

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Reparační potenciál mezenchymálních kmenových buněk  
v kultuře hepatocytů stresovaných bisfenolem S**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Jana Marešová**

**Obor studia: Reprodukční biotechnologie**

**Vedoucí práce: Tereza Žalmanová**

© 2017 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že diplomovou práci „Reparační potenciál mesenchymálních kmenových buněk v kultuře hepatocytů stresovaných bisfenolem S“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího a konzultantky diplomové práce za použití odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

V Praze dne

.....

podpis

## **Poděkování**

Chtěla bych touto cestou moc poděkovat Lucie Višejnové Ph.D. za veškerou pomoc, ochotu a trpělivost po celou dobu trvání mých pokusů.

## **Reparační potenciál mezenchymálních kmenových buněk v kultuře hepatocytů stresovaných bisfenolem S**

### **Souhrn**

Kmenové buňky představují velmi zajímavou cestu novodobé léčby, jejich potenciál však není dosud plně využit. Vzhledem k jejich vlastnostem diferenciací do jiných typů buněk, ale zůstávají kandidáty na obnovu opotřebovaných či poškozených buněk, náhradu tkání a na vyléčení nebo zmírnění celé řady smrtelných onemocnění. Mezi takové zdravotní potíže můžou patřit i defekty způsobené vlivem látek zvaných bisfenoly. Tyto látky kromě vlivu na endokrinní a reprodukční soustavu negativně působí i na jaterní tkáň.

V této práci byl sledován účinek bisfenolu S, který je dnes užíván jako běžná náhrada bisfenolu A v průmyslových produktech, na hepatocyty linie HepG2. U jaterních buněk byly sledovány jejich typické projevy – viabilita, proliferace a produkce ATP. Byl popsán účinek bisfenolu S o koncentracích 1-1000  $\mu\text{M}$ . Následovala série experimentů, kdy HepG2 poškozené bisfenolem S byly kokultivovány s mezenchymálními kmenovými buňkami (pMSCs) a byl sledován potenciální terapeutický efekt pMSCs na poškozené funkce hepatocytů HepG2. Bisfenol S v koncentracích 1000 a 500  $\mu\text{M}$  snižoval viabilitu, proliferaci a produkci ATP u HepG2. pMSCs dokázaly tyto negativní účinky bisfenolu S zmírnit, avšak ne zcela potlačit.

**Klíčová slova:** bisfenol S, hepatocyt, kmenová buňka, viabilita, proliferace, ATP

# **Regenerative potential of mesenchymal stem cells in culture of hepatocytes treated by bisphenol S**

## **Summary**

Stem cells represent interesting approach in current therapies. However, their potential is not fully utilized. Their ability to differentiate into many types of tissues leave them as promising candidates for regenerative medicine. The field for therapy by mesenchymal stem cells is also the organ damage caused by bisphenols, the endocrine disruptors affecting mammalian reproduction and also the liver tissue.

In this work, the effect of bisphenol S, the common substituent of bisphenol A, on HepG2 cell line was monitored. HepG2 viability, proliferation and ATP production was analyzed under influence of bisphenol S with concentrations 1-1000  $\mu\text{M}$ . In the following step, HepG2 stressed by bisphenol S were cocultured with mesenchymal stem cells (pMSCs) and the possible therapeutical effect of pMSCs on HepG2 functions was observed. Bisphenol S at concentrations 1000 and 500  $\mu\text{M}$  decreased viability, proliferation and ATP production of HepG2. The addition of pMSCs into HepG2 culture partially reverses this negative role of bisphenol S in HepG2 functions.

**Key words:** bisphenol S, hepatocyte, stem cell, tissue cultures, viability, proliferation, ATP

# Obsah

1	Úvod .....	1
2	Cíl práce.....	2
3	Literární rešerše .....	3
3.1	Historie výzkumu kmenových buněk.....	3
3.2	Definice kmenových buněk a typy kmenových buněk .....	4
3.3	Mezenchymální kmenové buňky .....	5
3.3.1	Základní charakteristiky MSCs .....	5
3.3.2	Výskyt MSCs v těle .....	7
3.3.3	Izolace a kultivace MSCs .....	7
3.4	Možnosti léčby kmenovými buňkami včetně MSCs .....	8
3.5	Problémy využití kmenových buněk.....	10
3.6	Játra .....	10
3.6.1	Anatomie jater.....	11
3.6.2	Histologická stavba jater.....	11
3.6.3	Typy jaterních buněk .....	12
3.6.4	Funkce jater.....	12
3.7	Hepatocyt .....	14
3.7.1	Stavba hepatocytu .....	14
3.7.2	Orgány hepatocytu a jejich funkce .....	14
3.7.3	Linie HepG2 .....	15
3.8	Bisfenoly .....	16
3.8.1	Výskyt bisfenolů v prostředí.....	17
3.8.2	Bisfenol A .....	18
3.8.3	Bisfenol F.....	19
3.8.4	Bisfenol S.....	19
3.8.5	Vliv bisfenolů na játra.....	20
3.8.6	Další negativní vlivy bisfenolů .....	21
4	Materiál a metodika .....	23
4.1	Kultivace prasečích mesenchymálních kmenových buněk.....	23
4.2	Kultivace linie hepatocytů HepG2 .....	23
4.3	Pasážování buněk .....	23

4.4	Počítání buněk .....	24
4.5	Příprava roztoků bisfenolu S .....	24
4.6	Nasazení pMSCs na pokus a jejich ovlivnění roztoky BPS .....	24
4.7	Nasazení HepG2 na pokus a jejich ovlivnění roztoky BPS .....	24
4.8	Kokultivace pMSCs a HepG2 a jejich ovlivnění BPS .....	25
4.9	Metoda měření buněčné viability Alamar Blue .....	26
4.10	Metoda měření buněčné proliferace pomocí barviva Hoechst .....	26
4.11	Metoda měření koncentrace ATP v buňkách .....	27
4.12	Morfologické hodnocení pMSCs a HepG2 .....	27
4.13	Statistické hodnocení .....	27
5	Výsledky .....	29
5.1	Buněčná viabilita pMSCs ovlivněných BPS .....	29
5.2	Buněčná viabilita HepG2 ovlivněných BPS .....	30
5.3	Buněčná proliferace HepG2 ovlivněných BPS .....	31
5.4	Produkce ATP u HepG2 ovlivněných BPS .....	33
5.5	Buněčná viabilita HepG2 ovlivněných BPS a kokultivovaných s pMSCs .....	34
5.6	Produkce ATP u HepG2 ovlivněných BPS a kokultivovaných s pMSCs .....	36
5.7	Morfologická pozorování buněk ovlivněných BPS .....	37
6	Diskuse .....	40
7	Závěr .....	42
8	Reference .....	43
9	Použité zkratky .....	55

# 1 Úvod

Kmenové buňky jsou v současné době předmětem mnoha vědeckých studií a také se stávají tématem diskusí týkajících se léčby různých onemocnění nebo etických či náboženských problémů jejich používání. Schopnost diferenciací kmenových buněk do jiných buněčných tkání a tím regenerace jejich poškozených částí dává naději na vyléčení různých zdravotních obtíží či nevyléčitelných chorob v budoucím světě medicíny (Salem a Thiermermann, 2010).

Řada vážných a smrtelných onemocnění člověka v dnešní době vzniká ztrátou nebo degenerací určitých typů buněk. Regenerativní medicína, která se zabývá obnovením funkce poškozených orgánů a buněk, využívá buněčné terapie kmenovými buňkami a nabízí možnost vyléčení nebo zpomalení průběhu nemoci (Dai Pré et al., 2016). Takto by v budoucnu mohly být obnoveny srdeční buňky po srdečním selhání, poškozené buňky slinivky při diabetu 2. typu nebo buňky nefunkčního imunitního systému. Zajímavým potenciálním využitím kmenových buněk se zdá být i možnost léčby Parkinsonovy (Cerri et al., 2015) a Alzheimerovy choroby (Turgeman, 2015).

Ne všechna onemocnění vznikají opotřebením orgánových soustav. V dnešní době existuje mnoho chemických látek a komponentů vyskytujících se v životním prostředí, které ohrožují naše zdraví, vývoj a reprodukci. Mezi tyto všudypřítomné látky patří skupina bisfenolů, které se označují jako tzv. endokrinní disruptory. Tyto chemikálie, používané při průmyslové výrobě plastů a pryskyřic, jsou součástí mnoha běžných výrobků, které denně člověk používá (Nakagawa a Tayama, 2000). Z nich se poté mohou uvolňovat do ovzduší, kontaminovat vodu a následně dostat do organismů. Bylo prokázáno, že tyto látky mají výrazný vliv na rozmnožovací soustavu živočichů (Sweeney et al., 2016).

V této práci byl sledován účinek působení bisfenolu S v kultuře hepatocytů a mezenchymálních kmenových buněk. Bisfenol S byl vybrán, protože v současnosti nahrazuje používání bisfenolu A, ale jeho možné negativní vlivy nejsou dostatečně prozkoumány. Hepatocyty byly stresovány různými koncentracemi bisfenolu a následně kultivovány s mezenchymálními kmenovými buňkami. Byl tak zjištěn vliv bisfenolu na viabilitu a metabolické funkce hepatocytů a následně změna při aplikaci mezenchymálních kmenových buněk. Tato práce poskytne poznatky o chování hepatocytů a mezenchymálních kmenových buněk v nepříznivém prostředí bisfenolu S a může přinést informaci o možném terapeutickém potenciálu mezenchymálních kmenových buněk.



## 2 Cíl práce

Cílem práce je ověřit tyto hypotézy:

- 1) Bisfenol S působí negativně na viabilitu, proliferaci a produkci ATP u hepatocytů.
- 2) Mezenchymální kmenové buňky mohou hrát roli při obnově funkce hepatocytů poškozených bisfenolem S.

# 3 Literární rešerše

## 3.1 Historie výzkumu kmenových buněk

Historie výzkumu kmenových buněk má počátky již na začátku minulého století. Termín kmenová buňka se začal poprvé objevovat ve spojitosti se zárodečnými buňkami, jako jsou spermatogonie a oocyty a dále s krevními buňkami. Mnoho vědců se také domnívalo, že kmenové buňky hrají důležitou roli při tvorbě nádorů a rozvoji leukémie. Po vzestupu lékařských odvětví, jako hematologie a imunologie, byla v padesátých letech 20. století po několika experimentech s kostní dření stanovena teorie kmenových buněk (Brunt et al., 2012).

Na přelomu 60. a 70. let 20. století se Friedenstein a jeho kolegové (1970) zabývali již přítomností stromálních kmenových buněk v kostní dření. Ty byly zjištěny pouze ve velmi malém množství v populaci hematopoetických kmenových buněk. Tyto stromální buňky jsou dnes označovány jako mezenchymální kmenové buňky (MSCs). Friedenstein tyto buňky značil jako CFU-F, což znamená buňky tvořící fibroblastové kolonie. Poté byla také popsána schopnost diferenciací MSCs do mezodermálních tkání. Výzkum MSCs pokračoval i nadále a v 80. letech byla prokázána jejich schopnost diferencovat do chondrocytů, osteoblastů a adipocytů. V roce 1981 britští a američtí vědci provedli první úspěšnou izolaci a následně i kultivaci embryonálních kmenových buněk z blastocysty (Williams a Hare, 2011).

V roce 1990 byla prokázána schopnost MSCs diferencovat se do buněk myogenní tkáně. Thomson et al. (1998) také poprvé popsali možnost využití kmenových buněk jako potencionálního zdroje nových orgánů. V této době se rovněž začaly objevovat etické otázky ohledně použití kmenových buněk a došlo k omezení výzkumu zejména u embryonálních kmenových buněk (Brunt et al., 2012). O necelých deset let později byla představena koncepce indukovaných pluripotentních kmenových buněk, čili dediferencovaných somatických buněk, schopných navrácení se do pluripotentního stavu prostřednictvím opětovné exprese genů zajišťující kmenový charakter buněk (Takahashi et al., 2007). V posledních letech se provádí řada klinických studií zaměřených na terapeutický potenciál kmenových buněk v reparaci funkcí či náhradě různých tkání, například v regeneraci srdeční tkáně po selhání srdce, na opravu kostních defektů při vrozených poruchách osteogeneze nebo na zlepšení či alespoň zpomalení průběhu neurologických chorob (Squillaro et al., 2016).

### 3.2 Definice kmenových buněk a typy kmenových buněk

Regenerativní medicíně využívající kmenové buňky se dostává čím dál více pozornosti, protože by mohla poskytovat možnosti obnovy poškozených tkání a jejich navrácení do původního zdravého stavu (Chen et al., 2016). Léčba využívá především schopnosti diferenciaci kmenových buněk v různé typy tkání v těle. Díky této vlastnosti mohou být opotřeбенé části tkání nahrazeny novými buňkami, které je navrátí do původní funkce nebo alespoň zlepši jejich stav. Mezi hlavní kandidáty buněčné terapie patří mezenchymální kmenové buňky (Murray et al., 2014).

Kmenové buňky v těle mají mnoho podob a funkcí, proto není možné říci, že existuje pouze jediný typ kmenových buněk. Bylo rozeznáno a izolováno několik druhů kmenových buněk, které se od sebe liší stupněm diferenciacního potenciálu (Bongso a Richards, 2004). Lze je rozdělit na dva charakteristické typy z hlediska jejich původu a místa výskytu. Rozdělujeme je na **embryonální kmenové buňky**, které se podílejí na prenatálním vývoji, a na **dospělé neboli orgánové kmenové buňky**, vyskytující se v dospělém organismu během celého života. Oba typy buněk jsou předmětem výzkumu pro potenciální využití v lékařství (Ulloa-Montoya, 2005). Embryonální kmenové buňky se nacházejí ve vnitřní buněčné mase embryoblastu a jsou důležité při diferenciaci buněk blastocysty již po pátém dnu vývoje. Tyto buňky mají největší diferenciacní kapacitu a patří mezi totipotentní buňky, které dávají vzniknout všem buňkám ze všech tří zárodečných listů a buňkám zárodečným (Thomson et al., 1998). Embryonální kmenové buňky mají velmi dobrou schopnost sebeobnovy a mohou potenciálně vytvářet nekonečné množství buněk. Lidské embryonální kmenové buňky jsou definovány pomocí trojice transkripčních faktorů Sox2, Oct4 a Nanog (Snippert a Clevers, 2011). Tento typ buněk je však spojován s řadou etických, náboženských a technických problémů, neboť při jejich izolaci z blastocysty dochází ke zničení zárodku (Thomson et al., 1998). Častou vyskytující se překážkou ve využití embryonálních kmenových buněk je také tvorba teratomů a nádorů z embryonální tkáně (Klabusay et al., 2009).

Druhý typ kmenových buněk, dospělé kmenové buňky, je na rozdíl od embryonálních buněk značně specializován na určité typy tkání. Tyto buňky jsou multipotentní a jsou schopné diferencovat na buňky tkáně, ve které se vyskytují. Předpokládá se, že zajišťují důležitou buněčnou obnovu v daném místě (Bongso et al., 2004). Jejich počet v lidském těle je nepatrný, ve tkáních mohou být uloženy jako prekurzory buněk v buněčných nikách po řadu let. Jakmile tyto prekurzory niky opustí a dostanou se k místu poranění, začnou se diferencovat v daný typ buněk (Colf et al., 2007).

Kmenové buňky mohou mít také vliv na rozvoj nádorového bujení v těle. Jako tzv. **nádorové kmenové buňky** se označuje skupina kmenových buněk, které se přestaly kontrolovaně dělit a diferencovat. I když jejich pravý původ není zatím zcela objasněn, je z důvodu jejich nekontrolovatelného dělení předpokládáno, že jsou zodpovědné za vznik rakoviny a rozvoj metastáz (Ciurea et al., 2014). Mezi nejvíce známé a prozkoumané patří nádorové buňky leukémie, dále se zkoumají nádorové kmenové buňky mléčné žlázy. Při studiu leukémií bylo zjištěno, že v nádorech se vyskytuje heterogenní populace buněk, u kterých byly zjištěny podobné vlastnosti jako u kmenových buněk, jako je schopnost sebeobnovy a vysoký stupeň proliferace. Tato populace nádorových kmenových buněk je důležitá pro rozvoj nádorů a také se podílí na odpovědi na léčebné postupy a terapie. Ve výzkumu týkajícího se využití terapií proti nádorovým kmenovým buňkám bylo zjištěno, že tento postup může být účinnější, neboť snížením těchto kmenových nádorových buněk došlo k eliminaci vzniku nádorových buněk (Aguilar-Gallardo a Simón, 2013).

V roce 2006 Takahashi et al. vytvořili první linii **indukovaných pluripotentních kmenových buněk**, které jsou odvozeny od somatických buněk, které jsou již diferencovány. Stávají se tak znovu pluripotentní a mají mnoho společných vlastností s embryonálními buňkami. Navíc jsou indukované kmenové buňky shodné s genotypem dárce a nevzniká tak imunitní bariéra. Pro indukci byly použity čtyři transkripční faktory Sox2, Oct4, Klf4 a c-Myc. Tyto buňky se mohou dále diferencovat na jiné buňky, jako například neurony, buňky srdce nebo hematopoetické buňky (Hipp a Atala, 2008).

### **3.3 Mezenchymální kmenové buňky**

V předchozí kapitole byly zmíněny dvě kategorie kmenových buněk. Současný výzkum se zaměřil na kmenové buňky, které jsou snadno dostupné a lehce kultivovatelné. Mezi takové patří mezenchymální kmenové buňky (MSCs). Ty jsou popisovány jako dospělé multipotentní kmenové buňky, které se vyskytují hlavně v kostní dřeni. Bylo zjištěno, že kostní dřeň obsahuje dva typy kmenových buněk, jednak právě MSCs a také hematopoetické kmenové buňky (Owen a Friedenstein, 1988).

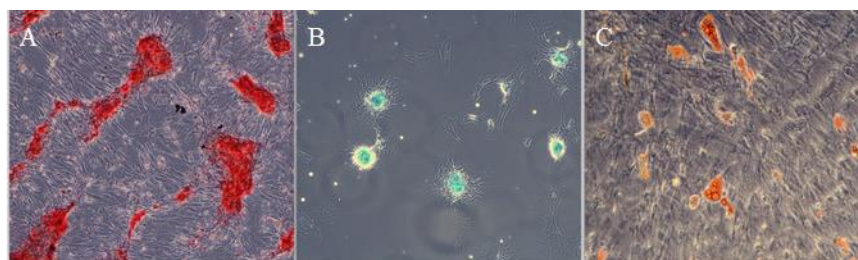
#### **3.3.1 Základní charakteristiky MSCs**

MSCs mají schopnost diferenciaci do mnoha terminálně diferencovaných tkání *in vivo* a také *in vitro*. Diferencují se v mezodermové tkáni a dávají vznik adipocytům, osteocytům, chondrocytům, srdečním buňkám a neuronům (Bobis et al., 2010). Mohou dobře regulovat krvetvorbu v kostní dřeni (Bieback, 2008). MSCs mají charakteristický protáhlý

vřetenovitý tvar, kulovité jádro s velkým množstvím jadérek a jsou vybaveny velkým množstvím buněčných organel (Williams a Hare, 2011). Jako mnoho kmenových buněk se většinou dělí asymetricky za vzniku jedné prakticky totožné dceřiné buňky a jedné progenitorové buňky, která zůstává v nediferencovaném stavu a v případě potřeby může být diferencována na daný typ buňky (Snippert a Clevers, 2011). Toto dělení je řízeno několika extracelulárními a intracelulárními faktory v kombinaci s danou orientací buněčného vřetena. Záleží také na vnitřním prostředí a signálech buněčné niky, ve které se buňka nachází. Po dělení kmenové buňky je zpravidla jedna buňka zabudována přímo do niky, zatímco druhá jí opouští. Buněčná nika tak může ovlivňovat počet kmenových buněk v buněčných tkáních (Chen et al., 2016).

Dle Wonga et al. (2015) mají MSCs úzký vztah s pericyty, buňkami v krevních kapilárách. Pericyty jsou mezenchymálního původu a vyskytují se v blízkosti bazální laminy kapilár. Poté, co se z membrány uvolní vlivem signálních molekul, se pericyt krevním proudem dostane až k místu poranění nebo zánětu. Tam se pericyt stává MSC buňkou, která funguje jako první regenerační a hojící stimul (Caplan, 2014). Bylo také zjištěno, že MSCs cirkulují v krevním řečišti u pacientů se zlomeninami. Během pokusů s exogenní aplikací MSCs do těla bylo zjištěno, že dodané buňky jsou křehčí a mohou být z krve ihned odstraněny. Transplantované buňky snadněji podléhají apoptóze. Je tedy důležité, kam přesně se tyto exogenní buňky aplikují (Zhou et al., 2015).

Typickou charakteristikou MSC je jejich schopnost diferencovat do buněk kosti (osteocyty), chrupavky (chondrocyty) a tukové tkáně (adipocyty) (Obrázek 1). Při *in vitro* kultivacích lze do kultivačních médií přidávat diferenciační faktory (hormony a růstové faktory), které MSCs stimulují k diferenciaci v osteocyty, což se projevuje mimojiné produkcí kalcifikovaných struktur. Chondrocyty pak produkují glykosaminoglykany a adipocyty obsahují tukové kapénky.



**Obrázek 1: MSCs diferencované do osteocytů (A), chondrocytů (B) a adipocytů (C).** A – červeně zabarvené (alizarinová červeň) kalcifikované struktury; B – modře zabarvené (alcianová modř) glykosaminoglykany; C – červeně zabarvené (oil red) tukové kapénky. Zvětšení 100x (Lucie Vištejnová 2017).

### 3.3.2 Výskyt MSCs v těle

Přítomnost MSCs byla zaznamenána na nejrůznějších místech v těle. Seznam orgánů, ve kterých se kmenové buňky vyskytují, se tedy stále rozrůstá a zahrnuje orgány trávicího traktu, jako játra či slinivka, orgány nervové soustavy, jako mozek a mícha, dále kostní dřeň, kůže, svaly, zubní dřeň nebo rohovka (Klabussay et al., 2005). Jejich výskyt byl zjištěn také v tukové tkáni, pupečnickové krvi nebo v různých tkáních plodu (Salem a Thiemermann, 2009). V současné době se nejčastěji pracuje s MSCs izolovanými z kostní dřeně, tukové nebo pupečnicko tkáně.

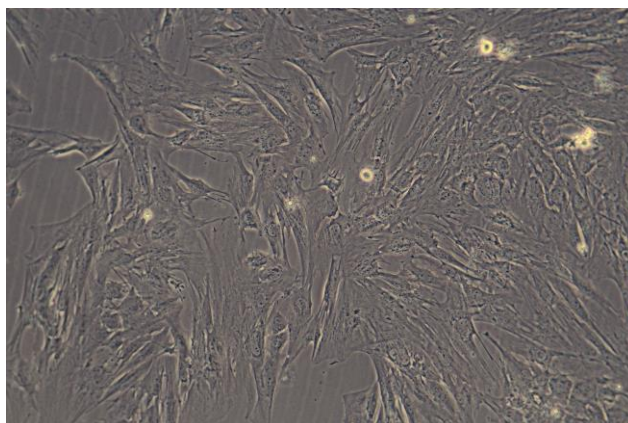
Velmi významný zdroj kmenových buněk je kostní dřeň. Zde se vyskytují hematopoetické kmenové buňky a MSC buňky, schopné diferenciaci v mezodermové tkáni. Kmenové buňky kostní dřeně jsou zatím jediným typem kmenových buněk, který je užíván v dnešní medicíně. Děje se tak pomocí transplantace kostní dřeně. Tyto buňky mohou být diferencovány ve všechny typy krvinek (Marketou et al., 2015).

### 3.3.3 Izolace a kultivace MSCs

MSCs mohou být získány jednoduchou cestou odběru z kostní dřeně. Kostní dřeň byla prvním místem odběru a je stále nejvíce používanou cestou jako je tomu například ve studii Forteho et al. (2005), kdy byly MSCs izolovány z kosti stehenní samice myši. Dalším zdrojem je pupečnicková tkáň a krev (Deans a Moseley, 2000). Velmi dobrým zdrojem bohatým na tyto buňky je také tuková tkáň. MSCs odvozené z tukové tkáně se dají získat při kosmetické liposukci (Witkowska-Zimny a Walenko, 2011). Dobře se dá využít také zubní dřeň, která je bohatá na mnoho typů mesenchymálních kmenových buněk. Využívá se hlavně dřeň z horních i spodních stoliček. Tyto buňky jsou potencionálním kandidátem na léčbu zubních obtíží a mohou být důležitým bodem v oblasti dentální regenerativní medicíny (Ledesma-Martínez et al., 2016). Výhodou použití MSCs z kostní dřeně a tukové tkáně jsou také minimální etické problémy.

K identifikaci MSCs při jejich izolaci napomáhá řada pozitivních a negativních povrchových markerů. Jako negativní markery jsou nejčastěji používány CD34 a CD45, znaky typické pro hematopoetické buňky. Mezi důležité pozitivní markery MSCs patří Stro-1, CD106 a CD73, i když jejich funkce nejsou doposud zcela objasněny (Kolf et al., 2007). Stro-1 je nejvíce popsán povrchový marker. Buňky pozitivní pro tento marker podporují růst buněk kostí a chrupavek, což je v souladu s diferenciačními vlastnostmi MSCs. Naopak buňky negativní na Stro-1 nejsou schopné vytvářet kolonie (Denis et al., 2002). Gronthos et

al. (2003) uvádí další potenciální marker CD106, který je exprimován v krevních cévách a má souvislost s adhezivními vlastnostmi MSCs na kultivační plast (Obrázek 2). Schopnost MSCs adherovat na kultivační plast je dalším selekčním a charakteristickým rysem MSCs. Třetím důležitým povrchovým markerem je CD73, neboli lymfocyt vaskulární adhezní protein, který je v kombinaci s CD106 a Stro-1 využívám k pozitivní identifikaci MSCs při izolacích a následných kultivacích (Kolf et al., 2007).



**Obrázek 2: Mezenchymální kmenové buňky na kultivačním platu.** Zvětšení 200x (Marešová, 2017).

### 3.4 Možnosti léčby kmenovými buňkami včetně MSCs

U MSCs jsou popisovány tři mechanismy, jakými mohou MSCs přispívat k regeneraci tkání. MSCs mohou diferencovat v buňky specifické pro danou tkáň, mohou produkovat řadu regulačních molekul podporující sebeobnovu původních buněk orgánu, a nebo mohou modulovat imunitní systém ve směru zahojení či obnovy tkáně.

Léčba kmenovými buňkami má zatím mnoho doposud nevyužitých možností. V dnešní době se kmenové buňky aplikují v podstatě jen při transplantaci kostní dřeně. Transplantace kmenových buněk je vhodná pro pacienty s akutní lymfoblastickou leukémií. Dárcovská kostní dřeň napomáhá obnovovat všechny krevní elementy u pacientů. Kmenové buňky z pupečnickové krve jsou vhodné při onemocnění a nefunkčnosti kostní dřeně. (Horowitz et al., 1990). MSCs z kostní dřeně jsou schopné regenerovat poškozenou srdeční tkáň po srdečním selhání. Studie na zvířecích modelech prokázaly, že jsou tyto buňky schopné zvýšit ejekční fázi levé srdeční komory a snížit poruchy a defekty způsobené infarktem (Klabussay et al., 2009). Injekce MSCs u hlodavců způsobily zlepšení poškozených kardiomyocytů a zvýšily hustotu krevních kapilár (Xu et al., 2004).

Několik studií se zabývalo schopností MSCs ovlivňovat buňky imunitního systému, tzv. imunomodulačním potenciálem MSCs. Bylo zjištěno, že mají značné imunosupresivní vlastnosti a mohou tak ovlivnit imunitní systém mezibuněčným kontaktem nebo produkcí různých molekul. MSCs mohou také inhibovat diferenciaci dendritických buněk a dokáží inhibovat cytotoxické a natural killer (NK) buňky (Spaggiari et al, 2006). Bylo prokázáno, že mohou udržovat proliferaci B lymfocytů do plazmatických buněk, které poté produkují protilátky. Naopak inhibují proliferaci T lymfocytů (Meisel et al., 2004). Imunosupresivní působení se týká také pomocných a cytotoxických T lymfocytů. K inhibici buněk produkují MSCs řadu solubilních faktorů jako například prostaglanid E2 (PGE2), transformující růstový faktor  $\beta 1$  (TGF-  $\beta 1$ ), hepatocytární růstový faktor (HGF), a také prostřednictvím galektinů (Deans a Moseley, 2000). PGE2 je důležitým faktorem inhibice T lymfocytů. Nižší hladina TGF-  $\beta 1$  způsobuje nárůst protizánětlivých Th buněk (Mattar a Bieback, 2015).

V současné době existuje pouze experimentální léčba některých nemocí jako například Alzheimerova choroba (Turgeman, 2015), Parkinsonova nemoc (Cerri et al., 2015) či srdeční a jaterní selhání využívající kmenové buňky. Dalším příkladem klinických experimentálních aplikací kmenových buněk je použití epidermálních kmenových buněk na popálená místa a jejich využití na kožní náhrady. MSCs se experimentálně používají na obnovu tkání po srdečních chorobách, infarktu, po kostních zlomeninách a na některé druhy rakoviny. Hematopoetické kmenové buňky jsou testovány na onemocnění jako je anémie a hemofilie (Serakinci a Keith, 2006). MSCs byly také experimentálně použity k léčbě fulminantního selhání jater u hlodavců. Tato nemoc je charakteristická postupným odumíráním většiny hepatocytů a léčba je prováděna pouze transplantací jater. Bylo zjištěno, že po injekci MSCs do jater hlodavců způsobilo zmírnění patologických změn, snížení hepatocytové smrti, zlepšení zdravotního stavu i u jedinců v konečné fázi onemocnění (Farini et al., 2014). Bylo zjištěno, že MSCs mohou být také indukovány k tomu, aby se diferencovaly do hepatocytů (Al Ghrbawy et al., 2015). Petersen et al. (1999) uvádí, že buňky z kostní dřeně, které byly transplantovány nemocné myši, byly schopné diferenciaci v hepatocyty nebo v jaterní oválné kmenové buňky. K jejich indukci je potřeba HGF a fibroblastový růstový faktor 4 (FGF-4) (Al Ghrbawy et al., 2015). Bylo zjištěno, že HGF podněcuje u hemopoetických kmenových buněk proliferaci na hepatocytární linii a tím se do jisté míry podílí na regeneraci a obnově jaterní tkáně (Oh et al., 2000).



### **3.5 Problémy využití kmenových buněk**

Existuje mnoho etických otázek ohledně výzkumu spojeného s kmenovými buňkami. Etické problémy jsou spojovány s používáním kmenových buněk především embryonálních kmenových buněk (de Wert a Mummery, 2003). Tyto buňky jsou získávány z již existujících embryonálních buněčných linií, které jsou při odběru kmenových buněk zničeny. Naskytá se zde otázka, zda-li je embryo považováno již za hodnotný lidský život, a zda-li má člověk právo do něj zasahovat. Kmenové buňky získané z embryí, která nejsou využita při umělém oplodnění na IVF klinikách, nejsou tolik kontroverzní, ale i přesto vyvolávají pochybnosti, přestože mnoho embryí je stejně předurčeno k likvidaci (Daar et al., 2004). Argumenty podporující použití embryonálních kmenových se opírají o to, že embryo nemá vyvinuté orgánové soustavy, nemá nervovou soustavu a nemůže být prohlášené za žijícího tvora. Například v Belgii je získávání kmenových buněk z embryí povoleno (Harris et al., 2005). Proti používání těchto buněk stojí argumenty, které v terapii kmenovými buňkami embryonálního původu vidí neúctu k lidskému životu a přerušení původního určení buněk embrya ke vzniku člověka. Zisk ESC by tedy měl být zajištěn tak, aby nedošlo ke zničení embrya nebo izolací dospělých kmenových buněk (Kogler et al., 2004).

Buňky podobné embryonálním kmenovým mohou být izolovány z abortovaných plodů. Toto zahrnuje další etickou otázku cíleně řízených potratů pro získání kmenových buněk (Daar et al., 2004). Na rozdíl od embryonálních nejsou dospělé kmenové buňky tématem těchto etických problémů a mohou se stát jejich vhodnou alternativou. Ani indukované pluripotentní kmenové buňky zatím nejsou předmětem etických otázek.

### **3.6 Játra**

Játra jsou jedním z nejdůležitějších orgánů člověka. S výjimkou kůže jsou také největším orgánem. Zajišťují mnoho funkcí v těle, od metabolismu látek jako jsou sacharidy, lipidy nebo aminokyseliny, přes skladování glukózy ve formě glykogenu, udržování stálé hladiny glykémie, vylučování a detoxikace metabolitů či toxinů a také ovlivnění termoregulace. Jsou důležitým místem degradace hemoglobinu a je zde vytvářena žluč, potřebná k trávení lipidů. Vzhledem k nespočtu funkcí v organismu jsou játra nezbytným orgánem pro život (Langmeier et al., 2009).

### 3.6.1 Anatomie jater

Játra jsou u člověka uložena v pravé části břišní dutiny v podbráničním prostoru. Jsou trojúhelníkového tvaru a mohou dosahovat hmotnosti 1200 až 1800 gramů v závislosti na pohlaví. Na celém povrchu jsou kryta vazivovým pouzdrém *capsula Glissoni*. U člověka játra tvoří čtyři laloky – pravý, levý, čtverhranný a oválný. Členění laloků může být u různých druhů savců odlišné, například u prasete můžeme rozeznat laloků šest, kdy jsou pravý a levý lalok rozděleny na dva (Monga, 2010).

Krev je do jater přiváděna pomocí dvou cest. 80 % krve je přiváděno přes vrátnicovou žílu (*vena portae*), zbylá krev je vedena přes jaterní tepnu (*arteria hepatica*). Vrátnicová žíla zajišťuje funkční oběh jater, přivádí odkysličenou krev z orgánů, která je bohatá na živiny. Jejím postupným větvením se krev dostává až do portální triády a přes jaterní sinusoidy se dostává k centrální véně (*vena centralis*). Centrální větvy se spojují a krev je vedena přes jaterní žíly (*vena hepatica*) do dolní duté žíly. Jaterní tepnou se do jater dostává zbylý objem krve. Po jejím větvení na interlobulární arterie se okysličená krev dostává do sinusoid, kde se částečně mísí s odkysličenou krví z vrátnicové žíly. Poté je krev vedena od periferie jaterního lalůčku k jeho centru (Junqueira et al., 1997).

### 3.6.2 Histologická stavba jater

Základní stavební jednotkou jaterního parenchymu je jaterní lalůček. Je to šestiúhelníkový útvar s centrální vénou, který je obklopený portobiliárním prostorem. U prasete jsou jaterní lalůčky ještě odděleny tenkou vazivovou vrstvou, na rozdíl od lidských, které mezi sebou nemají přesně definované hranice. Portobiliární prostor jaterního lalůčku je místem, kde jsou uloženy portální triády. Na jeden lalůček připadá zhruba 3-6 portálních triád, které jsou tvořeny portální žílou (*vena portae*), jaterní tepnou (*arteria hepatica*) a žlučovodem (Peng et al., 2016). V okolí triád se často objevují lymfatické buňky, zejména Kupfferovy buňky s makrofágovou aktivitou (Senoo et al., 2010). K centrální véně se sbíhají trámce hepatocytů. Žluč vytvořená v hepatocytech stéká k periférii lalůčku, kde vstupuje do intralobulárních žlučovodů a pak do žlučovodů v triádách. Ty všechny potom zesilují a splývají v jaterní vývod (*ductus hepaticus*), kterým opouštějí játra do místa uložení – žlučníku (Junqueira et al., 1997).

### 3.6.3 Typy jaterních buněk

Hepatocyty představují největší zastoupení buněk v jaterním parenchymu. Zajišťují velké množství funkcí a jsou hlavními metabolickými buňkami jater. Jsou šestiúhelníkového tvaru a jejich velikost se pohybuje mezi 20 - 30  $\mu\text{m}$ . Obsahují jedno až dvě jádra, jádérka a mají výrazné zastoupení jiných buněčných organel jako endoplazmatické retikulum, mitochondrie a Golgiho aparát. Kromě vytváření žluče z metabolických látek v krvi, je v hepatocytech produkováno velké množství krevních proteinů jako je albumin, protrombin či fibrinogen. Hepatocyty slouží také jako místo deaminace aminokyselin (Ling et al., 2012).

Dalším druhem buněk vyskytujícím se v jaterním parenchymu jsou Kupfferovy buňky. Jsou odvozeny od mononukleárních kmenových buněk uložených v kostní dřeni, které se do krve dostávají ve zralé formě jako monocyty. Ty se poté dostávají krevním řečištěm do jater, kde jsou diferencovány na Kupfferovy buňky (Campion, 2008). Tyto buňky nemají pravidelný tvar a působí jako makrofágy s fagocytární a cytotoxickou aktivitou. Jsou schopny fagocytovat nebo inaktivovat bakterie a další cizorodé látky. Spolu s NK buňkami a dendritickými buňkami představují důležitou imunitní obranu proti patogenům (Bilzer et al., 2006). Mají dlouhou životnost v řádu až několik měsíců a mohou být nahrazeny nově vzniklými buňkami z kostní dřene. Podílejí se také na odstranění odumřelých erytrocytů a degradaci hemoglobinu, která ještě pokračuje v hepatocytech. S těmito buňkami spolupracují další druhy lymfatických buněk, tzv. Pit buňky, které fungují jako NK buňky a mají výraznou cytotoxickou aktivitu (Peng et al., 2016).

Dalším typem jaterních buněk jsou Itovy buňky, které se vyznačují svým typickým hvězdicovitým tvarem. Jsou to buňky s velkými vakuolami, které jsou vyplněné lipidy a slouží tak jako lipidový rezervoár (Uetsuka et al., 2005). Mají také schopnost uchovávat velké zásobní množství vitamínu A v podobě retinyl esteru. Jsou tak důležitým regulátorem stálé hladiny vitamínu A. Hvězdicovité buňky jsou také v některých studiích považovány do jisté míry za škodlivé, přispívají totiž k rozvoji fibrotizace jaterní tkáně, která může postupně vést až k cirhóze (Senoo et al., 2010).

### 3.6.4 Funkce jater

Úloha jater v lidském těle je nezaměnitelná. Jejich hlavním úkolem je udržet stálou hladinu vnitřního prostředí. Zasahují do metabolismu mnoha látek, jako například sacharidů, tuků, aminokyselin a proteinů (Han et al., 2016). Mezi jejich hlavní metabolickou funkci lze zařadit udržování stálé hladiny glukózy v krvi v rozmezí 3,5-5,6 mmol/l. Hladinu glykémie

játra udržují přeměnou glukózy na zásobní glykogen a jeho ukládáním do hepatocytů při hyperglykémii nebo degradací glykogenu a uvolnění glukózy do krve při hypoglykémii. Proces, při kterém se v játrech tvoří zásobní glykogen, se nazývá glykogeneze, jeho odbourávání označujeme jako glykogenolýzu (Woerle et al., 2003). Obsah glykogenu v játrech klesá v průběhu noci a nejnižší hodnoty dosahuje před snídaní, naopak po jídle jeho hladina prudce stoupá. Při vyčerpání zásob glykogenu nebo při hladovění může být pro tvorbu glukózy použit jiný, necukerný zdroj, jako například různé prekurzory glukózy, zejména glycerol, alanin, laktát či mastné kyseliny. Tento proces vytváření glukózy je označován jako glukoneogeneze (Han et al., 2016). Laktát a alanin musí být nejdříve převedeny na pyruvát, který je dále karboxylován na oxalacetát a fosfoenolpyruvát syntetizující glukózu (Consoli et al., 1987).

Játra jsou také místem metabolismu lipidů. Ten probíhá i na jiných místech v těle, ale v játrech má větší intenzitu. Probíhá zde beta oxidace mastných kyselin, které následně slouží jako zdroj při glukoneogenezi (Han et al., 2016). Mastné kyseliny vznikají lipogenezí z přebytečných sacharidů. Nadbytek mastných kyselin je z těla odstraněn v podobě ketoláték. Játra hrají také důležitou úlohu při metabolismu lipoproteinů, syntetizují se zde lipoproteiny VLDL a HDL (Ling et al., 2012). Jsou také místem syntézy cholesterolu a probíhá zde detoxikace amoniaku. Játra jsou také důležitým místem tvorby žluči, která vzniká z přebytečného cholesterolu. Žluč je významná při trávení lipidů a napomáhá jejich emulgaci. Také se s ní vylučují některé látky jako cholesterol a metabolity ven z těla. Žlučové kyseliny tedy napomáhají vstřebávání tuků a také vitamínů. V játrech probíhá také degradace cizorodých látek. Jako příklad můžeme uvést metabolismus ethanolu. Kromě metabolických funkcí se v játrech skladují důležité látky jako některé vitamíny A, D, B12 a také železo, měď či kobalt. Vylučovací funkce jater je důležitá k vyloučení bilirubinu, který se do jater dostane navázan na albuminy. V játrech je od nich odloučen a je převeden do žluče na vyloučení (Woerle et al., 2003).

Jaterní tkáň postihuje mnoho různých onemocnění, které ovlivňují její funkce. Mezi časté příčiny dlouhotrvajících nemocí jater patří konzumace nadměrného množství alkoholu či vliv toxických látek. Důsledkem nemocí jater může být také jaterní selhání. Při neléčení může být životu nebezpečné, protože játra přestávají normálně fungovat a dochází k narušení životních funkcí celého těla (Whitehouse a Wendon, 2013). Mezi další onemocnění postihující jaterní tkáň patří steatóza. Studie Jianga et al. (2014) se zabývala možným vlivem aplikace bisfenolu A v prenatálním vývoji na pozdější výskyt steatózy v dospělém věku. Bisfenol narušuje funkci jaterních mitochondrií a tím ovlivňuje ukládání lipidů do hepatocytů.

To by mohlo být významnou příčinou výskytu tohoto onemocnění u lidí. Játra jsou také místem výskytu nádorů. Není výjimkou, že jaterní nádory jsou důsledky metastázování z jiných orgánů a to zejména ze slinivky břišní (Sun et al., 2016). Některé studie naznačují vztah mezi jaterními kmenovými buňkami a rakovinou jater. Jaterní kmenové buňky mohou být zdrojem pro rozvoj rakoviny, která může vzniknout při jejich mutaci, ke které mají sklon, když se špatně diferencují (Zhi et al., 2016). Mezi takovéto nádory patří hepatoblastomy, které patří k častým nádorům dětí (Xu et al., 2015).

### **3.7 Hepatocyt**

Nejdůležitějšími buňkami jater jsou hepatocyty, které zaujímají až dvě třetiny jaterního parenchymu. Tyto šestiúhelníkové buňky v játrech zajišťují mnoho důležitých metabolických dějů, endokrinních a sekrečních funkcí.

#### **3.7.1 Stavba hepatocytu**

Jak již bylo zmíněno v kapitole o jaterních buňkách, hepatocyty jsou buňky, které mohou obsahovat více jader, některé buňky mohou obsahovat až dvě oválná jádra. V jejich cytoplazmě můžeme také nalézt velké množství buněčných organel, zajišťujících mnoho metabolických funkcí. Na membráně hepatocytu lze z hlediska polárního rozdělení najít tři různé oblasti – bazální (sinusoidní), přívádějící krev vrátnicové žíly a jaterní tepny, apikální, kde se vyskytují žlučové kanálky a laterální, na které se vyskytuje řada spojů gap junctions, které zajišťují komunikaci mezi jednotlivými hepatocyty (Monga, 2010).

V jaterním lalůčku jsou hepatocyty rozděleny do tří zón z hlediska vzdálenosti od centrální žíly. Hepatocyty v první zóně, nejbližší cévě přinášející krev, jsou nejvíce ovlivněny změnami v aktuálním krevním složení. Například při otravě toxickou látkou budou právě tyto hepatocyty prvními poškozenými buňkami v lalůčku. Jsou také prvními hepatocyty, které odbourávají glykogen při hladovění. V druhé a třetí zóně reagují na tyto vlivy hepatocyty až z druhé vlny. U těchto hepatocytů se nejdříve projeví nedostatek kyslíku v krvi, neboť se k nim krev dostává postupně přes zónu jedna a dvě (Junqueira, 1997).

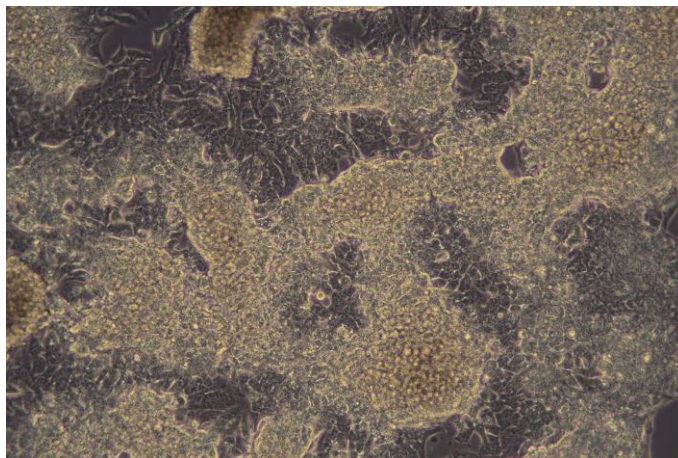
#### **3.7.2 Organely hepatocytu a jejich funkce**

Jaterní buňka obsahuje velké množství mitochondrií, v jednom hepatocytu lze nalézt až 2000 mitochondrií. Mají také hojné zastoupení hladkých a hrubých endoplazmatických retikulí a Golgiho aparátu.

Endoplazmatické retikulum v hepatocytech zajišťuje vylučování látek z těla. V hladkém endoplazmatickém retikulu probíhá přeměna ve vodě nerozpustného bilirubinu, vzniklého degradací hemoglobinu za pomoci Kupfferových buněk, na rozpustnou formu bilirubin-glukuronid, který je odváděn do žluče a poté vyloučen ven z těla. Nedostatečné odvádění bilirubinu může mít za následek vznik žlučových kamenů. Neprůchodnost žlučových cest může vést ke žloutence.

### 3.7.3 Linie HepG2

Lidské hepatocyty se staly základním modelem pro řadu cytotoxických studií a jsou na nich zkoumány účinky vyvíjených léků. Nicméně jejich omezená dostupnost a krátká životnost značně komplikuje jejich použití. Vhodnou alternativou se zdá být linie lidských hepatocytů HepG2, odvozená od jaterního hepatomu (Obrázek 3), která je dnes používána při řadě xenobiotických experimentů (Jennen et al., 2010). Použití HepG2 se uplatňuje i k posouzení vlivů endokrinních disruptorů, jako například bisfenolu A či F (Dumont et al., 2011), kde simulují skutečné projevy hepatocytů. HepG2 se ale od primárních hepatocytů lehce odlišují. Narozdíl od nich obsahují ve většině případů pouze jedno jádro a mají omezenou metabolickou aktivitu. Pravděpodobně také mají méně specifických enzymů než primární hepatocyty. (Wilkening et al., 2003).

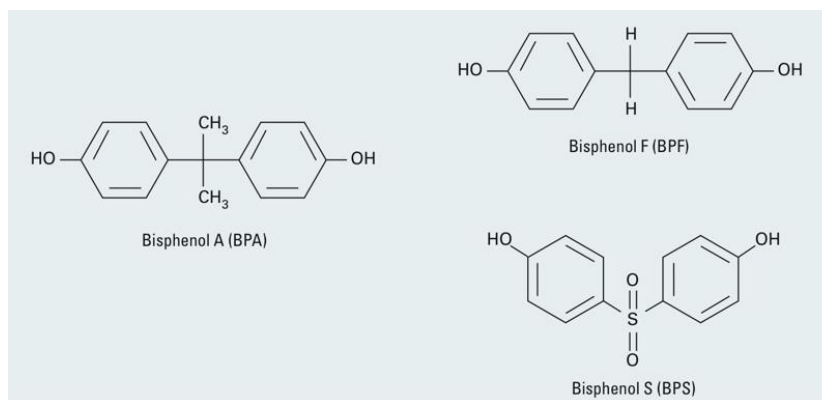


**Obrázek 3: Linie hepatocytů HepG2. Zvětšení 200x (Marešová, 2017).**

### 3.8 Bisfenoly

Mnohé studie zabývající se problematikou poruch plodnosti a reprodukce prokázaly, že za posledních 60 let došlo ke zvýšení výskytu rakoviny a vývojových vad reprodukčního ústrojí (Fenichel et al., 2013). Bylo také zjištěno, že došlo k poklesu kvality a množství mužských spermií a k nárůstu vývojových vad pohlavních orgánů, jako například kryptorchizmu (Sharpe, 2003). Tato zjištění jsou přisuzována látkám ze skupiny endokrinních disruptorů. Endokrinní účinky těchto průmyslových látek byly prokázány také u divoké zvěře (Maffini et al., 2006) a některé studie prokázaly, že zvýšení těchto hormonálních látek koreluje s inhibicí růstu rostlin (Wang et al., 2015).

Bisfenoly jsou skupina chemických látek organického původu, které patří do endokrinních disruptorů, které mají estrogení efekt na organismy (Naik a Vijayalaxmi, 2009). Tyto chemikálie jsou známy jako difenylamety, které obsahují dva benzenové kruhy oddělené jedním centrálním atomem uhlíku, jako je tomu u bisfenolu A. U některých druhů bisfenolů je centrální atom uhlíku nahrazen jinou chemickou skupinou, jako je tomu například u bisfenolu S, kde se vyskytuje sulfon (obrázek 4). Bisfenoly jsou dnes používány jako komponenty při výrobě plastů a epoxidových pryskyřic, které jsou přítomny v ochranných nátěrech, plechovkách, konzervách a také v nápojových kartonech a pesticidech (Tiwari et al., 2012). Z těchto látek se bisfenoly mohou uvolňovat do potravin nebo se dostat do životního prostředí. Zde se mohou stát kontaminantem vody a půdy, ze kterých mohou být absorbovány do zemědělských produktů a dostanou se tak zpět k lidským spotřebitelům. V neposlední řadě se z průmyslových výrobků dostávají do lidské populace, kde jim bývá přisuzován negativní účinek na reprodukční funkce a vývoj zárodků (Gould et al., 1998).



Obrázek 4: Chemická struktura bisfenolu A, F a S (Rochester a Bolden, 2015).

### 3.8.1 Výskyt bisfenolů v prostředí

Člověk ročně vyprodukuje nespočetné množství znečišťujících a toxických látek, které ohrožují naše životní prostředí. Pouze malá část z nich je bezpečně odstraněna z prostředí, ostatní látky jsou významným ekologickým problémem dneška. Většina kontaminantů se poté vyskytuje v půdě, pitné vodě a ovzduší. Bisfenoly a další endokrinní disruptory se do prostředí dostávají ze zemědělských objektů, statků a továren.

Bisfenol A je mírně rozpustný, může se tedy z plastů snadno uvolňovat do vody, a může být absorbován do půdních sedimentů (Staples et al., 1998). Dle Fromme et al. (2002) byl bisfenol A nalezen ve většině vzorků vody a ve všech odpadních čistírenských kalech, které byly zkoumány. Z 35 vzorků sedimentů, byl bisfenol A nalezen u 30 z nich. Jako pokusné organismy při sledování toxicity vody byly využity ryby, řasy a bezobratlí. Bylo zjištěno, že největší citlivost k bisfenolům mají řasy. Výsledky studií však poukazují na relativně nízkou hladinu bisfenolů v povrchových vodách. Bisfenol A byl také zjištěn na odpadních skládkách z degradovaných plastů, odkud se může dostávat do okolí (Yamamoto a Yasuhara, 1999).

Nejen bisfenol A je uvolňován do okolního prostředí, bylo zjištěno, že také bisfenol F je v nízkých koncentracích přítomen v čerstvých sedimentech řek a v povrchových vodách (Fromme et al., 2002). Byl také detekován v pitné vodě, kam se mohl dostat z epoxidových pryskyřic, které jsou běžně používány při stavbě vodovodního potrubí. Koncentrace bisfenolu F v prostředí však byly výrazně nižší než u bisfenolu A.

Bisfenol S se jeví jako menší hrozba pro lidské zdraví, jeho negativní účinky se zdají být slabší než u bisfenolu A (Rochester a Bolden, 2015). Hlavním problémem uvolňování bisfenolu S do prostředí je jeho špatná degradovatelnost. Narozdíl od bisfenolu A nebo F se



může v prostředí hromadit po dlouhou dobu. Dle Danzla et al. (2009), mohou být bisfenoly A a F biologicky dobře degradovatelné na mořském dně, bisfenol S však tímto způsobem degradován není.

### 3.8.2 Bisfenol A

Bisfenol A, 2,2 bis (hydroxyfenyl) propan, byl v roce 1891 původně vyroben jako syntetický estrogen, nebyl však použit k praktickému užívání, neboť jeho estrogenní účinek byl asi 10 tisíc krát nižší než 17 beta-estradiol (Rubin et al., 2001). K rozšíření jeho používání po několika letech výrazně napomohlo recyklování papíru. Od poloviny 20. století se rychle stal běžnou součástí při výrobě plastů, plastových obalů a pryskyřic (Rubin, 2011). Bylo zjištěno, že bisfenol A může v lidském těle napodobit účinky estrogenu a že může způsobovat nebo přispívat k mnohým poruchám plodnosti (Gould et al., 1998). Bylo zjištěno, že větší absorpce bisfenolu A kůží, může zvýšit riziko poškození jater a ledvin nebo jiných orgánů v těle. Bylo zjištěno, že vyšší hladina bisfenolu A byla naměřena u skupiny lidí pracujících s účtenkovými papíry, jako například pokladní, neboť je tato látka součástí účtenkového papíru (Pivnenko et al., 2015). Více bisfenolu A v moči měli také lidé kouřící cigarety. Bisfenol A má velmi krátký poločas rozpadu (zhruba 6 hodin) a z organismu se tedy dostává velmi rychle. Přesto za tak krátkou dobu působení dokáže poškodit vývoj plodu a to i v malých dávkách (Rubin et al. 2001). Nagawa a Tayama (2000) zjistili, že bisfenol A je v hepatocytech rozložen na hlavní konjugát glukuronid a na další méně důležité metabolity. Jako glukuronid, který se dále vyskytuje v moči, je z těla odstraněno mnoho toxických látek. Bisfenol A je rychle glukurován v hepatocytech a odstraněn ven z těla (Takeuchi et al., 2014). Bylo zjištěno, že i přes velmi rychlé detoxikační operace v hepatocytech, byl při nízkých koncentracích bisfenol A zjištěn i po delším časovém období, látka byla stále mírně cytotoxická. Toxicita bisfenolů je zřejmě závislá na délce uhlovodíku mezi fenolovými skupinami.

Jelikož je však bisfenol A součástí většiny užívaných plastových výrobků, kontakt s touto látkou může být nepřetržitý. V současné době je bezpečná hladina příjmu bisfenolu A stanovena na 50mg/kg/den. Negativní účinky u potkanů byly zjištěny již při dávkách 10mg/kg/den (Castro et al., 2015). Welshons et al. (2005) zjistili, že bisfenol A může narušit sekreci žláz i při dávce 20 mg/kg.

V poslední době je zkoumán jeho vliv na zvýšení hmotnosti, obezitu a nemoci s ní spojené (Welshons et al., 2005). Rubin a Soto (2009) tvrdí, že bisfenol A má vliv na mechanismy, které regulují hmotnost, ukládání lipidů a stálou hladinu glukózy v krvi. Bylo prokázáno, že vyšší hladina bisfenolu A byla spojena s výskytem kardiovaskulárních chorob a

diabetu (Laang et al., 2008). Po několika studiích, zabývajících se jeho negativním vlivem na lidské zdraví, je bisfenol A postupně nahrazován jinými komponenty, jako je například bisfenol S nebo bisfenol F. Bisfenol S v dnešní době nahrazuje bisfenol A v papírenském průmyslu, byl v menším množství nalezen v účtenkách nebo lepenkových krabicích (Pivnenko et al., 2015).

### **3.8.3 Bisfenol F**

Bisfenol F, bishydroxyfenyl (nebo 4,4 dihydroxyfenyl) metan, je analogem bisfenolu A, který má podobné využití jako bisfenol A. Uplatňuje se při výrobě plastů, laků, nátěrů, pryskyřic a také v lékařství, kde se vyskytuje jako složka zubních tmelů a protetických pomůcek (Leepipatpiboon et al., 2005). Bisfenol F patří jako jiné bisfenoly také mezi potenciální potravinové kontaminanty, do kterých se dostává z potravinových obalů a folií. Byl nalezen v konzervovaných potravinách a to dokonce v třikrát větším množství než bisfenol A (Jordakova et al., 2003). Bylo prokázáno, že bisfenol F má také podobné estrogení účinky na organismy. Dle Cabatona et al. (2006) je bisfenol F snadno prostupný přes placentární bariéru březích myší do myších zárodků. Při cytotoxických studiích na hepatocytech HepG2 bylo zjištěno, že bisfenol F má v porovnání s jinými bisfenoly střední toxický účinek, a že buňkami je lépe metabolizován než bisfenol A (Audebert et al., 2011).

### **3.8.4 Bisfenol S**

Bisfenol S, 4,4 dihydroxydifenylsulfon, je analogem bisfenolu A, který jej postupně nahrazuje při výrobě veškerých plastových výrobků. Tzv. BPA free produkty tedy zaručují nepřítomnost bisfenolu A, obsahují však jiný druh bisfenolu. Bisfenol S byl nalezen v produktech běžně používaných v domácnosti, jako jsou šampony, laky, make-up a zubní pasty. Bylo zjištěno jeho malé množství jako složka papírových produktů, jako jsou účtenky, stvrzenky anebo letenky a také v potravinách, mléčných výrobcích, mase, zelenině či cereáliích (Rochester a Bolden, 2015). Je důležité zmínit, že žádné náhražky původního bisfenolu A nebyly testovány na vedlejší účinky před tím, než byly vytaveny na trh.

O tom, zda-li je bisfenol S správnou náhražkou bisfenolu A, se vedou značné spory, zvláště po výsledcích několika experimentů, zabývajících se touto problematikou. Viñas and Watson (2013) ve své studii zjistili, že bisfenol S má stejný estrogení potenciál jako bisfenol A a může ovlivňovat endokrinní funkce v organismu a přispívat tak k poruchám plodnosti. Dle Naderiho et al. (2014) bisfenol S negativně ovlivňuje reprodukční funkce u ryb *Dania Magna*, u kterých se při přítomnosti této látky ve vodě navýšil počet samičích jedinců na úkor

samčích, také byly pozorovány změny v délce jejich těla, změny v koncentracích estradiolu a testosteronu, nižší počet spermií a tak celkové snížení kvality plodnosti a reprodukce. Některé studie se zabývaly vlivem bisfenolu S na jiná než reprodukční onemocnění a to na zvýšený výskyt diabetu.

### **3.8.5 Vliv bisfenolů na játra**

Játra hrají významnou úlohu při udržování homeostáze a jsou centrem metabolických dějů v těle. Proto je pravděpodobné, že bude právě tento orgán ovlivněn bisfenoly i v menších dávkách. Potenciální toxicita bisfenolů v jaterní tkáni se stala tématem mnoha pokusů a vědeckých studií. Shangai et al. (2012) ve svých pokusech na myších prokázali, že po každodenní aplikaci bisfenolu A po dobu 30 dnů narůstá u myši hmotnost a velikost jater. Byla zjištěna zvýšená degenerace a nekróza v jaterní a tkáni a také celková jaterní nekompatnost. Huc et al. (2012) uvádí, že bisfenoly, respektive bisfenol A, můžou v nízkých koncentracích způsobit snížení mitochondriální aktivity jaterních hepatocytů a také ovlivnit ukládání lipidů v hepatocytech HepG2 linie. Snížení mitochondriální aktivity po účinku bisfenolu A bylo potvrzeno i ve studii Khan et al. (2015). Dle tohoto pokusu bisphenol A přispívá k oxidačnímu stresu. Oxidativní poškození mitochondrií v hepatocytech souvisí s jaterními nemocemi, jako je chronická hepatitida C nebo steatóza jater.

Bisfenolům je také přisuzován vliv na rozvoj dalších jaterních obtíží. Dle DeBenedictis et al. (2015) se bisfenoly podílejí na vzniku jaterních nádorů či metabolických poruch. Tyto látky způsobují značné snížení aktivity mitochondriálních enzymů a to může vést ke zvýšení oxidativního stresu. Byly zjištěny histologické změny na hepatocytech po působení bisfenolu A, ty vykazovaly rozsáhlou degeneraci, edém nebo krvácení. Nakagawa a Tayama (2000) tvrdí, že v pokusech ověřujících cytotoxické účinky bisfenolu A a dalších bisfenolů na krysích hepatocytech, byly největší změny zjištěny po aplikaci diethylstilbestrolu a bisfenolu A. Ty u buněk způsobovaly až 54 % pokles viability. Sníženou viabilitu potkaních hepatocytů po ovlivnění bisfenolem prokázala i studie Moon et al. (2012).

Určitý vliv na jaterní tkáň mají bisfenoly již v prenatálním období. Bylo zjištěno, že prenatální působení bisfenolu A u jater myši může ovlivnit ukládání lipidů v hepatocytech během dospělosti a u jedinců je zaznamenán zvýšený výskyt steatózy jater (Jiang et al., 2014). U fetálních jater byla také snížena produkce albuminu, který se objevuje mezi prvními proteiny a je považován za znak jaterního zranění (DeBenedictis et al., 2015). Bisfenol A tedy může narušit biochemické pochody v játrech během fetálního vývoje.

### 3.8.6 Další negativní vlivy bisfenolů

Negativní účinky bisfenolů jsou často spojovány s reprodukčními poruchami. V pokusech na zvířatech bylo prokázáno mnoho účinků na reprodukční soustavu. Například u samičího potomstva myší, vystavených za březosti bisfenolu A, došlo ke změnám na pohlavních orgánech, hlavně k jejich zvětšení a zmožutnění (Sugiura-Ogasawara et al., 2005). Podobných výsledků bylo dosaženo i u jiných pokusů na březích myší. Rubin et al. (2001) zjistil, že se bisfenol A podílí na změnách v estrálním cyklu myší, které se narodily samicím ovlivněných za březosti touto látkou. Kromě poruch estrálních cyklů byl zjištěn také pokles hladiny luteinizačního hormonu v plazmě, což mělo za následek snížení počtu ovulovaných oocytů (Rubin et al., 2001). Cabaton et al. (2006) ve své studii zjistil, že po aplikaci bisfenolu F březím kryšám, byly i po čtyřech dnech od podání zjištěny residua bisfenolu F ve všech testovaných tkáních, jako děloha, placenta i plod. To, že jsou bisfenoly schopné ovlivnit vývoj plodu, bylo prokázáno v mnoha studiích (Newbold et al., 2007). Dle Eladak et al. (2015) mají bisfenoly nahrazující bisfenol A podobný antiandrogenní účinek. V pokusech na potkanecích a myších se bisfenol A podílel na dřívějším nástupu puberty u samic a podílel se na zvyšování celkového procenta neplodnosti. U samců zvyšoval výskyt agresivního chování a projevů úzkosti. Bisfenolům je přisuzováno i mnoho jiných negativních účinků. V poslední době se poukazuje na možnou souvislost vyšší hladiny bisfenolů se zvyšováním lidské hmotnosti a výskytem obezity. Rubin a Soto (2009) uvádí, že potomci březích myší, vystavených za březosti bisfenolu A v pitné vodě, vykazovali větší nárůst hmotnosti než kontrolní jedinci. Větší hmotnost byla zjištěna i u potomků, kterým byl bisfenol A podáván postnatálně. U skupiny zvířat, kterým byla podána nižší dávka bisfenolu, byla zjištěna větší hmotnost, než u zvířat s nižšími dávkami. Svými pokusy propaguje tvrzení, že bisfenol A zvyšuje celkový obsah lipidů v tkáních a podporuje jejich ukládání do HepG2. Héliés-Toussaint et al. (2014) se také zabývaly problematikou bisfenolu S a výskytu obezity. Při svých pokusech bisfenol S aplikoval na hepatocytech linie HepG2. Výsledky byly poté porovnány s účinky stejné koncentrace bisfenolu A. Bylo zjištěno, že obě chemické látky mají podobný potenciál ke zvyšování ukládání lipidů v buňkách. Tyto poznatky ukazují na to, že bisfenol S může mít stejné účinky na výskyt obezity u lidské populace jako bisfenol A a jeho používání nemusí vyřešit tento problém.

Pozitivní vztah mezi hladinou bisfenolu A v moči a výskytem diabetu byl zjištěn i ve studii Wanga et al. (2011). Zde bylo zjištěno, že skupiny lidí s nejvyšší hladinou bisfenolu A v moči, měli sklon a predispozice k obezitě a výskytu cukrovky. Alonso-Magdalena et al.

(2006) zjistili, že u myší, kterým byly podány nízké dávky bisfenolu A, klesla hladina glukózy, která souvisí s vyšší hladinou inzulínu v plasmě. Po čtyřech dnech působení bisfenolu A byla u myší zjištěna hyperinzulémie, to může mít vliv na inzulínovou rezistenci a vznik diabetu. Přítomnost inzulínová rezistence varuje před budoucím vznikem diabetu druhého typu a výskytem kardiovaskulárních chorob. Souvislost bisfenolu A s metabolickými poruchami a diabetem potvrdil i Silver et al. (2011) v moči u lidí.

## 4 Materiál a metodika

Experimentální část diplomové práce probíhala v laboratořích Biomedicínského centra, Lékařské fakulty UK v Plzni, za pomoci Ing. Lucie Vištejnové Ph.D. v termínu od srpna 2016 do března 2017.

### 4.1 Kultivace prasečích mezenchymálních kmenových buněk

Prasečí mezenchymální kmenové buňky (dále jen pMSCs) byly kultivovány v kultivačním médiu na 75 cm<sup>2</sup> plastové lahvi (Techno Plastic Products) v CO<sub>2</sub> inkubátoru o teplotě 37 °C. Kultivační médium obsahovalo alpha-MEM (Minimum Essential Medium, Biosera), 10 % FBS (Fetal Bovine Serum, Biosera), 0.6 ug/ml penicilinu, 1 ug/ml streptomycinu (Biosera) a 1 umol/l L-glutaminu (Biosera).

### 4.2 Kultivace linie hepatocytů HepG2

Hepatocyty linie HepG2 byly kultivovány stejně jako pMSCs v CO<sub>2</sub> inkubátoru o teplotě 37 °C. Byly kultivovány v HepG2 médiu na 25 cm<sup>2</sup> nebo 75 cm<sup>2</sup> plastové láhvi. Médium pro HepG2 bylo složeno z DMEM (Dubleccos Modified Eagle Medium, Gibco), 10 % FBS (Gibco), 1 μmol/l L-glutaminu (Biosera) a 0.6 μg/ml penicilinu a 1 μmol/l streptomycinu (Biosera).

### 4.3 Pasážování buněk

pMSCs i HepG2 byly nejprve vyndány z CO<sub>2</sub> inkubátoru do laminárního boxu, poté bylo odsáto staré kultivační médium a buňky byly opláchnuty 10 ml fosfátového pufru (PBS). Následně byl přidán 1 ml trypsin/EDTA 1x (Biosera) a buňky byly dány na 5 - 6 min do CO<sub>2</sub> inkubátoru. Poté bylo pod mikroskopem zkontrolováno, zda se buňky odlepily ode dna, a pokud ano, byly přidány 4 ml kultivačního média. Následovala centrifugace buněk (210 g, 10 min) a vzniklá peleta byla po odlití supernatantu resuspendována v 1 ml kultivačního média. Buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce a byla určena koncentrace buněčné suspenze (počet buněk/ml).

#### **4.4 Počítání buněk**

K buněčné peletě (pMSCs, HepG2) byl přidán 1 ml příslušného média a buňky byly důkladně resuspendovány v médiu. Poté bylo odebráno 10 ul do 1.5 ml zkumavky a bylo přidáno 190 ul trypanové modře (Sigma Aldrich), vše bylo řádně promícháno. Následně byla sestrojena Bürkerova komůrka, do které se z každé strany pod sklíčko aplikovalo 10 ul směsi buněk a trypanové modře.

Na každé straně komůrky v pěti čtvercích bez společné hrany a oddělených trojitou čarou bylo pomocí mikroskopu Olympus CKX41 (objektiv 10x) spočítáno množství buněk. Z těchto dohromady deseti hodnot byl udělán průměr a ten byl vynásoben 20x (koeficient ředění původní buněčné suspenze trypanovou modří). Získané číslo bylo vynásobeno konstantou  $10^4$  a výsledek dal koncentraci buněčné suspenze (počet buněk/ml).

#### **4.5 Příprava roztoků bisfenolu S**

Pro ovlivňování buněk bisfenolem S (BPS) byly připraveny různě koncentrované roztoky bisfenolu S (Sigma Aldrich). Pro pMSCs byl roztok připraven z BPS a média pMSCs a pro HepG2 z BPS a média HepG2. BPS bylo testováno v koncentracích 1000, 500, 250, 100, 10, 1  $\mu$ M. Zásobní roztok BPS v DMSO měl koncentraci 100 mM.

#### **4.6 Nasazení pMSCs na pokus a jejich ovlivnění roztoky BPS**

pMSCs byly kultivovány dle kapitoly 4.1, pasážovány dle 4.3 a spočítány dle 4.4. Pro pokusy byly použity 96 jamkové panely (TPP). pMSCs byly nasazovány v hustotě 6 000 buněk na jamku v objemu kultivačního média 150 ul dle schématu (Tabulka 1). Druhý den byly pMSCs ovlivněny roztoky BPS, kdy bylo nejprve odsáto staré pMSCs médium a následně bylo přidáno 150  $\mu$ l roztoku BPS o dané koncentraci (4.5). Panely byly poté vráceny zpět do CO<sub>2</sub> inkubátoru. Po 24, 48 a 72 hod byla měřena viabilita (4.9) pMSCs. V den ovlivňování buněk byla změřena viabilita neovlivněných pMSCs (= 0 hod).

#### **4.7 Nasazení HepG2 na pokus a jejich ovlivnění roztoky BPS**

HepG2 byly kultivovány dle kapitoly 4.2, pasážovány dle 4.3 a spočítány dle 4.4. HepG2 byly nasazovány v hustotě 20 000 buněk na jamku v objemu kultivačního média 150  $\mu$ l dle schématu (Tabulka 1). Druhý den byly HepG2 ovlivněny roztoky BPS, kdy bylo odsáto HepG2 médium a poté bylo přidáno 150  $\mu$ l roztoků BPS o dané koncentraci. Panely byly poté vráceny zpět do CO<sub>2</sub> inkubátoru. Po 24, 48 a 72 hod byla měřena viabilita (4.9) a proliferace

(4.10) HepG2. V den ovlivňování buněk byla změřena viabilita a proliferace neovlivněných HepG2 (= 0 hod).

**Tabulka 1: Schéma panelu nasazení a ovlivnění buněk pro metody viability a proliferace samotných pMSCs a samotných HepG2.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	kontrola (buňky v médiu)			blank (pouze médium)								
<b>B</b>	DMSO 1000 $\mu$ M											
<b>C</b>	BPS 1000 $\mu$ M											
<b>D</b>	BPS 500 $\mu$ M											
<b>E</b>	BPS 250 $\mu$ M											
<b>F</b>	BPS 100 $\mu$ M											
<b>G</b>	BPS 10 $\mu$ M											
<b>H</b>	BPS 1 $\mu$ M											

#### 4.8 Kokultivace pMSCs a HepG2 a jejich ovlivnění BPS

HepG2 byly kultivovány dle kapitoly 4.2., pasážovány dle 4.3 a spočítány dle 4.4. Buňky byly nasazeny v hustotě 20 000 buněk na jamku v objemu kultivačního média 150  $\mu$ l dle schématu v Tabulka 2. Buňky byly vloženy zpět do inkubátoru a kultivovány do druhého dne. Druhý den byly připraveny tři vybrané roztoky BPS v HepG2 médiu o koncentraci 1000, 500 a 250  $\mu$ M (4.5), které byly po odsátí starého kultivačního média přidány k HepG2 ve 150  $\mu$ l dle schématu (Tabulka 2). Panely byly poté přendány zpět do CO<sub>2</sub> inkubátoru a kultivovány do dalšího dne.

Třetí den byly připraveny buňky pMSCs. Ty byly kultivovány dle kapitoly 4.1, pasážovány dle 4.3 a spočítány dle 4.4. Poté byly připraveny suspenze pMSCs v roztocích BPS (koncentrace BPS 1000, 500 a 250  $\mu$ M) a v HepG2 médiu. Následovalo odsátí starého média od již kultivovaných a ovlivňovaných HepG2 a bylo přidáno 150  $\mu$ l suspenze pMSCs v roztocích BPS. Jako kontroly sloužily samotné HepG2 v roztocích BPS, samotné pMSCs v roztocích BPS, samotné pMSC v HepG2 médiu, samotné HepG2 v HepG2 médiu a směs pMSCs a HepG2 v HepG2 médiu (Tabulka 2). Panely byly poté vráceny zpět do CO<sub>2</sub> inkubátoru. Po 24, 48 a 72 hod byla měřena viabilita buněk (4.9) a koncentrace ATP v buňkách (4.11).



**Tabulka 2: Schéma panelu nasazení a ovlivnění HepG2 kokultivovaných s pMSCs.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	pMSCs			pMSCs 1000 uM BPS			HepG2 1000 uM BPS			pMSCs + HepG2 1000 uM BPS		
<b>B</b>	HepG2			pMSCs 500 uM BPS			HepG2 500 uM BPS			pMSCs + HepG2 500 uM BPS		
<b>C</b>	pMSCs + HepG2			pMSCs 250 uM BPS			HepG2 250 uM BPS			pMSCs + HepG2 250 uM BPS		
<b>D</b>	blank (pouze médium)			blank (1000 uM BPS)			blank (500 uM BPS)			blank (250 uM BPS)		
<b>E</b>												
<b>F</b>												
<b>G</b>												
<b>H</b>												

#### 4.9 Metoda měření buněčné viability Alamar Blue

Viabilita buněk byla měřena pomocí metody Alamar Blue využívající kit AlamarBlue Cell Viability Reagent (ThermoFisher Scientific). Bylo postupováno dle protokolu od výrobce. Ke 150  $\mu$ l média v každé jamce bylo přidáno 15  $\mu$ l AlamarBlue reagentu a buňky byly inkubovány 2 hod v 37°C. Poté bylo z každé jamky přepipetováno 150  $\mu$ l do černého 96 jamkového panelu a byla změřena intenzita fluorescence při excitaci 530nm a emisi 590nm pomocí destičkového readeru Synergy HT (Biotek). Buněčná viabilita byla měřena pro každý typ buněk a pro kokultivované buňky v 6 opakováních.

#### 4.10 Metoda měření buněčné proliferace pomocí barviva Hoechst

Proliferace buněk byla měřena současně s měřením buněčné viability, tedy ve stejných jamkách. Po 1.5 hod inkubace buněk s AlamarBlue reagentem bylo do každé jamky přidáno 3  $\mu$ l Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific) o finální koncentraci 1  $\mu$ g/ml a byla dokončena 2 hod inkubace. Hoechst 33342 je interkalační činidlo volně prostupující membránou živých buněk a po vazbě na dvoušroubovicovou molekulu DNA vydává fluorescenční signál. Po změření viability buněk bylo z každé jamky odebráno médium a jamky byly opláchnuty PBS. Poté bylo do jamek přidáno 220  $\mu$ l 1 % tritonu/EDTA a buňky byly lyzovány třepáním při 37°C po dobu 30 min. Poté byl panel zamražen na -80°C. Po zamražení všech časových bodů byly panely rozmrazeny a 200  $\mu$ l z každé jamky bylo přepipetováno do černých 96 jamkových panelů a byla změřena intenzita fluorescence při excitaci 350nm a emisi 461nm na destičkovém readeru Synergy H1 (Biotek). Proliferace buněk byla měřena v 6 opakováních.

#### 4.11 Metoda měření koncentrace ATP v buňkách

Koncentrace ATP v buňkách byla měřena pomocí kitu ATP Determination Kit (ThermoFisher Scientific). Nejprve byly buňky opláchnuty PBS a bylo přidáno 220  $\mu$ l 1% triton X/EDTA. Následovala inkubace 30 min při 37°C a třepání. Takto lyzované buňky byly zamrazeny na -80°C. Po nasbírání všech časových bodů byla v buněčných lyzátech změřena koncentrace ATP. Bylo postupováno dle protokolu od výrobce. Nejprve byl připraven reakční roztok obsahující D-luciferin, luciferázu, dithiothreitol (DDT) a reakční pufr (Tabulka 3).

**Tabulka 3: Složení reakčního roztoku pro měření koncentrace ATP.**

Komponenty	H <sub>2</sub> O	20X reakční pufr	0,1M DDT	10 mM D-luciferin	luciferáza
Objem (ml)	8,9	0,5	0,1	0,5	2,5

V dalším kroku byla ředěním ATP standardu pomocí v 1% tritonu/EDTA připravena kalibrační křivka složená z koncentračních bodů – 2000, 1000, 750, 500, 250, 100, 10 a 0  $\mu$ M. Poté bylo do 96 jamkového bílého panelu napipetováno 90  $\mu$ l reakčního standardu a 10  $\mu$ l z kalibračních standardů nebo z analyzovaných vzorků. Následovala inkubace 15 minut ve tmě při pokojové teplotě a vzniklý luminiscenční signál byl měřen pomocí destičkového readeru Synergy H1 (Biotek) v nastaveném luminiscenčním módu. Měření bylo provedeno v 6 opakováních.

#### 4.12 Morfologické hodnocení pMSCs a HepG2

K morfologickému zhodnocení buněk po ovlivnění BPS byly použity 24 jamkové panely (TPP). Buňky byly pasážovány a spočítány dle kapitol 4.3 a 4.4. Následně byly ovlivněny roztoky BPS (4.6 a 4.7). Hustota HepG2 na jamku byla 110 000 a pMSCs 12 000 buněk na jamku. Všechny panely s buňkami byly umístěny do CO<sub>2</sub> inkubátoru. Po uplynutí požadovaného času (24h, 48h, 72h a 120h) byly jednotlivé panely přeneseny pod mikroskop s fotoaparátem (Olympus CKX41, software QuickPhoto), kde byly vytvořeny jednotlivé snímky z každé jamky panelu se zvětšením 20x.

#### 4.13 Statistické hodnocení

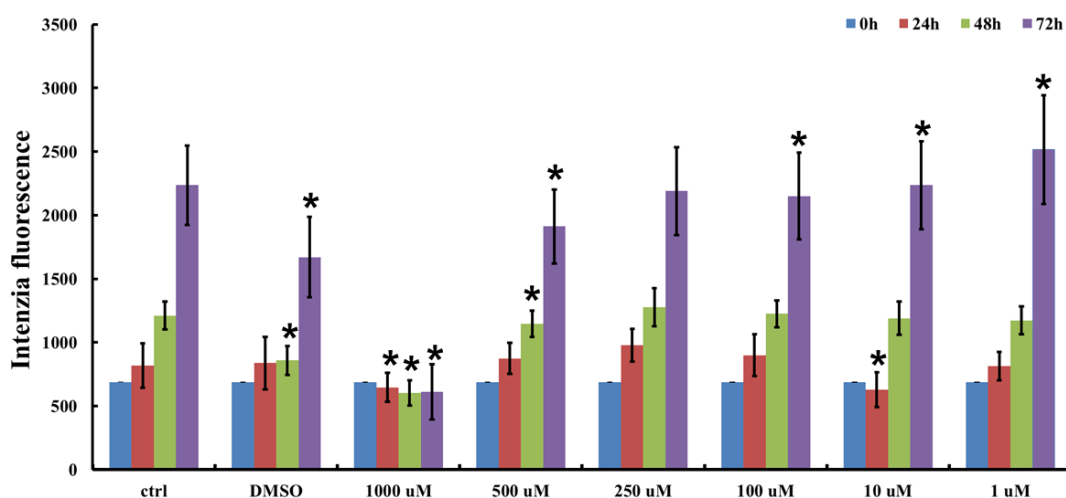
Naměřené hodnoty ze všech pokusů byly převedeny do programu Statistica (StatSoft, verze 9). Pro porovnávání dvou závislých skupin dat – kontroly a ovlivněných vzorků, byl

použit neparametrický Wilcoxonův test. Hladina významnosti pro statistické šetření byla  $p < 0.05$ .

# 5 Výsledky

## 5.1 Buněčná viabilita pMSCs ovlivněných BPS

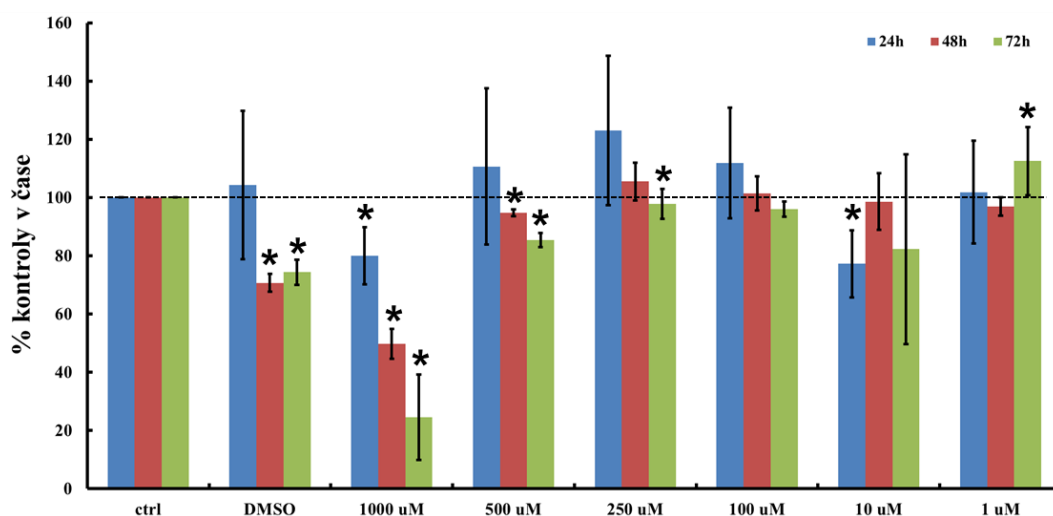
Buněčná viabilita pMSCs byla měřena metodou Alamar Blue. Z Graf 1 vyplývá, že BPS měl na viabilitu pMSCs negativní vliv v nejvyšší koncentraci 1000  $\mu\text{M}$ . Tato koncentrace byla pro buňky toxická ve všech měřených časech a buňky vykazovaly nižší životnost ve srovnání s neovlivněnou kontrolou. Koncentrace BPS 500  $\mu\text{M}$  a nižší neměly na viabilitu pMSCs negativní vliv. Hodnota fluorescence v těchto koncentracích byla obdobná jako u kontrolního vzorku bez ovlivnění, v čase 72 hod od ovlivnění byla naopak pozorována zvýšená míra buněčné viability. Samotné DMSO, ve kterém je BPS rozpuštěný, a které odpovídalo koncentraci ve vzorku BPS o koncentraci 1000  $\mu\text{M}$ , mělo na buňky negativní vliv jen v časech 48 a 72 hod po ovlivnění. BPS tedy působí na pMSCs negativně jen v koncentraci 1000  $\mu\text{M}$ , při nižších koncentracích BPS buňky rostou srovnatelným tempem jako v neovlivněné kontrole.



**Graf 1: Viabilita pMSCs ovlivněných bisfenolem S.** Na ose x jsou vyznačeny jednotlivé koncentrace bisfenolu S ( $\mu\text{M}$ ) a na ose y intenzita fluorescence. Statisticky významné rozdíly ( $p < 0.05$ ) mezi neovlivněnou kontrolou (ctrl) a ovlivněnými buňkami v daném časovém bodě jsou označeny (\*).

Pro vyjádření procentuálního rozdílu mezi ovlivněnými a neovlivněnými buňkami (%) byly naměřené hodnoty fluorescence pro daný časový bod vyděleny hodnotou fluorescence neovlivněných buněk ve stejném časovém bodě. Kontrola je zde tedy vyjádřena jako 100 % a hodnoty ovlivněných buněk ukazují % nárůstu či poklesu vůči kontrole v daném časovém bodě (Graf 2). I tento graf znázorňuje nejvyšší toxicitu BPS pro pMSCs v koncentraci 1000  $\mu\text{M}$ , kde se hodnoty po 72 hod působení propadly až ke 20 % oproti kontrole. Viabilita

pMSCs při ovlivnění o nižších koncentracích BPS se pohybovala v rozmezí okolo hodnot kontroly.

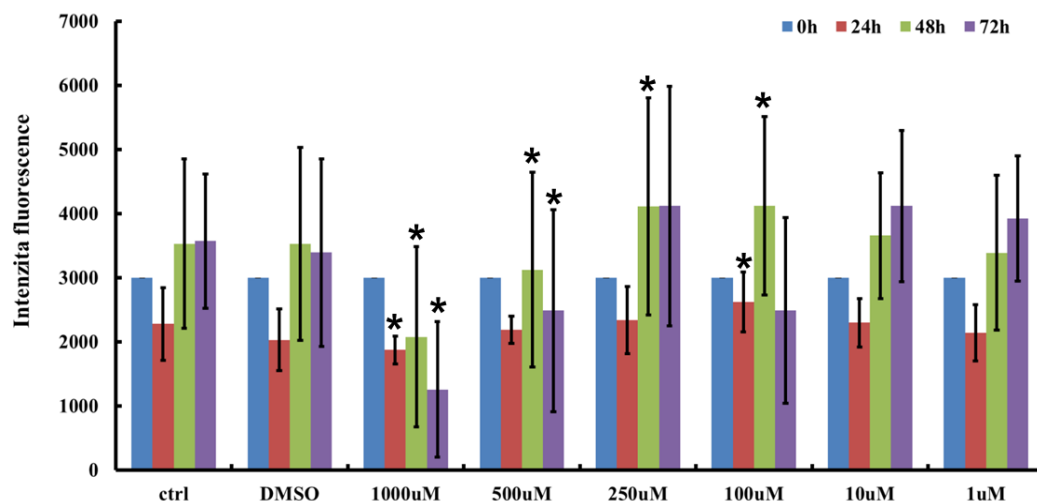


**Graf 2: Viabilita pMSCs ovlivněných bisfenolem S vztažená ke kontrole v daném čase.** Osa x znázorňuje jednotlivé koncentrace bisfenolu S (μM), osa y znázorňuje % kontroly v čase. Statisticky významné rozdíly ( $p < 0.05$ ) mezi neovlivněnou kontrolou a ovlivněnými buňkami v daném časovém bodě jsou označeny (\*).

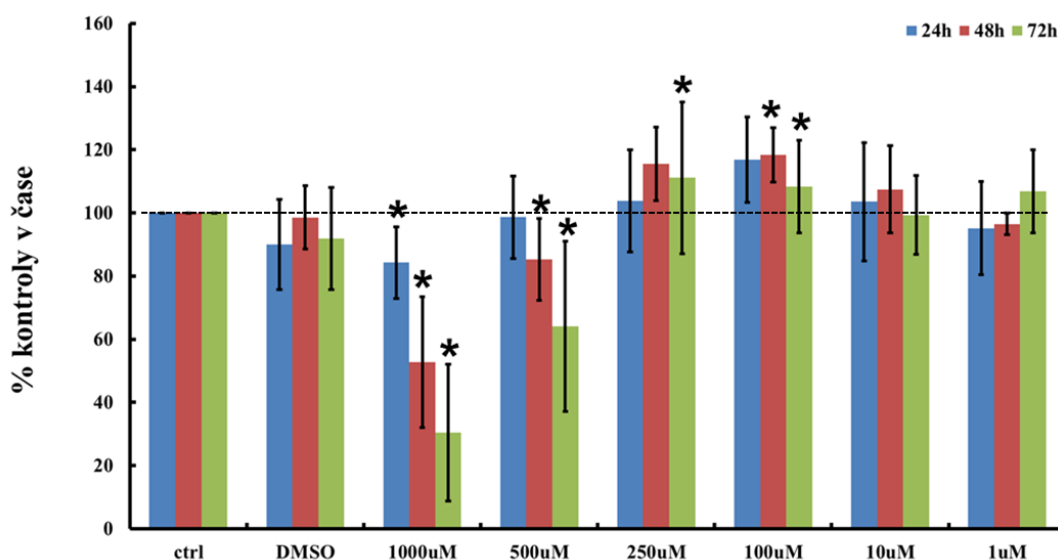
## 5.2 Buněčná viabilita HepG2 ovlivněných BPS

Buněčná viabilita hepatocytů HepG2 byl měřená pomocí metody Alamar Blue. I u HepG2 byl pozorován negativní vliv BPS na jejich viabilitu u koncentrace BPS 1000 μM a v časech 48 a 72 hod po ovlivnění i u 500 μM (Graf 3). BPS o ostatní nižších koncentracích neměl na viabilitu HepG2 negativní vliv, i když jejich růstová tendence nebyla tak výrazná jako u pMSCs.

Pro vyjádření procentuálního rozdílu mezi ovlivněnými a neovlivněnými buňkami (%) byly naměřené hodnoty fluorescence pro daný časový bod vyděleny hodnotou fluorescence neovlivněných buněk ve stejném časovém bodě. Kontrola je zde tedy vyjádřena jako 100 % a hodnoty ovlivněných buněk ukazují % nárůstu či poklesu vůči kontrole v daném časovém bodě (Graf 4). Viabilita HepG2 po ovlivnění BPS o koncentraci 1000 μM poklesla za 48 hod na 50 % a za 72 hod na 30 %. Koncentrace BPS 500 μM pak způsobila pokles viability na 80% po 48 hod a na 60 % po 72 hod. Viabilita HepG2 v ostatních koncentracích BPS se pohybovala okolo kontrolního měření, případně byl pozorován mírný nárůst. Samotné DMSO, ve kterém je BPS rozpuštěný, a které odpovídalo koncentraci ve vzorku BPS o koncentrací 1000 μM, nemělo na viabilitu HepG2 žádný vliv.



**Graf 3: Viabilita HepG2 ovlivněných bisfenolem S.** Na ose x jsou vyznačeny jednotlivé koncentrace bisfenolu S ( $\mu\text{M}$ ) a na ose y intenzita fluorescence. Statisticky významné rozdíly ( $p < 0.05$ ) mezi neovlivněnou kontrolou (ctrl) a ovlivněnými buňkami v daném časovém bodě jsou označeny (\*).

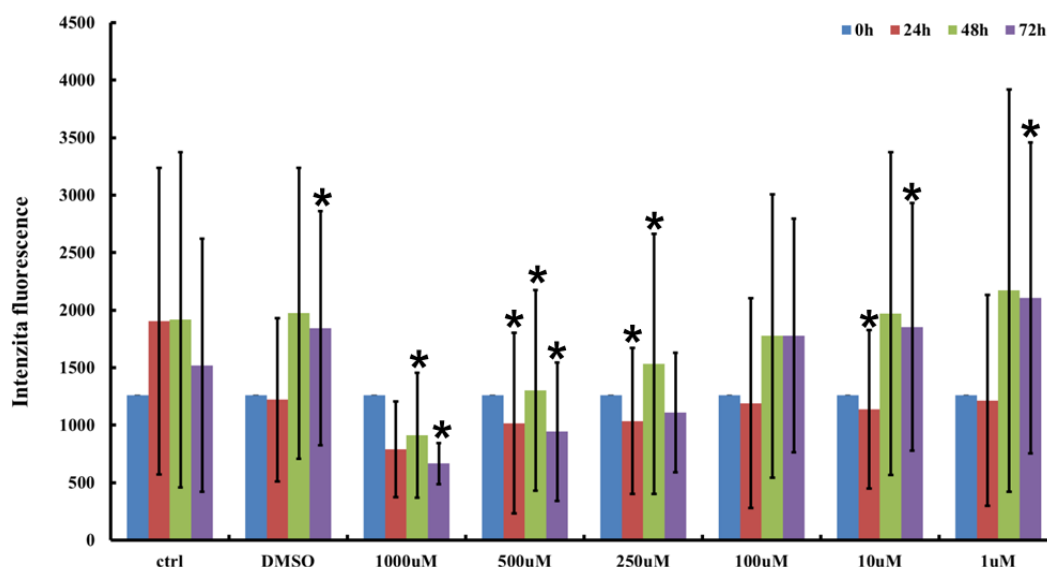


**Graf 4: Viabilita HepG2 ovlivněných bisfenolem S vztážená ke kontrole.** Osa x znázorňuje jednotlivé koncentrace bisfenolu S ( $\mu\text{M}$ ), osa y znázorňuje % kontrolly v čase. Statisticky významné rozdíly ( $p < 0.05$ ) mezi neovlivněnou kontrolou a ovlivněnými buňkami v daném časovém bodě jsou označeny (\*).

### 5.3 Buněčná proliferace HepG2 ovlivněných BPS

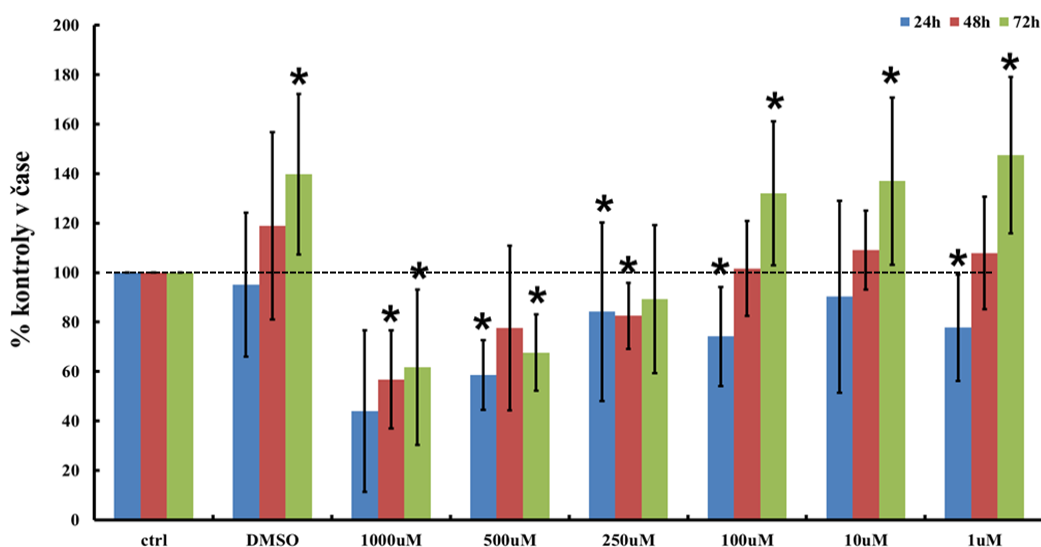
Měření buněčné proliferace u HepG2 bylo provedeno metodou měření fluorescenčního signálu z interkalačního činidla Hoechst 33342 navázaného na dvoušroubovici DNA. Vysoké koncentrace BPS 1000 a 500  $\mu\text{M}$  měly negativní vliv na proliferaci buněk ve všech měřených časech. Dle Graf 5 lze usoudit, že negativní byla pro HepG2 i koncentrace BPS 250  $\mu\text{M}$ . BPS o koncentracích 100 – 1  $\mu\text{M}$  neměl na proliferaci HepG2 toxický vliv. Zajímavé je, že BPS způsobil pokles proliferace HepG2 po 24 hod po

působení všech koncentrací a u koncentrací 100 – 1  $\mu\text{M}$  došlo po 48 a 72 hod k obnovení proliferační kapacity buněk.



**Graf 5: Buněčná proliferace HepG2 ovlivněných bisfenolem S.** Na ose x jsou vyznačeny jednotlivé koncentrace bisfenolu S ( $\mu\text{M}$ ) a na ose y intenzita fluorescence. Statisticky významné rozdíly ( $p < 0.05$ ) mezi neovlivněnou kontrolou (ctrl) a ovlivněnými buňkami v daném časovém bodě jsou označeny (\*).

Pro vyjádření procentuálního rozdílu mezi ovlivněnými a neovlivněnými buňkami (%) byly naměřené hodnoty fluorescence pro daný časový bod vyděleny hodnotou fluorescence neovlivněných buněk ve stejném časovém bodě. Kontrola je zde tedy vyjádřena jako 100 % a hodnoty ovlivněných buněk ukazují % nárůstu či poklesu vůči kontrole v daném časovém bodě. Dle Graf 6 lze potvrdit, že koncentrace BPS 1000, 500 a 250  $\mu\text{M}$  působí na proliferaci HepG2 nejvíce negativně. Zároveň je ukázán žádný efekt DMSO, pokles proliferace po 24 hod u všech koncentrací BPS po 24 hod inkubace a naopak nárůst proliferace po 48 a 72 hod inkubace u BPS o koncentracích 100 – 1  $\mu\text{M}$ .



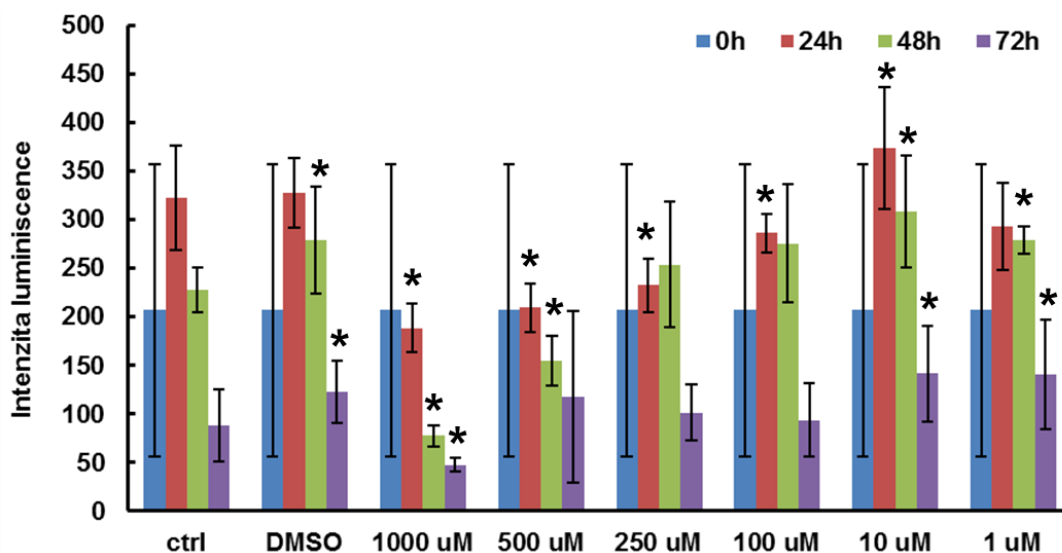
**Graf 6: Buněčná proliferace HepG2 ovlivněných bisfenolem S a vztažená k neovlivněné kontrole v daných časech.** Osa x znázorňuje jednotlivé koncentrace bisfenolu S (µM), osa y znázorňuje % kontroly v čase. Statisticky významné rozdíly ( $p < 0.05$ ) mezi neovlivněnou kontrolou a ovlivněnými buňkami v daném časovém bodě jsou označeny (\*).

#### 5.4 Produkce ATP u HepG2 ovlivněných BPS

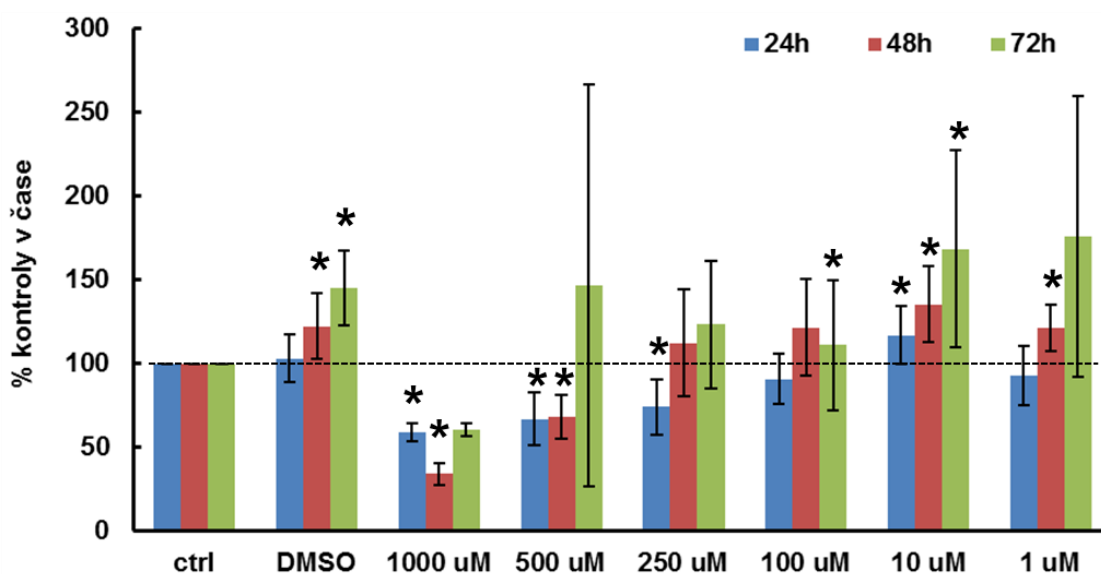
Tato metoda sledovala buněčný metabolismus HepG2 po ovlivnění BPS pomocí kvantifikace adenosin tri-fosfátu (ATP), základního zdroje energie pro buňku. Graf 7 ukazuje sníženou produkci ATP při koncentracích BPS 1000 µM a 500 µM. Při koncentraci BPS 250 µM došlo k poklesu produkce ATP jen po 24 hod a při ostatních nižších koncentracích BPS byla produkce ATP srovnatelná s neovlivněnou kontrolou či mírně vyšší.

Pro vyjádření procentuálního rozdílu mezi ovlivněnými a neovlivněnými buňkami (%) byly naměřené hodnoty luminiscence pro daný časový bod vyděleny hodnotou luminiscence neovlivněných buněk ve stejném časovém bodě. Kontrola je zde tedy vyjádřena jako 100 % a hodnoty ovlivněných buněk ukazují % nárůstu či poklesu vůči kontrole v daném časovém bodě. Graf 8 potvrzuje pozorování z předchozího Graf 7, kdy nejvýraznější pokles produkce ATP ve srovnání s neovlivněnou kontrolou byl způsoben nejvyšší koncentrací BPS.





**Graf 7: Produkce ATP u HepG2 ovlivněných bisfenolem S.** Na ose x jsou vyznačeny jednotlivé koncentrace bisfenolu S ( $\mu\text{M}$ ) a na ose y intenzita luminiscence. Statisticky významné rozdíly ( $p < 0.05$ ) mezi neovlivněnou kontrolou (ctrl) a ovlivněnými buňkami v daném časovém bodě jsou označeny (\*).

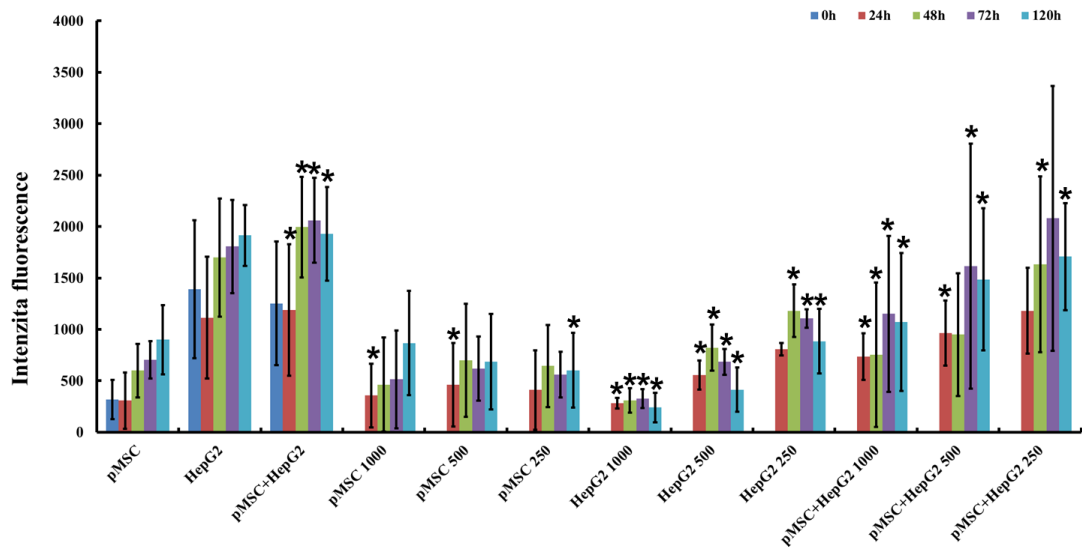


**Graf 8: Produkce ATP u HepG2 ovlivněných bisfenolem S a vztažená k neovlivněné kontrole v daných časech.** Osa x znázorňuje jednotlivé koncentrace bisfenolu S ( $\mu\text{M}$ ), osa y znázorňuje % kontrolly v čase. Statisticky významné rozdíly ( $p < 0.05$ ) mezi neovlivněnou kontrolou a ovlivněnými buňkami v daném časovém bodě jsou označeny (\*).

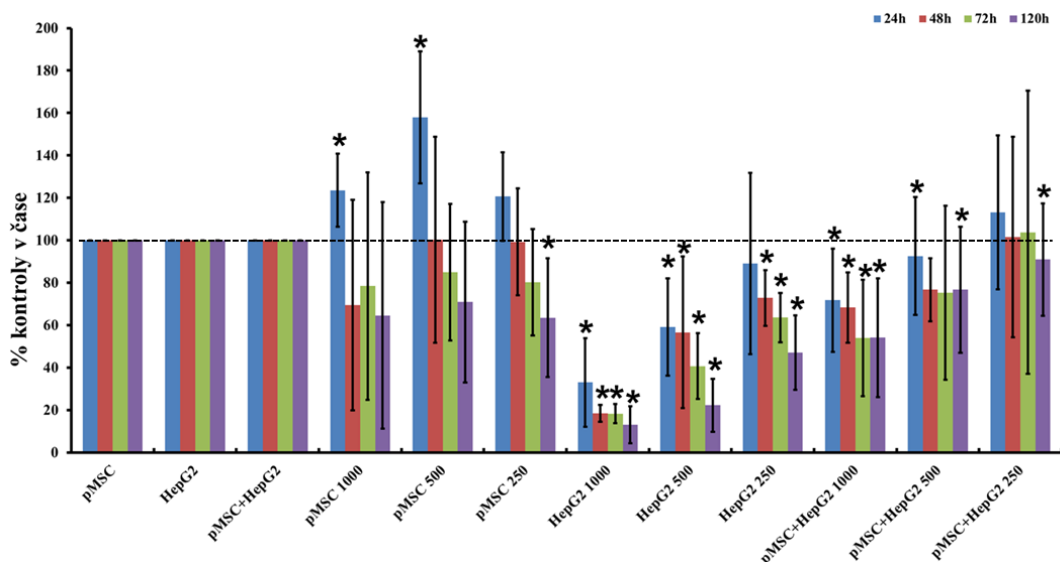
### 5.5 Buněčná viabilita HepG2 ovlivněných BPS a kokultivovaných s pMSCs

Viabilita buněk byla měřena metodou Alamar Blue. Graf 9 ukazuje, že se viabilita kokultury pMSC+HepG2 nelišila od viability samotných HepG2. Samostatně kultivované BPS ovlivněné HepG2 pak vykazovaly koncentračně závislé snížení viability, a naopak, samostatně kultivované pMSCs byly BPS ovlivněny minimálně. HepG2 ovlivněné BPS a

kokultivované s pMSCs také vykazovaly pokles viability vůči neovlivněné kontrole, ale tento pokles byl mírnější, než byl pokles viability u samotných a BPS ovlivněných HepG2 (Graf 10).



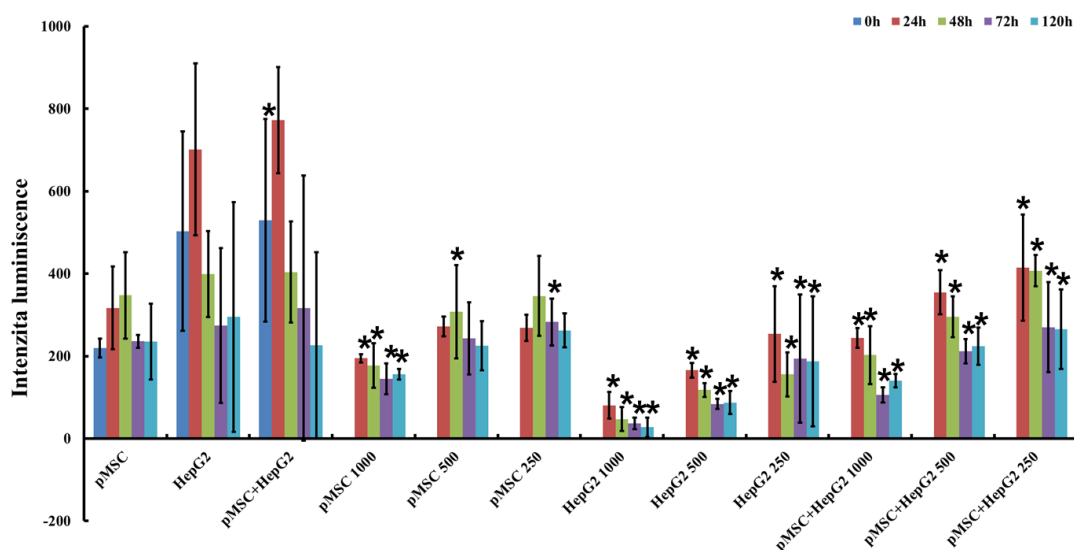
**Graf 9: Viabilita HepG2 ovlivněných bisfenolem S a kokultivovaných s pMSCs.** Osa x znázorňuje typy buněk a koncentrace bisfenolu S (250, 500, 1000  $\mu$ M), osa y znázorňuje intenzitu fluorescence. Statisticky významné rozdíly ( $p < 0.05$ ) mezi neovlivněnou kontrolou (pMSC, HepG2, pMSC+HepG2) a ovlivněnými buňkami v daném časovém bodě jsou označeny (\*).



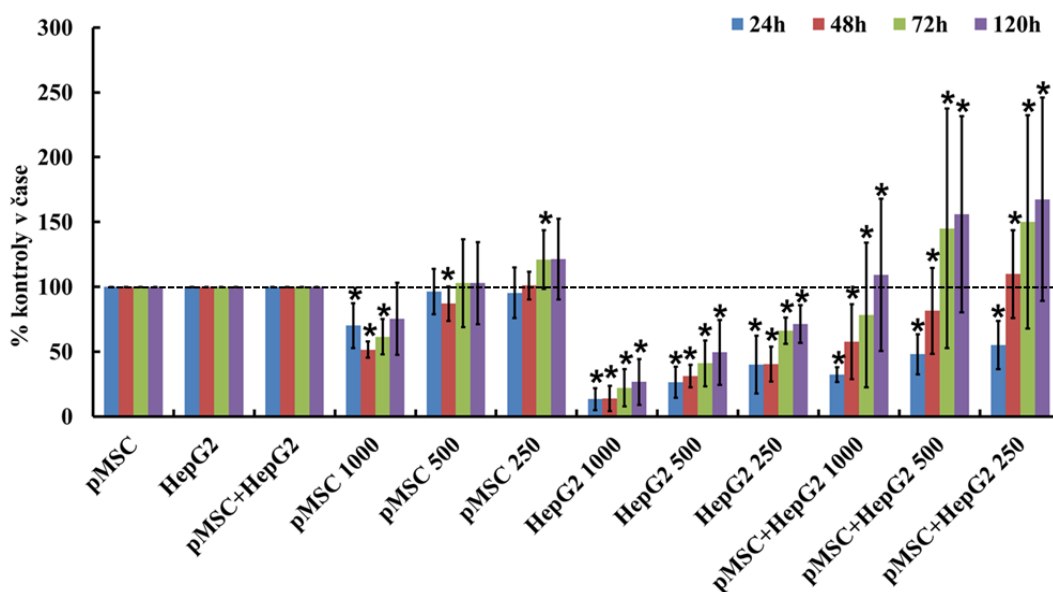
**Graf 10: Viabilita HepG2 ovlivněných bisfenolem S a kokultivovaných s pMSC vztažená k neovlivněné kontrole v daných časech.** Osa x znázorňuje typy buněk a koncentrace bisfenolu S (250, 500, 1000  $\mu$ M), osa y znázorňuje % neovlivněné kontroly (pMSC, HepG2, pMSC+HepG2) v čase. Statisticky významné rozdíly ( $p < 0.05$ ) mezi neovlivněnou kontrolou a ovlivněnými buňkami v daném časovém bodě jsou označeny (\*).

## 5.6 Produkce ATP u HepG2 ovlivněných BPS a kokultivovaných s pMSCs

Tato metoda sledovala buněčný metabolismus HepG2 po ovlivnění BPS a v kokultuře s pMSCs pomocí kvantifikace adenosin tri-fosfátu (ATP), základního zdroje energie pro buňku. Dle Graf 11 samostatně kultivované HepG2 a HepG2 v kokultuře s pMSCs produkovaly přibližně stejná množství ATP, pMSCs i HepG2 kultivované samostatně a ovlivněné BPS o koncentraci 1000  $\mu\text{M}$  naopak produkovaly nejméně ATP ve srovnání s neovlivněnou kontrolou. Graf 12 pak ukazuje, že pokles produkce ATP u HepG2 ovlivněných BPS a kokultivovaných s pMSCs byl mírnější než pokles produkce ATP u HepG2 v samokultuře.



**Graf 11: Produkce ATP u HepG2 ovlivněných bisfenolem S a kokultivovaných s pMSCs.** Osa x znázorňuje typy buněk a koncentrace bisfenolem S (250, 500, 1000  $\mu\text{M}$ ), osa y znázorňuje intenzitu luminiscence. Statisticky významné rozdíly ( $p < 0.05$ ) mezi neovlivněnou kontrolou (pMSC, HepG2, pMSC+HepG2) a ovlivněnými buňkami v daném časovém bodě jsou označeny (\*).

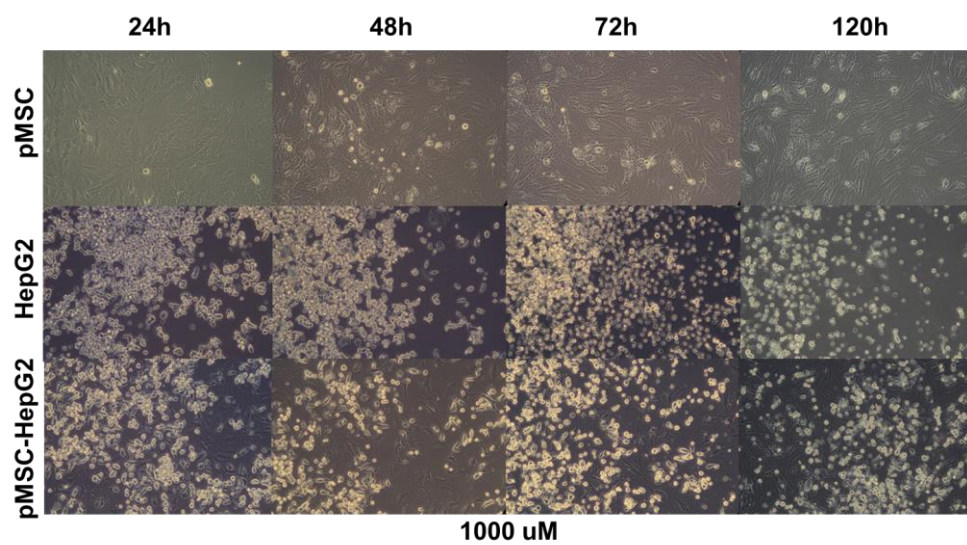


**Graf 12: Produkce ATP u HepG2 ovlivněných bisfenolem S a kokultivovaných s pMSC vztažená k neovlivněné kontrole v daných časech.** Osa x znázorňuje typy buněk a koncentrace bisfenolu S (250, 500, 1000  $\mu\text{M}$ ), osa y znázorňuje % neovlivněné kontroly (pMSC, HepG2, pMSC+HepG2) v čase. Statisticky významné rozdíly ( $p < 0.05$ ) mezi neovlivněnou kontrolou a ovlivněnými buňkami v daném časovém bodě jsou označeny (\*).

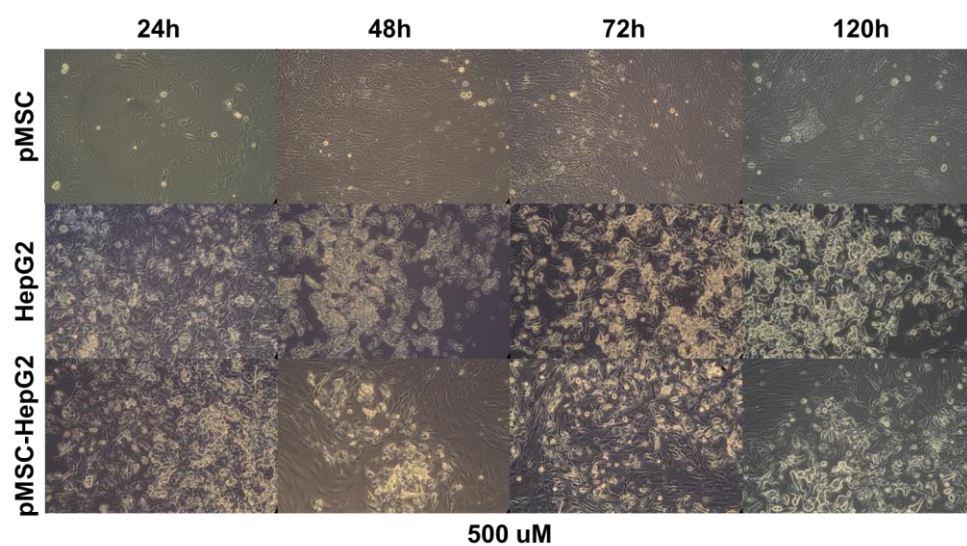
## 5.7 Morfologická pozorování buněk ovlivněných BPS

Změny v morfologii ovlivněných pMSCs, HepG2 a kokultury pMSCs a HepG2 jsou znázorněny na Obrázek 5 (BPS 1000  $\mu\text{M}$ ), Obrázek 6 (BPS 500  $\mu\text{M}$ ) a na Obrázek 7 (BPS 250  $\mu\text{M}$ ). Na Obrázek 5 lze vidět změnu v morfologii HepG2 po 24, 48, 72 i 120 hodinovém působení BPS 1000  $\mu\text{M}$ . Většina buněk po působení BPS ztratila svůj původní tvar a buňky byly viditelné jako samostatné kulovité útvary, které značily jejich odumření. Tato změna tvaru se vyskytuje i ve směsi HepG2 s pMSCs. Naopak u samotných pMSCs nebyla viditelná výrazná morfologická změna.

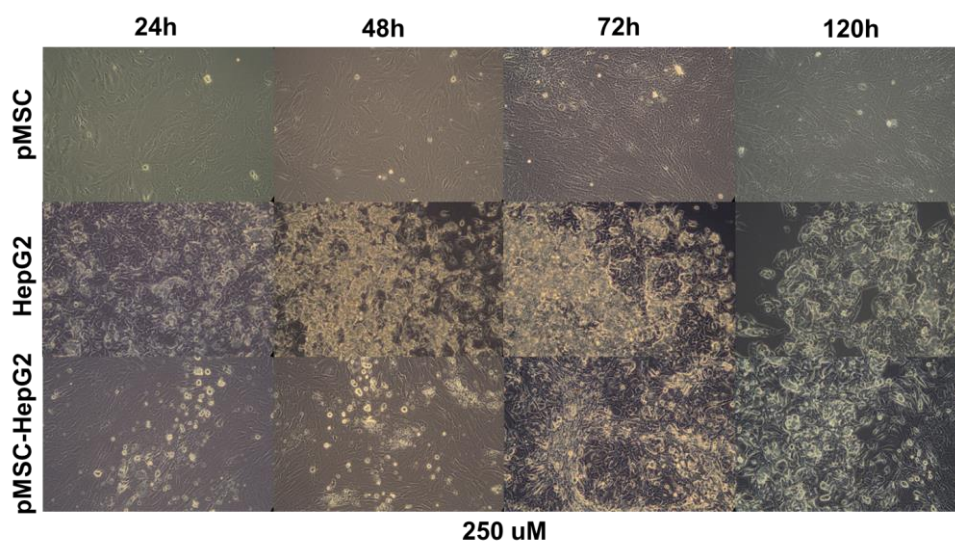
Obrázek 6 a 7 ukazují, že nižší koncentrace BPS nepůsobily natolik výraznou změnu morfologie HepG2 jako koncentrace nejvyšší. I po 120 hodinách lze u HepG2 v samostatné kultuře, tak v kokultuře s pMSCs pozorovat jejich typický hranatý tvar.



Obrázek 5: Morfologie pMSCs, HepG2 a jejich kokultury v prostředí 1000  $\mu$ M bisfenolu S. Zvětšení 100x.



Obrázek 6: Morfologie pMSCs, HepG2 a jejich kokultury v prostředí 500  $\mu$ M bisfenolu S. Zvětšení 100x.



Obrázek 7: Morfologie pMSCs, HepG2 a jejich kokultury v prostředí 250  $\mu$ M bisfenolu S. Zvětšení 100x.

## 6 Diskuse

V dnešní době je používání bisfenolu S (BPS) jakožto náhrady bisfenolu A (BPA) značně rozšířeno. Rochester a Bolden (2015) uvádí, že se BPS vyskytuje v běžně používaných produktech jako jsou papíry, zubní pasty či šampony. Mnoho studií se zabývalo vlivem BPA na biochemické děje v orgánech. Je však otázkou, zda také zmíněný BPS, který je svou chemickou strukturou velmi podobný BPA, nemá stejně negativní vliv na zdraví.

Jednou z nezodpovězených otázek v problematice používání bisfenolů, zejména u BPS, je jeho odbourávání v organismu a jeho případný negativní vliv nejen reprodukční schopnosti organismů, ale také na další životně důležité orgány včetně jater.

V této práci byl studován vliv BPS na jaterní buňky, konkrétně linii lidských hepatocytů HepG2. U HepG2 ovlivněných různými koncentracemi BPS (1-1000  $\mu\text{M}$ ) byla sledována viabilita, proliferace, produkce ATP a buněčná morfologie. Ukázalo se, že BPS snižoval jak viabilitu, tak proliferaci HepG2 při koncentracích 1000 a 500  $\mu\text{M}$ . Při nižších koncentracích BPS byly viabilita i proliferace HepG2 srovnatelné s viabilitou a koncentrací neovlivněných HepG2. K obdobnému závěru dospěla i studie Fice et al. (2013) v pokusech s různými druhy bisfenolů ovlivňujícími HepG2, kde bylo zjištěno, že nízké koncentrace BPA, BPS a dalších bisfenolů nemají velký vliv na jejich viabilitu, zatímco koncentrace 1000  $\mu\text{M}$  způsobila pokles až 70 %. Hélias-Toussaint et al. (2014) pozoroval až 77%ní pokles viability u HepG2 stresovaných BPS a 60%ní pokles viability u adipocytů. Dle této práce má BPS u HepG2 výrazný vliv i na proliferaci a metabolismus ATP. Buněčná proliferace hlavně v nejvyšších koncentracích BPS (1000  $\mu\text{M}$ ) dosahovala nižších hodnot než kontrola, stejně jako produkce ATP. Dle Khana et al. (2015) bisfenoly podněcují nárůst oxidačního stresu v mitochondriích hepatocytů a tím značně snižují jejich metabolickou aktivitu. V našich pokusech bylo zjištěno, že na metabolickou produkci ATP měly nejvíce negativní vliv vysoké koncentrace BPS (500 a 1000  $\mu\text{M}$ ). Je nutno zmínit, že tento pokles produkce ATP u HepG2 může být důsledkem snížené buněčné proliferace, neboť se po působení BPS snížil počet životaschopných buněk. Tuto souvislost mezi snížením proliferace a snížením produkce ATP zmiňuje ve své práci i Huc et al. (2011). V naší studii byly zjištěny podobné účinky BPS na viabilitu, proliferaci a produkci ATP u HepG2 jako v jiných studiích používajících při svých pokusech BPA. Tyto poznatky podporují tvrzení, že BPS není vhodným kandidátem na náhradu BPA v průmyslových produktech.

Tato práce měla dále za úkol pozorovat reparační potenciál mezenchymálních kmenových buněk (pMSCs) v kultuře HepG2 stresovaných BPS. Nejprve byl zkontrolován efekt BPS na samotné pMSCs a bylo zjištěno, že tyto buňky jsou o něco odolnější vůči BPS, neboť pouze nejvyšší koncentrace BPS (1000  $\mu\text{M}$ ) způsobila pokles jejich viability. Tyto výsledky poukazují na vyšší schopnost pMSCs udržet svoji viabilitu než toho jsou schopni HepG2 i přes jejich vyšší nasazovací hustotu. Je možné, že BPS má odlišný vliv na tyto dva typy buněk stejně jako bylo pozorováno ve studii Hélias-Toussainta et al. (2014).

Finální částí práce bylo popsát vliv pMSCs na HepG2 negativně stresovaných BPS. Jako negativně stresované HepG2 byly vybrány podmínky kultivace HepG2 v koncentracích BPS 1000, 500 a 250  $\mu\text{M}$ , kdy bylo ukázáno, že tyto koncentrace snižují viabilitu a proliferaci HepG2 a snižují produkci ATP u HepG2. Po následném přidání pMSCs do kultury stresovaných HepG2 byl pozorován mírnější pokles viability HepG2 a produkce ATP těmito buňkami v porovnání s poklesem těchto charakteristik u samotných HepG2. Zmírňující efekt pMSCs může být způsoben tzv. parakrinním působením pMSCs, kdy tyto buňky mohou vylučovat do prostředí regulační molekuly podporující zachování hepatocytárních funkcí jako. Mezi tyto molekuly mohou spadat HGF, TGF- $\beta$  či prostaglandin E2 (Deans a Moseley, 2000).

Při realizaci této experimentální práce vyšlo najevo metodické omezení, která je nutno zmínit v souvislosti s interpretací výsledků. V kokultivačních experimentech HepG2 s pMSCs ovlivněných BPS byl pozorován nárůst hodnot viability a produkce ATP v porovnání s kulturou samotných HepG2 ovlivněných BPS. Tento nárůst by mohl být způsoben tím, že je v kokultuře více buněk než v samotné kultuře. Pokud jsou však změny ve viabilitě a produkci ATP vyjádřeny jako procenta z neovlivněné kokultury HepG2 a pMSCs a samotné kultury HepG2, je tento rozdíl stále zachován a lze tedy usuzovat, že pMSCs zlepšovaly kondici HepG2 stresovaných BPS v případě sledované viability a produkce ATP. V budoucích experimentech by se tento problém dal obejít zařazením tzv. kultivační membrány, kdy by pMSCs byly fyzicky odděleny od HepG2 například nylonovou membránou a bylo by sdíleno pouze kultivační prostředí.



## 7 Závěr

Cílem práce bylo ověřit hypotézy, že bisfenol S působí negativně na viabilitu, proliferaci produkci ATP u hepatocytů, a že mezenchymální kmenové buňky mohou hrát roli při obnově funkce hepatocytů poškozených bisfenolem S.

Bisfenol S je používán jako náhrada bisfenolu A v průmyslových výrobcích jako jsou papíry a plasty. Bisfenol A prokazatelně působí jako endokrinní disruptor u savců a jako polutant životního prostředí, a je proto žádoucí hledat jeho náhradu. Otázkou je, zda bisfenol S je vhodná volba, neboť současné studie ukazují, že bisfenol S je minimálně stejně škodlivý v reprodukci savců jako bisfenol A.

V této práci byl studován vliv bisfenolu S na vybrané funkční charakteristiky hepatocytů – viabilitu, proliferaci a produkci ATP. Bisfenol S se projevil jako škodlivý v těchto charakteristikách v koncentracích 1000 a 500  $\mu\text{M}$ . Mezenchymální kmenové buňky dokázaly tyto negativní účinky bisfenolu S zmírnit, avšak ne zcela potlačit. Cíle práce byly tímto splněny.

## 8 Reference

- Al Ghrbawy, N. M., Afify, R. A. A. M., Dyaa, N., El Sayed, A. A. 2015. Differentiation of Bone Marrow: Derived Mesenchymal Stem Cells into Hepatocyte-like Cells. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. 32 (3). 276 – 283.
- Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E., Nadal A. 2006. The Estrogenic Effect of Bisphenol A Disrupts Pancreatic beta-Cell Function In Vivo and Induces Insulin Resistance. *Environ Health Perspect*. 114 (1). 105 – 112.
- Akin, L., Kendirci, M., Narin, F., Kurtoglu, S., Saraymen, R., Kondolot, M., Kocak, S., Elmali, F. 2015. The endocrine disruptor bisphenol A may play a role in the aetiopathogenesis of polycystic ovary syndrome in adolescent girls. *ACTA PEDIATRICA*. 104 (4). e171 – e177.
- Audebert, M., Dolo, L., Perdu, E., Cravedi, J. P., Zalko, D. 2011. Use of the gamma H2AX assay for assessing the genotoxicity of bisphenol A and bisphenol F in human cell lines. *ARCHIVES OF TOXICOLOGY*. 85 (11). 1463 – 1473.
- Bieback, K. 2008. Basic Biology of Mesenchymal Stem Cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 35. 151 – 152.
- Bilzer, M., Roggel, F., Gerbe, A. L. 2006. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver international*. 26 (10). 1175 – 1186.
- Bobis, S., Jarocho, D., Majka, M. 2006. Mesenchymal stem cells: characteristic and clinical applications. *Folia histochemical et cytobiologica*. 44 (4). 215 – 230.
- Bongso, A., Richards, M. 2004. History and perspective of stem cell research. *Best practice and research in clinical obstetrics and gynaecology*. 18 (6). 827 – 842.
- Brunt, K. R., Weisel, R. D., Li, R. K. 2012. Stem cells and regenerative medicine – future perspectives. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 90 (3). 327 – 335.

Cabaton, N., Chagno, M. Ch., Lhuguenot, J. C., Cravedi, J. P., Zalko, D. 2006. Disposition and Metabolic Profiling of Bisphenol F in Pregnant and Nonpregnant Rats. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY*. 54 (26). 10307 – 1034.

Cabaton, N., Zalko, D., Rathahao, E., Canlet, C., Delous, G., Chagnon, M. Ch., Cravedi, J. P., Perdu, E. 2008. Biotransformation of bisphenol F by human and rat liver subcellular fractions. *Toxicology in Vitro*. 22 (7). 1697 – 1704.

Cabaton, N., Dumont, C., Severin, I., Perdu, E., Zalko, D., Cherkaoui-Malki, M., Chagnon, M. Ch. 2009. Genotoxic and endocrine activities of bis(hydroxyphenyl)methane (Bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line. *Toxicology*. 255 (1). 15 – 24.

Caplan, A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*. 9 (5). 641 – 650.

Casals-Casas, C., Desvergne, B. 2011. Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption. 73. 135 – 162.

Caplan, A. I. 2015. Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where and How. *Stem Cells International*. 2015. 1 – 6.

Cerri, S., Greco, R., Levandis, G., Ghezzi, C., Mangione, A. S., Fuzzati-Armentero, M. T., Bonizzi, A., Avanzini, M. A., Maccario, R., Blandini, F. 2015. Intracarotid Infusion of Mesenchymal Stem Cells in an Animal Model of Parkinson's Disease, Focusing on Cell Distribution and Neuroprotective and Behavioral Effects. *STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE*. 4 (9). 1073 – 1085.

Chen, C., Fingerhut, J. M., Yamashita, Y. M. 2016. The ins(ide) and outs(ide) of asymmetric stem cell division. *Current Opinion in Cell Biology*. 43. 1 – 6.

Ciurea, M. E., Georgescu, A. M., Purcaru, S. O., Artene, S. A., Emami, G. H., Boldeanu, M. V., Tache, D. E., Dricu, A. 2014. Cancer Stem Cells: Biological Functions and Therapeutically Targeting. *International Journal of Molecular Sciences*. 15 (5). 8169 – 8185.

- Colborn, T., vom Saal, F. S., Soto, A. M. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect.* 101 (5). 378 – 384.
- Consoli, A., Kennedy, F., Miles, J., Gerich, J. 1987. Determination of Krebs cycle metabolic carbon exchange in vivo and its use to estimate the individual contributions of gluconeogenesis and glycogenolysis to overall glucose output in man. *J Clin Invest.* 80 (5). 1303 – 1310.
- Daar, A. S., Bhatt, A., Court, E., Singer, P. A. 2004. Stem cell research and transplantation: Science leading ethics. *Transplantation Proceedings.* 36 (8). 2504 – 2506.
- Dai Pré, E., Conti, G., Sbarbati, A. 2016. Hyaluronic Acid (HA) Scaffolds and Multipotent Stromal Cells (MSCs) in Regenerative Medicine. *STEM CELL REVIEWS AND REPORTS.* 12 (6). 664 – 681.
- Danzl, E., Sei, K., Soda, S., Ike, M., Fujita, M. 2009. Biodegradation of Bisphenol A, Bisphenol F and Bisphenol S in Seawater. *Environmental Research and Public Health.* 6 (4). 1472 – 1484.
- de Wert, G., Mummery, C. 2003. Human embryonic stem cells: research, ethics and policy. *Human Reproduction.* 18 (4). 672 – 682.
- Deans, R. J., Moseley, A. M. 2000. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology.* 28 (8). 875 – 884.
- Dumont, C., Perdu, E., de Sousa, G., Debrauwer, L., Rahmani, R., Cravedi, J. P., Chagnon, M. Ch. 2011. Bis(hydroxyphenyl)methane-bisphenol F-metabolism by the HepG2 human hepatoma cell line and cryopreserved human hepatocytes. *Drug and Chemical Toxicology.* 34 (4). 445 – 453.
- Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M. J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Habert, R. 2015. A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertility and Sterility.* 103 (1). 11 – 21.

- Filip, S., Mokry, J., English, D., Vojacek, J. 2005. Stem cells plasticity and issues of stem cell therapy. *Folia Biologia*. 51 (6). 180 – 187.
- Fenichel, P., Chevalier, N., Brucker-Davis, F. 2013. Bisphenol A: An endocrine and metabolic disruptor. *Annales d'Endocrinologie*. 74 (3). 211 – 220.
- Fic, A., Žegura, B., Sollner Dolenc, M., Filipič, M., Peterlin Mašič, L. 2013. Mutagenicity and DNA damage of bisphenol A and its structural analogues in HepG2 cells. *Archives of industrial hygiene and toxicology*. 64 (2). 189 – 200.
- Forte, G., Minieri, M., Cossa, P., Antenucci, D., Sala, M., Gnocchi, V., Fiaccavento, R., Carotenuto, F., De Vito, P., Baldini, P. M., Prat, M., Di Nardo, P. 2005. Hepatocyte Growth Factor Effects on Mesenchymal Stem Cells: Proliferation, Migration, and Differentiation. *STEM CELLS*. 24 (1). 23 – 33.
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., Lalykina, K. S. 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinetics*. 3 (4). 393 – 403.
- Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Muller, J., Wenzel, A. 2002. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research*. 36 (6). 1429 – 1438.
- Geret, H. H. J., Tilmant, K., Gerin, B., Chanteux, H., Depelchin, B. O., Dhalluin, S., Atienzar, F. A. 2012. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biology and Toxicology*. 28 (2). 69 – 87.
- Gould, J., Leonard, L., Maness, S., Wagner, B., Conner, K., Zacharewski, T., Safe, S., McDonnell, D., Gaido. 1998. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 142 (1 – 2). 203 – 214.
- Grove, J. E., Bruscia, E., Crause, D. S. 2004. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *STEM CELLS*. 22 (4). 487 – 500.

- Han, H. S., Kang, G., Kim, J. S., Choi, B. H., Koo, H. S. 2016. Regulation of glucose metabolism from liver-centric perspective. *Experimental and Molecular Medicine*. 48. e218.
- Hare, J. M. 2009. Translational development of mesenchymal stem cell therapy for cardiovascular diseases. *Texas Heart Institute journal*. 36 (2). 145 – 147.
- Hassink, R. J., de la Riviere, A. B., Mummery, C. L., Dovendans, P. A. 2003. Transplantation of cells for cardiac repair. *Journal of the american college of cardiology*. 41 (5). 711 – 717.
- Héliés-Toussaint, C., Peyre, L., Costanzo, C. 2014. Is bisphenol S a safe substitute for bisphenol A in terms of metabolic function? An in vitro study. *TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY*. 280 (2). 224 – 235.
- Horwitz, E. M., Le Blanc Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Deans, R. J., Krause, D. S., Keating, A. 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*. 7 (5). 393 – 395.
- Huc, L., Lemarié, A., Guéraud, F., Héliés-Toussaint, C. 2012. Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells. *Toxicology in Vitro*. 26 (5). 709 – 717.
- Husain, Q., Quayyum, S. 2012. Biological and enzymatic treatment of bisphenol A and other endocrine disrupting compounds: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 33 (3). 260 – 292.
- Hwang, W. S., Lee, B. Ch., Lee, Ch. K., Kang, S. K. 2005. Cloned Human Embryonic Stem Cells for Tissue Repair and Transplantation. *Stem Cells Reviews*. 1 (2). 99 – 109.
- Jennen, D. G. J., Magkoufopoulou, Ch., Ketelslegers H. B., van Herwijnen, M. H. M., Kleinjans, J. C. S., van Delft, J. H. M. 2010. Comparison of HepG2 and HepaRG by Whole-Genome Gene Expression Analysis for the Purpose of Chemical Hazard Identification. *Toxicol Science*. 115 (1). 66 – 79.

Junqueira C, Carneiro J, Kelley RO. 1997. *Základy histologie (Basic Histology)*. H&H. Jinočany. p 502. ISBN 8085787-37-7.

Karayiannis, P., Main, J., Thimas, H. C. 2004. Hepatitis vaccines. *British medical bulletin*. 70 (1). 29 – 49.

Khan, S., Beigh, S., Chaudhari, B. S., Sharma, S., Abdi, S. A. H., Ahmad, S., Ahmad, F., Parvez, S., Raisuddin, S. 2015. Mitochondrial dysfunction induced by Bisphenol A is a factor of its hepatotoxicity in rats. *Environmental Toxicology*. 31 (12). 1922 – 1934.

Klabusay, M., Dvořák, P., Mayer, J. 2005. Kmenové buňky: nový příslib v medicíně. *Vnitřní lékařství*. 51 (2). 206 – 215.

Klabusay, M., Skopalík, J., Meluzín J. 2009. Kmenové buňky v kardiologii: minulost, současnost a budoucnost celulární terapie poškozeného myokardu. *Interní medicína*. 11 (10). 452 – 457.

Kolf, C. M., Cho, E., Tuan, R. S. 2007. Mesenchymal stromal cells: Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of the niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research and Therapy*. 9 (1). 204.

Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., Sharkis, S. J. 2001. Multi-Organ, Multi-Lineage Engraftment by a Single Bone Marrow-Derived Stem Cell. *Cell*. 105 (3). 369 – 377.

Kumar, R., Goh, G. B. Chronic hepatitis B and fatty liver: Issues in clinical management. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 40 (6). 755 – 759.

Lang, I. A., Galloway, T. S., Scarlett, A., Henley, W. E., Depledge, M., Wallace, R. B., Melzer, D., 2008. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *Jama Journal of the American Medical Association*. 300 (11). 1303 – 1310.

- Ledesma-Martínez, E., Mendoza-Nuñez, V. M., Santiago-Osorio, E. 2016. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. *Stem Cell International*. 2016.4709572.
- Ling, J., Lewis, J., Douglas, D., Kneteman, N. M., Vance, D. E. 2013. Characterization of lipid and lipoprotein metabolism in primary human hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta – molecular and Cell Biology of Lipids*. 1831 (2). 387 – 397.
- Maffini, M. V., Rubin, B. S., Sonnenschein, C., Soto, A. M. 2006. Endocrine disruptors and reproductive health: The case of bisphenol-A. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 254. 179 – 186.
- Maheshwari, A., Thuluvath, P. J. 2010. Management of acute hepatitis C. *Clinics in liver disease*. 14 (1). 169 – 176.
- Mattar, P., Bieback, K. 2015. Comparing the immunomodulatory properties of bone marrow, adipose tissue, and birth associated tissue mesenchymal stromal cells. *Frontiers in immunology*. 6: 560.
- Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Gobel, U., Daubener, W., Dilloo, D. 2004. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T cells responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *BLOOD*. 103 (12). 4619 – 4621.
- Monga, S. P. S. 2010. *Molecular Pathology of Liver Diseases*. Springer Science & Business Media. p. 931. 1441971076.
- Murray, I. R., West, C. C., Hardy, W. R., James, A. W., Park, T. S., Nguyen, A., Tawonsawatruk, T., Lazzari, L., Soo, C., Penault, B. 2014. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture wessels. *CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES*. 71 (8). 1353 – 1374.
- Naderi, M., Wong, M. Y., Gholami, F. 2014. Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquatic Toxicology*. 148. 195 – 203.



- Nakagawa, Y., Tayama, S. 2000. Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rat hepatocytes. *ARCHIVES OF TOXIKOLOGY*. 74 (2). 99 – 105.
- Newbold, R. R., Jefferson, W. N., Padilla-Banks, E., 2007. Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract. *Reproductive Toxicology*. 24 (2). 253 – 258.
- Oh, S. H., Miyazaki, M., Kouchi, H., Inoue, Y., Sakaguchi, M., Tsuji, T., Shima, M., Nigashio, K., Namba, M. 2000. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into hepatocyte lineage in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*. 279 (2). 500 – 504.
- Owen, M., Friedenstein, A. J. 1988. Stromal stem cells: marrow-derived stem osteogenic precursors. *Ciba foundation symposia*. 136. 42 – 60.
- Peng, H., Wisse, E., Tian, Z. 2015. Liver natural killer cells: subsets and roles in liver immunity. *Cellular and Molecular Immunology*. 13 (3). 328 – 336.
- Petruff, C. A., Bedford, A., Gordon, F. D., Chopra, S. 1997. Hepatitis Vaccines. *Digestive diseases*. 15 (1 – 2). 1 – 22.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., Marshak, D. R. 2009. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284 (5411). 143 – 147.
- Pivnenko, K., Pedersen, G. A., Eriksson, E., Astrup, T. F. 2015. Bisphenol A and its structural analogues in household waste paper. *Waste Management*. 44. 39 – 47.
- Rochester, R. J., Bolden, A. L. 2015. Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. *Environ Health Perspect*. 123. 643 – 650.
- Rosenmai, A. K., Dybdahl, M., Pedersen, M., Vugt-Lussenburg, B. M. A., Wedeby, E. B., Taxvig, C., Vinggaard, A. M. 2014. Are Structural Analogues to Bisphenol A Safe Alternatives?. *Toxicol Sci*. 139 (1). 35 – 47.

- Rossant, J. 2001. Stem Cells from the Mammalian Blastocyst. *STEM CELLS*. 19 (6). 477 – 482.
- Rubin, B. S. 2011. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 127 (1 – 2). 27 – 34.
- Rubin, B. S., Murray, M. K., Damassa, D. A., King, J. C., Soto, A. M. 2001. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect*. 109 (7). 675 – 680.
- Rubin, B. S., Soto, A. M. 2009. Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 304 (1 – 2). 55 – 62.
- Salem, H. K., Thiemermann, C. 2010. Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding and Clinical Status. *Stem Cells*. 28 (3). 585 – 596.
- Senoo, H., Yoshikawa, K., Morri, M., Miura, M., Imai, K., Mezaki, Y. 2010. Hepatic stellate cell (vitamin A storage cell) and its relative – past, present and future. *Cell biology international*. 34 (12). 1247 – 1272.
- Silver, M. K., O'Neill, M. S., Sowers, M. R., Park, S. K. 2011. Urinary Bisphenol A and Type-2 Diabetes in U.S. Adults: Data from NHANES 2003-2008. *PLOS ONE*. 6: e26868.
- Sharpe, R. M. 2003. The oestrogen hypothesis where do we stand now?. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ANDROLOGY*. 26 (1). 2 – 15.
- Shepard, C. W., Simard, E. P., Finelli, L., Fiore, A. E., Bell, B. P. 2006. Hepatitis B virus Infection: Epidemiology and Vaccination. *Epidemiologic Reviews*. 28 (1). 112 – 125.
- Smith, A. G. 2001. Embryo-derived stem cells: Of mice and men. *Annual review of cell and developmental biology*. 17. 435 – 462.

Snippert, H.J., Clevers, H. 2010. Tracking adult stem cells. *EMBO REPORTS*. 12 (2). 113 – 122. Spagiari, G. M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M. C., Moretta, L. 2006.

Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *BLOOD*. 107 (4). 1484 – 1490.

Staples, Ch. A., Dome, P. B., Klecka, G. M., Oblock, S. T., Harris, L. R. 1998. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*. 36 (10). 2149 – 2173.

Sugiura-Ogasawara, M., Ozaki, Y., Sonta, S. I., Makino, T., Suzumori, K. 2005. Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. *Human Reproduction*. 20 (8). 2325 – 2329.

Sun, J. H., Luo, Q., Liu, L. L., Song, G. B. 2016. Liver cancer stem cell markers: Progression and therapeutic implications. *World journal of gastroenterology*. 22 (13). 3547 – 3557.

Sweeney, M. F., Hasan, M., Soto, A. M., Sonnenschein, C. 2015. Environmental endocrine disruptors: Effects of the human male reproductive system. *REVIEWS IN ENDOCRINE & METABOLIC DISORDERS*. 16 (4). 341 – 357.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131 (5). 861 – 872.

Takeuchi, T., Tsutsumi, O., Ikezuki, Y., Takai, Y., Taketani, Y. 2004. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocrine journal*. 51 (2). 165 – 169.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., Jones, J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282 (5391). 1145 – 1147.

- Tiwari, D., Kamble, J., Chilgunde, S., Patil, P., Maru, G., Kawle, D., Bhartiya, U., Joseph, L., Vanage, G. 2012. Clastogenic and mutagenic effects of bisphenol A: An endocrine disruptor. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 743 (1 – 2). 83 – 90.
- Tuan, R. S., Boland, G., Tuli, R. 2002. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Research and Therapy*. 5 (1). 32 – 45.
- Turgeman, G. 2015. The therapeutic potential of mesenchymal stem cells in Alzheimer's disease: converging mechanisms. *NEURAL REGENERATION RESEARCH*. 10 (5). 698 – 699.
- Uetsuka, K., Nishikawa, S., Yasoshima, A., Nakayama, H., Doi, K. 2005. Histopathological Characteristics of Ito Cells and Kupffer Cells in the Feline Liver. *Journal of veterinary medical science*. 68 (3). 235 – 242.
- Viñas, R., Watson, Ch. S. 2013. Bisphenol S Disrupts Estradiol-Induces nongenomic Signaling in Rat Pituitary Cell Line: Effects on Cell Function. *Environ Health Perspect*. 121 (3). 352 – 358.
- Walsh, K., Alexander, G. J. M. 2001. Update on chronic viral hepatitis. *Postgraduated medical journal*. 77 (910). 498 – 505.
- Wang, S., Wang, L., Zhou, M., Wang, Q., Zhou, Q., Huang, X. 2015. Effects of bisphenol A, an environmental endocrine disruptor, on the endogenous hormones of plants. *Environmental Science and Pollution Research*. 22 (22). 17653 – 17662.
- Welshons, W. V., Nagel, S. C., vom Saal, F. S. 2005. Large Effects form Small Exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*. 147 (6). 56 – 69.
- Whitehouse, T., Wendon, J. 2013. Acute liver failure. *Best practice and research in clinical gastroenterology*. 27 (5). 757 – 769.

Wilkening, S., Stahl, F., Bader, A. 2003. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metabolism and Disposition*. 31 (8). 1035 – 1042.

Williams, A. R., Hare, J. M. 2011. Mesenchymal Stem Cells: Biology, patho-physiology, translational findings and therapeutic implications for cardiac disease. *Circulation Research*. 109 (8). 923 – 940.

Witkowska-Zimny, M., Walenko, K. 2011. Stem cells from adipose tissue. *Cellular and molecular biology letters*. 16 (2011). 236 – 257.

Woerle, H. J., Meyer, Ch., Dostou, J. M., Gosmanov, N. R., Islam, N., Popa, E., Wittlin, S. D., Welle, L., Gerich, J. E. 2003. Pathways for glucose disposal after meal ingestion in humans. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*. 286 (4). 716 – 725.

Wong, S. P., Rowley, J. E., Redpath, A. N., Tilman, J. D., Fellous, T. G., Johnson, J. R. 2015. Pericytes, mesenchymal stem cells and their contributions to tissue repair. *Pharmacology & Therapeutics*. 151. 107 – 120.

Wong, H. L., Siu, W. S., Fung, C. H., Zhang, Ch., Shum, W. T., Zhou, X., L., Lau, C. B. S., Zhang, J., F., Leung, P., C., Fu, W., M., Ko, C., H. 2014. Characteristics of stem cells derived from rat fascia: In vitro proliferative and multilineage potential assessment. *MOLECULAR MEDICINE REPORTS*. 11 (3). 1982 – 1990.

Yamamoto, T., Yasuhara, A. 1999. Quantities of bisphenol a leached from plastic waste samples. *Chemosphere*. 38 (11). 2569 – 2576.

Zhi, X. S., Zi, X. Y., Hu, Y. P. 2016. The potential role of liver stem cells in initiation of primary liver cancer. *Hepatology international*. 10 (6). 893 – 901.

## 9 Použité zkratky

$\alpha$ -MEM ...  $\alpha$ -Minimal Essential Medium

ATP ... adenosin – 3 – fosfát

BPA ... bisfenol A

BPS ... bisfenol S

DMEM ... Dulbecco's Minimal Essential Medium

DMSO ... dimethylsulfoxid

EDTA ... kyselina ethylendiamintetraoctová

FBS ... fetální bovinní sérum

HepG2 ... linie lidských hepatocytů

HGF ... hepatocytární růstový faktor

PBS ... fosfátový pufr

PGE2 ... prostaglandin E2

pMSCs ... prasečí mezenchymální kmenové buňky

TGF- $\beta$  ... transformující růstový faktor

TPP ... Techno Plastic Products