

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Ústav komplexních systémů

Bakalářská práce

Vliv běžných pesticidů na lidské buňky

Autor: Miroslav Slivoně

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Renata Štysová Rychtáriková, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: MSc. Ganna Platonova

Studijní program a obor: Ekologie a ochrana prostředí, Ochrana vod

Forma studia: Prezenční

Ročník: Čtvrtý

České Budějovice, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdávanému textu do této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací na Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

Miroslav Slivoně

Poděkování

Touto formou bych rád poděkoval vedoucí mé bakalářské práce Ing. Bc. Renatě Štysové Rychtárikové, Ph.D. a svému konzultantovi MSc. Ganne Platonové. Dále chci poděkovat prof. RNDr. Daliboru Štysovi, CSc a laboratorním pracovnícím Šárce Beranové a Pavlíně Tláskalové za poskytnuté studijní materiály, rady a pomoc při samotném provedení experimentu. Nakonec bych rád poděkoval všem, kteří se jakkoli podíleli na tvorbě této bakalářské práce, především svým nejbližším za poskytnuté rady, podporu a trpělivost.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Miroslav SLIVONĚ**
Osobní číslo: **V16B050P**
Studijní program: **B1601 Ekologie a ochrana prostředí**
Studijní obor: **Ochrana vod**
Téma práce: **Vliv běžných pesticidů na lidské buňky**
Zadávací katedra: **Ústav komplexních systémů**

Zásady pro vypracování

Náplní bakalářské práce bude sledování a vyhodnocování toxického účinku pesticidů běžně se vyskytujících ve vodě (metolachloru, terbutylazinu a chloridazonu) na lidské buňky (hepatocyty ze standardních kultur, lidské dermálními fibroblasty a mesenchymální kmenové buňky) pomocí vysokorozlišené světelné mikroskopie v jasném širokém poli NanoTruth.

V současné době se při mikroskopickém vyhodnocování toxicity standardně počítají počty buněk v různých stavech (živé, apoptické, nekrotické) a počty buněčných dělení. Cílem práce bude doplnit metodu o různé charakteristiky vnitrobuněčného pohybu a změn struktury buněk, což by mělo vést k větší citlivosti metody a ke specifitějším závěrům o mechanismu působení.

Práce bude zahrnovat:

1. Vypracování literární rešerše na dané téma.
2. Experimentální práce: příprava buněčné kultury, světelná mikroskopie.
3. Zpracování a analýza obrazových dat.
4. Sepsání bakalářské práce.

Rozsah pracovní zprávy: **30-50 stran**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby (do 10 stran)**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- Želježić D. et al. Environ. Sci. Pollut. Res. 25(19), 19065-19081, 2018.
Rychtáriková R. et al. Entropy 20(2), 106, 2018.
Rychtáriková R. et al. Entropy 18(10), 372, 2016.
Rychtáriková R. et al. Ultramicroscopy 179, 1-14, 2017.
Rychtáriková R. & Štys D., Lect. Notes Bioinform. 1029, 700-711.

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

Datum zadání bakalářské práce: 13. prosince 2018
Termín odevzdání bakalářské práce: 4. května 2020

V Českých Budějovicích dne 11. ledna 2019


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Zátiší 728/II
389 25 Vodňany (2)


Ing. Petr Císař, Ph.D.
ředitel

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. LITERÁRNÍ REŠERŠE	9
2.1. EKOTOXIKOLOGIE	9
2.2. EKOTOXIKOLOGICKÉ TESTY	10
2.3. KLASIFIKACE TOXIKOLOGICKÝCH TESTŮ DLE DOBY EXPOZICE	10
2.3.1. <i>Akutní testy toxicity</i>	10
2.3.2. <i>Subakutní testy toxicity (subchronické)</i>	11
2.3.3. <i>Chronické testy toxicity</i>	11
2.4. KLASIFIKACE TESTŮ DLE VYSPĚLOSTI DESIGNU TESTOVACÍHO SYSTÉMU	12
2.4.1. <i>Testy první generace</i>	12
2.4.2. <i>Testy druhé generace</i>	12
2.4.3. <i>Testy třetí generace</i>	13
2.4.4. <i>Testy čtvrté generace</i>	15
2.5. KLASIFIKACE TESTŮ PODLE ROZSAHU VYUŽITÍ ŽIVÉHO ORGANISMU	15
2.5.1. <i>Testy cytotoxicity „in vivo“</i>	15
2.5.2. <i>Testy cytotoxicity „in vitro“</i>	16
2.5.3. <i>Testy cytotoxicity „in silico“</i>	17
2.6. TERBUTHYLAZIN (TBA)	18
2.6.1. <i>Toxikologie a ekotoxikologie TBA</i>	19
2.7. TERBUTHYLAZIN-2-HYDROXY (HTBA)	21
2.7.1. <i>Toxikologie a ekotoxikologie HTBA</i>	22
3. MATERIÁL A METODIKA	24
3.1. POKUSNÝ HERBICID	24
3.2. POKUSNÉ BUNĚČNÉ LINIE	24
3.3. STANOVENÍ CYTOTOXICITY POMOCÍ MIKROSKOPU NIKON BIOSTATION IM-Q.....	26
3.3.1. <i>Metoda dilatačního testu in vitro</i>	26
3.3.2. <i>Metoda specifické růstové rychlosti in vitro</i>	27
3.4. STANOVENÍ CYTOTOXICITY POMOCÍ MIKROSKOPU NANOTRUTH.....	27
3.4.1. <i>Simultánní kolorimetrická kalibrace digitálního fotoaparátu a optické dráhy</i>	28
3.4.2. <i>Separace buněk v obraze</i>	29
3.4.3. <i>Metoda optického toku</i>	29
3.4.4. <i>Vizualizace obrazových dat pomocí software Least Information Loss (LIL)</i>	29

4. VÝSLEDKY	31
4.1. STANOVENÍ CYTOTOXICITY POMOCÍ BIOSTATION IM-Q.....	31
4.1.1. <i>Vybrané snímky z komerčního mikroskopu BioStation IM-Q</i>	<i>31</i>
4.1.2. <i>Metoda dilatačního testu in vitro.....</i>	<i>31</i>
4.1.3. <i>Metoda specifické růstové rychlosti in vitro.....</i>	<i>37</i>
4.2. STANOVENÍ CYTOTOXICITY POMOCÍ VYSOKOROZLIŠNÉHO MIKROSKOPU NANOTRUTH.....	39
5. DISKUSE	46
6. ZÁVĚR	49
7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	50
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	58
9. PŘÍLOHY	61
9.1. PŘEHLED ÚDAJŮ O POŘÍZENÝCH SÉRIÍ SNÍMKŮ TESTOVANÝCH BUNĚČNÝCH LINÍÍ.....	61
9.2. SPOLEČNÉ INFORMACE PRO VŠECHNY POŘÍZENÉ SÉRIE OBOU BUNĚČNÝCH KULTUR.....	61
9.3. TABULKY INFORMACÍ K SNÍMÁNÍ PROVEDENÝCH NA BUNĚČNÝCH KULTURÁCH MG63	61
9.4. TABULKY INFORMACÍ K SNÍMÁNÍ PROVEDENÝCH NA BUNĚČNÝCH KULTURÁCH HEPG2	80
10. ABSTRAKT	98
11. ABSTRACT	99

1. Úvod

Herbicide lze v současné době detekovat ve velké části povrchových i podzemních vod nedaleko zemědělsky obhospodařovaných ploch a městských aglomerací. Z těchto proti plevelu ošetřovaných ploch, se tyto nebezpečné látky dostávají do vody jednorázově, ve vysokých koncentracích, nebo soustavně, ve velmi nízkých koncentracích (Kopp a kol., 2015; Halešová a Kotyzová, 2018). Tyto ekologické katastrofy mohou mít negativní vliv nejen na cílové organismy, ale i na lidský organismus či celý ekosystém. To potvrzují mnohé studie zkoumající vliv pesticidů na savčí buňky *in vitro*, včetně buněk lidských (např. Lovaković a kol., 2017; Mladinić a kol., 2009, 2012). Pro nás nejvíce inspirativní práce byla provedena na Ústavu pro lékařský výzkum a ochranu zdraví Chorvatské univerzity v Záhřebu, kde v jedné ze svých posledních rozsáhlých prací testovali *in vitro* koncentrační řadu TBA ($0,58 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a $8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) na lidských hepatocytech a bílých krvinkách. Tyto uvedené koncentrace TBA byly zvoleny na základě doporučených evropských referenčních hodnot (European Commission, 2011). Výsledky těchto experimentů ukazují, že pouze nejvyšší koncentrace TBA ($8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) snížila životaschopnost lymfocytů o 15 %. Nicméně cytotoxický účinek na lidské hepatocyty pozorován nebyl, pouze byla pozorována nízká nestabilita DNA (Želježić a kol., 2018).

Cílem této bakalářské práce bylo rozšířit znalosti o specifikaci vlivu TBA na buněčné kultury savců, a tedy o mechanismy účinků souvisejících s jeho expozicí u lidí, pomocí mikroskopického pozorování biologicko-fyzikálních procesů v nezačleně (fyziologicky a morfologicky nezměněné) buňce. Takovýto přístup k měření buněčné aktivity by mohl navíc přinést metodu studia látkové cytotoxicity, která by byla rychlejší, citlivější a správnější než dosud známé metody.

Mikroskopické pozorování bylo provedeno pomocí komerčně vyráběného mikroskopu Nikon BioStation IM-Q a pomocí vysokorozlišného světelného mikroskopu v jasném a širokém poli NanoTruth vyvíjeném na Ústavu komplexních systémů Jihočeské univerzity (Rychtáriková a Štys, 2017). Snímky buněk byly v případě mikroskopu BioStation vyhodnoceny vizuálně. Snímky z mikroskopu NanoTruth byly vyhodnocovány kombinací převzatých i originálních metod zpracování digitálního obrazu.

2. Literární rešerše

Již kolem roku 2000 př.n.l. se ve staré řečtině setkáváme se slovem *toxicon*, které znamená šíp, či se slovem *toxon*, které znamená luk. Tato slova mají přímou spojitost s jedy, které se v dřívější době aplikovaly na hroty šípů. Odtud pochází kořen slova toxikologie, tedy vědy zabývající se jedy. Toxikologie se stejně jako jakákoli jiná věda dělí na podobory. V první řadě jde o popisnou toxikologii, která se zabývá popisem poškození organismu toxickou látkou. Dále je nutné zmínit predikční toxikologii (odhaduje toxicitu ze struktury chemické látky), soudní lékařství (řeší prokázání otrav v kriminální sféře), klinickou toxikologii (zabývá se využitím chemických sloučenin k léčbě a diagnóze), toxikologii psychotropních a omamných látek (studuje vliv toxických látek na organismus), toxikologii potravin a aditiv (řeší negativní vlivy přídatných látek na kvalitu potravin), toxikologii agrochemikálií (zabývá se otázkou hnojiv, pesticidů, ap.), průmyslovou toxikologii (studuje chemické látky v odpadech průmyslové výroby) a ekotoxikologii (Klusoň, 2014). Poslední tři jmenované podobory, přičemž zejména ten poslední, jsou pro tuto bakalářskou práci stěžejní.

2.1. Ekotoxikologie

Pojem ekotoxikologie se výrazněji začíná objevovat začátkem 2. poloviny 20. století. Za zakladatele tohoto oboru se všeobecně považuje francouzský toxikolog René Truhaut. Ten jako první začal výrazněji kombinovat znalosti dvou oborů, ekologie a toxikologie.

Ekotoxikologie se zabývá studiem škodlivých látek působících přímo i nepřímo na organismy i na celkové životní prostředí. Zabývá se různými změnami v populacích nebo společenstvech v závislosti na výskytu určitých polutantů v jejich životním prostředí či se snaží o monitoring a predikci budoucích vlivů polutantů na ekosystémy. Tyto polutanty mohou být antropogenního i přírodního původu a můžeme je nalézt ve všech možných skupenstvích. (Anděl, 2011).

Podle Jorgensena (2008) se ekotoxikologie zabývá vývojem metod umožňujících specifikovat a následně minimalizovat negativní vlivy nebezpečných látek na životní prostředí. Taktéž tvrdí, že prioritou ekotoxikologie je identifikovat hlavní důsledky

interakcí toxinu a organismu na všech ekosystémových úrovních. Tyto nové informace jsou pak využity v praxi nejen k přímé ochraně, ale i k celkové prevenci, například před úhynem různých organismů nebo znečištěním životního prostředí.

2.2. Ekotoxikologické testy

Hlavním cílem ekotoxikologických (bio)testů je zjištění, zda je určitá látka toxická nebo nikoliv a jestli má nebo nemá negativní vliv na životní prostředí.

Podle textu publikovaného Kočím a Mocovou (2009) se nesmí opomínat i jejich ekonomický vliv. Například v případě úniku toxických látek do vodního prostředí se spustí nespočet řetězových reakcí na všech stupních biologické organizace. Ty pak snadno mohou změnit kvalitu ekosystémových služeb. Ekosystémové služby poskytují člověku vodu, potraviny, všemožné suroviny pro výrobu a spotřebu nebo fyzikální či chemické procesy, které dnešní průmysl bezplatně využívá. Význam těchto testů také zasahuje i do dalších odborných odvětví. Jedním z nich je oblast práva, která dle zveřejněných výsledků upravuje podmínky šíření a využívání nepřehledného množství látek. Příkladem mohou být zákony č. 185/2001 Sb. o odpadech, zákon č. 350/2011 Sb. o chemických látkách nebo mezinárodní směrnice EIA (z angl. Environmental Impact Assessment), ERA (z angl. Environmental Risk Assessment) aj.

2.3. Klasifikace toxikologických testů dle doby expozice

Jedním z parametrů, který můžeme využít ke klasifikaci toxikologických testů je expoziční doba. Jedná se o časový interval, po který působí testovaná látka na testovaný organismus. Délka tohoto intervalu vždy závisí na odolnosti konkrétního organismu, na agresivitě dané chemické látky a na okolním prostředí. Je důležité si také uvědomit, že totožná látka může v různé koncentraci nebo v různém typu prostředí vyvolat i více typů účinků (Kopp a kol., 2015).

2.3.1. Akutní testy toxicity

Akutní (krátkodobé) testy toxicity slouží ke zhodnocení účinku toxické látky na testovaný organismus v případě jednorázového podání nebo během velmi krátkého časového období jeho života. Nejčastěji se setkáme s expoziční dobou trvající 24, 48, 72

nebo 96 hodin, méně často pak s týdenními či dvoutýdenními testy. Výstupem bývá tzv. úmrtnost (mortalita) nebo se z výsledků určí koncentrace (tzv. LC50; z angl. lethal concentration) či dávka (tzv. LD50; z angl. lethal dose), při níž hyne právě 50 % testovaných organismů. Akutní toxicita testované látky zpravidla velmi často závisí na způsobu expozice. Je tedy velmi nezbytné rozlišovat, jakým způsobem byla chemická látka při experimentu podána. Z tohoto důvodu bývá tento údaj spolu s charakterizací testu uveden u hodnoty stanoveného indexu (Hoffman, 1995; Paleček a kol., 1996).

2.3.2. Subakutní testy toxicity (subchronické)

Dle Palečka a kol. (1996) slouží subchronické testy toxicity ke stanovení vlivu chemické látky na organismus po její 28 až 90 denní kumulaci v organismu. U těchto testů dochází k podání chemické látky nejčastěji jednou denně, a to v množstvích nižších, než tomu bývá u akutních testů toxicity. Výstupem jsou hodnoty NOAEL (z angl. no observed adverse effect level), které odpovídají dávkám, u kterých ještě nebyl pozorován škodlivý účinek. Hodnoty LOAEL (z angl. lowest observed adverse effect level) zase odpovídají nejnižšímu množství látky, u kterého škodlivý účinek již pozorován je. Tyto dvě výše uvedené hodnoty ovšem nemusí odhalit následky způsobené dlouhodobou expozicí. Pro tyto účely byly navrženy chronické testy toxicity, které bývávají odvozeny na základě výsledků testů subakutních (Horák a kol., 2004; Balog a Zapletalová, 1998).

2.3.3. Chronické testy toxicity

Chronické (dlouhodobé) testy toxicity představují studium účinků testované látky, která je podávána pravidelně a dlouhodobě, zpravidla déle než 90 dní. Pozorované vlastnosti testovaných látek jsou mutagenního, karcinogenního a teratogenního charakteru. Vliv toxinu bývá zpravidla pozorován až na dalších vývojových stádiích, generacích a potomcích testovaného organismu. Může mít totiž vliv na snížení porodnosti, může být pozorován výskyt degenerativních útvarů nebo i možný přenos dědičných vad a chorob. Nejvíce testované bývají jednoduché organismy, např. řasy a vodní korýši. Výstupy těchto testů mohou také sloužit k určení hodnot NOAEL a LOAEL (Hodgson, 2004; Hellingerová, 2008).

2.4. Klasifikace testů dle vypělosti designu testovacího systému

2.4.1. Testy první generace

U toxikologických testů první generace jsou využívány obvyklé metody odpovídající charakteru akutních testů toxicity. Ty probíhají v laboratorních podmínkách na zpravidla jednoduchých organismech nebo buněčných kulturách (Křůmal, 2006; Hoffman, 2003). Příkladem lze z ryb uvést živorodku duhovou (*Poecilia reticulata*) a dánio pruhované (*Brachydanio rerio*), z korýšů hrotnatku velkou (*Daphnia magna*), z chlorokokálních řas druhu *Scenedesmus quadricauda* a *Scenedesmus subspicatus* nebo z hospodářských rostlin hořčici bílou (*Sinapsis alba*) či salát setý (*Lactuca sativa*).

Pro realizaci těchto testů bývá stěžejní sterilní laboratoř a adekvátní vybavení, příprava chovu testovacích organismů, vodného výluhu a zásobních roztoků solí (Halamová, 2007).

Některé testy byly standardizovány na mezinárodní úrovni, což umožnilo porovnat výsledky z obrovského množství laboratoří různých zemí. Tuto standardizaci pravidelně provádí ISO (z angl. International Organization for Standardization) a OECD (z angl. Organization for Economic Cooperation in Development), (Tichý, 2003; Hoffman 2003).

Kontrolou a srovnáním s výsledky vícera laboratoří dostaneme, například pomocí testů způsobilosti laboratoří, tzv. validovaný postup pro konkrétní biotest.

V porovnání s exaktními metodami enviromentální analýzy patří mezi hlavní nevýhody těchto testů jejich omezená vypovídající hodnota, výše uvedený omezený počet standardizovaných postupů nebo i finanční náročnost z hlediska nutnosti dlouhodobého udržování testovacích organismů (Svobodová a kol., 2000; Ambrožová, 2003).

2.4.2. Testy druhé generace

Toxikologické testy druhé generace jsou v aktuální době nejpoužívanějším typem biotestů, známější pod názvem mikrobiotesty. Při mikrobiotestech bývají jako testující organismy využívány zejména savčí buněčné tkáňové kultury (nahradili testy

na klíčících rostlinách), dále pak lyofilizované kultury bakterií, imobilizované a hluboce zmražené kultury řas, tkáňové kultury bezobratlých nebo různá ranná vývojová stadia obratlovců ve formě jiker a vajíček (Rojíčková, a Maršálek, 1997; Kočí a Mocová 2009).

2.4.3. Testy třetí generace

Toxikologické testy třetí generace využívají tzv. bioindikátorů a biomarkerů, které jsou součástí tzv. biosenzorů. Tento přístup se nazývá biomonitoring a v současné době dochází k jeho významné aplikaci do praxe (např. Koblížek a kol., 2002). Biomonitoring bývá využit při stanovení míry expozice lidského organismu nebezpečným látkám či jako indikátor včasného varování před konkrétními syndromy a chorobami.

Bioindikátory jsou indikační organismy signalizující přítomnost zpravidla nežádoucích látek v konkrétním prostředí. V případě kontaktu bioindikátoru s toxikantem dojde k vyvolání stresové reakce organismu, následně dochází k produkci, případně k alteraci jeho fyziologických hladin. Za biomarker jsou považovány všechny možné odezvy bioindikátoru na přítomnost nežádoucích látek monitorovaného prostředí. Tyto odezvy mohou být nejen fyziologického, biochemického nebo histologického charakteru, ale může jít i o pouhé změny v chování (Mráz a Stránský, 2009). Podstatou využití biomarkerů je výborná znalost biologie testovacího organismu, která je stěžejní pro správnost interpretace odpovědi testovacího organismu prostřednictvím změn konkrétního biomarkeru k přítomnosti toxikantu (Forbes a kol., 2009; Maršálek 2002).

Nejčastěji rozlišujeme dva druhy biomarkerů. Prvním jsou biomarkery expozice, které indikují, že byl bioindikátor vystaven vlivu toxikantu či jeho metabolitu. Tyto markery sice mohou včasně detekovat toxikant pomocí varovných signálů bioindikátoru, čímž je možno předejít například rozsáhlejšímu znečištění, ale nepodávají informace o rozsahu a stupni reálného poškození. Druhým typem jsou biomarkery efektu, které indikují, že došlo k nežádoucímu působení toxikantu na úrovni organismů, které se projevilo poškozením organismu. Konkrétním příkladem je využití testovacího organismu citlivého k organofosfátovému insekticidu způsobujícímu pokles

aktivity enzymu acetyl-cholinesterázy, který je zodpovědný za transport nervových vzruchů (Connon a kol., 2012).

Biomarkery a bioindikátory, jako součást biosenzorů, jsou primárně biologického původu, konkrétně se může jednat o mikroorganismus, enzym, protilátku, oligonukleotid, biomembránu, buněčnou organelu nebo tkáň. Biomarkery a bioindikátory jsou v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem (elektrochemickým, optickým, piezoelektrickým, akustickým a kalorimetrickým). Biosenzory jako celek potom poskytují signál přímo úměrný koncentraci analytu ve vzorku (Maršálek, 2002).

V ekotoxikologii jsou využívány především biosenzory optického typu, které jsou založeny na interakci světelného záření s chemickými látkami (Kizek a kol., 2003). Mezi tyto interakce řadíme techniky, jako jsou především bioluminiscence nebo autofluorescence.

U bioluminiscenčních metod je využíváno chemických reakcí, díky nimž dochází k emisi světla z molekuly v excitovaném stavu. Bioluminiscence je samovolné záření látek vznikající jako přebytek záření vyzařovaného z organismu nad úroveň jeho tepelného záření v dané spektrální oblasti o určité teplotě. Trvání tohoto záření pokračuje i po skončení budícího účinku (Rost, 1995). K těmto bioluminiscenčním stanovením bývá využíván spektrální přístroj luminometr, který detekuje a počítá kvantitativní zastoupení ATP produkované živými mikroorganismy (např. plísněmi a bakteriemi), díky čemuž lze demonstrovat organické znečištění studovaného vzorku. Detekce spočívá ve změření světelné emise, která vzniká v důsledku biochemických reakcí, kdy enzym luciferáza štěpí substrát luciferin. Luminometr, tedy kromě biologické části, obsahuje citlivý fyzikální fotodetektor, jehož výstupem je signál vyjádřený v jednotkách relativního světla (RLU).

Použití bioluminiscence nalezneme při monitoringu úrovně hygieny v potravinářství nebo zdravotnictví, například k detekci fekálního znečištění (bakteriální kmen *Escherichia coli*) nebo ke stanovení těžkých kovů a vápenatých iontů (druhy medúz *Aequorea* a *Obelia*). Mezi další využívané bakteriální kmeny patří *Pseudomonas fluorescens* HK44, který je schopný detekovat a degradovat naftalen. HK44 byl prvním geneticky modifikovaným mikroorganismem, který byl uvolněn do terénu mimo laboratoř, za účelem sledování svého bioremediačního potenciálu (Applegate a kol.,

1998; Trögl a kol., 2012). Další geneticky modifikovaný kmen *Pseudomonas putida* TVA8 obdobně umožňuje bioluminiscenční genovou expresi reagující na přítomnost sloučenin benzenu, toluenu, ethylbenzenu a xylenu (Kuncová a kol., 2016).

Jestliže světelné záření emitované bioindikátorem zmizí po odstranění zdroje ozáření, jedná se o (auto)fluorescenci. Tato metoda spočívá v ozáření speciálních chemických látek (fluorochromů) světlem s kratšími vlnovými délkami, následované vyzářením světla s delšími vlnovými délkami, čímž se mění i pozorované zbarvení daného fluorochromu. Tento princip umožňuje detekovat například množství některých sloučenin obsažených v buněčných kulturách pomocí fluorescenčního mikroskopu (např. Huang a kol., 2009) či pomocí průtokové cytometrie (např. Mahler a kol., 2011).

2.4.4. Testy čtvrté generace

Testy čtvrté generace spočívají v kombinaci metod a prvků toxikologických testů třetí generace a on-line monitorovacích systémů s dálkovým přenosem dat. V rámci jejich vývoje došlo k zdokonalení analytických metod popsanych v kapitole testů toxicity třetí generace. Mezi základní požadavky těchto složitějších a pokrokovějších testů čtvrté generace patří automatizace, reprodukovatelnost a objektivnost. Jsou také velmi citlivé, mají velmi nízké provozní náklady a nijak významně nezasahují do rovnováhy studovaných systémů (Maršálek, 2002).

2.5. Klasifikace testů podle rozsahu využití živého organismu

2.5.1. Testy cytotoxicity „in vivo“

Cytotoxikologické testy „in vivo“ (lat. „v živém“) jsou prováděny na živoucích organismech. Tyto testy byly používány zejména v minulosti a jsou proto zdrojem podstatné části toxikologických dat (Horák a kol., 2004).

Zvolení živého pokusného organismu závisí na spoustě okolností. Příkladem může být citlivost vůči danému toxikantu, jeho dostupnost na trhu nebo náročnost jeho chovu. Volba testovacího organismu závisí na příslušných zákonech či mezinárodních směrnících, úmluvách a dohodách.

Konkrétně byly pro tyto účely nejčastěji využívány laboratorní myši a potkani, králík domácí (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*) nebo morče domácí (*Cavia porcellus*). Ovšem koncem 20. století byl kladen důraz na snížení počtů testovacích organismů či k jejich úplnému nahrazení alternativami, jako jsou bezobratlí či embrya obratlovců. Příkladem je test FETAX (z angl. frog embryo teratogenesis assay-Xenopus), při kterém je jako testovací organismus využívána drápatka vodní (*Xenopus laevis*). Dále bývají při těchto testech využívány rybí embrya nebo imobilizované či lyofilizované organismy (např. mořské bakterie *Vibrio fischeri*). Poměrné zastoupení samců a samic by mělo v experimentu odpovídat 1:1 (Kopp a kol., 2009; Kočí a Mocová, 2009).

2.5.2. Testy cytotoxicity „in vitro“

Testy *in vitro* (lat. „ve skle“) v praxi neprovádíme přímo na zkoumaném organismu, ale na jeho udržovaných buněčných kulturách v tkáňové laboratoři. Ty bývají často nasazovány na tzv. Petriho misky či vyhřívané kultivační misky (Kubincová a kol., 2016).

Prvotní (originální) buněčná kultura izolovaných buněk je tzv. primární kultura (primokultura). Buňky z primokultur pocházejí buď z normálních nebo nádorových tkání. Nádorové buňky se zpravidla snáze dělí, kultivují a k stárnutí buněčné kultury nedochází. Jednou z nejznámějších je buněčná linie HeLa z děložního čípku Henrietty Lacks (Kočárek a kol., 2006).

V důsledku pasážování vzniká tzv. sekundární kultura (subkultura). Buňky této subkultury jsou následně množeny, dokud není získáno dostatečné množství pro experiment. U normálních buněčných kultur dochází po několika pasážích k ukončení buněčného dělení, tedy k tzv. zestárnutí buněčné kultury.

Pro testování toxicity jsou obecně vhodné snadno dostupné buněčné linie homogenního, jasně definovaného charakteru, které dovolují testování mnoha typů vzorků, a přitom dávají reprodukovatelný výsledek. V současné době bývají nejčastěji používány zvířecí buněčné linie (Kanazawa a kol., 2007).

Mezi lidské buněčné linie odvozené z kostních tkání patří mimo jiné i buněčná linie MG-63 (viz. kap. 3.2). Ač je tato buněčná linie odvozena z osteosarkomů, zachovává si možnost diferenciaci za přítomnosti markerů, kam patří například aktivita alkalické

fosfatázy nebo produkce osteokalcinu (Zhao a kol., 2007; Rudnik a kol., 2007; Grausová a kol., 2009; Kalbáčová a kol., 2009).

Při experimentálním studiu toxicity xenobiotik a metabolismu jater je výhodné používat modelové hepatocytární linie, např. linie HepG2 a jejich deriváty (viz. kap. 3.2), (Želježić a kol., 2018; Fanelli A., 2016). Důvodem je vysoký stupeň morfologické a funkční diferenciacie linie HepG2 *in vitro* (Moscato S. a kol., 2015). Linie HepG2 je vhodným modelem pro studium intracelulárního transportu a dynamiky proteinů, lipidů, žlučových kanálků a sinusových membrán, což může být důležité pro studium lidských jaterních onemocnění, pro detekci cytotoxických a genotoxických látek (Mersch-Sundermann V. a kol., 2004).

Výsledek *in vitro* testů závisí na spoustě okolností. Jednou z nich je schopnost buněčné kultury metabolizovat daný druh toxikantu. Pokud se buněčné kultuře povede toxikant metabolizovat, nedochází k žádným pozorovatelným účinkům. V opačném případě dochází ke změně nebo zpomalení buněčných procesů, které mohou končit až buněčnou nekrózou či apoptózou.

Mezi výhody *in vitro* testů patří jejich vysoká citlivost a reprodukovatelnost, dále nízké časové a finanční nároky. Nevýhodou je, že buněčné kultury nebudou moci nikdy stoprocentně simulovat celý živý organismus, hlavně jeho enzymaticko-imunitní systém (Kopp a kol., 2015).

2.5.3. Testy cytotoxicity „*in silico*“

Termín *in silico* lze chápat jako „spočteno počítačem, zjištěno počítačovou simulací“ (např. Tichý, 2008). Tento přístup využívá rozsáhlé soubory dat, které jsou získány testováním na standardních i alternativních zvířecích modelech.

Zpravidla se výpočetní modely vytvářejí celkovým zobecněním údajů, které jsou získány technikou analýzy QSAR (z angl. quantitative structure-activity relationships), která pomocí matematické statistiky vyjadřuje kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou, případně fyzikálně chemickými vlastnostmi toxické látky a její biologickou účinností. Onen soubor informací o struktuře a vlastnostech látek se často týká jak série látek sobě podobných z hlediska struktury (homologická série), tak i těch látek, které jsou strukturně různorodé (heterogenní série). Možnost použitelnosti QSAR modelu

je určena rozsahem hodnot sérií využitých k jeho tvorbě. Čím větší je daná série, tím lepší je odvození QSAR modelu.

Také bývají využívány i kinetické fyziologické simulační modely PBSM (z angl. physiologically-based simulation models), expertní systémy založené na souborech pravidel a údajů o toxických indexech, modely vytvořené technikami molekulové dynamiky, modely založené na biologické podobnosti, alometrických rovnicích či využívající umělou inteligenci ve formě umělých neuronových sítí.

Důležité je vždy uvést pravděpodobnost správnosti těchto modelů, protože se výsledky získané použitím těchto modelů mohou snadno lišit od skutečnosti. Tato správnost matematického odhadu výsledku je ovlivněna různými faktory, mezi které patří věk, fyziologický stav, životní prostředí, podmínky expozice organismu a další (Tichý a kol. 2005).

2.6. Terbutylazin (TBA)

Terbutylazin, N²-terc-butyl-6-chlor-N⁴-ethyl-1,3,5-triazin-2,4-diamin, patří do chlor-s-triazinové skupiny herbicidů. Ve fotosyntetizujících organismech působí především jako inhibitor fotosyntézy, kde ve fotosystému II narušuje transport elektronů nahrazením plastochinonu, který je nepostradatelnou složkou při tvorbě adenosintrifosfátu (ATP), tedy buněčné energie (Mikulka a Kneifelová 2004).

Účinnou látku terbutylazin najdeme v mnoha komerčních přípravcích Akris, Aspect Pro, Balaton, Bolton Duo, Bromoterb, Calaris, Gardoprim Plus Gold 500 Sc, Koban T, Lumax, Successor T, Successor Tx, Sulcotrek, Talos nebo Zeagran 350 (Agromanuál, 2020). V těchto přípravcích je TBA aplikován zejména na zemědělská pole, kdy celková spotřeba pouze samotné účinné látky terbutylazin byla v České republice 119 tun v roce 2007 a 113 tun v roce 2013 (ALS CR, 2015).

Terbutylazin je na fotosyntetizující části rostlin zpravidla aplikován plošně. Při nižších objemech aplikovaných herbicidů setrvává na místě dopadu, listech rostlin. Jelikož je třeba, aby byl TBA absorbován i kořeny rostlin, může být jeho účinnost v tomto případě snížena a je nutné aplikovat herbicidy opakovaně nebo ve vyšších objemech (Smolin a Rapoport, 1959).

V zemědělství se TBA využívá zpravidla v kombinaci s dalšími účinnými látkami. Příkladem může být kombinace TBA a mesotrionu a to zejména při pěstování

slunečnice roční (*Helianthus annuus*) pro zamezení růstu obilovin, dvouděložných rostlin a jiných plevelů. Nicméně TBA bývá také značně využíván v kulturách kukuřice, a to v kombinaci s mesotrionem a s-metolachlorem (Glyamova a Stirmanov, 2014). Dále jej nalezneme v kulturách brambor, hrášku, fazolí, čiroku, cukrové třtiny nebo při pěstování kávy, kakaa, oliv, vinné révy či v sadech ovocných stromů (WHO 2003). TBA je využíván i ve vodním hospodářství, lesnictví, průmyslu (WHO 2003) i pro osobní potřebu v boji proti plísním, řasám či bakteriím (USEPA 1995).

Dle článků Carafa a kol., 2007 a Pinto a kol., 2012 se koncentrace TBA ve vodním prostředí běžně pohybují v jednotkách, případně v desetinách $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Co se týče koncentrací TBA v povrchových vodách České republiky, v mezidobí 2006 až 2017 byly Českým hydrometeorologickým ústavem naměřeny nejvyšší roční koncentrace v rozmezí 2,7–9,6 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (ČHMÚ, 2020a).

Poločas rozpadu TBA je ovlivněn mnoha faktory. Jedním z nich je pH okolního prostředí, kdy při vyšším pH probíhá rozklad pomaleji (6 a více měsíců) a v případě relativně nízkého pH probíhá rozklad rychleji (2 až 3 měsíce). Mezi další stěžejní faktory ovlivňující rozklad patří teplota, záření nebo činnost mikroorganismů.

Mezi metabolity TBA patří terbuthylazin-2-hydroxy, atrazin-desethyldeisopropyl, atrazin-desisopropyl, terbuthylazin-desethyl, atrazin-desethyl deisopropyl-2-hydroxy a terbuthylazin-desethyl-2-hydroxy (Dousset a kol., 1999).

2.6.1. Toxikologie a ekotoxikologie TBA

Karcinogenita TBA nebyla zatím nijak prokázána, ovšem toxicita je nezpochybnitelná, což demonstruje tabulka toxicity vůči vybraným zástupcům organismů (tab. č. 1.).

Využívání TBA se v posledních desetiletích pravidelně zvyšuje, jelikož účinně nahradil atrazin, který byl v zemích EU v minulosti zakázán (Sass a Colangelo, 2006). Nedávné studie však naznačují, že TBA může vzhledem ke své perzistenci představovat podobný environmentální problém jako atrazin (Stipičević a kol. 2015, 2017).

Mechanismy působení související s jeho expozicí vztahující se ke zvířatům a lidem jsou stále nedostatečně zkoumány. Existuje několik způsobů expozice člověka TBA. Obecná populace je většinou vystavena požití kontaminované pitné vody a dermálnímu

kontaktu. K expozici dochází také na pracovištích, kde se TBA vyrábí či aplikuje, a to jak v komerčních, tak v průmyslových podmínkách, buď kontaktem látky s kůží nebo inhalací (USEPA 1995).

V roce 2011 stanovila Evropská komise pro TBA následující referenční hodnoty: ADI 0,004 mg·kg⁻¹ tělesné hmotnosti den⁻¹, AOEL 0,0032 mg·kg⁻¹ tělesné hmotnosti den⁻¹ a ARfD 0,008 mg·kg⁻¹ tělesné hmotnosti den⁻¹ (EC 2011; EFSA 2011, 2017; USEPA 2018). Výbor pro posuzování rizik Evropské agentury pro chemické látky (ECHA 2015) nezavedl pro TBA žádnou klasifikaci ohledně možné karcinogenity.

V posledních letech však množství údajů o potenciálních škodlivých účincích TBA dále rostlo. Několik studií přisuzovalo sloučenině negativní účinky na endokrinní funkce v *in vitro* (Forgacs a kol., 2013; Kjeldsen a kol., 2013; Ghisari a kol., 2015) i *in vivo* (Bossi a kol., 2013; Taxvig a kol., 2013) testech cytotoxicity. Většina nedávných toxikologických studií TBA a jeho degradačních produktů a metabolitů se zaměřila na vodní organismy (Štěpanová a kol., 2012; Mikulíková a kol., 2013; Manera a kol., 2016a, b). Jejich výsledky ukázaly, že expozice TBA ovlivnila přežití, vývoj a růst testovaných organismů. Konkrétně způsobila biochemické, hematologické, patologické změny v orgánech a tkáních nebo oxidační stres. Studie toxicity TBA na experimentálních modelech hlodavců jsou již méně rozsáhlé. Benković a kol. (2012) uváděli poškození hematologických a některých biochemických markerů u hlodavců. Gebel a kol. (1997) studovali genotoxicitu TBA taktéž na hlodavcích, a to pomocí testu mikronukleární kostní dřeně, ovšem genotoxické účinky potvrzeny nebyly. Jiné výsledky studie naznačují, že by TBA mohl narušit integritu genomu krevních buněk potkana *in vivo* (Lovaković a kol., 2017) a lidských lymfocytů *in vitro* (Mladinić a kol., 2009, 2012).

Tab.1: Vybrané hodnoty toxicity TBA (PPDB, 2019a)

Specifikace, expozice	Dávka	Taxon	Organismus
Přijatelný denní příjem ADI	0,004 mg·kg ⁻¹	savci (<i>Mammalia</i>)	pes domácí (<i>Canis lupus f. familiaris</i>)
Akutní orální LD50	> 1000 mg·kg ⁻¹	savci	krysa obecná (<i>Rattus rattus</i>)
Dermální LD50	> 2000 mg·kg ⁻¹	savci	krysa obecná

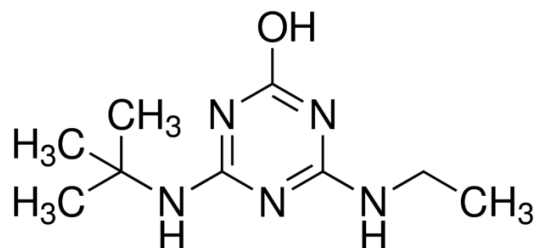
Inhalace, 4-hod. LC50	> 5,3 mg·l ⁻¹	savci	krysa obecná
Akutní 96-hod. LC50	2,2 mg·l ⁻¹	ryby (<i>Osteichthyes</i>)	pstruh duhový (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
Chronická 21-denní NOEC	0,09 mg·l ⁻¹	ryby	pstruh duhový
Akutní 48-hod. EC50	21,2 mg·l ⁻¹	korýši (<i>Crustacea</i>)	hrotnatka velká (<i>Daphnia magna</i>)
Chronický 21-denní NOEC	0,019 mg·l ⁻¹	korýši	hrotnatka velká
Akutní 96-hod. expozice LC50	0,167 mg·l ⁻¹	korýši	druh krevety <i>Americamysis bahia</i>
Chronická 28-denní NOEC, ve vodním prostředí	0,5 mg·l ⁻¹	členovci (<i>Arthropoda</i>)	druh pakomára <i>Chironomus riparius</i>
Akutní 7-denní EC50 biomasa	0,0128 mg·l ⁻¹	áronovité (<i>Araceae</i>)	okřehek hrbatý (<i>Lemna gibba</i>)

2.7. Terbutylazin-2-hydroxy (HTBA)

Terbutylazin-2-hydroxy (2- (terc-butylamino) -6- (ethylamino) -1H-1, 3,5-triazin-4- on, obr. č. 1) patří spolu s terbutylazin-desethyl-hydroxy a terbutylazin-desethyl k hlavním degradačním produktům (metabolitům) TBA v povrchových a podzemních vodách. Tato degradace chemických látek probíhá za přispění biotických a abiotických rozkladných procesů (oxidace, fotodegradace, hydrolýza, biologický rozklad aj.). Tyto procesy způsobují štěpení triazinového kruhu (dealkylaci alkylovaných aminoskupin, deaminaci, hydroxylaci aj.). Tato degradace (částečný rozpad chemické struktury) je ovlivněna mnoha faktory, například teplotou. Ve vodním prostředí a při teplotě 20–25 °C se poločas rozpadu HTBA pohybuje mezi 112 a 120 dny, zatímco při teplotě 10 °C to je až 456 dní (Nodler a kol., 2013; Huber a kol., 2000).

Dle hodnot zveřejněných v databázi Českého hydrometeorologického ústavu (ČHMÚ) získaných v mezidobí 2009–2017, byla v roce 2011 v povrchových vodách České republiky naměřena nejvyšší koncentrace 0,99 µg·l⁻¹ HTBA v objektu PVL_2481 – Mnichovický potok (povodí řeky Želivky). Druhou nejvyšší naměřenou hodnotou je koncentrace 0,79 µg·l⁻¹ z roku 2014 a třetí nejvyšší naměřenou hodnotou je koncentrace 0,5 µg·l⁻¹ z roku 2017 (ČHMÚ, 2020b). Dalším příkladem na evropské úrovni může být

koncentrace $9,24 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ HTBA z roku 2011 naměřená v povodí řeky Llobregat (Španělsko) (Masia a kol., 2015).



Obr. č. 1. Chemická struktura metabolitu terbuthylazin-2-hydroxy (Sigma-Aldrich International GmbH, 2019).

2.7.1. Toxikologie a ekotoxikologie HTBA

Toxikologický vliv HTBA na vybrané organismy je uveden v tabulce č. 2.

Tab. č.2: Vybrané hodnoty toxicity HTBA (PPDB, 2019b)

Specifikace, expozice	Dávka	Taxon	Organismus
Akutní orální LD50	$> 2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	savci (<i>Mammalia</i>)	krysa obecná (<i>Rattus rattus</i>)
Akutní 96-hod. LC50	$> 2,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$	ryby (<i>Osteichthyes</i>)	pstruh duhový (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
Akutní 48-hod. EC50	$2,8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$	koryši (<i>Crustacea</i>)	hrotnatka velká (<i>Daphnia magna</i>)
Chronická 28-denní NOEC, ve vodním prostředí	$400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	členovci (<i>Arthropoda</i>)	druh pakomára žijící v sedimentu (<i>Chironomus riparius</i>)
Akutní 72-hod. EC50	$> 3,8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$	řasy (<i>Algae</i>)	druh zelené mikrořasy (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)

Ve studii Koutnik a kol. (2017) měl HTBA v koncentracích $75 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, $375 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a $750 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (při expozici delší než 22 dní) negativní vliv na metabolismus raka mramorovaného (*Procambarus fallax f. virginalis*). U juvenilních stádií testovaných raků bylo zjištěno výrazné zpomalení ontogeneze. Od 7. vývojového stádia byla

pozorována výrazně nižší tělesná hmotnost a vyšší hladina oxidačního stresu. Testovaní jedinci dále vykazovaly změny tubulárního systému včetně rozpadu tubulárního epitelu s úplnou ztrátou struktury na některých místech hepatopankreatu.

Dle Velíška a kol. (2014) negativně ovlivnila chronická expozice HTBA rychlost vývoje, rychlost růstu a antioxidační obranný systém plůdku kapra obecného (*Cyprinus carpio L.*). Ontogenetické a histologické změny ryb byly pozorovány pouze při vyšších koncentracích HTBA (1,4 a 3,5 mg·l⁻¹), ale rychlosti růstu a výskyt antioxidačního enzymu byly ovlivněny u ryb vystavených nejnižší testované koncentraci odpovídající hodnotám naměřeným v českých řekách (tj. 0,0029 mg·l⁻¹). Důležité je vzít v úvahu i to, že vodní prostředí často obsahuje i další látky, při jejichž kombinované expozici s HTBA může být negativní vliv HTBA ještě zesílen. To bylo částečně potvrzeno v již zmíněné studii Velíška a kol. (2016b), kde byl popisován vliv triazinových metabolitů (HTBA, terbuthylazin-desethylu a atrazinu-2-hydroxy). Ty způsobily v jaterní tkáni kapra obecného patologické změny. Terbutylazin-desethyl také ovlivnil hladiny antioxidačních enzymů v raném vývojovém stadiu kapra, ovšem bez jednoznačných negativních účinků na životaschopnost kapřích embryí, líhnutí nebo chování kaprů.

3. Materiál a metodika

Experimentální práce byla realizována pod záštitou Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Ústavu komplexních systémů (ÚKS) Fakulty rybářství a ochrany vod (FROV) v Nových Hradech.

3.1. Pokusný herbicid

Pesticid terbutylazine-2-hydroxy (PESTANALTM, CAS 66753-07-9) byl dodán ve formě analytického standartu firmou Sigma-Aldrich International GmbH (č. produktu 46019, šarže BCBZ7083, číslo CAS 66753 07 9, čistota 97 %, vlhkost 3,8 %).

HTBA byl dodán ve formě bílého prášku. Na digitální analytické váze s přesností na 4 desetinná místa bylo odebráno 0,08 g HTBA. Toto množství bylo rozpuštěno v 500 ml DMSO, což odpovídalo koncentraci 0,16 g·l⁻¹. Z toho bylo odebráno 50 µl do 500 ml DMEM (celkový objem 500 ml, výsledná koncentrace 0,08 g·l⁻¹ HTBA). Z tohoto roztoku bylo následně odebráno buď 10 µl, 1 µl nebo 0,75 µl, které byly aplikovány přímo do média s buňkami. Díky tomu bylo možné docílit konečných koncentrací o hodnotách 8 mg·l⁻¹, 0,8 mg·l⁻¹ a 0,58 mg·l⁻¹, které byly vybrány na základě denních referenčních hodnot stanovených evropskou komisí pro zdraví spotřebitelů (European Commission, 2011, Želježić a kol., 2018).

3.2. Pokusné buněčné linie

Adherentní buněčné linie použité v experimentech pocházely z Evropské sbírky autentizovaných buněčných kultur (ECACC).

Přípravu buněčných kultur pro mikroskopii provedly Šárka Beranová a Pavlína Tláskalová z laboratoře tkáňových kultur ÚKS. Složky médií byly zakoupeny dle aktuální dostupnosti a cenové nabídky (např. od VWR International, Fisher Scientific, Sigma Aldrich).

Jako substrát pro kultivaci buněk bylo zvoleno médium **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)**, které bylo nutno doplnit o určité komponenty chránící buněčné kultury před nežádoucími patogeny a dodávají jim vhodné množství živin či dalších látek nezbytných pro jejich prosperitu.

Obohacené médium DMEM vykazovalo složení:

- 87,7 % původního neobohaceného DMEM se zvýšeným obsahem glukosy
- 10 % bovinního fetálního séra
- 1 % aminokyseliny L-glutaminu
- 0,3 % aminoglykosidu gentamicinu
- 1 % antibiotik a antimykotik

K oplachu buněk bylo využito roztoku **fosfátového pufru** o složení:

- 140 mM NaCl (chlorid sodný)
- 2,7 mM KCl (chlorid draselný)
- 10 mM NaHPO₄·12H₂O (dodekahydrát hydrogenforforečnanu sodného)
- 1,8 mM KH₂PO₄ (dihydrogenfosforečnan draselný)

Tab. č. 3: Základní informace o použitých buněčných liniích HepG2 a MG63 (Sigma-Aldrich International GmbH 2020a; 2020b)

Buněčná linie	Lidská MG63	Lidská HepG2
ECACC kat. č.	86051601	85011430
Biologický zdroj	Lidská kost	Jaterní tkáň
Popis	Lidský osteosarkom	Lidský hepatocelulární karcinom
Karyotyp	Modální č. 66; hypotriploid	Modální č. 55
Morfologie	Fibroblast	Epiteliální
Profil DNA (data STR-PCR)	Amelogenin: X, Y D7S820: 10 CSF1PO: 10,12 THO1: 9,3 D13S317: 11 TPOX: 8,11 D16S539: 11 vWA: 16,19 D5S818: 11,12	Amelogenin: X, Y D7S820: 10 CSF1PO: 10,11 THO1: 9 D13S317: 9,13 TPOX: 8,9 D16S539: 12,13 vWA: 17 D5S818: 11,12
Popis linie	Z osteosarkomu čtrnáctiletého muže. Produkuje vysoké výtěžky interferonu po superindukci kyselinou polyinosinovou-polycytidilovou, cyklohexamidem a aktinomycinem. Antigenicky je interferon MG-63 těsněji příbuzný lidskému fibroblastu než interferon leukocytů.	Z jaterní biopsie patnáctiletého muže s dobře diferencovaným hepatocelulárním karcinomem. Buňky vylučují různé plazmatické proteiny, např. albumin, α-2-makroglobulin, α-1-antitrypsin, transferrin a plasminogen. Byly úspěšně pěstovány ve velkých kultivačních systémech. Povrchové antigeny viru hepatitidy B nebyly detekovány. Buňky by měly dobře reagovat na stimulaci lidským růstovým hormonem.

3.3. Stanovení cytotoxicity pomocí mikroskopu Nikon BioStation IM-Q

Nikon BioStation IM-Q je časosběrná sestava obsahující mikroskop (snímající ve fázovém kontrastu), inkubátor, vysoce citlivou CCD kameru (počet pixelů 1280×960; zesílení/gain 1,7; expozice 1/90 s) a zdroj světla (použitá intenzita světla 85 %) s chlazením. BioStation byl použit k pořízení digitálního záznamu vývojových fází buněčných kultur.

Pomocí mikrokinematografické sestavy BioStation IM-Q bylo jednotlivě pořízeno 12 obrazových sérií dat buněčné kultury MG63 a buněčné kultury HepG2 pěstovaných na dělené Petriho misce v médiu DMEM obsahujícím HTBA (0; 0,58; 0,8; 8 mg·l⁻¹ jednotlivě v každém oddíle Petriho misky). Buněčné kultury byly udržovány při 37 °C a 5 % CO₂. Hustota buněčné kultury HepG2 a MG63 přibližně odpovídala 2×10⁵ a 3×10⁵ buněk na 8,8 cm². Každé čtyři obrazové série dat pro každou z vybraných buněčných kultur odpovídaly jedné ze zvolených koncentrací HTBA. Každá ze sérií obsahovala 2161 snímků, které byly foceny s dvou minutovým rozestupem po dobu 72 hodin.

Pořízené série snímků buněčných linií byly následně vyhodnoceny kvantitativní analýzou obrazových dat metodami dilatačního testu a specifické růstové rychlosti (kap. 3.3.1 a 3.3.2). Jednotlivé výsledky pro každou trojici sérií se stejnou koncentrací HTBA byly zprůměrovány (aritmetický průměr ± směrodatná odchylka).

3.3.1. Metoda dilatačního testu *in vitro*

Dilatace je jev nastávající po tzv. pasáži. Záznam z časosběrného kinematografického zařízení BioStation IM-Q byl vizuálně kvantitativně analyzován, byla určena frekvence dilatování buněk. Pro dilataci se vyhodnocují snímky focené v 2., 12., 22., 32., 42., 52. a 62. minutě od počátku snímání Petriho misky. Toto vyhodnocení bylo provedeno u kontrolního vzorku bez inhibice HTBA a u vzorků s koncentracemi 0,58 mg·l⁻¹, 0,8 mg·l⁻¹ a 8 mg·l⁻¹.

Výsledky jsou zobrazeny v grafech č. 1-2 jako procentuální zastoupení dilatovaných buněk vůči všem buňkám v obraze, a to v závislosti na určitém čase vývoje buněčných kultur a zvolených koncentrací toxikantu HTBA.

3.3.2. Metoda specifické růstové rychlosti in vitro

Zjednodušené vyhodnocení cytotoxicity pomocí specifické růstové rychlosti proběhlo součtem jednotlivých buněk v obraze v následujících časech (min): 1, 1440, 2880 a 4320. To bylo provedeno u každé buněčné série pro všechny čtyři paralelní trojice sérií obrazových dat, které odpovídaly zvoleným koncentracím HTBA i jednomu kontrolnímu vzorku (tedy 0; 0,58; 0,8; 8 mg·l⁻¹). Tyto hodnoty byly následně pro jednotlivé buněčné kultury zprůměrovány a vyneseny v grafech č. 3 a č. 4.

3.4. Stanovení cytotoxicity pomocí mikroskopu NanoTruth

Druhým přístrojem využitým pro realizaci experimentu je na zakázku vyrobený (Optax, Praha) invertovaný vysokorozlišný širokoúhlý světelný mikroskop s jasným polem NanoTruth.

Optická cesta začíná dvěma světelnými diodami Luminus 360 s maximální možnou hodnotou proudu 5000 mA (v popsáných experimentech byl použit proud o hodnotě 4500 mA), které osvětlují vzorek pomocí řady světelných záblesků a umožňují tak získání snímků s vysokým poměrem signál/kvantový šum. Optický systém mikroskopu byl dále vylepšen infračervenými (775 nm) a ultrafialovými (450 nm) filtry (Edmund Optics). Po průchodu skrze vzorek putuje světlo k objektivu (Nikon LWD 40×/0,55, Ph1 ADL, 1/1,2, WD 2.1). Tubusová čočka Mitutovo (5×) a projekční čočka (2×) zvětšují a promítají obraz na kameru JAI s 12bitovým barevným digitálním čipem Kodak KAI-16000 s rozlišením 4872×3248 (zesílení 0, offset 300 a expozice 293,6 ms). Při tomto celkovém zvětšení je velikost objektu promítaného na pixel kamery 32 nm. Proces zachycení primárního signálu je řízen speciálně vyvinutým softwarem (Lonhus a kol., 2019). Během snímání mikroskopem NanoTruth byly buněčné kultury MG63 a HepG2 udržovány v kultivačním systému Biotech FCS2 při 37°C. Hustota testovaných buněčných kultur MG63 a HepG2 ve vzorku činila vždy 15 000 b·cm⁻².

Série digitálních snímků buněčných kultur ve 12bpc formátu raw (tj. 12 bitů na jeden barevný obrazový kanál, z angl. bit per channel, primárního digitálního signálu) byly dále zpracovány a vizualizovány postupy popsány v kap. 3.4.1–3.4.4. Soupis datových sérií a jejich specifikace jsou uvedeny v kap. 9.

3.4.1. Simultánní kolorimetrická kalibrace digitálního fotoaparátu a optické dráhy

Optická vignetace a další vady v digitálním obraze (primárních datech) byly korigovány softwarem VerCa (ÚKS) pomocí simultánní kalibrace optické dráhy mikroskopu a čipu kamery (Platonova a kol., 2019).

Experimentální část kalibrace byla provedena Mgr. Gannou Platonovou a Ing. Ali Ghaznavim z ÚKS:

1. Pomocí mikroskopické fotokamery bylo postupně nasnímáno 12 snímků šedých filtrů lišících se intenzitou odstínu. Filtry 1–10 byly nanášeny na 2 mm podložní skličko (Step ND filter NDL–10S–4). Nultý (snímek nejtmaší intenzity) a dvanáctý odstín (snímek nejsvětlejší intenzity) byly jednotlivě nasnímány přikrytým objektivem a bez jakékoli vrstvy. Snímky filtrů byly uloženy do adresáře „camera“.

2. Objektiv mikroskopu byl nahrazen imitací objektivu s upevněným vláknovým spektrofotometrem Ocean Optics USB 4000 VIS-NIR-ES, pomocí kterého byla měřena světelná spektra procházející šedými filtry popsány v bodě 1. Jednotlivá transparentní spektra filtrů byla ve formátu .txt uložena do složky „light“.

Výpočetní část obrazové kalibrace a korekce (algoritmus software VerCa):

A) Konstrukce kalibrační křivky pro každý pixel

(1) Spektra červených, zelených a modrých filtrů Bayerovy masky kamery mikroskopu (dodané výrobcem kamery) byly digitalizovány, zapsány a uloženy jako kalibrační data „spectrum.txt“ do adresáře „camera“.

(2) Vynásobením naměřených transparentních spekter (získaných v bodu 2 předchozí experimentální části kalibrace) spektra filtrů Bayerovy masky (viz. bod A1 výpočetní části kalibrace) byla pro každý barevný filtr Bayerovy masky získána spektra světla dopadajícího na daný filtr Bayerovy masky.

(3) Metodou lichoběžníkového pravidla byl pro každý šedý filtr vypočítán celkový počet fotonů dopadající na jednotlivý (r, g, b) kamerový filtr jako integrál plochy pod příslušným spektrem (získaným v bodě A2 výpočetní části kalibrace).

(4) Pro každý pixel všech kalibračních snímků (viz. bod 1 experimentální části) byl zkonstruován kalibrační bod kalibrační křivky jako závislost celkového počtu fotonů pixelů (dopadajících na kameru) na intenzitě pixelu ve snímku. Každá dvojice dvou po sobě následujících kalibračních bodů byla proložena lineární interpolací.

B) Korekce intenzity experimentálních raw dat

Intenzita každého pixelu všech snímků buňky (v raw formátu) byla přepočítána pomocí kalibračního vztahu příslušné části kalibrační křivky. Pro navazující operace obrazové analýzy bylo výsledné zobrazení pozorované buňky převedeno do 14bitového bezztrátového formátu .png (z angl. Portable Network Graphics).

3.4.2. Separace buněk v obraze

Pro vyhodnocení intracelulární dynamiky metodou optického toku, byly ze zkalibrovaných obrazových dat manuálně separovány vhodné (jasně ohraničené) buňky, pomocí skriptu programu Matlab[®] (Mathworks, Natick, MA, USA).

3.4.3. Metoda optického toku

Intracelulární dynamika separované buňky byla počítána v prostředí Matlab[®] metodou optického toku (Sun a kol., 2010; 2013). Výstupem pro každý pár po sobě jdoucích barevných (r, g, b) obrazových kanálů jednotlivých snímků v raw formátu byly dvě matice ortogonálních vektorových změn (ve směru osy x vs. ve směru osy y) v obraze. Intenzitní změny pixelu ve dvou po sobě jdoucích snímcích vyjádřené ortogonálními vektorovými složkami byly dále kvantifikovány dvěma způsoby: jako euklidovská délka výsledného vektoru (v pixelech, $p_x \sim 64$ nm), který je svírán danými ortogonálními vektorovými složkami, a jeho směr (úhel, v radiánech). Celková změna mezi dvěma po sobě jdoucími snímky sledované separované buňky byla vyhodnocena jako aritmetický průměr euklidovských délek a rotačních úhlů všech vektorů výsledného obrazu v závislosti na čase pořízení snímku buňky, a to zvláště pro každý barevný filtr Bayerovy masky kamerového čipu. Výsledné (zašuměné) časové závislosti byly vyhlazeny metodou jednoduchého klouzavého průměru přes 19 polí.

3.4.4. Vizualizace obrazových dat pomocí software Least Information Loss (LIL)

Jelikož v dnešní době většina digitálních obrazovek zobrazuje pouze 8bitové formáty byla všechna >8 bitová obrazová data vizualizována pomocí software LIL Converter (ÚKS) převodem na 8 bpc. Výhodou tohoto převodu je minimální ztráta dat (Štys a kol., 2016).

Změna bitové hloubky je prováděna pro každý barevný kanál jednotlivě. Vždy je v celé obrazové sérii nalezeno globální intenzitní maximum a minimum, prázdné intenzitní hladiny jsou z výpočtu vynechány. V tomto programu lze i obrazová data oříznout, což je užitečné zejména pro odstranění okrajových řádků a sloupců snímků obsahujících prázdné (vadné) pixely.

4. Výsledky

4.1. Stanovení cytotoxicity pomocí Biostation IM-Q

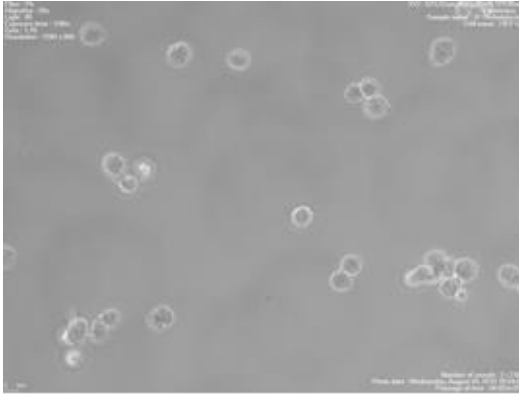
4.1.1. Vybrané snímky z komerčního mikroskopu BioStation IM-Q

Celkové chování buněk po intoxikaci HTBA o koncentraci 0; 0,58; 0,8 a 8 mg·l⁻¹ bylo sledováno pod mikroskopem Nikon BioStation IM-Q (kap. 3.3). Na obrázku č. 2 jsou jako příklad vybrány typické časoběrné snímky buněčné kultury, v tomto případě buněčné kultury HepG2 kultivované bez přítomnosti HTBA. Časy získání těchto snímků odpovídají časům, při kterých byly kvantitativně vyhodnocovány buněčné dilatace (2–62 minuta) a specifická růstová rychlost (2, 1440, 2882 a 4320 minuta). Při dalších testovaných koncentracích HTBA, i v případě testu na buněčnou linii MG63, nebyly ve snímcích pozorovány významné kvalitativní a kvantitativní rozdíly týkající se počtu a tvaru buněk. Detailní kvalitativní analýza snímků byla provedena měřením buněčné dilatace a specifické růstové rychlosti (viz. následující kapitoly).

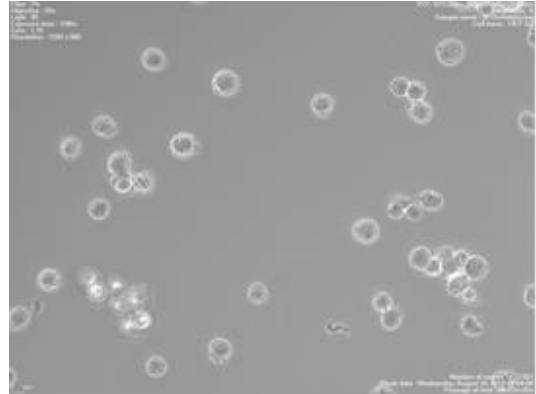
4.1.2. Metoda dilatačního testu *in vitro*

Dilatace je jev nastávající po tzv. pasáži, která se provádí z důvodu výměny živného média, přesunu či zmnožení buněčné kultury. Tehdy dochází (mimo jiné) k pozměnění cytoskeletu, jako důsledek přechodu (přichycení, adhezi) buňky z volného prostoru živného média na dno kultivační mističky. Posléze dochází k rozšíření jejich povrchových membrán, čemuž říkáme dilatace. Za standardní dobu dilatace celé neovlivněné buněčné populace bývá považováno 60 minut. Tato hodnota je ovšem jen orientační, protože doba dilatace je u každé buněčné kultury rozdílná. Dilataci také ovlivňuje hustota buněčné kultury, složení kultivačního média, teplota, množství CO₂ a další faktory. Dále je nutné pamatovat na fakt, že některé látky mohou dilataci buněk urychlovat (Půža, 1976). Po ukončení pasáže se cytoskelet vrací do původního stavu, který zajišťuje správné fyziologické funkce buňky. Dilatační test sleduje rychlost a efektivitu tohoto přechodu (dilatace), která může být ovlivněna testovaným inhibitorem (Nečas a kol., 1991).

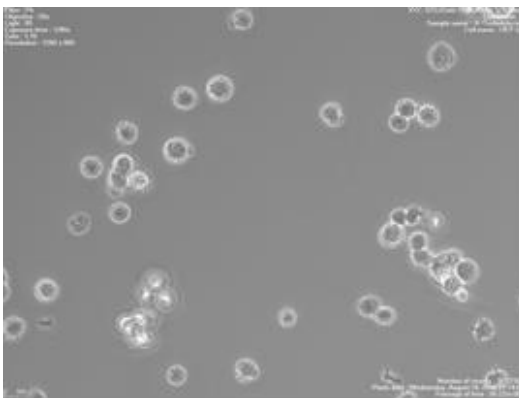
2. minuta



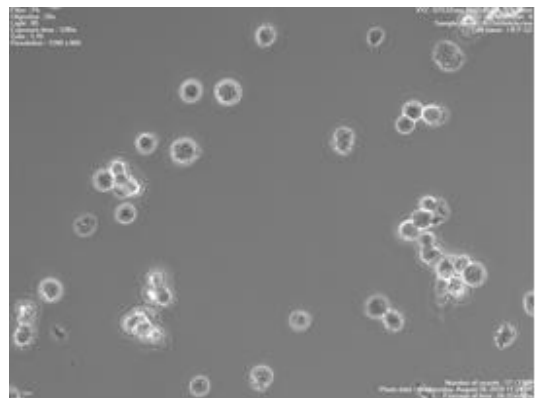
12. minuta



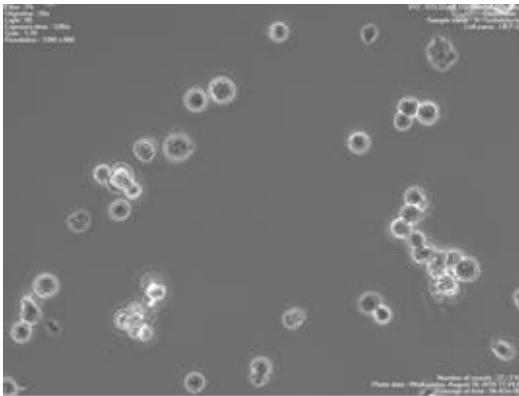
22. minuta



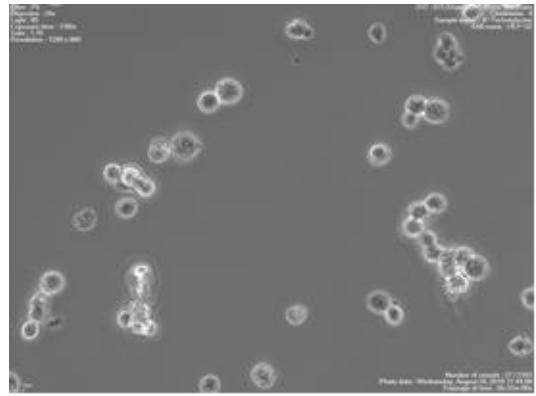
32. minuta



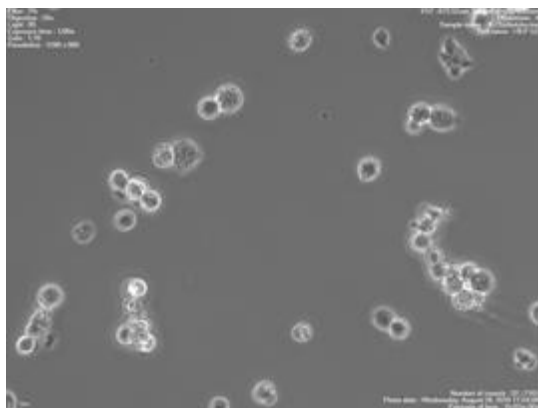
42. minuta



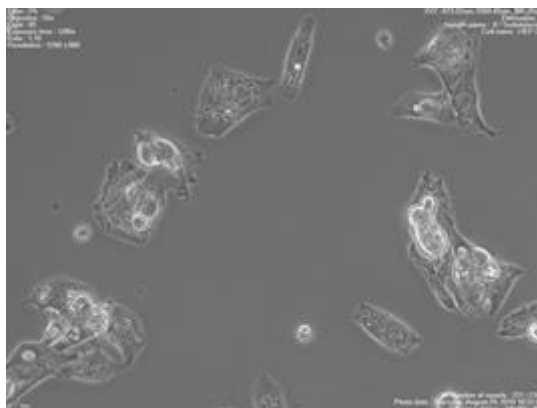
52. minuta



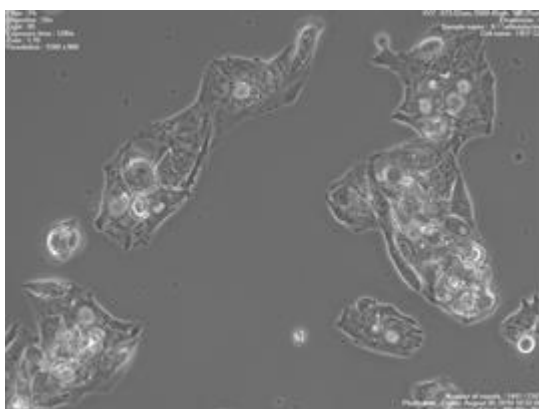
62. minuta



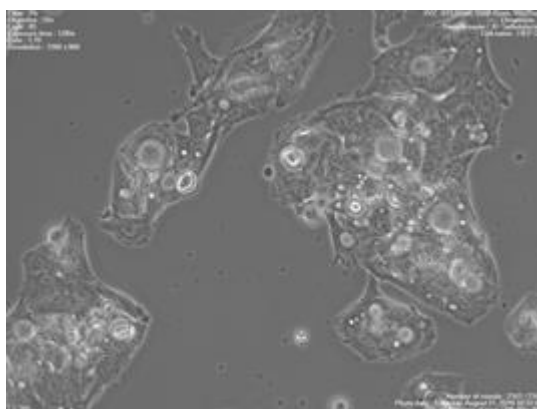
1440. minuta



2882. minuta

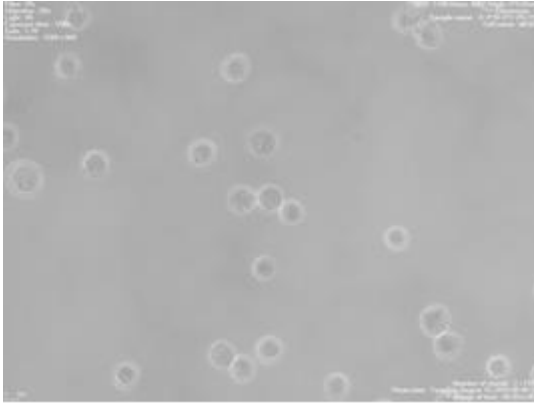


4320. minuta

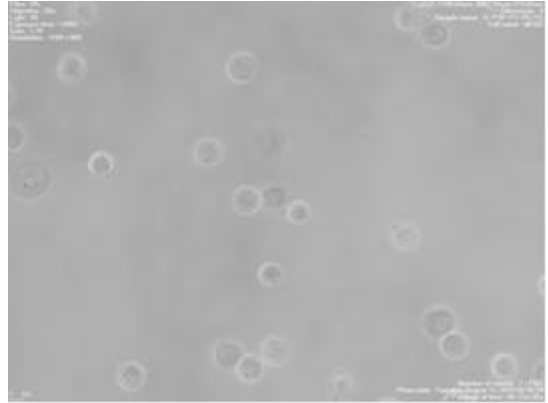


Obr. č. 2. Snímky kontroly buněčné linie HepG2 bez HTBA pořízené ve 2., 12., 22., 32., 42., 52., 62., 1440., 2882., 4320. minutě od začátku experimentu.

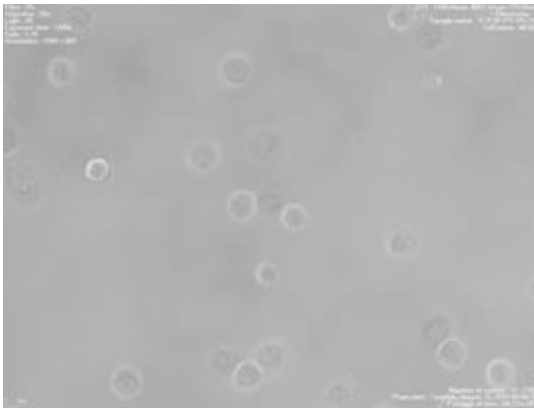
2. minuta



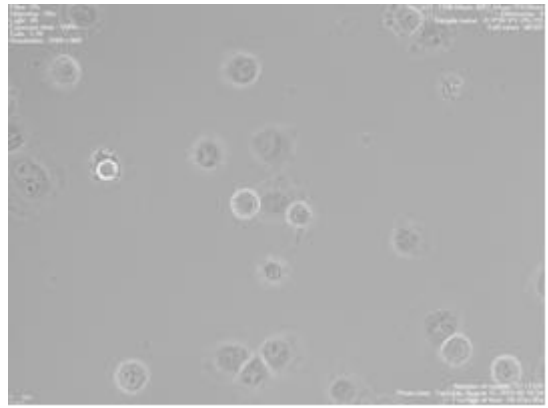
12. minuta



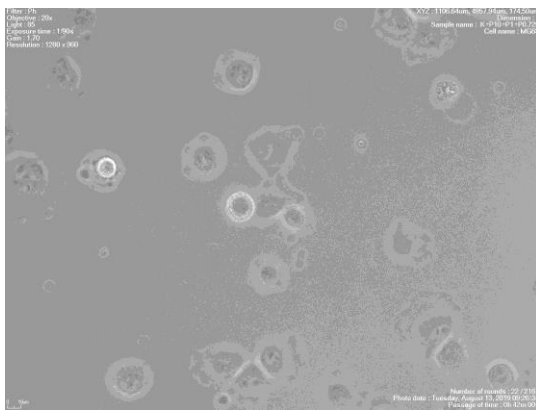
22. minuta



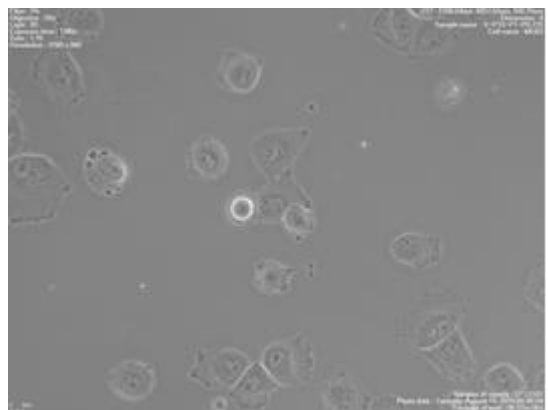
32. minuta

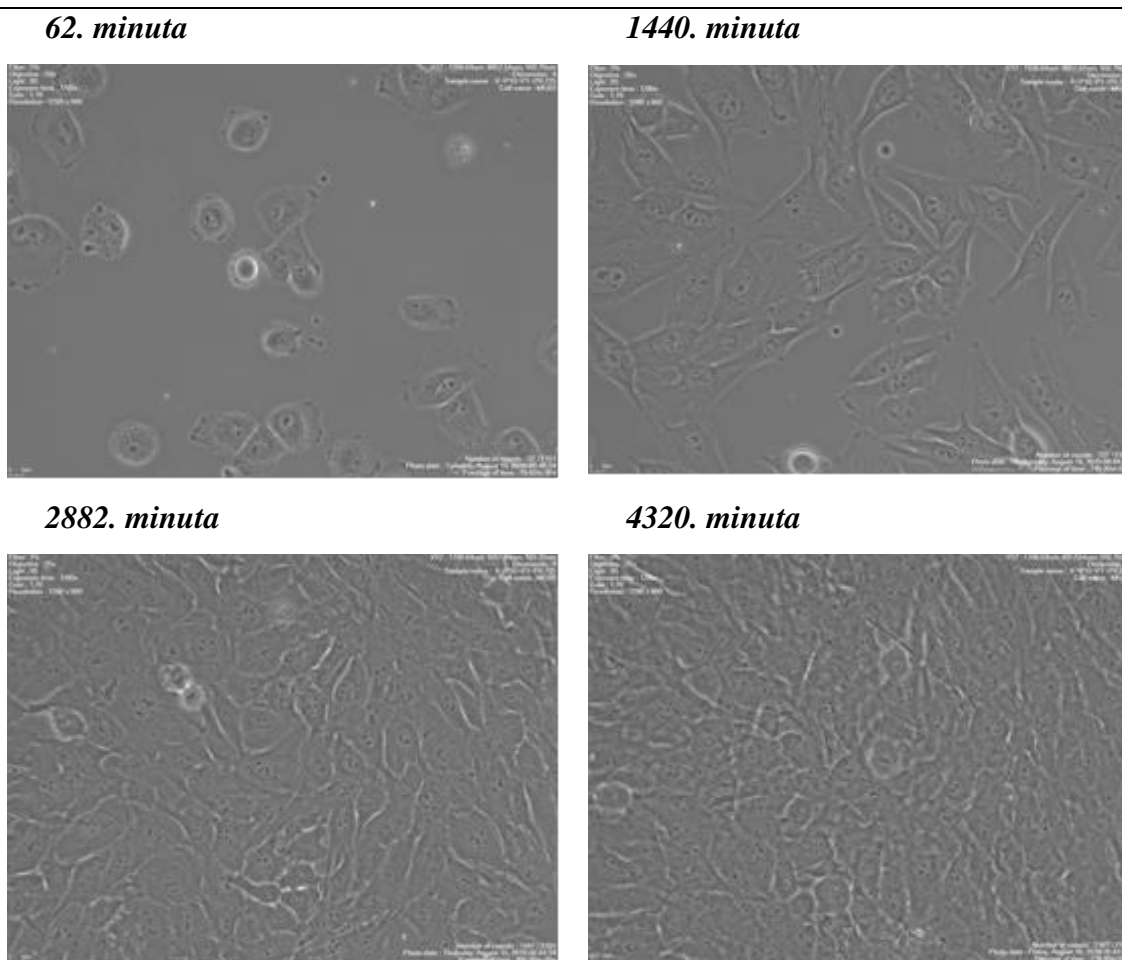


42. minuta



52. minuta

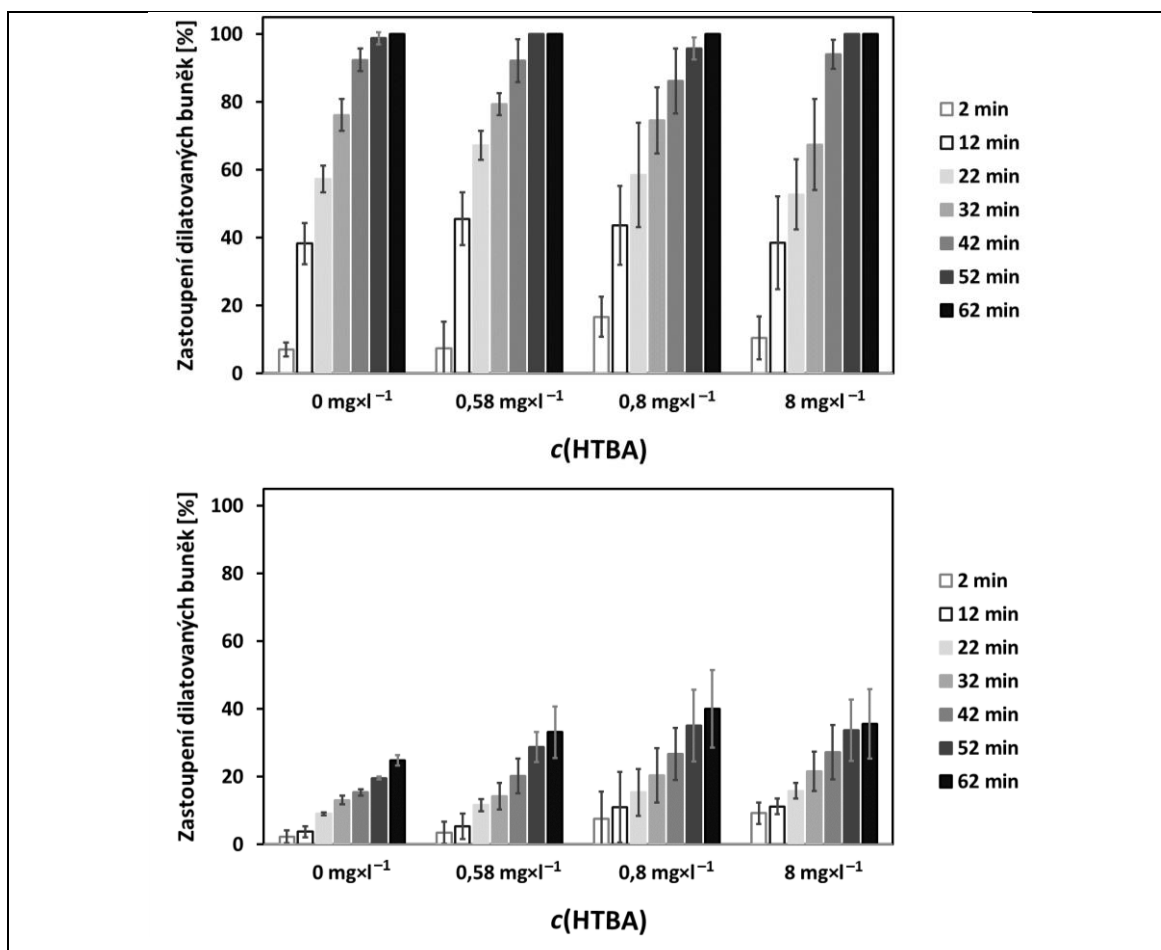




Obr. č. 3. Snímky kontroly buněčné linie MG63 bez přidaného inhibitoru (HTBA) pořízené ve 2., 12., 22., 32., 42., 52., 62., 1440., 2882., 4320. minutě od začátku experimentu.

Sledování buněčné dynamiky bylo v prvním testu provedeno vizuálním kvalitativním hodnocením procentuálního zastoupení dilatovaných buněk ve snímcích pořízených mikroskopickým zařízením BioStation IM-Q v desetiminutových časových intervalech po dobu přibližně 1 h (kap. 3.3.1). V níže zobrazených grafech č. 1 a č. 2 je uvedeno průměrné procentuální zastoupení dilatovaných buněk buněčných linií MG63 a HepG2 vypočtené vždy ze tří paralelních experimentů pro každou koncentraci HTBA i příslušnou kontrolu bez HTBA. Rozptyl těchto tří hodnot symbolizuje vynesená chybová úsečka (standardní směrodatná odchylka) každého sloupce v grafu. Procentuální zastoupení těchto tří hodnot bylo vyneseno v závislosti na čase (min) a koncentraci HTBA v růstovém médiu ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

Při podrobnějším pohledu na graf č. 1 (*horní*) si lze všimnout, že se počet dilatovaných buněk MG63 v závislosti na čase zvyšoval. Dvě minuty po započetí experimentu bylo průměrně detekováno od 7 % dilatovaných buněk (kontrolní vzorek bez HTBA) až po 18 % dilatovaných buněk (koncentrace 0,8 mg·l⁻¹). Ve dvanácté minutě bylo pak napočítáno 37 – 48 % dilatovaných buněk. Tato rychlost nárůstu počtů dilatovaných buněk se ve všech koncentracích v následujících časech snižovala, ale i přes to bylo zjištěno, že v 52. minutě jsou v koncentracích 0,58 mg·l⁻¹ a 8 mg·l⁻¹ dilatovány již všechny buňky zorného pole kamery. Deset minut poté byly dilatovány všechny buňky zorného pole. Nárůsty počtů dilatovaných buněk v čase vykazovaly pro všechny testované koncentrace hyperbolický průběh.



Graf č. 1. Procentuální zastoupení dilatovaných buněk buněčné kultury MG63 (*horní*) a HepG2 (*dolní*) v závislosti na čase a koncentraci HTBA.

V případě grafu č. 1 (*dolní*), kdy byl hodnocen vliv HTBA na buněčnou linii HepG2, lze pozorovat, že celkový procentuální nárůst počtu dilatovaných buněk za stejný celkový časový interval (62 min) je nižší (přibližně o 60 %) než v případě buněčné kultury MG63. Vzhledem ke skutečnosti, že byl výše zmíněný trend pozorován u všech testovaných koncentrací, lze tento snížený konečný procentuální počet dilatovaných buněk HepG2 vztáhnout k celkově nižší rychlosti buněčné dilatace, která je (dle zjištěných hodnot) pro HepG2 buňky charakteristická.

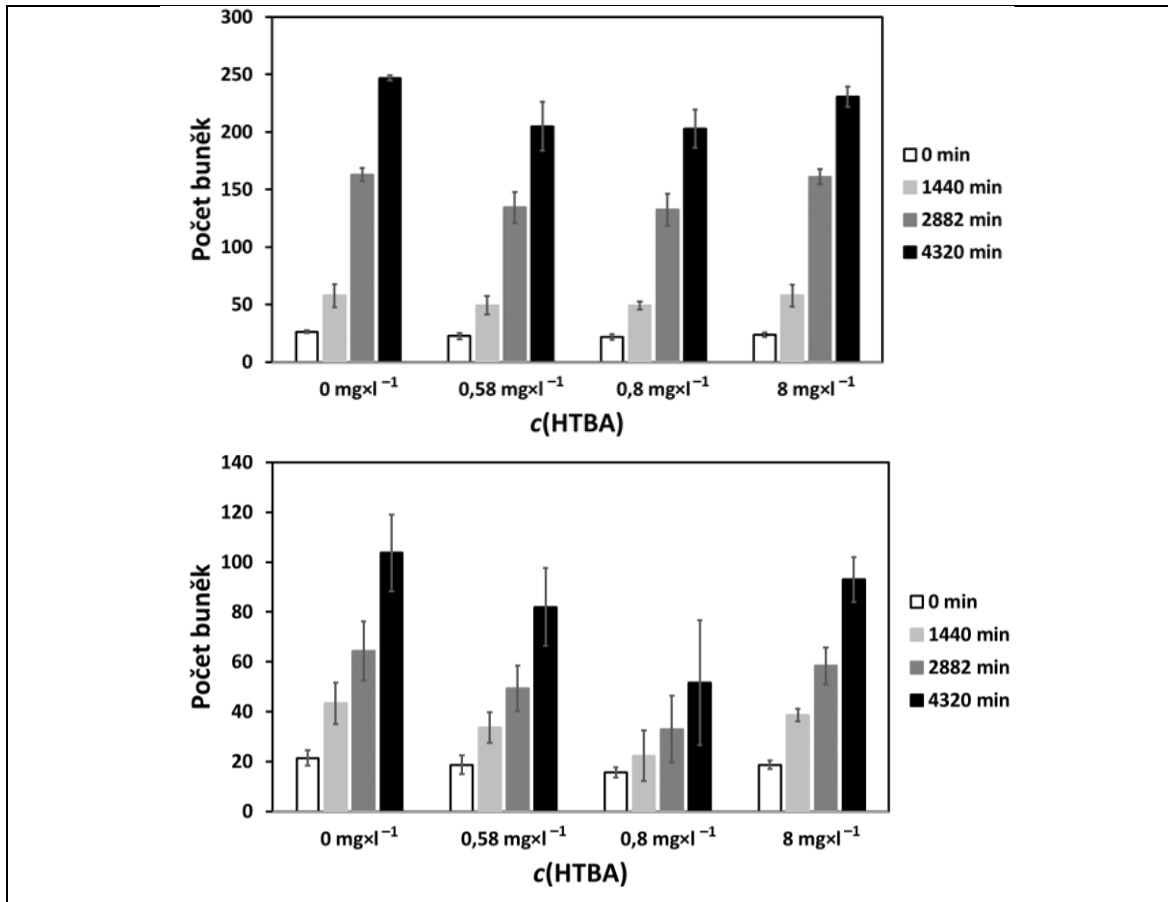
4.1.3. Metoda specifické růstové rychlosti *in vitro*

Metoda specifické růstové rychlosti (SRR) je obvyklou metodou stanovení růstu buněčných populací. Primárně byla tato metoda popsána prof. Málkem roku 1950. Pro buněčné kultury živočišných buněk byla popsána p. Činátlem roku 1967. Podle p. Půži (1976) se při této metodě sleduje doba zmnožení (zdvojnásobení) buněčné populace, která může být ovlivněna chemickou látkou či změnou prostředí. Tato metoda dále prezentuje kvalitu vnějších a vnitřních podmínek růstu a taktéž může být ukazatelem růstu biomasy. Výstupem je tzv. růstová křivka charakteristického tvaru.

Podle p. Kočárka (2006) je při podrobném stanovení SRR buněčné populace za výsledek standardně považována křivka růstové rychlosti. Ta začíná velmi krátkou tzv. *lag* fází, kdy počet buněk ve vzorku stagnuje (někdy i poklesne), což je způsobeno adaptací buněk na kultivační prostředí. Následuje tzv. log fáze (logaritmická, resp. exponenciální fáze), ve které množství buněk ve vzorku začíná růst exponenciálně. Zde je možné zachytit velké množství buněk při mitóze. Následuje třetí tzv. stacionární fáze, při které dochází k útlumu až úplnému zastavení buněčného dělení, což bývá způsobeno například inhibičními mechanismy toxikantu, snížením pH způsobené zvýšením obsahu oxidu uhličitého nebo při lokálním vyčerpáním kultivačního média.

V této kapitole jsou popsány výsledky zjednodušené (čtyřbodové) metody měření SRR, kdy je pouze počítán celkový počet buněk po 0, 24, 48 a 72hodinové kultivaci buněk snímaných zařízením BioStation IM-Q. Detailní popis experimentu je uveden v kapitole 3.3.2. V níže uvedených grafech č. 3 a č. 4 jsou zobrazeny průměrné počty buněk buněčných linií MG63 a HepG2, vypočtené vždy ze tří paralelních experimentů pro každou koncentraci HTBA i příslušnou kontrolu bez HTBA, a to v závislosti

na čase 72 hodin trvajícího experimentu. Rozptyl těchto tří hodnot symbolizuje vynesená chybová úsečka (standardní směrodatná odchylka) každého sloupce v grafu.



Graf č. 2. Celkový počet buněk MG63 (*horní*) a HepG2 (*dolní*) v závislosti na čase a koncentraci HTBA.

Graf č. 2 ukazuje závislosti aktuálního počtu buněk daného snímku na koncentraci HTBA a čase. V čase 0, tedy na úplném počátku experimentu, byly napočítány a zprůměrovány aktuální počty nedilatovaných buněk v zorném poli kamery. Tyto hodnoty mohou být ovšem trochu matoucí, protože většina těchto buněk je ještě nedilatovaných, tedy nepřichycených k podkladu (obr. č. 2, 2. minuta). Nedilatované buňky se v médiu vznášejí a mohou v následujícím čase zorné pole kamery opustit. Další počítání buněk zorného pole bylo provedeno v 1440. minutě po zahájení experimentu. Tyto buňky jsou již kompletně dilatované a ke změně jejich množství dochází jen vlivem mitózy. Konkrétně se počet buněk, vzhledem k počátečnímu množství buněk, téměř zdvojnásobil (případ koncentrace 8 mg·l⁻¹ a kontroly) nebo

zvětšil téměř o třetinu (koncentrace $0,8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Ve 2882. minutě od počátku experimentu se počet buněk HepG2 vzhledem ke 1440. minutě experimentu zvýšil o třetinu až čtvrtinu, ovšem u buněk MG63 byl téměř dvojnásobný. V posledním měření (4320. minut od zahájení experimentu) byl nárůst obou buněčných populací zhruba třetinový.

Nejvyššího konečného průměrného množství buněk, bylo (u obou buněčných linií) dosaženo v případě kontrolních experimentů bez HTBA. To by mohlo naznačovat, že přítomnost HTBA v růstovém médiu buněk má negativní dopad na konečný počet buněk všech inhibovaných vzorků. Ovšem v rozporu s tím je druhé nejvyšší zjištěné průměrné množství buněk. To bylo napočítáno při nejvyšší koncentraci $8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ HTBA, což přímo odporuje celkovému trendu klesajícího množství buněk se zvyšující se koncentrací inhibitoru (viz koncentrace $0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,58 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ v grafu č.2.). Tento trend je výraznější v případě buněk HepG2 (dolní část grafu č. 2.), nicméně pozorovatelný je i v případě buněk MG63. Na základě těchto rozporuplných výsledků je tedy možné, že v případě koncentrace $8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ došlo k lidské chybě. Ta byla pravděpodobně způsobena fyziologickými limity lidského oka, kdy nebylo možné detekovat přesné množství buněk, které byly po 72 hodinách kultivace extrémně natěsnané v kultivačním prostoru (viz. obr. č. 2. a č. 3., čas 4320 min.).

HTBA tedy mohl mít negativní vliv na růstovou rychlost testovaných buněčných populací, ovšem pro potvrzení této teorie by bylo třeba experiment rozšířit či zopakovat. Negativní vliv HTBA na cytoskeletální aktivitu buněk ovšem pozorován nebyl.

4.2. Stanovení cytotoxicity pomocí vysokorozlišného mikroskopu NanoTruth

Vzhledem ke skutečnosti, že v předchozích experimentech popsaných v kapitole 4.2. nebyl pozorován, žádný významný intoxikační účinek HTBA na rychlost růstu buněčných linií MG63 a HepG2 a jejich dilataci k povrchu, bylo přistoupeno ke studiu jejich intracelulárních změn.

Vnitrobuněčná dynamika vybraných buněčných linií byla po intoxikaci HTBA o koncentraci 0 ; $0,58$; $0,8$ a $8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ sledována pomocí na zakázku vyrobeného mikroskopu NanoTruth, který umožňuje sledovat živou savčí buňku komplexně, a to neinvazivním přístupem (kap. 3.4.). Specifikace získaných obrazových sérií jsou detailně uvedeny v kap. 9. Z těchto sérií naměřených dat pro čtyři testované koncentrace

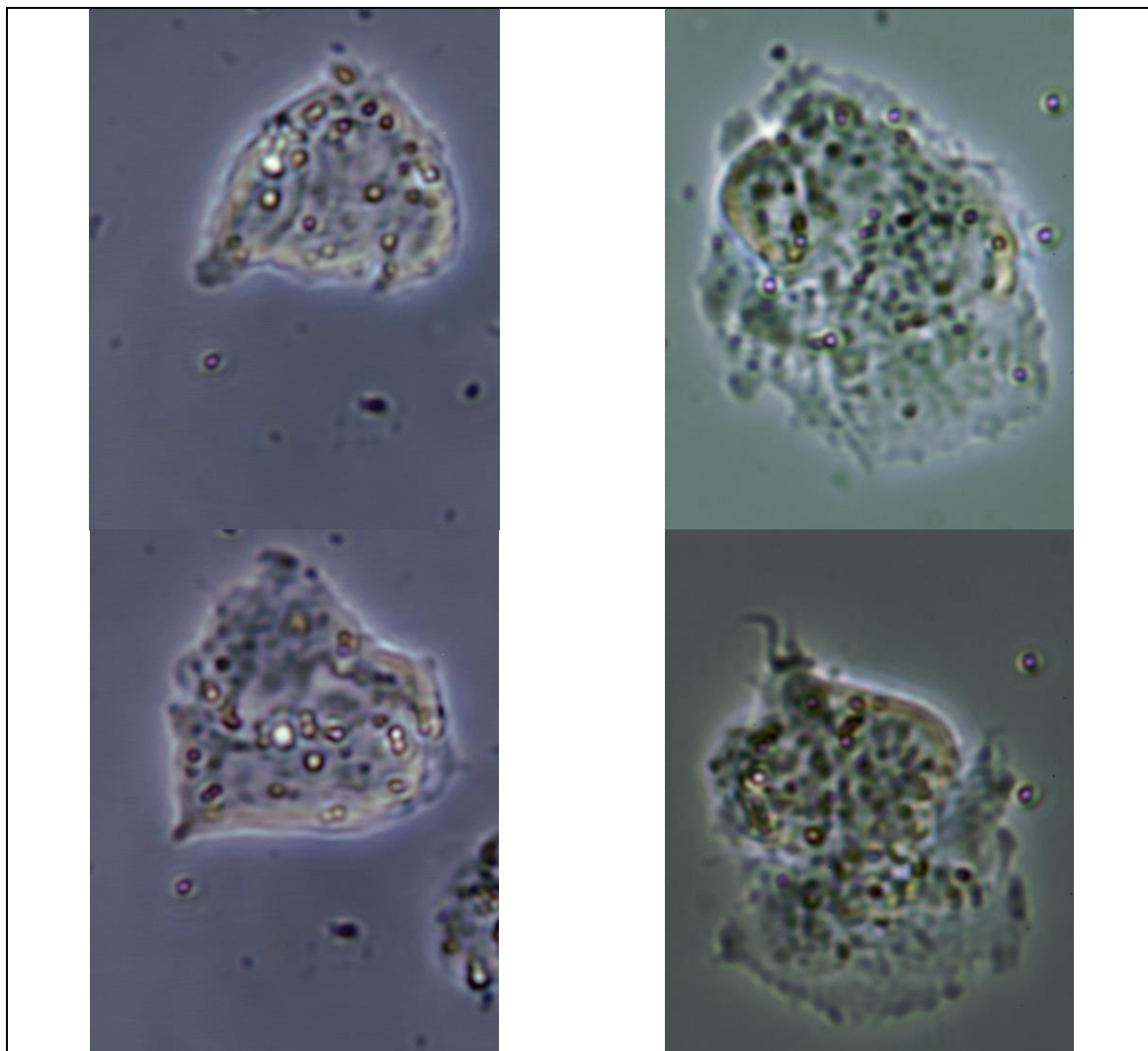
HTBA a dvě testované buněčné linie byly pro další analýzu popsány v následujících kapitolách náhodně vybrány dvě dilatované buňky linie HepG2, z nichž jedna byla kultivovaná v prostředí s nejvyšší testovanou koncentrací HTBA ($8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a druhá buňka pocházela z kontrolního experimentu.

Pro hrubé a rychlé vyhodnocení získaných dat, byly z pořízených sérií snímků buněčných kultur vytvořeny krátké videozáznamy. Při vizuálním porovnání kontrolního videozáznamu bez HTBA s videozáznamy intoxikovaných buněčných kultur, nebyl zjištěn žádný zřejmý vliv inhibitoru. Jako ukázka (obr. č. 4) jsou vybrány první a poslední snímky vzorku buněčné linie HepG2 kultivované bez přítomnosti a v přítomnosti $8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ HTBA. Kontrolní experiment bez HTBA byl prováděn po dobu přibližně 5 h, zatímco buňka vystavená koncentraci HTBA $8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ byla sledována po dobu přibližně 11 h. Z obrázku č. 4 je zřejmé, že u obou buněk nedošlo během sledovaného období k mitóze, ani k jiné významné strukturní změně.

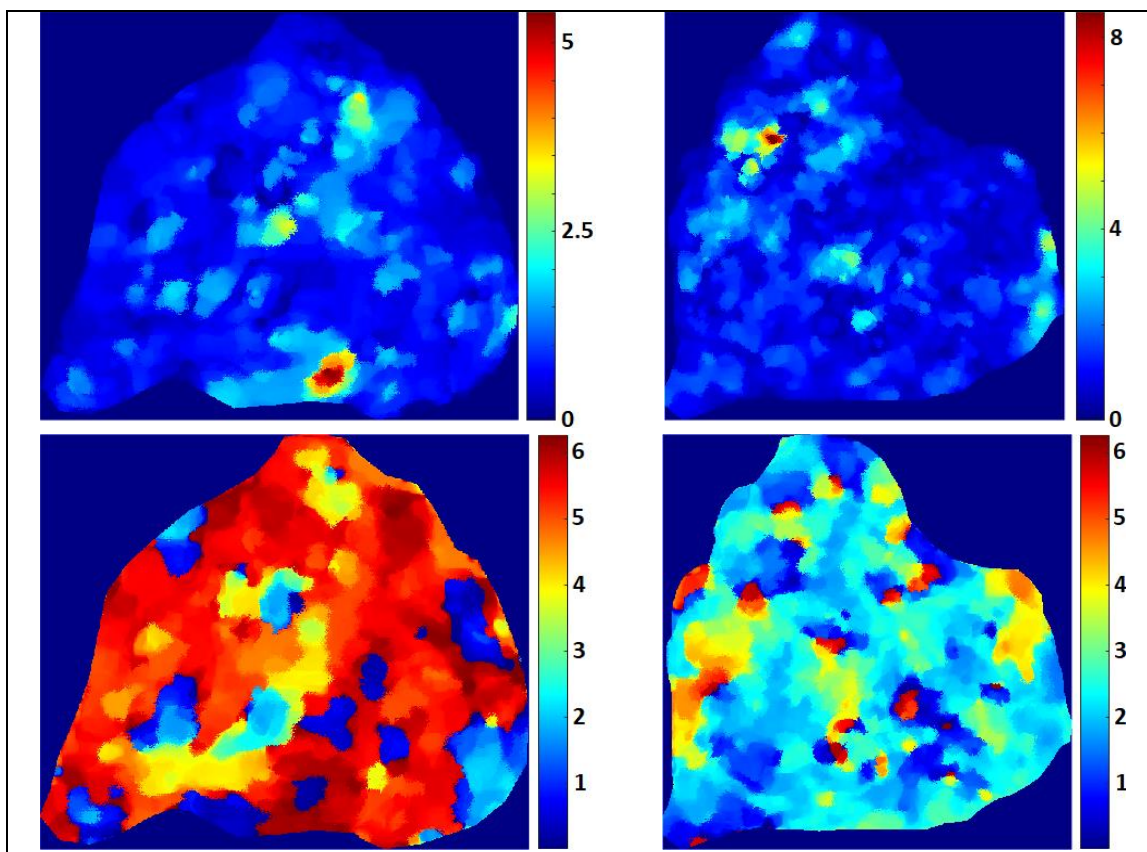
Následně bylo přistoupeno ke graficko-matematickému způsobu vyhodnocení dat vnitrobuněčné dynamiky. Pro tyto účely byly vybrané buňky separovány (kap. 3.4.3.) a následně matematicky vyhodnoceny (kap. 3.4.4.) v interaktivním programovém prostředí Matlab[®] pomocí metody optického toku (Sun a kol., 2010; 2013). Vizualizací optického toku v obrazových datech ve formě primárního signálu barevné kamery světelného mikroskopu v jasném poli získáváme výborný nástroj ke studiu rychlosti a směru pohybu jednotlivých objektů v obraze, v našem případě o pohybu organel a dalších intracelulárních kompartmentů v savčí buňce. Každý barevný kanál čipu kamery (červený r, zelený g1, zelený g2, modrý b) podává i dostatečnou informaci o časoprostorových spektrálních změnách v intracelulárním prostoru.

Optický tok mezi každými dvěma po sobě jdoucími barevnými kanály (r, g1, g2, b) snímků (tj. zkalibrovaného primárního signálu kamery) buněk v sérii byl vyhodnocen dvěma způsoby: jako euklidovská délka a jako směrový úhel vektorů změn v digitálním obraze. Na obr. 5–6 jsou ukázky vizualizací euklidovských délek a úhlů vektorů v prvním a posledním páru snímků série (červený kanál) zachycující hepatocyt HepG2 exponovaný a neexponovaný pesticidu HTBA. Ve všech případech uvedených na obr. č. 5–6, i v celých testovaných sériích, bylo možné pozorovat, že rychlost pohybu uvnitř buňky byla relativně homogenní (a to také nezávisle na barevném kanále obrazu). Naopak změny směru pohybu v obraze (tj. úhlů optického toku) byly v průběhu celého

experimentu (s pesticidem i bez pesticidu) značně heterogenní a v každém obraze datové série dosahovaly vždy plného možného rozsahu hodnot, tj. $0-2\pi$ rad.



Obr. č. 4. První (*horní řádek*) a poslední (*dolní řádek*) snímek vzorku buňky linie HepG2 v prostředí $8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ HTBA, série z 29. 11. 2019 (*pravý sloupec*) a bez přítomnosti HTBA, série z 11. 4. 2019 (*levý sloupec*).



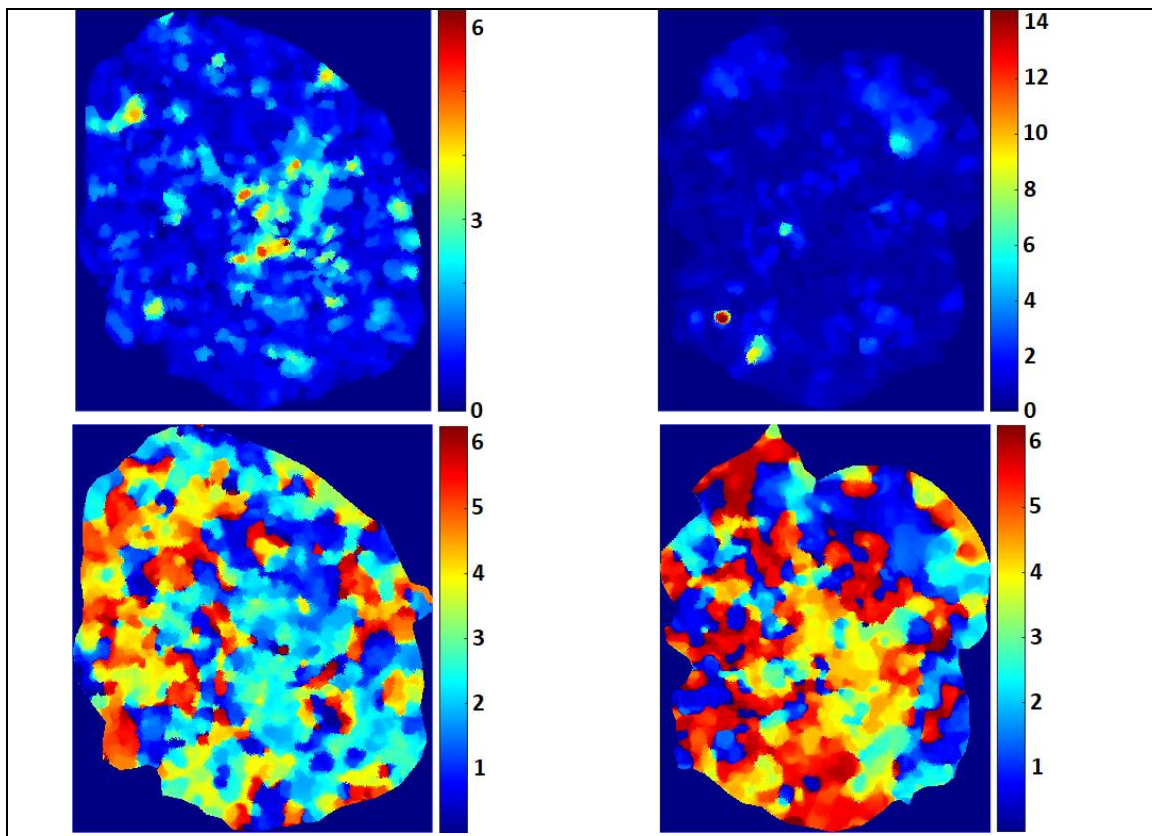
Obr. č. 5. Euklidovské délky (*horní řádek*, stupnice v pixelech) a směrové úhly (*dolní řádek*, stupnice v radiánech) vektorů optických toků pro první dva (*pravý sloupec*) a poslední dva (*levý sloupec*) snímky buňky HepG2 v přítomnosti $8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ HTBA, série z 29. 11. 2019. Červený kanál Bayerovy masky kamery čipu.

Možnost plně porovnat obě analyzované série, tj. s/bez HTBA, v průběhu celého experimentu bylo umožněno výpočtem dvou makroskopických veličin, které charakterizují změny ve dvou po sobě jdoucích snímcích (barevných kanálech Bayerovy masky) jedním číslem – průměrnou euklidovskou délkou vektorů optického toku a průměrným směrovým úhlem optického toku.

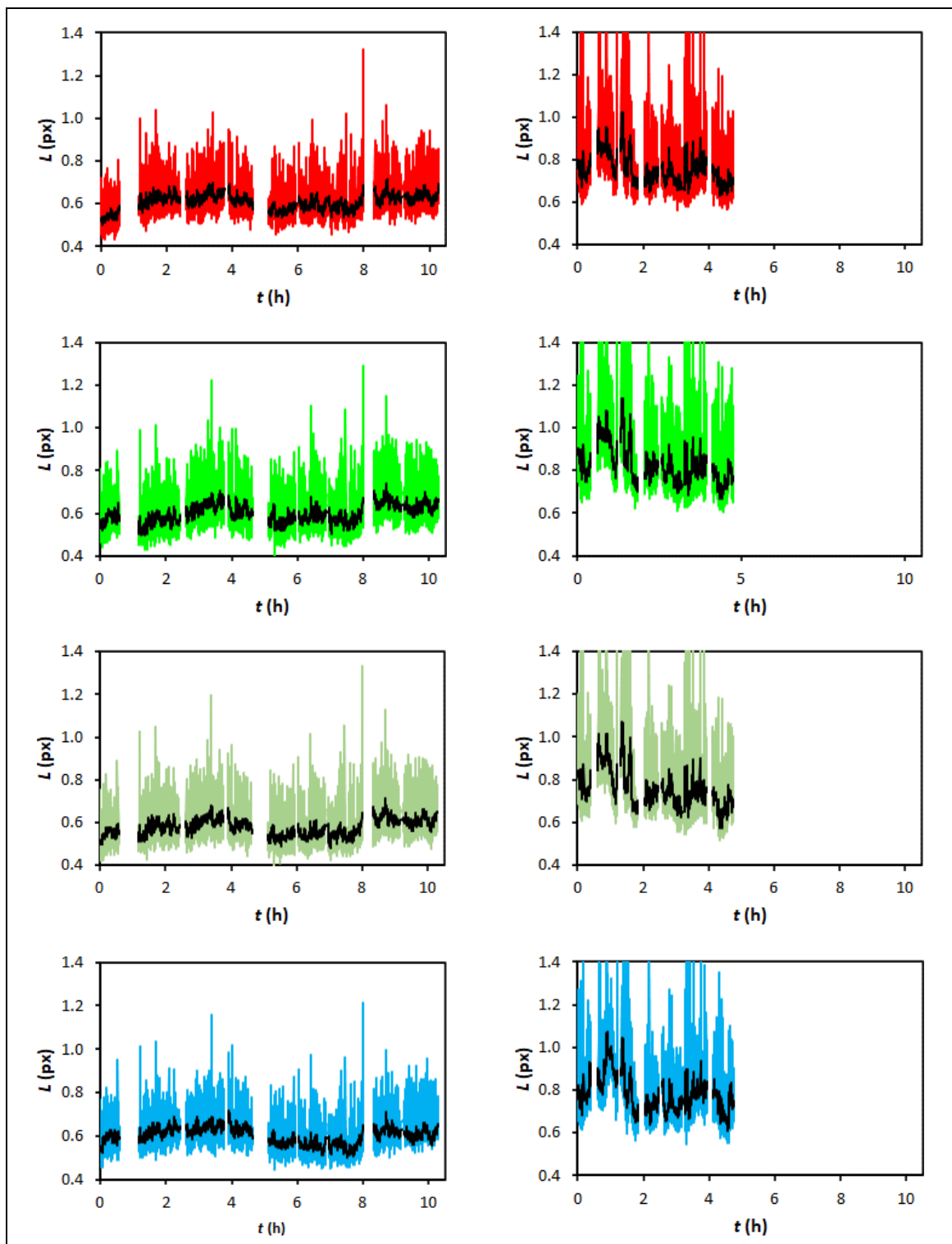
Výsledky této časové analýzy změn optických toků v obraze jsou uvedeny v grafech č. 3–4. Výsledky jsou viditelné zejména pro odšuměné, černé, křivky. Ve všech případech uvedených v grafech č. 3–4 lze pozorovat určité oscilace těchto obrazových změn v čase. Nicméně tyto oscilace se liší ve velikostech frekvencí i amplitud podle použité koncentrace HTBA i podle typu makroskopické veličiny. Nejvýraznější rozdíly po expozici HTBA jsou vidět při porovnání průměrných délek vektorů optického toku (graf č. 3). Zatímco hodnoty průměrných délek vektorů optického toku se v případě buňky HepG2 kultivované bez HTBA pohybovaly v rozmezí přibližně 0.5–0.7 px,

v případě buňky vystavené působení $8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ HTBA se pohybovaly v rozmezí od 0.6 do 1.1 px. Taktéž frekvence oscilací je v případě kontaminované buňky odhadem $2\times$ nižší, avšak přesnou matematickou analýzu se nepodařilo provést. Průměrné směrové úhly vektorů změn optického toku v obraze (graf č. 4) nebyly mezi exponovanou a neexponovanou buňkou tolik rozdílné jako vektorové délky, přesto jistý trend inhibice (nižší amplituda i frekvence oscilací) po vystavení buňky HepG2 kontaminantu HTBA pozorován byl.

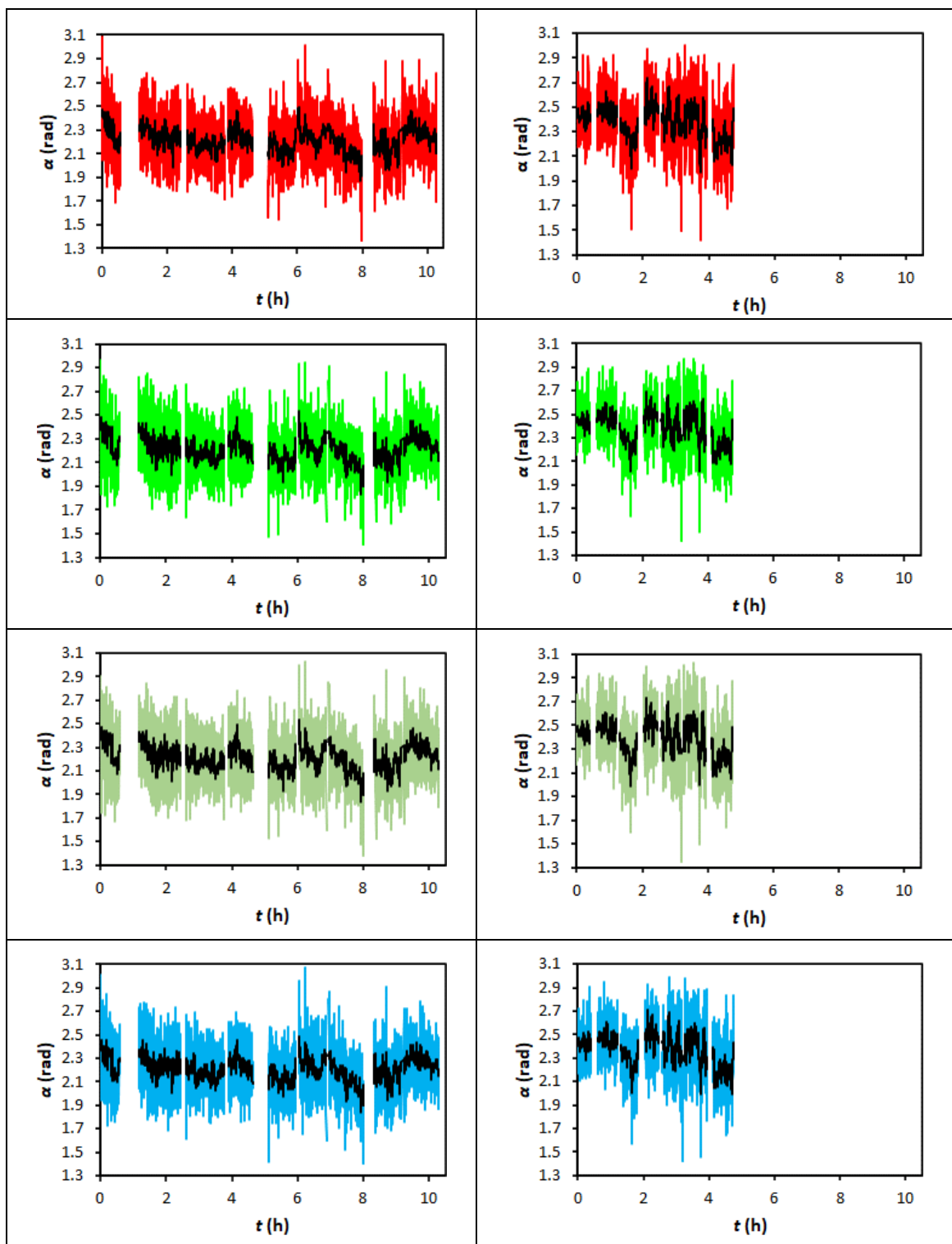
Na základě těchto výsledků je tedy možné, že HTBA v koncentraci $8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ má negativní vliv na lidské jaterní buňky. Nicméně, zda je tento jev specifický a zda je metoda optického toku opravdu jeho vhodným ukazatelem, může ukázat jenom zpracování a vyhodnocení dalších experimentů.



Obr. č. 6. Euklidovské délky (*horní řádek*, stupnice v pixelech) a směrové úhly (*dolní řádek*, stupnice v radiánech) vektorů optických toků pro první dva (*pravý sloupec*) a poslední dva (*levý sloupec*) snímky buňky HepG2 bez přítomnosti HTBA, série z 11. 4. 2019. Červený kanál Bayerovy masky kamery čipu.



Graf č. 3. Závislost délky L (pixely) vektorů optických toků na čase t (hodiny) pro buňku linie HepG2 v prostředí $8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ HTBA, série z 29. 11. 2019 (*levý sloupec*) a bez přítomnosti HTBA, série z 11. 4. 2019 (*pravý sloupec*). Výsledky pro (*shora dolů*) červený filtr r , zelený filtr $g1$, zelený filtr $g2$ a modrý filtr b Bayerovy masky čipu kamery. Černé křivky odpovídají vyhlazeným barevným křivkám pomocí klouzavého průměru.



Graf č. 4. Závislost směrových vektorů α (radiány) vektorů optických toků na čase t (hodiny) pro buňku linie HepG2 v prostředí $8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ HTBA, série z 29. 11. 2019 (*levý sloupec*) a bez přítomnosti HTBA, série z 11. 4. 2019 (*pravý sloupec*). Výsledky pro (*shora dolů*) červený filtr r , zelený filtr $g1$, zelený filtr $g2$ a modrý filtr b . Černé křivky odpovídají vyhlazeným barevným křivkám pomocí klouzavého průměru.

5. Diskuse

Základním cílem experimentů popsaných v této bakalářské práci bylo posouzení, zda je možné světelnou mikroskopií pozorovat vliv majoritního metabolitu herbicidu terbuthylazinu (TBA), tedy terbuthylazinu-2-hydroxy (HTBA), na lidské buněčné linie.

Inspirací pro vysvětlení toxického účinku terbuthylazinu na živočišnou buňku by mohl být způsob destrukce buňky rostlinné. Stejně tak jako většina pesticidů triazinového typu, terbuthylazin pravděpodobně brání procesu přechodu elektronů ve fotosystému II, kdy jeho molekuly vytěsňují plastochinon (nositel elektronů), jenž je nepostradatelnou součástí thylakoidní membrány chloroplastů. V důsledku toho dochází k nedostatku energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP), která je jedním z cílových produktů fotosyntézy (Appleby a kol., 2010). U živočichů dochází k tvorbě ATP v procesu zvaném dýchací řetězec, který probíhá na vnitřní membráně mitochondrií. Zde by mohly molekuly TBA (případně HTBA) bránit přenosu elektronů podobným způsobem jako je tomu u rostlin, tedy zabráněním tvorbě ATP vytěsněním ubichinonu (koenzym Q₁₀) či jiných látek schopných přenosu elektronů v dýchacím řetězci. To by pak potvrzovalo snížení vnitrobuněčné dynamiky (kap. 4. 2) sníženou tvorbou energie. Tato teorie je ovšem pouhou spekulací a její potvrzení by vyžadovalo širokosáhlý výzkum v daném oboru.

Toxický účinek triazinů, jako takových, na organismy je popsán ve více jak 1000 (zdroj: databáze Google Scholar) tištěných i elektronických publikacích, ovšem studie týkající se přímo tohoto metabolitu, už tak četné nejsou. Dle databáze Google Scholar byl HTBA zmíněn v pouhých 29 studiích. Jako příklad mohou být uvedeny studie provedené na kaprovi obecném (Velíšek a kol., 2014; 2015), rakovi mramorovaném (Velíšek a kol., 2017; Koutník a kol., 2017) či rakovi červeném (Stará a kol., 2016), kdy byly pozorovány hlavně histologické a ontogenetické změny jak dospělých, tak juvenilních jedinců, a to při vyšších koncentracích (jednotky mg·l⁻¹) TBA či HTBA. V jiných dvou studiích byl vliv TBA popsán jako prakticky netoxický na ptactvo, což bylo potvrzeno na kachně divoké (*Anas platyrhynchos*) a křepeli virginském (*Colinus virginianus*), u kterých byla hodnota LD₅₀ vyšší než 5620 mg·l⁻¹ (TOXNET, 2016). Vliv TBA a HTBA byl také zkoumán na savcích (Lovaković a kol., 2017 nebo Benković a kol., 2012), ovšem jen malá část z nich se zabývá jejich možným

negativním vlivem na lidské buněčné linie. V rozsáhlé studii Želježić a kol. (2018), která byla pro tuto bakalářskou práci inspirací, byly použity koncentrace 0,58 mg·l⁻¹, 0,8 mg·l⁻¹ a 8 mg·l⁻¹ TBA. Zveřejněné výsledky této práce ukazují, že pouze nejvyšší koncentrace TBA (8 mg·l⁻¹) snížila životaschopnost lymfocytů o 15 %. Nicméně cytotoxický účinek na lidské hepatocyty (jaterní buňky) pozorován nebyl, pouze byla pozorována jejich nízká nestabilita DNA (Želježić a kol., 2018). V další velmi podobně zaměřené studii bylo prokázáno narušení integrity genomu lidských lymfocytů (Mladinić a kol. 2009; 2012). Na základě výsledků těchto prací jsme se rozhodli převzít testované koncentrace a vyzkoušet jejich vliv v *in vitro* experimentu na lidské buněčné linie HepG2 a MG63.

Prvním diskutabilním prvkem by mohla být vhodnost převzaté koncentrační řady (0; 0,58; 0,8 a 8 mg·l⁻¹). Ta sice neodpovídá koncentracím použitým v podobných experimentech Velíška a kol. (2014; 2015; 2016a; 2016b; 2017), ani běžně měřeným hodnotám povrchových vod ČR (viz kap. 2.6 a 2.7), ovšem shoduje se s doporučenými evropskými referenčními hodnotami (European Commission, 2011). Dále je také dobré vzít v úvahu kombinovaný vliv vícera chemických látek v životním prostředí. Vodní prostředí často obsahuje i další chemické látky vyskytující se ve vodním ekosystému přirozeně, ale i vlivem člověka. Je tedy možné, že při jejich kombinované expozici s HTBA může být jejich negativní dopad na daný ekosystém významně zesílen, což bylo důvodem k přijetí vyšších koncentrací HTBA, než tomu je například u publikací Velíška a kol. (2014; 2015; 2016a; 2016b; 2017). Dalším důvodem byla možnost porovnání získaných výsledků s výsledky zveřejněnými v publikaci Želježić a kol. (2018).

Vliv inhibitoru na buněčnou aktivitu byl snímán dvěma mikroskopickými zařízeními – komerčním Nikon BioStation IM-Q a, zejména, vývojovým prototypem NanoTruth, který má potenciál, díky své speciální konstrukci umožňující zisk detailního mikroskopického obrazu, přinést nové poznání o účincích látek založené na komplexním pozorování pohybů uvnitř živé neovlivněné buňky. Vývoj takto specifické konstrukce mikroskopu NanoTruth (kap. 4.2) doprovázela spousta technických problémů. Bylo by tedy přinejmenším možné polemizovat, jestli výsledky nebyly ovlivněny lidskými či technickými chybami. Už samotné získání dat provázely určité nedostatky. Z technických problémů to bylo přehřívání LED osvětlení při snímání

buněčných kultur, nebo neustálé rozostřování obrazu vlivem vibrací, pravděpodobně způsobených projíždějícími auty nebo činnostmi přístrojů a zaměstnanců v dalších částech budovy. Proto bylo nutné každých 30 až 60 minut experiment přerušit a toto rozostření opravit, což způsobilo rozdělení experimentu na zpravidla 8 až 10 sérií o rozdílných počtech snímků. Dále se, vzhledem ke konstrukci mikroskopu, nepodařilo zajistit 5% obsah CO₂ v atmosféře během průběhu experimentu nebo bylo velmi obtížné připravit vzorek vždy o stejné buněčné hustotě. Kombinace všech těchto a dalších faktorů mohla, ale i nemusela, mít negativní vliv na celkovou i vnitrobuněčnou aktivitu. Dále jsme se neustále potýkali s mikroskopickými nečistotami nebo technickými problémy čipu kamery snižujícími kvalitu obrazu, které bylo nutné vyřešit simultánní kolorimetrickou kalibrací digitálního fotoaparátu a optické dráhy, a následně pak i kalibrací každého pořízeného snímku (viz kap. 3.4.1). Nutností bylo také dlouhodobé uchování obrovských množství dat (blížící se 9 TB) a velkou časovou náročnost výše popsaného zpracování a následného vyhodnocení dat. Všechna tato popsána úskalí byla sice určitými způsoby vyřešena, ovšem i nadále poskytují prostor pro zdokonalení, a tedy i následný výzkum. Řešení některých z těchto technických problémů může přinést použití nové verze mikroskopu NanoTruth, která je dostupná od srpna 2019.

Z konečných výsledků *in vitro* experimentů pořízených na mikroskopu NanoTruth a vyhodnocovaných metodou optického toku v digitálním obraze lze usoudit, že HTBA v koncentraci 8 mg·l⁻¹ mohl významně ovlivnit vnitrobuněčnou dynamiku buněk HepG2, čímž by se mohl potvrdit negativní vliv na lidské (a tedy i savčí) buňky. Toto tvrzení podporují již výše zmíněné publikace od Želježić a kol. (2018), Mladinić a kol. (2009; 2012), ovšem k jasnému potvrzení tohoto závěru by bylo třeba vyhodnotit všechna získaná a zpracovaná data (viz kap. 9.3–9.4) a realizovat další podobné experimenty zakládající se na popisu vlivu TBA (HTBA) na vnitrobuněčnou dynamiku neznačené, a tedy fyziologicky a morfologicky nezměněné, lidské buňce. Pokud se výše uvedené výsledky potvrdí dalšími experimenty, přínosem tohoto výzkumu může být i vyvinutí nového, relativně přesného a správného, toxikologického biotestu s využitím tkáňových kultur.

6. Závěr

V rámci této bakalářské práce byl posuzován vliv terbutylazinu-2-hydroxy (HTBA) na lidské buněčné linie MG63 (osteosarkom) a HepG2 (hepatocyt) formou akutních testů toxicity *in vitro* v koncentracích 0; 0,58; 0,8 a 8 mg·l⁻¹ HTBA.

V prvním případě byla buněčná aktivita snímána pomocí mikroskopu BioStation IM-Q, kdy výsledky byly vyhodnoceny dvěma vizuálními metodami. První metodou je specifická rychlost růstu sledované buněčné populace a druhou metodou je rychlost dilatace, tedy cytoskeletální aktivita. Výsledky tohoto experimentu sice naznačují určitý negativní vliv odvozený od trendu klesajícího množství buněk v závislosti na zvyšující se koncentraci HTBA, ovšem výkyv hodnot v případě koncentrace 8 mg·l⁻¹ HTBA je přinejmenším zamyšlení hodný. Ten byl pravděpodobně způsoben lidskou chybou, tedy rozlišovacími limity lidského oka. Z toho důvodu bylo přistoupeno k druhému způsobu stanovení toxicity HTBA mikroskopem NanoTruth.

V druhém případě byla snímána vnitrobuněčná dynamika pomocí na zakázku vyrobeného světelného mikroskopu NanoTruth. Vzhledem k technické a časové náročnosti byla vyhodnocena pouze data odpovídající působení 8 mg·l⁻¹ HTBA na náhodně vybranou buňku HepG2 a data z relevantního kontrolního experimentu. Využito přitom bylo počítačového zpracování a analýzy digitálního mikroskopického obrazu, konkrétně metody optického toku. V tomto případě byla zjištěna nižší vnitrobuněčná dynamika u exponovaného vzorku než u vzorku bez přítomnosti studované látky, což naznačuje možný negativní vliv HTBA na testovanou buněčnou kulturu.

V rámci budoucího postupu v této oblasti výzkumu, vidíme například potenciál v odstranění technických nedokonalostí využívaného mikroskopu NanoTruth nebo v zrychlení celkového vyhodnocení obrovských množství obrazových dat. V následující diplomové práci bych se mohl zaměřit na vyhodnocení zbylých obrazových dat (popsaných v kap. 9) a jejich porovnání s novými daty, pořízenými dokonalejší technikou.

7. Seznam citované literatury

- Agromanuál.cz, Terbutylazine [online]. Kurent, s.r.o, 2020 [cit. 5.4.2020]. Dostupné na WWW <https://www.agromanual.cz/cz/pripravky/ucinne-latky/ucinna-latka/terbutylazine>
- ALS Czech Republic s.r.o. (ALS CR), ALS Pesticidy [online]. 2015, 15 [cit. 18. 3. 2020.] Dostupné na WWW: <https://www.alsglobal.cz/media-cz/pdf/pesticidy-2015.pdf>
- AMBROŽOVÁ, J. *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. Praha: VŠCHT, 2003, 226. ISBN 80-7080-521-8.
- ANDĚL, P. *Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring*. Liberec: Evernia, 2011, 22. ISBN 978-80-903787-9-7. [cit. 21. 10. 2020.] Dostupné na WWW: http://evernia.cz/publikace/Ekotoxikologie_bioindikace_a_biomonitoring.pdf.
- APPLEBY, A. P.; MÜLLER, F., Weed Control., Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry [online]. 2010. doi:10.1002/14356007.a28_165. ISBN 978-3-527-30673-2. [cit. 26.4.2020]. Dostupné na WWW: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14356007.a28_165.pub2
- APPLEGATE, B.; KEHRMEYER, S.; SAYLER, G.; A chromosomally based tod-luxCDABE whole-cell reporter for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) sensing. *Appl Environ Microbiol* [online]. Červenec 1998, 64 (7): 2730-5 PMID: 9647859 PMCID: PMC106455 [cit. 8. 4. 2020.] Dostupné na WWW: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9647859>.
- BALOG, K.; ZAPLETALOVÁ-BÁRTLOVÁ, I. *Základy toxikologie*, Ostrava: Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství. 1998, s. 108. ISBN 80-86111-29-6.
- BAYER, B. E. Color imaging array, Patent US3971065 A, 1975.
- BENKOVIČ, V.; DIKIČ, D.; GRGORINIČ, T.; et al. *Haematology and blood chemistry changes in mice treated with terbutylazine and its formulation Radazin TZ-50*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. 2012, 89(5), 955–959. [cit. 11. 10. 2019.] Dostupné na WWW: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00128-012-0813-6>.
- BOSSI, R.; VINGGAARD, A. M.; TAXVIG, C.; et al. *Levels of pesticides and their metabolites in Wistar rat amniotic fluids and maternal urine upon gestational exposure*. *Int. Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2013, 10(6), 2271–2281. [cit. 2. 4. 2020.] Dostupné na WWW: <https://www.mdpi.com/1660-4601/10/6/2271>.
- CARAFÀ, R.; WOLLGAST, J.; CANUTI, E.; et al. *Seasonal variations of selected herbicides and related metabolites in water, sediment, seaweed and clams in the Sacca di Goro coastal lagoon (Northern Adriatic)*. *Chemosphere* [online]. Listopad 2007, 69 (10): 1625-1637. [cit. 2. 4. 2020.] PMID: 17610932 DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.05.060 Dostupné na WWW: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17610932>.
- CONNON, R. E.; GEIST, J.; WERNER, I., Effect-Based Tools for Monitoring and Predicting the Ecotoxicological Effects of Chemicals in the Aquatic Environment. *Sensors* [online]. 12(12), 12741-12771. 2012 [cit. 20. 11. 2019.]. DOI: 10.3390/s120912741. ISSN 1424-8220. Dostupné na WWW: <http://www.mdpi.com/1424-8220/12/9/12741/>.
- Český hydrometeorologický ústav (ČHMÚ) Hydrologie – oddělení jakosti vody: Pasport látky terbutylazin 2020a [cit. 13.4.2020]. Dostupné na WWW http://hydro.chmi.cz/pasporty/pasport.php?seq=3287779&mf=6&vyskyt_zdroj6=VODA&vy-skyt_agenda6=32&vyskyt_matrice6=2000868184&vyskyt_typodb6=41&vyskyt_rok6=2010&vyskyt_vod6=&vyskyt_vdo6=.

- Český hydrometeorologický ústav (ČHMÚ) Hydrologie – oddělení jakosti vody: Pasport látky terbuthylazin 2-hydroxy 2020b [cit. 13.4.2020]. Dostupné na WWW: http://hydro.chmi.cz/pasporty/pasport.php?seq=3333443&mf=6&vyskyt_zdroj6=VODA&vyskyt_agenda6=32&vyskyt_matrice6=2000868184&vyskyt_typodb6=41&vyskyt_rok6=2012&vyskyt_vod6=&vyskyt_vdo6=.
- DOUSSET, S.; MOUVET, C.; SCHIAVON, M. *Degradation of [14C] terbuthylazine and [14C] atrazine in laboratory soil microcosms*. Wiley Online Library, [online] 49: 9-16. 1999 [cit. 31. 3. 2020.]. DOI:10.1002/(SICI)1096-9063(199701)49:1<9::AID-PS472>3.0.CO;2-F Dostupné na WWW: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291096-9063%28199701%2949%3A1%3C9%3A%3AAID-PS472%3E3.0.CO%3B2-F>.
- European Commission (EC), Health & Consumers Directorate-General Unit E.3, *Review report for the active substance terbuthylazine finalised in the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health at its meeting on 17 June 2011* [online]. SANCO / 11337/2011 rev 2, Brusel: EC, 17.6.2011 [cit. 1.4.2020]. Dostupné na WWW: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.ViewReview&id=467>.
- European Food Safety Authority (EFSA), *Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance terbuthylazine*. [online]. EFSA Journal 2011; Parma: EFSA, 2011, 9(1), 1969 [cit. 2.11.2019]. Dostupné na WWW: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2011.1969/epdf>.
- European Food Safety Authority (EFSA), *Peer review of the pesticide risk assessment for the active substance terbuthylazine in light of confirmatory data submitted*. [online]. EFSA Journal 2017; Parma: EFSA, 15(6), 4868, [cit. 2.11.2019]. Dostupné na WWW: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2017.4868/epdf>. ISSN: 1831-4732.
- European Chemicals Agency (ECHA), *Committee for Risk Assessment RAC Opinion proposing harmonised classification and labelling at EU level of Terbuthylazine (ISO); N-tert-butyl-6-chloro-N'-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine*. [online]. CLH-O-0000001412-86-66/F Helsinky: ECHA, 15.6.2015 [cit. 2.11.2019]. Dostupné na WWW: <https://echa.europa.eu/documents/10162/7ae57f3d-2f2b-469d-ab34-5b97e48f493a>.
- FANELLI, A. "*HepG2 (liver hepatocellular carcinoma): cell culture*". [online]. 2016 [cit. 30. 9. 2019.]. Dostupné na WWW: <http://www.hepg2.com/>.
- FORBES, V. E.; PALMQVIST, A.; BACH, L. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*. [online]. 2006, 25(1), 272-280. [cit.2.11.2019]. Dostupné na WWW: <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/05-257R.1>. ISSN 0730-7268.
- FORGACS, A.L.; D'SOUZA, M.L.; HUHTANIEMI, I.T.; et al. Triazine herbicides and their chlorometabolites alter steroidogenesis in BLTK1 murine Leydig cells. *Toxicological Sciences*. [online]. 13.5.2013, 134(1), 155–167. [cit.6.9.2019]. Dostupné na WWW: <https://academic.oup.com/toxsci/article/134/1/155/1666047>.
- GALLYAMOVA, O.V.; STIRMANOV, A.V. Terbuthylazin [online]. 2014 [cit. 6.9.2019]. Dostupné na WWW: http://www.pesticidy.ru/active_substance/terbuthylazine
- GEBEL, T.; KEVEKORDES, S., PAV, K.; et al. In vivo genotoxicity of selected herbicides in the mouse bone-marrow micronucleus test. *Archives of Toxicology*. [online]. Leden 1997, 71(3), 193–197. [cit.6.12.2019]. Dostupné na WWW: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002040050375>.
- GHISARI, M.; LONG, M.; TABBO, A.; et al. Effects of currently used pesticides and their mixtures on the function of thyroid hormone and aryl hydrocarbon receptor in cell culture.

Toxicology and Applied Pharmacology. [online]. 2015, 284(3), 292–303. [cit.6.9.2019].
Dostupné na WWW: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X15000551>.

- GRAUSOVÁ, L.; BAČÁKOVÁ, L.; KROMKA, A.; et al. Molecular markers of adhesion, maturation and immune activation of human osteoblast-like MG 63 cells on nanocrystalline diamond films. *Diamond & Related Materials*. [online]. Březen 2009, 18, 258–263, [cit.6.9.2019]. Dostupné na WWW: <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2008.10.023>.
- GUO, L.; DIAL, S.; SHI, L.; et al. Similarities and differences in the expression of drug-metabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*. [online]. Březen 2011, 39(3), 528–538. [cit.6.12.2019]. Dostupné na WWW: <http://dmd.aspetjournals.org/content/39/3/528.short>.
- HALAMOVIČ, K., *Ekotoxikologické biotesty a jejich význam pro hodnocení starých zátěží*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2007. str. 39-50. Vedoucí bakalářské práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.
- HALEŠOVÁ, T.; KOTYZOVÁ, M. Výskyt pesticidních látek ve vybraných lokalitách CHKO Moravský kras s dopadem na skapové vody. *Časopis Ochrana přírody*, 2018, č.1, str. 22-26.
- HELLINGEROVÁ, L., *Ekotoxikologické stanovení kalů z čistíren odpadních vod*, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 91 s. Vedoucí diplomové práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová Ph.D.
- HODGSON, E., *A Textbook of Modern Toxicology*, 3rd. Edition, New Jersey: Jon Wiley & Sons, 2004, 557 s. ISBN 0-471-26508-X.
- HOFFMAN, D. J., et al. *Handbook of ecotoxicology*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995, 755 s. ISBN-10: 08-737-1585-3.
- HOFFMAN, D. J., et al. *Handbook of ecotoxicology*. 2nd edition. Boca Raton: Lewis Publishers, 2003. 1290 s. ISBN 1-56670-546-0.
- HORÁK, J.; LINHART, I.; KLUSON, P., *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*, 1. vyd., Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004, 187 s. ISBN 80-7080-548-X.
- HUBER, A.; BACH, M.; FREDE, H.G., Pollution of surface waters with pesticides in Germany: modeling non-point source inputs. *Agriculture, Ecosystems and Environment* [online]. 2000. 80, 191-204 [cit.8.4.2020]. Dostupné na WWW: [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(00\)00145-6](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(00)00145-6).
- HUANG B.; BATES M.; XIAOWEI Z., Super-Resolution Fluorescence Microscopy, *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2009. 78:1, 993-1016 [cit.17.4.2020]. Dostupné na WWW: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biochem.77.061906.092014>
- JORGENSEN, S. E. (ed.) 2008. *Encyclopedia of ecology: Ecotoxicology: The History and Present Directions*. Oxford: Elsevier, 2008, s.1195–1201. ISBN 9780080454054.
- ROJÍČKOVÁ, R.; MARŠÁLEK, B., *Hodnocení alternativních testů toxicity*. In *Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí*. 1. vyd. Vodňany: Jihočeská univerzita, Výzkumný ústav vodohospodářský a hydrobiologický, 1997. s. 65-77.
- KALBÁČOVÁ, M.; REZEK, B.; BAREŠOVÁ, V.; et al. *Nanoscale topography of nanocrystalline diamonds promotes differentiation of osteoblasts*. *Acta Biomaterialia*. [online]. říjen 2009. 5(8),3076-3085. [cit.6.12.2019]. Dostupné na WWW: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.04.020>
- KANAZAWA, I.; YAMAGUCHI, T.; YANO, S.; et al. Adiponectin and AMP kinase activator stimulate proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells.

BioMed Central Cell Biology. [online]. Listopad 2007. 8, 51. [cit.10.12.2019]. Dostupné na WWW: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2214728/>.

- KIZEK, R.; VACEK, J.; TRNKOVÁ, L.; et al. Elektrochemické biosenzory v analýze zemědělských produktů a vzorků životního prostředí. *Chemické listy*. [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2003, **97**(10), 1003-1006. Dostupné na WWW: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2003_10_05.pdf. ISSN 1213-7103 (online), ISSN 0009-2770 (tištěné).
- KOBLÍŽEK, M.; MALÝ, J.; MASOJÍDEK, J.; et al. A biosensor for the detection of triazine and phenylurea herbicides designed using Photosystem II coupled to a screen-printed electrode. *Biotechnology and Bioengineering*. [online]. 2002, 78, 110–116, [cit.16.4.2020]. Dostupné na WWW: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.10190>.
- KOČÁREK, E.; PÁNEK, M.; NOVOTNÁ, D. *Klinická cytogenetika I: úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 120. Praha: Karolinum. 2006. ISBN 8024610698.
- KOČÍ, V.; MOCOVARÁ, K. *Ekotoxikologie pro chemiky*. Verze 1.0 (2009) [online]. Praha: Vysoká škola chemicko –technologická v Praze, 2009 [cit. 20.12.2019]. Dostupné na WWW: http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-978-80-7080-699-9/. ISBN 978-80-7080-699-9.
- KOUTNIK, D.; STARA, A.; ZUSKOVA, E.; et al. The chronic effects of terbuthylazin-2-hydroxy on early life stages of marbled crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. [online]. březen 2017, 136, 29–33. Dostupné na WWW: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.08.008>.
- KOLÁŘOVÁ, H.; STANĚK, J.; ROSINA, J. *Biofyzika pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada Publishing a.s., 2006, 230 s. ISBN 9788024713830.
- KOPP, R.; POŠTULKOVÁ, E.; HILSCHEHOVÁ, K. *Základy vodní ekotoxikologie*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2015. (str. 67, 68, 104, 105, ...) ISBN 978-80-7509-334-9.
- KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; et al. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutation Research*. [online]. 18.6.1998, 402(1–2), 185–202. Dostupné na WWW: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510797002972>.
- KNASMÜLLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; KEVEKORDES, S.; et al. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology* [online]. 20.5.2004, 198(1-3), 315–328. Dostupné na WWW: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X04001076>.
- KŘŮMAL, K. *Ekotoxikologické hodnocení vybraných monomerů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2006. 49 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
- KLUSOŇ, P. *Skripta Toxikologie*. Univerzita J. E. Purkyně v Ústí n. Labem, Fakulta životního prostředí, 2014, str. 8,17. ISBN 978-80-7414-811-8 (tištěné), ISBN 978-80-7414-834-7 (online: pdf).
- KUBINCOVÁ, P.; NOVÁK, J.; SOVADINOVÁ, I. Nový přístup při stanovení akutní systémové toxicity. *Chemické listy*. [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2016, 110(2), 118-125 [cit. 22.2.2020] Dostupné na WWW: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2016_02_118-125.pdf. ISSN 1213-7103.
- KUNCOVÁ, G.; ISHIZAKI, T.; SOLOVYEV, A.; et al. The repetitive detection of toluene with bioluminescence bioreporter *Pseudomonas putida* TVA8 encapsulated in silica hydrogel on an optical fiber. *Materials* [online]. 2016, 9(6). pii: E467 DOI: 10.3390/ma9060467. [cit. 22.2.2020]. Dostupné na WWW: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28773598>.

- LONHUS, K.; RYCHTÁRIKOVÁ, R.; PLATONOVA, G.; ŠTYS, D. Quasi-spectral characterization of intracellular regions in bright-field light microscopy images [online]. Nové Hradky: Ústav komplexních systémů, 2019, s. 7 [cit. 22.2.2020]. Dostupné na WWW: <https://arxiv.org/abs/1908.03696>.
- MASIA, A.; CAMPO, J.; NAVARRO-ORTEGA, A.; et al. Pesticide monitoring in the basin of Llobregat River (Catalonia, Spain) and comparison with historical data. *Science of the Total Environment* [online]. 2015, 503/504, 58-68. [cit. 22.2.2020]. Dostupné na WWW: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969714009681>.
- MAHLER, H.-CH.; JISKOOT, W. *Analysis of Aggregates and Particles in Protein Pharmaceuticals*. New Jersey: John Wiley&Sons, 2011, 384 s., ISBN: 978-1-118-15056-6.
- MANERA, M.; GIARI, L.; DEPASQUALE, J.A.; et al. European sea bass gill pathology after exposure to cadmium and terbuthylazine: expert versus fractal analysis. *Journal of Microscopy*. [online]. 2016a, 261(3), 291–299 [cit. 20.1.2020]. Dostupné na WWW: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jmi.12332>.
- MANERA, M.; DEZFULI, B.S.; DEPASQUALE, J.A.; et al. Multivariate approach to gill pathology in European sea bass after experimental exposure to cadmium and terbuthylazine. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. [online]. 2016b, 129, 282–290 [cit. 20.1.2020]. Dostupné na WWW: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651316300999>.
- MARŠÁLEK, B. Ekotoxikologické biotesty: rozdělení, přehled, použití. IN: Sborník pracovní konference - Ekotoxikologické Biotesty I, [online]. 18-19/9/2002, s. 8-24, 2002 [cit. 20.11.2019]. Dostupné na WWW: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2015/Bi5620/um/31589115/1.Prehled_a_rozdeleni_EB_text.pdf.
- MERSCH-SUNDERMANN, V.; KNASMÜLLER, S.; WU, X. J.; et al. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*. [online]. 2004, 198 (1–3), 329–340 [cit. 20.11.2019]. Dostupné na WWW: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.02.009>. PMID 15138059.
- MIKULÍKOVÁ, I.; MODRÁ, H.; BLAHOVÁ, J.; et al. Recovery ability of common carp (*Cyprinus carpio*) after a short-term exposure to terbuthylazine. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. [online]. 2013, 16(1), 17–23 [cit. 20.11.2019]. Dostupné na WWW: https://www.researchgate.net/publication/236925741_Recovery_ability_of_common_carp_Cyprinus_carpio_after_a_short-term_exposure_to_terbuthylazine.
- MIRET, S.; DE GROENE, E.M.; KLAFFKE, W. Comparison of In Vitro Assays of Cellular Toxicity in the Human Hepatic Cell Line HepG2. *Journal of Biomolecular Screening*. [online]. 2006, 11(2), 184-193 [cit. 20.11.2019]. Dostupné na WWW: <http://jbx.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1087057105283787>. DOI:10.1177/1087057105283787.
- MLADINIĆ, M.; PERKOVIĆ, P.; ŽELJEŽIĆ, D. Characterization of chromatin instabilities induced by glyphosate, terbuthylazine and carbofuran using cytome FISH assay. *Toxicology Letters* [online]. 2009, 189(2), 130–137 [cit. 8.10.2019]. Dostupné na WWW: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427409002616>.
- MLADINIĆ, M.; ŽELJEŽIĆ, D.; SHAPOSHNIKOV, S. A.; et al. The use of FISH-comet to detect c-Myc and TP 53 damage in extended-term lymphocyte cultures treated with terbuthylazine and carbofuran. *Toxicology Letters*. [online]. 2012, 211(1), 62–69 [cit. 8.10.2019]. Dostupné na WWW: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037842741200080X>.

- MOSCATO, S.; RONCA, F.; CAMPANI, D.; et al. Poly(vinyl alcohol)/gelatin Hydrogels Cultured with Hep G2 Cells as a 3D Model of Hepatocellular Carcinoma: A Morphological Study. *Journal of Functional Biomaterials*. [online]. 2015, 6 (6), 16–32 DOI:10.3390/jfb6010016, PMID 25590431. [cit. 8.10.2019] Dostupné na WWW: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4384098/>.
- MRÁZ, J.; STRÁNSKÝ, V. Biologické monitorování a biologické expoziční testy. In: *Státní zdravotní ústav* [online]. Praha: SZU, 2009, opr. 4.11.2009 [cit. 10.11.2019]. Dostupné na WWW: <http://www.szu.cz/tema/pracovni-prostredi/biologicke-monitorovani-a-biologicke-expozicni-testy>.
- NEČAS, O.; BÁRTEK, J.; HAŠEK, J.; a kol. *Cytoskelet*. Praha: Academia, 1991, 250 ISBN 80-200-0116-6.
- NODLER, K., LICHA, T., VOUSTA, D.T., Twenty years later atrazine concentrations in selected coastal waters of the Mediterranean and the Baltic sea. [online]. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 70: 112-118 [cit. 11.4.2020]. Dostupné na WWW: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23481690>.
- PALEČEK, J.; LINHART, I.; HORÁK, J. *Toxikologie a bezpečnost práce v chemii*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1996, 189 s. ISBN 80-7080-266-9.
- Pesticide Properties Database (PPDB), General informatik for terbuthylazine*. Agriculture and environment research unit at the University of Hertfordshire [online database]. Hertfordshire: AERU University of Hertfordshire. 2019a, [cit.1.4.2020]. Dostupné na WWW: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/623.htm>.
- Pesticide Properties Database (PPDB), General informatik for terbuthylazin-2-hydroxy*. Agriculture and environment research unit at the University of Hertfordshire [online database]. Hertfordshire: AERU University of Hertfordshire. 2019b, [cit.1.4.2020]. Dostupné na WWW: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/623.htm>.
- PINTO, A.P.; SERRANO, C.; PIRES, T.; et al. Degradation of terbuthylazine, difenoconazole and pendimethalin pesticides by selected fungi cultures. *Science of The Total Environment* [online] 2012, 435/436: 402-410, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.07.027. [cit. 20.1.2020]. Dostupné na WWW: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22878100>.
- PLATONOVA G.; ŠTYS D.; SOUČEK P.; et. al. Technically correct visualization of biological microscopic experiments [online]. *Nové Hradý: Ústav komplexních systémů*, 2019, 3-4 [cit. 9.4.2020]. Dostupné na WWW: <https://arxiv.org/abs/1903.06519>.
- PŮŽA, V. Mikrokinematografické sledování adheze a dilatace buněk pěstovaných in vitro. *Hradec Králové, Sborník vědeckých prací Lékařské Fakulty*, 1976, 19, 737-744.
- RUDNIK, V.; SANYAL, A.; SYED, F.A.; et al. Loss of ERE binding activity by estrogen receptor-alpha alters basal and estrogen-stimulated bone-related gene expression by osteoblastic cells. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 2007, 103, 896-907 [cit. 20.1.2020]. Dostupné na WWW: <https://doi.org/10.1002/jcb.21459>.
- RYCHTARIKOVÁ, R.; ŠTYS, D. Observation of dynamics inside an unlabeled live cell using bright-field photon microscopy: Evaluation of organelles' trajectories *Bioinformatics and Biomedical Engineering. IWBBIO*. [online]. Cham: Springer, 2017. Dostupné na WWW: https://doi.org/10.1007/978-3-319-56154-7_62. ISBN 978-3-319-56154-7.
- SASS, J.B.; COLANGELO, A. European Union bans atrazine, while the United States negotiates continued use. *Int J Occup Environ Health* [online]. 2006, 12(3), 260–267, Published online: 19 Jul 2013 [cit. 20.1.2020]. Dostupné na WWW: <https://doi.org/10.1179/oeh.2006.12.3.260>.

- Sigma-Aldrich International GmbH; Terbutylazine-2-hydroxy, PESTANAL®*, analytical standard [online]. Merck KGaA, Darmstadt (Germany), Prosinec 2019. Dostupné na WWW: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/46019?lang=en®ion=CZ>.
- Sigma-Aldrich International GmbH; Hep G2 Cell Line human, hepatocyte carcinoma, 85011430* [online]. Merck KGaA, Darmstadt (Germany), Leden 2020a. Dostupné na WWW: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_85011430?lang=en®ion=CZ.
- Sigma-Aldrich International GmbH; MG-63 Cell Line human, 86051601* [online]. Merck KGaA, Darmstadt (Germany), Leden 2020b. Dostupné na WWW: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_86051601?lang=en®ion=CZ.
- SMOLIN, E. M.; RAPOPORT, L. *Chemistry of Heterocyclic Compounds: s-Triazines and Derivatives, Volume 13*. London: Interscience Publishers. 1959, str. 217-258., Library of Congress Catalog Card Number (LCCCN) 59-8840.
- STARÁ, A.; ZUSKOVÁ, E.; KOUBA, A.; et al. Effects of terbuthylazine-desethyl, a terbuthylazine degradation product, on red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Science of the Total Environment* [online]. 2016, 566-567, 733–740 [cit. 20.1.2020]. Dostupné na WWW: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969716310439>.
- STIGAARD KJELDEN, L.; GHISARI, M.; BONEFELD-JORGENSEN, E.C. Currently used pesticides and their mixtures affect the function of sex hormone receptors and aromatase enzyme activity. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2013, 272(2), 453–464 [cit. 20.1.2020]. Dostupné na WWW: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X13003013>.
- STIPIČEVIĆ, S.; GALZINA, N.; UDIKOVIĆ-KOLIĆ, N.; et al. Distribution of terbuthylazine and atrazine residues in crop-cultivated soil: the effect of herbicide application rate on herbicide persistence. *Geoderma* [online]. 2015, 259-260, 300–309 [cit. 20.1.2020]. Dostupné na WWW: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016706115300057>.
- STIPIČEVIĆ, S.; MENDAŠ, G.; DVORŠČAK, M.; et al. Dissipation dynamics of terbuthylazine in soil during the maize growing season. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* [online]. 2017, 68(4), 336–342 [cit. 20.1.2020]. Dostupné na WWW: <https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/aiht.2017.68.issue-4/aiht-2017-68-3063/aiht-2017-68-3063.pdf>.
- SUN, D.; ROTH, S. & BLACK, M. J. "Secrets of Optical Flow Estimation and Their Principles" IEEE Int. Conf. on Comp. Vision & Pattern Recognition, [online]. 2010, DOI: 10.1109/CVPR.2010.5539939 [cit. 20.1.2020] Dostupné na WWW: https://www.researchgate.net/publication/221364345_Secrets_of_Optical_Flow_Estimation_and_Their_Principles#fullTextFileContent.
- SUN, D.; ROTH, S. & BLACK, M. J.: A Quantitative Analysis of Current Practices in Optical Flow Estimation and the Principles Behind Them. *International Journal of Computer Vision* [online] 2013 106, 115–137 DOI:10.1007/s11263-013-0644-x, [cit. 20.1.2020] Dostupné na WWW: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11263-013-0644-x#citeas>
- SVOBODOVÁ, Z.; et al. *Ekotoxikologie – praktická cvičení, část I.*, Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, 2000, 72 s., ISBN 80-85114-95-X.
- ŠTĚPÁNOVÁ, S.; PLHALOVÁ, L.; DOLEŽELOVÁ, P.; et al. The effects of subchronic exposure to terbuthylazine on early developmental stages of common carp. *The Scientific World Journal* [online]. 2012, Article ID 615920, 7 s. [cit. 20.1.2020]. Dostupné na WWW: <https://doi.org/10.1100/2012/615920>.

- ŠTYS, D.; JIZBA, P.; PAPÁČEK, S.; et al. On measurement of internal variables of complex self-organized systems and their relation to multifractal spectra. In Proceedings of the 6th IFIP TC 6 International Workshop (WSOS 2012) [online]. Delft, The Netherlands, 15–16 March 2012; pp. 36–47 [cit. 20.4.2020]. Dostupné na WWW: https://www.researchgate.net/publication/262351844_On_Measurement_of_Internal_Variables_of_Complex_Self-Organized_Systems_and_Their_Relation_to_Multifractal_Spectra
- ŠTYS, D.; NÁHLÍK, T.; MACHÁČEK, P.; et al. Least Information Loss (LIL) conversion of digital images and lessons learned for scientific image inspection. In *Bioinformatics and Biomedical Engineering. 4th International Work-Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (IWBBIO), Granada, Spain, apr 20-22, 2016*, vol. 9656 of Lect. Notes Bioinform. Ortuno F. and Rojas I., eds. Cham: Springer International Publishing, 2016, pp. 527–536. ISBN 978-3-319-31743-4.
- ŠUSTOVÁ, K., RŮŽIČKOVÁ, J.: Analysis of degree maturation of edam cheese by FT Near Infrared Spectroscopy. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis* [online]. 2008, 56, 221-228. Publikováno online 17.11.2014. Dostupné na WWW: <https://doi.org/10.11118/actaun200856010221>. ISSN 2464-8310.
- LOVAKOVIĆ, B. T.; PIZENT, A.; KAŠUBA, V.; et al. Effects of sub-chronic exposure to terbuthylazine on DNA damage, oxidative stress and parent compound/metabolite levels in adult male rats. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2017, 108(Pt A), 93–103 [cit. 20.1.2020]. Dostupné na WWW: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691517304283>.
- TAXVIG, C.; HADRUP, N.; BOBERG, J.; et al. In vitro—in vivo correlations for endocrine activity of a mixture of currently used pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2013, 272(3), 757–766 [cit. 20.1.2020]. Dostupné na WWW: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.07.028>.
- TICHÝ, M. Toxikologie pro chemiky: Toxikologie obecná, speciální, analytická a legislativ. 2. vyd. Praha: Univerzita Karlova, Karolinum, 2003. 119 s. ISBN 80-246-0566-X.
- TICHÝ, M.; ROTH, Z.; BLÁHA, K.; et al. Alternativní metody testování toxicity chemických látek in silico. *Chemické listy*. [online]. 2005, 99(10), 675-681. ISSN 1213-7103. [cit. 20.1.2020]. Dostupné na WWW: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_10_675-681.pdf.
- TICHÝ, M. Predikční toxikologie. In: *Státní zdravotní ústav* [online]. Praha: Státní zdravotní ústav. 2008 [cit. 2016-02-29]. Dostupné na WWW: <http://www.szu.cz/tema/pracovni-prostredi/predikcni-toxikologie>.
- TKAČIK, G.; GARRIGAN, P.; RATLIFF, C.; et al. Natural images from the birthplace of the human eye. *Journal PLOS ONE* [online]. 2011, 6(6), e20409 [cit. 20.1.2020]. Dostupné na WWW: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020409>.
- Toxicology Data Network (TOXNET), the National Library of Medicine, Terbuthylazine, 2019. [online database], [cit. 17.6.2019]. Dostupné na WWW: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+6148>
- TRÖGL J., CHAUHAN A., RIPP S., LAYTON A.C., KUNCOVÁ G., SAYLER G.S.: *Pseudomonas fluorescens* HK44: Lessons learned from a model whole-cell bioreporter with a broad application history. [online] *Sensors* 12 (2012) 1544-1571. DOI: 10.3390/s120201544. [cit. 8.4.2020]. Dostupné na WWW: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3304127/>.

- United States Environmental Protection Agency (USEPA) *Reregistration Eligibility Decision (RED): Terbutylazine* [online]. 1995, EPA738-R-95-005. [cit. 28.10.2019]. Dostupné na WWW: <http://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/2645.pdf>.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) *Office of Pesticide Programs: Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential*. [online]. Annual Cancer Report 2018. [cit. 2.11.2019] Dostupné na WWW: http://npic.orst.edu/chemicals_evaluated.pdf.
- VELÍŠEK, J.; STARÁ, A.; KOUTNIK, D.; et al. Effect of Terbutylazine-2-hydroxy at Environmental Concentrations on Early Life Stages of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International [online]. 2014, 2-6 Article ID 621304, [cit. 20.1.2020]. Dostupné na WWW: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/621304>.
- VELÍŠEK, J.; STARÁ, A.; KOUTNIK, D.; et al. Effects of terbutylazine on early life stages of common carp. *Neuro Endocrinology Letters* [online]. 2015, 36 dodatek 1, 120–125 [cit. 20.1.2020]. Dostupné na WWW: <https://europepmc.org/abstract/med/26757117>.
- VELÍŠEK, J.; KOUTNIK, D.; ZUSKOVÁ, E.; et al. Effects of the terbutylazine metabolite terbutylazine desethyl on common carp embryos and larvae. *Science of the Total Environment* [online]. 2016a, 539, 214–220 [cit. 20.1.2020]. Dostupné na WWW: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969715306549>.
- VELÍŠEK, J.; STARÁ, A.; ZUSKOVÁ, E. Effect of single and combination of three triazine metabolites at environmental concentrations on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2016b, 23, 24289–24297 [cit. 20.1.2020]. Dostupné na WWW: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-016-7689-7>.
- VELÍŠEK, J.; STARÁ, A.; ZUSKOVÁ, E.; et al. Effects of three triazine metabolites and their mixture at environmentally relevant concentrations on early life stages of marbled crayfish (*Procambarus fallax* f. *virginalis*). *Chemosphere* [online]. 2017, 175, 440–445 [cit. 20.1.2020]. Dostupné na WWW: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653517302588>.
- WESTERINK, W.M.; SCHOONEN, W.G. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicology in Vitro* [online]. 2007, 21(8), 1592–1602 [cit. 20.1.2020]. Dostupné na WWW: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0887233307001920>.
- World Health Organization (WHO) *Terbutylazine in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality*. [online]. Geneva: World Health Organization 2003. [cit. 27. 10. 2019]. Dostupné na WWW: https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/terbutylazine.pdf.
- ZHAO, G.; RAINES, A.; WIELAND, M.; et al., *Requirement for both micron-and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography*. *Biomaterials* [online]. 2007, 28, 2821–2829. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.02.024 Dostupné na WWW: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2754822/>.
- ŽELJEŽIĆ, D.; ŽUNEC, S.; BJELIŠ M.; et. al., Effects of the chloro-s-triazine herbicide terbutylazine on DNA integrity in human and mouse cells. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2018, 25, 19065–19081. [cit. 2. 8. 2019] Dostupné na WWW: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2046-7>

8. Seznam použitých zkratk

ADI	z angl. acceptable daily intake
AOEL	z angl. acceptable operator exposure
ARfD	z angl. acute reference dose
ATP	z angl. adenosine triphosphate
CAS	z angl. Chemical American Society
ČSN	chráněné označení českých technických norem
DIL	dilatace (funkce cytoskeletu) - metoda stanovení buněčné totoxicity
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DMEM	z angl. Dubblecco's modified Eagle's Minimum Essential Medium
DMSO	chemická látka dimethylsulfoxid
EC50	z angl. effective concentration 50%
ECACC	z angl. The European Collection of Authenticated Cell Cultures
ECHA	z angl. European Chemicals Agency
EFSA	z angl. European Food Safety Authority
EIA	z angl. Environmental Impact Assessment
ERA	z angl. Environmental Risk Assessment
FETAX	z angl. Frog Embryo Teratogenity Assay Xenopus
HeLa	buněčná linie lidských epiteliálních buněk
HepG2	testovaná buněčná linie lidského hepatocytárního karcinomu
HK44	označení pro geneticky upravený kmen bakterií <i>Pseudomonas fluorescens</i>
HTBA	chemická látka terbutylazine-2-hydroxy
ISO	z angl. International Organization for Standardization
JP-4	tryskové (proudové) palivo
LC50	z angl. lethal concentration 50%
LD50	z angl. lethal dose 50%
LIL	z angl. Least Information Loss
LOAEL	z angl. Lowest Observed Adverse Effect Level
MATLAB	z angl. matrix laboratory
MG63	testovaná buněčná linie lidského osteosarkomu
NOEC	z angl. No Observed Effect Concentration

OECD	z angl. Organization for Economic Cooperation in Development
PBS	z angl. phosphate-buffered saline
PBSM	z angl. Physiologically-Based Simulation Models
PFCI	progresivní familiární intrahepatální cholestáza
PHE	z angl. Public Health England
PNG	z angl. Portable Network Graphics
PPDB	z angl. Pesticides Properties DataBase
QSAR	z angl. Quantitative Structure-Activity Relationships
RAW	formát zobrazení dat
RGB	z angl. Red, Green, Blue
RLU	z angl. Relative Light Units
SRR	specifická růstová rychlost – metoda stanovení buněčné tototoxicity
TBA	herbicide terbuthylazine
TVA8	označení pro geneticky upravený kmen bakterií <i>Pseudomonas putida</i>
USEPA	z angl. United States Environmental Protection Agency
VerCa	počítačový software využívaný při úpravě obrazových dat
WHO	z angl. World Health Organization

9. Přílohy

9.1. Přehled údajů o pořízených sériích snímků testovaných buněčných linií

Údaje jsou zařazeny do dvou oddílů obsahujících 156 tabulek, přičemž první oddíl zahrnuje série snímků buněčných kultur MG63 (81 tabulek) a druhý oddíl zahrnuje série snímků buněčných linií HepG2 (76 tabulek). Série jsou řazeny dle datumu pořízení a obsahují základní informace pro možnou opětovnou realizaci experimentu.

9.2. Společné informace pro všechny pořízené série obou buněčných kultur

Použitý objektiv	LWD 40x/0.55, Pn1 ADL, ∞/1.2, WD 2.1
Použité filtry	E-long (UV), E-short (IR)
LED osvětlení (mA)	4000
Expoziční doba světla (μs)	293600

9.3. Tabulky informací k snímání provedených na buněčných kulturách MG63

Číslo série	1
Datum pořízení série	25. 4. 2019
Celková doba snímání série (s)	2173
Frekvence snímání (fps)	0,1960
Počet zpracovaných snímků série	426
Hodnota osy Z (μm)	22522,18
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	24. 4. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	4
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	Bez pesticidu

Číslo série	2
Datum pořízení série	25. 4. 2019
Celková doba snímání série (s)	2196
Frekvence snímání (fps)	0,1944
Počet zpracovaných snímků série	428
Hodnota osy Z (μm)	22522,53
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	24. 4. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	4
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	Bez pesticidu

Číslo série	3
-------------	---

Datum pořízení série	25. 4. 2019
Celková doba snímání série (s)	1927
Frekvence snímání (fps)	0,1956
Počet zpracovaných snímků série	377
Hodnota osy Z (μm)	22523,89
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	24. 4. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	4
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	4
Datum pořízení série	25. 4. 2019
Celková doba snímání série (s)	2350
Frekvence snímání (fps)	0,1945
Počet zpracovaných snímků série	457
Hodnota osy Z (μm)	22521,42
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	24. 4. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	4
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	5
Datum pořízení série	25. 4. 2019
Celková doba snímání série (s)	2321
Frekvence snímání (fps)	0,1917
Počet zpracovaných snímků série	445
Hodnota osy Z (μm)	22520,11
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	24. 4. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	4
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	6
Datum pořízení série	25. 4. 2019
Celková doba snímání série (s)	2363
Frekvence snímání (fps)	0,1926
Počet zpracovaných snímků série	455
Hodnota osy Z (μm)	22518,40
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	24. 4. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	4
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	7
Datum pořízení série	25. 4. 2019
Celková doba snímání série (s)	3444
Frekvence snímání (fps)	0,1925

Počet zpracovaných snímků série	663
Hodnota osy Z (μm)	22520,79
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	24. 4. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	4
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	8
Datum pořízení série	25. 4. 2019
Celková doba snímání série (s)	2406
Frekvence snímání (fps)	0,1920
Počet zpracovaných snímků série	462
Hodnota osy Z (μm)	22519,47
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	24. 4. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	4
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	9
Datum pořízení série	25. 4. 2019
Celková doba snímání série (s)	2303
Frekvence snímání (fps)	0,1924
Počet zpracovaných snímků série	443
Hodnota osy Z (μm)	22518,87
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	24. 4. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	4
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	1
Datum pořízení série	2. 5. 2019
Celková doba snímání série (s)	2394
Frekvence snímání (fps)	0,1909
Počet zpracovaných snímků série	457
Hodnota osy Z (μm)	22447,26
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	1. 5. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	5
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	2
Datum pořízení série	2. 5. 2019
Celková doba snímání série (s)	2727
Frekvence snímání (fps)	0,1900
Počet zpracovaných snímků série	518
Hodnota osy Z (μm)	22446,70
Typ snímané buněčné kultury	MG63

Datum přípravy buněčné kultury	1. 5. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	5
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	Bez pesticidu

Číslo série	3
Datum pořízení série	2. 5. 2019
Celková doba snímání série (s)	4162
Frekvence snímání (fps)	0,2035
Počet zpracovaných snímků série	847
Hodnota osy Z (μm)	22445,74
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	1. 5. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	5
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	Bez pesticidu

Číslo série	4
Datum pořízení série	2. 5. 2019
Celková doba snímání série (s)	2212
Frekvence snímání (fps)	0,1958
Počet zpracovaných snímků série	433
Hodnota osy Z (μm)	22445,84
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	1. 5. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	5
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	Bez pesticidu

Číslo série	5
Datum pořízení série	2. 5. 2019
Celková doba snímání série (s)	2499
Frekvence snímání (fps)	0,1949
Počet zpracovaných snímků série	487
Hodnota osy Z (μm)	22461,94
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	1. 5. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	5
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	Bez pesticidu

Číslo série	6
Datum pořízení série	2. 5. 2019
Celková doba snímání série (s)	2491
Frekvence snímání (fps)	0,2031
Počet zpracovaných snímků série	506
Hodnota osy Z (μm)	22445,3
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	1. 5. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	5
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	Bez pesticidu

Číslo série	7
Datum pořízení série	2. 5. 2019
Celková doba snímání série (s)	2040
Frekvence snímání (fps)	0,1912
Počet zpracovaných snímků série	390
Hodnota osy Z (μm)	22444,68
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	1. 5. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	5
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	8
Datum pořízení série	2. 5. 2019
Celková doba snímání série (s)	2682
Frekvence snímání (fps)	0,1611
Počet zpracovaných snímků série	2682
Hodnota osy Z (μm)	22444,1
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	1. 5. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	5
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	1
Datum pořízení série	19. 8. 2019
Celková doba snímání série (s)	1955
Frekvence snímání (fps)	0,2005
Počet zpracovaných snímků série	392
Hodnota osy Z (μm)	22529,48
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	18. 8. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	24
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	2
Datum pořízení série	19. 8. 2019
Celková doba snímání série (s)	5178
Frekvence snímání (fps)	0,2007
Počet zpracovaných snímků série	1039
Hodnota osy Z (μm)	22524,54
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	18. 8. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	24
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	3
Datum pořízení série	19. 8. 2019
Celková doba snímání série (s)	4662

Frekvence snímání (fps)	0,2008
Počet zpracovaných snímků série	936
Hodnota osy Z (μm)	22519,06
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	18. 8. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	24
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	4
Datum pořízení série	19. 8. 2019
Celková doba snímání série (s)	4578
Frekvence snímání (fps)	0,2010
Počet zpracovaných snímků série	920
Hodnota osy Z (μm)	22516,88
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	18. 8. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	24
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	5
Datum pořízení série	19. 8. 2019
Celková doba snímání série (s)	4041
Frekvence snímání (fps)	0,2004
Počet zpracovaných snímků série	810
Hodnota osy Z (μm)	22514,11
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	18. 8. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	24
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	6
Datum pořízení série	19. 8. 2019
Celková doba snímání série (s)	2051
Frekvence snímání (fps)	0,1902
Počet zpracovaných snímků série	390
Hodnota osy Z (μm)	22510,74
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	18. 8. 2019
Číslo pasáže buněčné kultury	24
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	1
Datum pořízení série	17.10.2019
Celková doba snímání série (s)	2099
Frekvence snímání (fps)	0,1929
Počet zpracovaných snímků série	405
Hodnota osy Z (μm)	22507,00

Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	16.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	60
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	2
Datum pořízení série	17.10.2019
Celková doba snímání série (s)	3302
Frekvence snímání (fps)	0,1914
Počet zpracovaných snímků série	632
Hodnota osy Z (μm)	22508,34
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	16.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	60
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	3
Datum pořízení série	17.10.2019
Celková doba snímání série (s)	3163
Frekvence snímání (fps)	0,1906
Počet zpracovaných snímků série	603
Hodnota osy Z (μm)	22510,9
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	16.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	60
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	4
Datum pořízení série	17.10.2019
Celková doba snímání série (s)	2581
Frekvence snímání (fps)	0,1895
Počet zpracovaných snímků série	489
Hodnota osy Z (μm)	22505,42
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	16.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	60
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	5
Datum pořízení série	17.10.2019
Celková doba snímání série (s)	3025
Frekvence snímání (fps)	0,1888
Počet zpracovaných snímků série	571
Hodnota osy Z (μm)	22507,20
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	16.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	60

Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8
--	---

Číslo série	6
Datum pořízení série	17.10.2019
Celková doba snímání série (s)	2845
Frekvence snímání (fps)	0,1898
Počet zpracovaných snímků série	540
Hodnota osy Z (μm)	22506,48
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	16.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	60
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	7
Datum pořízení série	17.10.2019
Celková doba snímání série (s)	2603
Frekvence snímání (fps)	0,1902
Počet zpracovaných snímků série	495
Hodnota osy Z (μm)	22509,00
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	16.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	60
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	8
Datum pořízení série	17.10.2019
Celková doba snímání série (s)	3117
Frekvence snímání (fps)	0,1896
Počet zpracovaných snímků série	591
Hodnota osy Z (μm)	22508,50
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	16.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	60
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	9
Datum pořízení série	17.10.2019
Celková doba snímání série (s)	2341
Frekvence snímání (fps)	0,1884
Počet zpracovaných snímků série	441
Hodnota osy Z (μm)	22506,99
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	16.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	60
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	10
-------------	----

Datum pořízení série	17.10.2019
Celková doba snímání série (s)	444
Frekvence snímání (fps)	0,1914
Počet zpracovaných snímků série	85
Hodnota osy Z (μm)	22507,59
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	16.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	60
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	8

Číslo série	1
Datum pořízení série	23.10.2019
Celková doba snímání série (s)	2173
Frekvence snímání (fps)	0,1910
Počet zpracovaných snímků série	415
Hodnota osy Z (μm)	22461,76
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	22.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	50
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8

Číslo série	2
Datum pořízení série	23.10.2019
Celková doba snímání série (s)	2731
Frekvence snímání (fps)	0,1919
Počet zpracovaných snímků série	524
Hodnota osy Z (μm)	22456,28
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	22.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	50
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8

Číslo série	3
Datum pořízení série	23.10.2019
Celková doba snímání série (s)	2980
Frekvence snímání (fps)	0,1909
Počet zpracovaných snímků série	569
Hodnota osy Z (μm)	22457,46
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	22.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	50
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8

Číslo série	4
Datum pořízení série	23.10.2019
Celková doba snímání série (s)	2485
Frekvence snímání (fps)	0,1875

Počet zpracovaných snímků série	466
Hodnota osy Z (μm)	22457,12
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	22.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	50
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8

Číslo série	5
Datum pořízení série	23.10.2019
Celková doba snímání série (s)	3042
Frekvence snímání (fps)	0,1917
Počet zpracovaných snímků série	583
Hodnota osy Z (μm)	22458,8
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	22.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	50
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8

Číslo série	6
Datum pořízení série	23.10.2019
Celková doba snímání série (s)	2005
Frekvence snímání (fps)	0,1900
Počet zpracovaných snímků série	381
Hodnota osy Z (μm)	22453,93
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	22.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	50
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8

Číslo série	7
Datum pořízení série	23.10.2019
Celková doba snímání série (s)	3819
Frekvence snímání (fps)	0,1781
Počet zpracovaných snímků série	680
Hodnota osy Z (μm)	22455,66
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	22.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	50
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8

Číslo série	8
Datum pořízení série	23.10.2019
Celková doba snímání série (s)	2858
Frekvence snímání (fps)	0,1889
Počet zpracovaných snímků série	540
Hodnota osy Z (μm)	22454,22
Typ snímané buněčné kultury	MG63

Datum přípravy buněčné kultury	22.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	50
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,8

Číslo série	9
Datum pořízení série	23.10.2019
Celková doba snímání série (s)	1998
Frekvence snímání (fps)	0,1892
Počet zpracovaných snímků série	378
Hodnota osy Z (μm)	22452,62
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	22.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	50
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,8

Číslo série	1
Datum pořízení série	31.10.2019
Celková doba snímání série (s)	3164
Frekvence snímání (fps)	0,1887
Počet zpracovaných snímků série	597
Hodnota osy Z (μm)	22561,28
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	30.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	66
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58

Číslo série	2
Datum pořízení série	31.10.2019
Celková doba snímání série (s)	3579
Frekvence snímání (fps)	0,1914
Počet zpracovaných snímků série	685
Hodnota osy Z (μm)	22550,98
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	30.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	66
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58

Číslo série	3
Datum pořízení série	31.10.2019
Celková doba snímání série (s)	2452
Frekvence snímání (fps)	0,1913
Počet zpracovaných snímků série	469
Hodnota osy Z (μm)	22549,66
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	30.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	66
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58

Číslo série	4
Datum pořízení série	31.10.2019
Celková doba snímání série (s)	2393
Frekvence snímání (fps)	0,1889
Počet zpracovaných snímků série	452
Hodnota osy Z (μm)	22544,16
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	30.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	66
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,58

Číslo série	5
Datum pořízení série	31.10.2019
Celková doba snímání série (s)	3415
Frekvence snímání (fps)	0,1895
Počet zpracovaných snímků série	647
Hodnota osy Z (μm)	22544,62
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	30.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	66
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,58

Číslo série	6
Datum pořízení série	31.10.2019
Celková doba snímání série (s)	2452
Frekvence snímání (fps)	0,1896
Počet zpracovaných snímků série	465
Hodnota osy Z (μm)	22537,60
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	30.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	66
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,58

Číslo série	7
Datum pořízení série	31.10.2019
Celková doba snímání série (s)	1144
Frekvence snímání (fps)	0,1897
Počet zpracovaných snímků série	217
Hodnota osy Z (μm)	22530,00
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	30.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	66
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,58

Číslo série	8
Datum pořízení série	31.10.2019
Celková doba snímání série (s)	3855

Frekvence snímání (fps)	0,1935
Počet zpracovaných snímků série	746
Hodnota osy Z (μm)	22527,48
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	30.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	66
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,58

Číslo série	9
Datum pořízení série	31.10.2019
Celková doba snímání série (s)	3259
Frekvence snímání (fps)	0,1927
Počet zpracovaných snímků série	628
Hodnota osy Z (μm)	22521,18
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	30.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	66
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,58

Číslo série	10
Datum pořízení série	31.10.2019
Celková doba snímání série (s)	4383
Frekvence snímání (fps)	0,1885
Počet zpracovaných snímků série	826
Hodnota osy Z (μm)	22514,64
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	30.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	66
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,58

Číslo série	11
Datum pořízení série	31.10.2019
Celková doba snímání série (s)	2668
Frekvence snímání (fps)	0,1900
Počet zpracovaných snímků serie	507
Hodnota osy Z (μm)	22513,88
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	30.10.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	66
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,58

Číslo série	1
Datum pořízení série	5.12.2019
Celková doba snímání série (s)	1922
Frekvence snímání (fps)	0,1847
Počet zpracovaných snímků série	355
Hodnota osy Z (μm)	22469,56

Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	4.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	81
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	2
Datum pořízení série	5.12.2019
Celková doba snímání série (s)	2277
Frekvence snímání (fps)	0,1893
Počet zpracovaných snímků série	431
Hodnota osy Z (μm)	22483,76
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	4.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	81
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	3
Datum pořízení série	5.12.2019
Celková doba snímání série (s)	2533
Frekvence snímání (fps)	0,1895
Počet zpracovaných snímků série	480
Hodnota osy Z (μm)	22486,56
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	4.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	81
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	4
Datum pořízení série	5.12.2019
Celková doba snímání série (s)	2717
Frekvence snímání (fps)	0,1873
Počet zpracovaných snímků série	509
Hodnota osy Z (μm)	22488,90
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	4.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	81
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	5
Datum pořízení série	5.12.2019
Celková doba snímání série (s)	2626
Frekvence snímání (fps)	0,1923
Počet zpracovaných snímků série	505
Hodnota osy Z (μm)	22489,72
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	4.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	81

Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8
--	---

Číslo série	6
Datum pořízení série	5.12.2019
Celková doba snímání série (s)	356
Frekvence snímání (fps)	0,1906
Počet zpracovaných snímků série	679
Hodnota osy Z (μm)	22490,34
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	4.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	81
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	7
Datum pořízení série	5.12.2019
Celková doba snímání série (s)	2423
Frekvence snímání (fps)	0,1911
Počet zpracovaných snímků série	463
Hodnota osy Z (μm)	22487,28
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	4.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	81
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	8
Datum pořízení série	5.12.2019
Celková doba snímání série (s)	2663
Frekvence snímání (fps)	0,1908
Počet zpracovaných snímků série	508
Hodnota osy Z (μm)	22481,96
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	4.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	81
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	9
Datum pořízení série	5.12.2019
Celková doba snímání série (s)	3444
Frekvence snímání (fps)	0,1922
Počet zpracovaných snímků série	662
Hodnota osy Z (μm)	22485,1
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	4.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	81
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	10
-------------	----

Datum pořízení série	5.12.2019
Celková doba snímání série (s)	1405
Frekvence snímání (fps)	0,1921
Počet zpracovaných snímků série	270
Hodnota osy Z (μm)	22489,23
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	4.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	81
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	8

Číslo série	1
Datum pořízení série	12.12.2019
Celková doba snímání série (s)	2046
Frekvence snímání (fps)	0,1931
Počet zpracovaných snímků série	395
Hodnota osy Z (μm)	22485,46
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	11.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	84
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8

Číslo série	2
Datum pořízení série	12.12.2019
Celková doba snímání série (s)	2810
Frekvence snímání (fps)	0,1911
Počet zpracovaných snímků série	537
Hodnota osy Z (μm)	22482,80
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	11.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	84
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8

Číslo série	3
Datum pořízení série	12.12.2019
Celková doba snímání série (s)	3226
Frekvence snímání (fps)	0,1906
Počet zpracovaných snímků série	615
Hodnota osy Z (μm)	22485,66
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	11.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	84
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8

Číslo série	4
Datum pořízení série	12.12.2019
Celková doba snímání série (s)	3074
Frekvence snímání (fps)	0,1945

Počet zpracovaných snímků série	598
Hodnota osy Z (μm)	22484,62
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	11.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	84
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8

Číslo série	5
Datum pořízení série	12.12.2019
Celková doba snímání série (s)	3303
Frekvence snímání (fps)	0,1889
Počet zpracovaných snímků série	624
Hodnota osy Z (μm)	22481,7
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	11.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	84
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8

Číslo série	6
Datum pořízení série	12.12.2019
Celková doba snímání série (s)	4830
Frekvence snímání (fps)	0,1915
Počet zpracovaných snímků série	925
Hodnota osy Z (μm)	22477,74
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	11.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	84
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8

Číslo série	7
Datum pořízení série	12.12.2019
Celková doba snímání série (s)	3638
Frekvence snímání (fps)	0,1905
Počet zpracovaných snímků série	693
Hodnota osy Z (μm)	22477,74
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	11.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	84
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8

Číslo série	8
Datum pořízení série	12.12.2019
Celková doba snímání série (s)	2417
Frekvence snímání (fps)	0,1978
Počet zpracovaných snímků série	478
Hodnota osy Z (μm)	22471,54
Typ snímané buněčné kultury	MG63

Datum přípravy buněčné kultury	11.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	84
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,8

Číslo série	1
Datum pořízení série	19.12.2019
Celková doba snímání série (s)	1546
Frekvence snímání (fps)	0,1895
Počet zpracovaných snímků série	293
Hodnota osy Z (μm)	22480,10
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	18.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	87
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58

Číslo série	2
Datum pořízení série	19.12.2019
Celková doba snímání série (s)	2119
Frekvence snímání (fps)	0,1925
Počet zpracovaných snímků série	408
Hodnota osy Z (μm)	22512,62
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	18.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	87
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58

Číslo série	3
Datum pořízení série	19.12.2019
Celková doba snímání série (s)	2037
Frekvence snímání (fps)	0,1919
Počet zpracovaných snímků série	391
Hodnota osy Z (μm)	22523,12
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	18.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	87
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58

Číslo série	4
Datum pořízení série	19.12.2019
Celková doba snímání série (s)	1913
Frekvence snímání (fps)	0,1929
Počet zpracovaných snímků série	369
Hodnota osy Z (μm)	22530,78
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	18.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	87
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58

Číslo série	5
Datum pořízení série	19.12.2019
Celková doba snímání série (s)	2017
Frekvence snímání (fps)	0,1899
Počet zpracovaných snímků série	383
Hodnota osy Z (μm)	22535,34
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	18.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	87
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58

Číslo série	6
Datum pořízení série	19.12.2019
Celková doba snímání série (s)	3265
Frekvence snímání (fps)	0,1917
Počet zpracovaných snímků série	626
Hodnota osy Z (μm)	22538,88
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	18.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	87
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58

Číslo série	7
Datum pořízení série	19.12.2019
Celková doba snímání série (s)	2486
Frekvence snímání (fps)	0,1931
Počet zpracovaných snímků série	480
Hodnota osy Z (μm)	22536,82
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	18.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	87
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58

Číslo série	8
Datum pořízení série	19.12.2019
Celková doba snímání série (s)	4026
Frekvence snímání (fps)	0,1888
Počet zpracovaných snímků série	760
Hodnota osy Z (μm)	22566,22
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	18.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	87
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58

Číslo série	9
Datum pořízení série	19.12.2019
Celková doba snímání série (s)	3770

Frekvence snímání (fps)	0,1899
Počet zpracovaných snímků série	716
Hodnota osy Z (μm)	22566,58
Typ snímané buněčné kultury	MG63
Datum přípravy buněčné kultury	18.12.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	87
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,58

9.4. Tabulky informací k snímání provedených na buněčných kulturách HepG2

Číslo série	1
Datum pořízení série	14.3.2019
Celková doba snímání série (s)	22197
Frekvence snímání (fps)	0,0295986
Počet zpracovaných snímků série	657
Hodnota osy Z (μm)	22495,52
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	13.3.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	10
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	1
Datum pořízení série	21.3.2019
Celková doba snímání série (s)	2121
Frekvence snímání (fps)	0,1919
Počet zpracovaných snímků série	407
Hodnota osy Z (μm)	22504,6
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	18.3.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	11
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	2
Datum pořízení série	21.3.2019
Celková doba snímání série (s)	2322
Frekvence snímání (fps)	0,1925
Počet zpracovaných snímků série	447
Hodnota osy Z (μm)	22508,45
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	18.3.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	11
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	3
Datum pořízení série	21.3.2019

Celková doba snímání série (s)	2429
Frekvence snímání (fps)	0,1890
Počet zpracovaných snímků série	459
Hodnota osy Z (μm)	22511,89
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	18.3.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	11
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	Bez pesticidu

Číslo série	1
Datum pořízení série	4.4.2019
Celková doba snímání série (s)	4579
Frekvence snímání (fps)	0,1941
Počet zpracovaných snímků série	889
Hodnota osy Z (μm)	22507,27
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	3.4.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	12
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	Bez pesticidu

Číslo série	2
Datum pořízení série	4.4.2019
Celková doba snímání série (s)	2070
Frekvence snímání (fps)	0,1913
Počet zpracovaných snímků série	396
Hodnota osy Z (μm)	22530,89
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	3.4.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	12
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	Bez pesticidu

Číslo série	3
Datum pořízení série	4.4.2019
Celková doba snímání série (s)	2995
Frekvence snímání (fps)	0,1940
Počet zpracovaných snímků série	581
Hodnota osy Z (μm)	22527,72
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	3.4.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	12
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	Bez pesticidu

Číslo série	4
Datum pořízení série	4.4.2019
Celková doba snímání série (s)	1432
Frekvence snímání (fps)	0,1913
Počet zpracovaných snímků série	274

Hodnota osy Z (μm)	22524,18
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	3.4.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	12
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	5
Datum pořízení série	4.4.2019
Celková doba snímání série (s)	1797
Frekvence snímání (fps)	0,1937
Počet zpracovaných snímků série	348
Hodnota osy Z (μm)	22522,88
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	3.4.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	12
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	6
Datum pořízení série	4.4.2019
Celková doba snímání série (s)	975
Frekvence snímání (fps)	0,1949
Počet zpracovaných snímků série	190
Hodnota osy Z (μm)	22521,56
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	3.4.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	12
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	7
Datum pořízení série	4.4.2019
Celková doba snímání série (s)	1618
Frekvence snímání (fps)	0,1928
Počet zpracovaných snímků série	312
Hodnota osy Z (μm)	22515,83
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	3.4.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	12
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	8
Datum pořízení série	4.4.2019
Celková doba snímání série (s)	1088
Frekvence snímání (fps)	0,1958
Počet zpracovaných snímků série	213
Hodnota osy Z (μm)	22518,47
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	3.4.2019

Číslo pasáže buněčné kultury	12
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	Bez pesticidu

Číslo série	1
Datum pořízení série	11.4.2019
Celková doba snímání série (s)	1927
Frekvence snímání (fps)	0,1941
Počet zpracovaných snímků série	374
Hodnota osy Z (μm)	22471,47
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	10.4.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	13
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	Bez pesticidu

Číslo série	2
Datum pořízení série	11.4.2019
Celková doba snímání série (s)	1621
Frekvence snímání (fps)	0,1894
Počet zpracovaných snímků série	307
Hodnota osy Z (μm)	22473,60
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	10.4.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	13
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	Bez pesticidu

Číslo série	3
Datum pořízení série	11.4.2019
Celková doba snímání série (s)	1727
Frekvence snímání (fps)	0,1934
Počet zpracovaných snímků série	334
Hodnota osy Z (μm)	22475,87
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	10.4.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	13
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	Bez pesticidu

Číslo série	4
Datum pořízení série	11.4.2019
Celková doba snímání série (s)	2143
Frekvence snímání (fps)	0,1946
Počet zpracovaných snímků série	417
Hodnota osy Z (μm)	22477,41
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	10.4.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	13
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	Bez pesticidu

Číslo série	5
Datum pořízení série	11.4.2019
Celková doba snímání série (s)	1857
Frekvence snímání (fps)	0,1971
Počet zpracovaných snímků série	366
Hodnota osy Z (μm)	22475,87
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	10.4.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	13
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	Bez pesticidu

Číslo série	6
Datum pořízení série	11.4.2019
Celková doba snímání série (s)	1492
Frekvence snímání (fps)	0,1917
Počet zpracovaných snímků série	286
Hodnota osy Z (μm)	22473,84
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	10.4.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	13
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	Bez pesticidu

Číslo série	7
Datum pořízení série	11.4.2019
Celková doba snímání série (s)	2166
Frekvence snímání (fps)	0,1939
Počet zpracovaných snímků série	420
Hodnota osy Z (μm)	22471,53
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	10.4.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	13
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	Bez pesticidu

Číslo série	8
Datum pořízení série	11.4.2019
Celková doba snímání série (s)	2533
Frekvence snímání (fps)	0,1927
Počet zpracovaných snímků série	488
Hodnota osy Z (μm)	22469,14
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	10.4.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	13
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	Bez pesticidu

Číslo série	9
Datum pořízení série	11.4.2019
Celková doba snímání série (s)	2269

Frekvence snímání (fps)	0,1917
Počet zpracovaných snímků série	435
Hodnota osy Z (μm)	22466,98
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	10.4.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	13
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Bez pesticidu

Číslo série	1
Datum pořízení série	14.11.2019
Celková doba snímání série (s)	1796
Frekvence snímání (fps)	0,1954
Počet zpracovaných snímků série	351
Hodnota osy Z (μm)	22698,8
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	13.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	9
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,58

Číslo série	2
Datum pořízení série	14.11.2019
Celková doba snímání série (s)	2827
Frekvence snímání (fps)	0,1914
Počet zpracovaných snímků série	541
Hodnota osy Z (μm)	22694,88
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	13.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	9
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,58

Číslo série	3
Datum pořízení série	14.11.2019
Celková doba snímání série (s)	3350
Frekvence snímání (fps)	0,1925
Počet zpracovaných snímků série	645
Hodnota osy Z (μm)	22687,88
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	13.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	9
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,58

Číslo série	4
Datum pořízení série	14.11.2019
Celková doba snímání série (s)	408
Frekvence snímání (fps)	0,1896
Počet zpracovaných snímků série	2152
Hodnota osy Z (μm)	22673,56

Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	13.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	9
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58

Číslo série	5
Datum pořízení série	14.11.2019
Celková doba snímání série (s)	2408
Frekvence snímání (fps)	0,1890
Počet zpracovaných snímků série	455
Hodnota osy Z (μm)	22677,36
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	13.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	9
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58

Číslo série	6
Datum pořízení série	14.11.2019
Celková doba snímání série (s)	2024
Frekvence snímání (fps)	0,1961
Počet zpracovaných snímků série	397
Hodnota osy Z (μm)	22669,1
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	13.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	9
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58

Číslo série	7
Datum pořízení série	14.11.2019
Celková doba snímání série (s)	2090
Frekvence snímání (fps)	0,1895
Počet zpracovaných snímků série	396
Hodnota osy Z (μm)	22659,12
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	13.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	9
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58

Číslo série	8
Datum pořízení série	14.11.2019
Celková doba snímání série (s)	2759
Frekvence snímání (fps)	0,1892
Počet zpracovaných snímků série	524
Hodnota osy Z (μm)	22661,14
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	13.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	9

Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58
--	------

Číslo série	9
Datum pořízení série	14.11.2019
Celková doba snímání série (s)	3279
Frekvence snímání (fps)	0,1906
Počet zpracovaných snímků série	625
Hodnota osy Z (μm)	22654,64
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	13.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	9
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58

Číslo série	1
Datum pořízení série	27.11.2019
Celková doba snímání série (s)	2654
Frekvence snímání (fps)	0,1922
Počet zpracovaných snímků série	510
Hodnota osy Z (μm)	22497,88
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	26.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	13
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,8

Číslo série	2
Datum pořízení série	27.11.2019
Celková doba snímání série (s)	2128
Frekvence snímání (fps)	0,1875
Počet zpracovaných snímků série	399
Hodnota osy Z (μm)	22518,64
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	26.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	13
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,8

Číslo série	3
Datum pořízení série	27.11.2019
Celková doba snímání série (s)	2292
Frekvence snímání (fps)	0,1924
Počet zpracovaných snímků série	441
Hodnota osy Z (μm)	22517,56
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	26.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	13
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,8

Číslo série	4
-------------	---

Datum pořízení série	27.11.2019
Celková doba snímání série (s)	1935
Frekvence snímání (fps)	0,1917
Počet zpracovaných snímků série	371
Hodnota osy Z (μm)	22516,34
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	26.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	13
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,8

Číslo série	5
Datum pořízení série	27.11.2019
Celková doba snímání série (s)	2632
Frekvence snímání (fps)	0,1877
Počet zpracovaných snímků série	494
Hodnota osy Z (μm)	22515,88
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	26.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	13
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,8

Číslo série	6
Datum pořízení série	27.11.2019
Celková doba snímání série (s)	2339
Frekvence snímání (fps)	0,1903
Počet zpracovaných snímků série	445
Hodnota osy Z (μm)	22523,16
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	26.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	13
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,8

Číslo série	7
Datum pořízení série	27.11.2019
Celková doba snímání série (s)	3401
Frekvence snímání (fps)	0,1926
Počet zpracovaných snímků série	655
Hodnota osy Z (μm)	22519,8
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	26.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	13
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,8

Číslo série	8
Datum pořízení série	27.11.2019
Celková doba snímání série (s)	2743
Frekvence snímání (fps)	0,1929

Počet zpracovaných snímků série	529
Hodnota osy Z (μm)	22520,42
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	26.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	13
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8

Číslo série	9
Datum pořízení série	27.11.2019
Celková doba snímání série (s)	3598
Frekvence snímání (fps)	0,1884
Počet zpracovaných snímků série	678
Hodnota osy Z (μm)	22517,82
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	26.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	13
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8

Číslo série	10
Datum pořízení série	27.11.2019
Celková doba snímání série (s)	2895
Frekvence snímání (fps)	0,1914
Počet zpracovaných snímků série	554
Hodnota osy Z (μm)	22517,36
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	26.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	13
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8

Číslo série	11
Datum pořízení série	27.11.2019
Celková doba snímání série (s)	3637
Frekvence snímání (fps)	0,1916
Počet zpracovaných snímků série	697
Hodnota osy Z (μm)	22515,92
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	26.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	13
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,8

Číslo série	1
Datum pořízení série	29.11.2019
Celková doba snímání série (s)	3523
Frekvence snímání (fps)	0,1927
Počet zpracovaných snímků série	679
Hodnota osy Z (μm)	22567,38
Typ snímané buněčné kultury	HepG2

Datum přípravy buněčné kultury	28.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	14
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	2
Datum pořízení série	29.11.2019
Celková doba snímání série (s)	4532
Frekvence snímání (fps)	0,1887
Počet zpracovaných snímků série	855
Hodnota osy Z (μm)	22565,98
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	28.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	14
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	3
Datum pořízení série	29.11.2019
Celková doba snímání série (s)	4150
Frekvence snímání (fps)	0,1899
Počet zpracovaných snímků série	788
Hodnota osy Z (μm)	22567,34
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	28.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	14
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	4
Datum pořízení série	29.11.2019
Celková doba snímání série (s)	2733
Frekvence snímání (fps)	0,1902
Počet zpracovaných snímků série	515
Hodnota osy Z (μm)	22566,14
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	28.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	14
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	5
Datum pořízení série	29.11.2019
Celková doba snímání série (s)	2976
Frekvence snímání (fps)	0,1884
Počet zpracovaných snímků série	566
Hodnota osy Z (μm)	22561,90
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	28.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	14
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	6
Datum pořízení série	29.11.2019
Celková doba snímání série (s)	3059
Frekvence snímání (fps)	0,1906
Počet zpracovaných snímků série	583
Hodnota osy Z (μm)	22561,32
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	28.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	14
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	7
Datum pořízení série	29.11.2019
Celková doba snímání série (s)	3783
Frekvence snímání (fps)	0,1914
Počet zpracovaných snímků série	724
Hodnota osy Z (μm)	22558,14
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	28.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	14
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	8
Datum pořízení série	29.11.2019
Celková doba snímání série (s)	2925
Frekvence snímání (fps)	0,1921
Počet zpracovaných snímků série	562
Hodnota osy Z (μm)	22567,20
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	28.11.2019
Číslo pasáže buněčné kultury	14
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	1
Datum pořízení série	16.1.2020
Celková doba snímání série (s)	2564
Frekvence snímání (fps)	0,1919
Počet zpracovaných snímků série	492
Hodnota osy Z (μm)	22628,86
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	15.1.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	1
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58

Číslo série	2
Datum pořízení série	16.1.2020
Celková doba snímání série (s)	2871

Frekvence snímání (fps)	0,1895
Počet zpracovaných snímků série	544
Hodnota osy Z (μm)	22634,28
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	15.1.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	1
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,58

Číslo série	3
Datum pořízení série	16.1.2020
Celková doba snímání série (s)	3105
Frekvence snímání (fps)	0,1913
Počet zpracovaných snímků série	594
Hodnota osy Z (μm)	22628,9
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	15.1.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	1
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,58

Číslo série	4
Datum pořízení série	16.1.2020
Celková doba snímání série (s)	4569
Frekvence snímání (fps)	0,1906
Počet zpracovaných snímků série	871
Hodnota osy Z (μm)	22625,82
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	15.1.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	1
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,58

Číslo série	5
Datum pořízení série	16.1.2020
Celková doba snímání série (s)	2866
Frekvence snímání (fps)	0,1933
Počet zpracovaných snímků série	554
Hodnota osy Z (μm)	22621,82
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	15.1.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	1
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,58

Číslo série	6
Datum pořízení série	16.1.2020
Celková doba snímání série (s)	3318
Frekvence snímání (fps)	0,1896
Počet zpracovaných snímků série	629
Hodnota osy Z (μm)	22618,28

Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	15.1.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	1
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58

Číslo série	7
Datum pořízení série	16.1.2020
Celková doba snímání série (s)	2954
Frekvence snímání (fps)	0,1889
Počet zpracovaných snímků série	485
Hodnota osy Z (μm)	22615,12
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	15.1.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	1
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58

Číslo série	8
Datum pořízení série	16.1.2020
Celková doba snímání série (s)	2544
Frekvence snímání (fps)	0,1906
Počet zpracovaných snímků série	485
Hodnota osy Z (μm)	22612,58
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	15.1.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	1
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58

Číslo série	9
Datum pořízení série	16.1.2020
Celková doba snímání série (s)	2911
Frekvence snímání (fps)	0,1903
Počet zpracovaných snímků série	554
Hodnota osy Z (μm)	22610,25
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	15.1.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	1
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,58

Číslo série	1
Datum pořízení série	23.1.2020
Celková doba snímání série (s)	2620
Frekvence snímání (fps)	0,1905
Počet zpracovaných snímků série	499
Hodnota osy Z (μm)	22503,56
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	22.1.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	2

Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,8
--	-----

Číslo série	2
Datum pořízení série	23.1.2020
Celková doba snímání série (s)	2511
Frekvence snímání (fps)	0,1892
Počet zpracovaných snímků série	475
Hodnota osy Z (μm)	22506,84
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	22.1.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	2
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,8

Číslo série	3
Datum pořízení série	23.1.2020
Celková doba snímání série (s)	3148
Frekvence snímání (fps)	0,1884
Počet zpracovaných snímků série	593
Hodnota osy Z (μm)	22510,52
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	22.1.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	2
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,8

Číslo série	4
Datum pořízení série	23.1.2020
Celková doba snímání série (s)	2335
Frekvence snímání (fps)	0,1906
Počet zpracovaných snímků série	445
Hodnota osy Z (μm)	22514,94
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	22.1.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	2
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,8

Číslo série	5
Datum pořízení série	23.1.2020
Celková doba snímání série (s)	1871
Frekvence snímání (fps)	0,1919
Počet zpracovaných snímků série	359
Hodnota osy Z (μm)	22517,00
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	22.1.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	2
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,8

Číslo série	6
-------------	---

Datum pořízení série	23.1.2020
Celková doba snímání série (s)	2870
Frekvence snímání (fps)	0,1920
Počet zpracovaných snímků série	551
Hodnota osy Z (μm)	22518,48
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	22.1.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	2
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,8

Číslo série	7
Datum pořízení série	23.1.2020
Celková doba snímání série (s)	1787
Frekvence snímání (fps)	0,1880
Počet zpracovaných snímků série	336
Hodnota osy Z (μm)	22519,04
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	22.1.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	2
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,8

Číslo série	8
Datum pořízení série	23.1.2020
Celková doba snímání série (s)	2195
Frekvence snímání (fps)	0,1891
Počet zpracovaných snímků série	415
Hodnota osy Z (μm)	22520,26
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	22.1.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	2
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	0,8

Číslo série	1
Datum pořízení série	6.2.2020
Celková doba snímání série (s)	1898
Frekvence snímání (fps)	0,1937
Počet zpracovaných snímků série	364
Hodnota osy Z (μm)	22417,80
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	5.2.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	5
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	2
Datum pořízení série	6.2.2020
Celková doba snímání série (s)	1927
Frekvence snímání (fps)	0,1889

Počet zpracovaných snímků série	364
Hodnota osy Z (μm)	22419,56
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	5.2.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	5
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	8

Číslo série	3
Datum pořízení série	6.2.2020
Celková doba snímání série (s)	1921
Frekvence snímání (fps)	0,1
Počet zpracovaných snímků série	371
Hodnota osy Z (μm)	22489,68
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	5.2.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	5
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	8

Číslo série	4
Datum pořízení série	6.2.2020
Celková doba snímání série (s)	3094
Frekvence snímání (fps)	0,1875
Počet zpracovaných snímků série	580
Hodnota osy Z (μm)	22487,82
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	5.2.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	5
Koncentrace terbutilazinu (mg/l)	8

Číslo série	5
Datum pořízení série	6.2.2020
Celková doba snímání série (s)	2810
Frekvence snímání (fps)	0,1904
Počet zpracovaných snímků série	535
Hodnota osy Z (μm)	22493,88
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	5.2.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	5
Koncentrace HTBA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	8

Číslo série	6
Datum pořízení série	6.2.2020
Celková doba snímání série (s)	2826
Frekvence snímání (fps)	0,1929
Počet zpracovaných snímků série	545
Hodnota osy Z (μm)	22489,50
Typ snímané buněčné kultury	HepG2

Datum přípravy buněčné kultury	5.2.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	5
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	7
Datum pořízení série	6.2.2020
Celková doba snímání série (s)	2815
Frekvence snímání (fps)	0,1904
Počet zpracovaných snímků série	536
Hodnota osy Z (μm)	22488,16
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	5.2.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	5
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	8
Datum pořízení série	6.2.2020
Celková doba snímání série (s)	3222
Frekvence snímání (fps)	0,1899
Počet zpracovaných snímků série	612
Hodnota osy Z (μm)	22488,26
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	5.2.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	5
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

Číslo série	9
Datum pořízení série	6.2.2020
Celková doba snímání série (s)	2785
Frekvence snímání (fps)	0,1928
Počet zpracovaných snímků série	537
Hodnota osy Z (μm)	22488,20
Typ snímané buněčné kultury	HepG2
Datum přípravy buněčné kultury	5.2.2020
Číslo pasáže buněčné kultury	5
Koncentrace HTBA (mg·l ⁻¹)	8

10. Abstrakt

V rámci této bakalářské práce byl zkoumán vliv terbuthylazinu-2-hydroxy (HTBA) na lidské buněčné kultury HepG2 a MG63 formou akutních testů toxicity *in vitro*, a to v koncentracích 0; 0,58; 0,8 a 8 mg·l⁻¹. Experiment byl rozdělen do dvou částí. V první části byla zkoumána celková biologická aktivita (mortalita, specifická rychlost růstu, dilatace – aktivita cytoskeletu) pomocí mikroskopického zařízení Nikon Biostation IM-Q. Vyhodnocení získaných snímků proběhlo vizuálně, kdy nebyl jednoznačně potvrzen zásadní vliv HTBA. V druhé části experimentu, prováděném na vysokorozlišném světelném mikroskopu NanoTruth, byla vyhodnocena data odpovídající koncentraci 8 mg·l⁻¹ HTBA a data z kontrolního experimentu bez přidaného HTBA testované na buněčné kultuře HepG2. Vyhodnocení získaných obrazových dat proběhlo matematicky, metodou optického toku. Z výsledných hodnot optického toku byla zjištěna nižší vnitrobuněčná dynamika u exponovaného vzorku než u vzorku bez přítomnosti HTBA. To naznačuje možný negativní vliv HTBA na testovanou buněčnou kulturu.

Klíčová slova: buňka, mikroskopie, terbuthylazin-2-hydroxy, toxikologie, vnitrobuněčná dynamika, optický tok

11. Abstract

The effect of terbutylazine-2-hydroxy (HTBA) on human cell cultures of HepG2 and MG63 in the form of acute in vitro toxicity tests was investigated at concentrations of 0; 0.58; 0.8; and 8 mg·l⁻¹. The experiment has two parts. In the first part was examined overall biological activity (mortality, specific growth rate, dilation - cytoskeletal activity) using a Nikon Biostation IM-Q microscopic device. The evaluation of the acquired images took place visually and the significant effect of HTBA was not confirmed. In the second part of the experiment, performed on a high-resolution NanoTruth light microscope, data corresponding to a concentration of 8 mg·l⁻¹ HTBA and data from a control experiment without added HTBA tested on HepG2 cell culture were evaluated. The evaluation of the obtained image data was performed mathematically, using the optical flow method. From the resulting values of optical flow, a lower intracellular dynamics was found in the exposed sample than in the sample without the presence of HTBA. This suggests a possible negative effect of HTBA on the cell culture tested.

Key words: cell, microscopy, terbutylazine-2-hydroxy, toxicology, intracellular dynamics, optical flow