-30 \mu\text{M}$ splněna opět ve všech pěti případech (100 %). Pouze v jednom z pěti případů tedy nebyly splněny kvantitativní parametry pro akceptovatelnost.

Výsledky ukázaly, že modelové látky testované při verifikaci metody vyvolaly stejnou odpověď, jako u historických kontrol. OECD (2015) uvádí stejné závěry: kyselina salicylová negativní (nesenzibilizující), isopropanol negativní (nesenzibilizující), ethylen glykol dimethakrylát slabě pozitivní (slabě senzibilizující). V další části experimentu byly provedeny testy s neznámými látkami (28/16, 3/16), výsledky přinesly závěr, že se jedná v obou případech o látky s nesenzibilizujícím potenciálem (v této metodě).

7 Závěr

V testech bylo celkem testováno 5 chemických látek, 3 modelové chemické látky se známými účinky na organismus a 2 chemické látky s neznámými účinky na organismus.

K získání dat byla použita metoda Nrf2-ARE luciferázová zkouška. Metoda byla testována na buněčné linii KeratinoSensTM. Data byla srovnána s jinými studiemi, které se zabývaly verifikací této metody.

Bylo prokázáno, že kyselina salicylová a isopropanol jsou látky nesenzibilizující, naopak ethylen glykol dimethakrylát je látka slabě senzibilizující.

Neznámé vzorky byly na základě zkušeností s modelovými látkami vyhodnoceny jako látky s nesenzibilizujícím potenciálem.

Metoda byla na základě experimentálních dat verifikována a zavedena do laboratorní praxe pro laboratoř skupiny Genetická toxikologie/ Testy *In vitro* Výzkumného ústavu organických syntéz, a. s. Pardubice.

8 Přílohy

Doubling time

Tab. 1: Počet buněk na misce za 3 dny

	koncentrace buněk/ miska (1)	koncentrace buněk/ miska (2)
0 hodin	40 000	20 000
24 hodin	108 000	43 000
48 hodin	144 000	47 000
72 hodin	221 000	107 000

Test se známými látkami

Experiment 1

Na spektrofotometru Biotek epoch byla naměřena absorbance při vlnové délce 580 nm. Měření byla provedena ve zvolených koncentracích 0,98-2000 μM u testovaných chemikálií. Pozitivní kontrola byla měřena v rozmezí koncentrací 4-64 μM . Níže uvedená data (Tab. 2, 4, 6) zachycují viabilitu buněk ve všech koncentracích po obarvení vitálním barvivem MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid). Dle vzorců z kapitoly 4. analýza dat a interpretace výsledků byly vypočteny další parametry nutné pro akceptovatelnost a vyhodnocení experimentů. Na luminometru Biotek Synergy HTX byla naměřena luminiscence a poté vypočítána indukce luciferázové aktivity (Tab. 3, 5, 7).

Tab. 2: Viabilita v % u vybraných chemikálií

	0,98	1,95	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000
SA	132,82	169,08	138,22	180,73	140,87	192,47	111,33	128,94	120,14	152,14	141,82	123,74
ISO	71,10	101,68	213,39	138,69	173,82	218,97	152,42	135,10	168,99	180,82	141,91	159,52
EDGMA	69,20	112,37	144,56	149,20	128,85	209,13	94,86	124,49	88,90	103,38	57,84	9,28
	4	8	16	32	64							
PK	106,79	104,85	110,78	86,85	33,14							
	průměr	sm. odch	rel. odch %									
NK	1,63	0,32	19,92									

Tab. 3: Luminiscence u vybraných chemikálií

	0,98	1,95	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000
SA	1,39	0,98	1,17	0,86	1,20	1,12	1,17	1,21	1,16	0,91	0,90	0,54
ISO	1,07	1,24	1,28	1,06	1,04	1,22	1,12	1,15	1,21	1,32	1,21	0,61
EDGMA	1,06	1,30	1,18	1,14	1,50	1,30	1,24	1,31	1,30	1,66	1,24	1,03
	4	8	16	32	64							
PK	1,60	2,00	2,98	7,84	3,07							

Experiment 2

Tab. 4: Viabilita v % u vybraných chemikálií

	0,98	1,95	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000
SA	92,489	101,298	94,534	172,919	87,036	133,386	144,082	155,092	183,091	87,770	65,959	61,974
ISO	75,85	96,81	87,24	74,42	93,65	87,28	89,51	97,57	88,89	98,28	97,48	105,67
EDGMA	83,95	94,09	100,43	93,67	104,53	101,82	96,33	113,95	99,10	104,65	34,52	20,46
	4	8	16	32	64							
PK	259,88	313,96	269,42	248,42	282,22							
	průměr	sm. odch	rel. odch %									
NK	0,83	0,11	13,87									

Tab. 5: Luminiscence u vybraných chemikálií

	0,98	1,95	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000
SA	1,04	1,20	1,16	1,20	1,30	0,65	0,62	0,50	0,55	0,75	0,96	0,53
ISO	1,08	1,04	1,06	1,18	1,00	1,09	1,15	1,03	0,93	1,08	0,94	0,97
EDGMA	0,87	1,06	0,99	1,34	2,30	1,36	2,15	3,99	8,82	51,36	121,62	51,64
	4	8	16	32	64							
PK	1,49	2,34	2,44	5,13	10,65							

Experiment 3

Tab. 6: Viabilita v % u vybraných chemikálií

	0,98	1,95	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000
SA	100,99	89,14	90,01	85,68	95,73	104,13	87,67	125,05	119,27	134,80	103,80	96,69
ISO	138,13	73,83	96,14	97,78	72,85	99,22	85,25	81,81	115,49	119,76	102,00	116,60
EDGMA	111,21	93,56	89,63	92,90	82,14	117,28	101,54	162,67	59,20	111,26	96,52	33,05
	4	8	16	32	64							
PK	53,38	94,86	72,44	69,28	83,18							
	průměr	sm. odch	rel. odch %									
NK	1,84	0,23	12,65									

Tab. 7: Luminiscence u vybraných chemikálií

	0,98	1,95	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000
SA	0,50	0,19	0,66	0,64	0,74	0,46	0,63	0,91	0,61	0,12	0,20	0,05
ISO	0,56	1,30	0,74	0,65	0,58	0,50	0,57	0,95	0,85	0,89	0,97	0,55
EDGMA	0,50	0,54	0,42	0,92	1,22	3,73	10,82	62,45	64,51	8,77	0,31	-0,02
	4	8	16	32	64							
PK	1,37	1,69	3,30	2,21	6,27							

Test s neznámými látkami

Experiment 1

Na spektrofotometru Biotek epoch byla naměřena absorbance při vlnové délce 580 nm. Měření neznámých látek byla provedena ve zvolených koncentracích 0,98-2000 μM a pozitivní kontrola v rozmezí koncentrací 4-64 μM . Níže uvedená data (Tab. 8,10) zachycují viabilitu buněk u neznámých vzorků ve všech koncentracích po obarvení vitálním barvivem MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid). Dle vzorců z kapitoly 4. analýza dat a interpretace výsledků byly vypočteny další parametry nutné pro akceptovatelnost a vyhodnocení experimentů. Dále byla na luminometru Biotek Synergy HTX naměřena luminiscence a poté vypočítána indukce luciferázové aktivity neznámých vzorků (Tab. 9,11).

Tab. 8: Viabilita v % u neznámých vzorků 28/16 a 3/16.

	0,98	1,95	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000
28/16	142,92	136,70	134,20	103,72	91,44	99,08	82,72	29,46	-20,90	-34,30	-35,22	-30,38
3/16	137,46	120,03	181,04	101,12	101,07	157,14	89,14	110,24	235,32	78,19	130,48	103,82
	4	8	16	32	64							
PK	51,08	113,38	149,31	88,61	140,52							
	průměr	sm. odch	rel. odch %									
NK	0,66	0,11	16,84									

Tab. 9: Luminiscence u neznámých vzorků 28/16 a 3/16

	0,98	1,95	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000
28/16	0,82	1,08	0,90	0,91	0,77	1,02	1,06	0,52	0,03	0,01	0,00	0,01
3/16	0,84	0,86	1,03	1,09	1,03	1,12	1,25	1,23	1,29	1,10	1,25	1,39
	4	8	16	32	64							
PK	1,24	1,51	2,91	1,96	5,50							

Experiment 2

Na spektrofotometru byla naměřena absorpance při vlnové délce 580 nm. Měření byla provedena ve zvolených koncentracích 0,98-2000 μ M a pozitivní kontrola v koncentracích 4-64 μ M. Níže uvedená data (Tab. 10) zachycují viabilitu buněk u neznámých vzorků ve všech koncentracích po obarvení vitálním barvivem MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid). Dle vzorců z části analýza dat a interpretace výsledků byly vypočteny další parametry nutné pro akceptovatelnost a vyhodnocení experimentů. Dále byla na luminometru naměřena luminiscence a poté vypočítána indukce luciferázové aktivity neznámých vzorků (Tab. 11).

Tab. 10: Viabilita v % u neznámých vzorků 28/16 a 3/16.

	0,98	1,95	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000
28/16	120,52	116,23	114,52	93,53	85,07	90,33	79,07	42,39	7,72	-1,51	-2,14	1,23
3/16	116,76	104,76	146,77	91,74	91,70	130,34	83,49	98,02	184,14	75,95	111,95	93,60
	4	8	16	32	64							
PK	56,59	100,18	124,92	83,12	118,87							
	průměr	sm. odch	rel. odch %									
NK	1,00	0,18	17,84									

Tab. 11: Luminiscence u neznámých vzorků 28/16 a 3/16

	0,98	1,95	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000
28/16	0,81	1,08	0,89	0,90	0,76	1,01	1,06	0,50	-0,01	-0,03	-0,04	-0,03
3/16	0,83	0,86	1,03	1,09	1,03	1,12	1,26	1,23	1,30	1,10	1,26	1,41
	4	8	16	32	64							
PK	1,37	1,69	3,30	2,21	6,27							

9 Literatura

Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen, K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Archives of Toxicology* 85, pp. 367-485.

Albrechtová, B. (2013). *In vitro* metody a jejich relevance vůči situaci *in vivo* – nové trendy v experimentech s tkáňovými kulturami. Brno, 2013. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita.

Baird, L. & Dinkova-Kostova, A. T. (2011). The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch. Toxicol.*, 85, pp. 241-272.

Berridge, M. V., Herst, P. M. & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, pp. 127-152.

Bhanushali, M., Bagale, V., Shirode, A., Joshi, Y. & Kadam, V. (2010). An in-vitro toxicity testing – a reliable alternative to toxicity testing by reduction, replacement and refinement of animals. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*, pp. 15-31.

Buschmann, J. (2013). The OECD Guidelines for the testing of chemicals and pesticides. *Methods Mol Biol*, pp. 37-56.

Česká národní rada (1992). Zákon na ochranu zvířat proti týrání. [online] [cit. 27. 12. 2017] URL:<<https://www.desinsekta.cz/share/download/legislativa/246-1992.pdf>>.

Davies, E. (2015). Advancing animal testing alternatives. [online] [cit. 27. 12. 2017] URL:<<https://www.chemistryworld.com/news/advancing-animal-testing-alternatives/9165.article>>.

Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem Res Toxicol.* 18, pp. 1779-1791.

Evropský parlament a Rada Evropy (2010). Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. [online] [cit. 27. 12. 2017] URL:< <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF>>.

ECETOC (2003). Contact sensitisation: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals. Technical Report No. 87.

Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 245, pp. 281-290.

EURL ECVAM (2013). DB-ALM Protocol No. 155: KeratinoSens™ [online] [cit. 16. 1. 2018] URL: <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/protocol/keratinosens-protocol-no.-155/key/p_1541>.

EURL ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens assay for skin sensitisation testing. Joint Research Centre of the European Commission, pp.42.

EURL ECVAM (2015a). Invitox protocol KeratinoSens, Index. Ecvam database service on alternative methods to animal experimentation, pp. 32.

EURL ECVAM (2015). Test Submission Template (TST): KeratinoSens assay for the testing of skin sensitizers. pp. 26.

Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. J Invest Dermatol, 126, pp. 1813-1822.

Grindon, C. & Bhogal, N. (2005). The fourth EC report on the statistics of laboratory animal use: trends, recommendations and future prospects. Altern Lab Anim, 33(4), pp. 417-426.

Holland, R. & Fishbein, J. C. (2010). Chemistry of the cysteine sensors in Kelch-like ECH-associated protein 1. Antioxid. Redox Signal., 17, pp. 1749-1761.

Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., Nebeshima, Y. (1997). An Nrf2/ small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. Biochem. Biophys. Res. Commun., 236(2), pp. 313-322.

Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., Ysasmoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. Genes Dev., 13, pp. 76-86.

Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 18,1, pp. 45-49.

Laboratoř experimentální medicíny, Dětská klinika, Lékařská fakulta Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci (2011). MTT test [online] [cit. 8. 11. 2017] URL: <<http://lem.ocol.cz/cs/info/mtt-test>>.

- Lapenna, S., Gabbert, S., & Worth, A. (2012). Training needs for toxicity testing in the 21st century: a survey-informed analysis. *Altern Lab Anim*, 40(6), pp. 313-320.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 (1-2), pp. 55-63.
- Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicological Sciences* 113, pp. 284-292.
- Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol.* 25 (3), pp. 733-744.
- Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, 33, pp. 1337-1352.
- Nolen-Hoeksema, S., Fredrickson, L. B., Atkins R. C., Loftus, R. G., Hilgard, R. E., Lutz, C. (2009). Atkinson and Hilgard's introduction to psychology, 16th edition, Cengage Learning EME, London, pp. 816.
- OECD (2010). Skin sensitization: Local Lymph Node assay. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 429. OECD, Paris, 20 pp.
- OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. [online] [cit. 27. 12.2017] URL: <[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)>.
- OECD (2015). Test Guideline No. 442D – In vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method, pp. 20.
- Page, H., Flood, P., & Reynaud, EG. (2013). Three-dimensional tissue cultures: current trends and beyond. *Cell Tissue Res.* 351(1), pp. 123.
- Pampaloni, F., Reanaud, E. G. & Stelzer, E. H. K (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Molecular cell biology*, 8, pp. 839-845.
- Pincock, S. (2005). EU plans to cut animals tests. Industry groups pledge to collaborate on refining reducing and replacing the use of lab animals. *The Scientist*. [online] [cit. 27. 12. 2017] URL:<<https://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/23505/title/EU-plans-to-cut-animal-tests/>>.

- REACH (2005). REACH. [online] [cit. 27. 12. 2017] URL: <<http://reach.cz/>>.
- Russell, L. W. M. S & Burch, R. L (1959). The principles of humane experimental technique. [online] [cit. 27. 12. 2017] URL:<http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc>.
- Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I. And Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* 150, pp. 301-316.
- Řeháčková, R. (2010). Stanovení cytotoxicity vybraných skupin xenobiotik. Rigorózní práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, pp. 87.
- Stehnová, O. (2011). Zkoumání cytotoxicity vybraných xenobiotik. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, pp. 16-28.
- Suzuki, T., Motohashi, H., Yamamoto, M. (2013). Toward clinical application of the Keap1Nrf2 pathway. *Trends Pharmacol. Sci.*, 34, pp. 340-346.
- United nations (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. [online] [cit. 25. 9. 2017] URL: <<http://www.unece.org/index.php?id=33181>>.
- Zurlo, J., Rudacille, D., & Goldberg, A. M. (1994). Animal and alternatives in testing: History, Science and ethics. [online] [cit. 27. 12. 2017] URL:<http://caat.jhsph.edu/publications/animal_alternatives/chapter3.html>.