

Univerzita Pardubice,
Fakulta chemicko-technologická

In-vitro testy genotoxického účinku nanomateriálů

Daniel Heblík

Bakalářská práce

2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Daniel Heblík**
Osobní číslo: **C15209**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **In-vitro testy genotoxického účinku nanomateriálů**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Popište základní biochemické mechanismy genotoxického účinku nanočástic. Diskutujte, zda existují mechanismy, které se v případě nanočástic uplatňují výrazněji, než v případě genotoxických látek dobře rozpustných v biologických tekutinách. Definujte nejdůležitější parametry nanočástic, které klíčovým způsobem ovlivňují jejich genotoxický účinek.
2. Vypracujte přehled in-vitro technik, které se nejčastěji využívají ke studiu genotoxických účinků nanočástic a stručně popište jejich fyzikálně-chemické principy. Uveďte přednosti a nevýhody jednotlivých technik a diskutujte specifické okolnosti, které je třeba brát v úvahu právě při studiu genotoxicity nanočástic.
3. Vysvětlete, jaké základní součásti by měla zahrnovat prakticky využitelná strategie testování genotoxicity nanočástic, a definujte úlohu in-vitro technik v rámci této strategie.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Miloslav Pouzar, Ph.D.

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

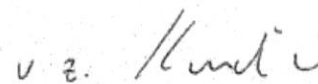
Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

PROHLÁŠENÍ

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jiné mu subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 23. června 2018

Daniel Heblík

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce doc. Ing. Miloslavu Pouzarovi, Ph.D. za cenné připomínky a odborné rady, kterými přispěl k vypracování této práce. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Elišce Konopáčové a Ing. Kateřině Hrdé za pomoc s praktickou částí mé bakalářské práce a mé rodině a přátelům za podporu během studia.

ANOTACE

Tato práce pojednává o problematice genotoxicity nanočástic. Práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část. V teoretické části jsou představeny pojmy nanočástice a nanomateriál, popsány mechanismy genotoxického účinku nanočástic, základní fyzikálně-chemické vlastnosti a parametry nanočástic a analytického prostředí, jež ovlivňují genotoxický potenciál nanočástic, v současnosti používané *in vitro* metody studia genotoxicity a strategie testování genotoxicity nanočástic. V praktické části je pak popsáno stanovení oxidačního stresu na modelovém organismu po expozici ZnO nanočásticím.

KLÍČOVÁ SLOVA

nanotoxikologie, nanočástice a nanomateriál, genotoxicita, mechanismy genotoxicity, vlastnosti nanočástic, *in vitro* testy, testovací strategie

TITLE

In-vitro tests of genotoxicity of nanomaterials

ANNOTATION

This work deals with issue of genotoxicity of nanoparticles. The thesis is divided into theoretical and practical part. In the theoretical part are introduced the terms nanoparticles and nanomaterials, described the mechanisms of genotoxic effect of nanoparticles, the basic physico-chemical properties and parameters of nanoparticles and analytical environment that influence the genotoxic potential of nanoparticles, currently used *in vitro* methods of genotoxicity studies and testing strategies of genotoxicity of nanoparticles. In the practical part is described the determination of oxidative stress in the model organism after exposure to ZnO nanoparticles.

KEYWORDS

nanotoxicology, nanoparticles and nanomaterials, genotoxicity, genotoxicity mechanisms, properties of nanoparticle, *in vitro* tests, testing strategies

OBSAH

ÚVOD.....	14
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	15
1.1 NANOČÁSTICE.....	15
1.2 MECHANISMY GENOTOXICKÉHO ÚČINKU NANOČÁSTIC	16
1.2.1 Genotoxicita nanočástic	16
1.2.1.1 Přímé primární mechanismy genotoxického účinku	17
1.2.1.2 Nepřímé primární mechanismy genotoxického účinku.....	18
1.2.1.3 Sekundární mechanismy genotoxického účinku	19
1.2.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti ovlivňující genotoxicitu nanomateriálů	21
1.2.2.1 Velikost a tvar nanočástic.....	21
1.2.2.2 Povrchový náboj.....	22
1.2.2.3 Další fyzikálně-chemické vlastnosti.....	23
1.2.3 Podmínky ovlivňující výsledky studií genotoxicity	24
1.2.3.1 Způsob syntézy NPs	24
1.2.3.2 Typ použitého média a jeho složení	25
1.2.3.3 Stabilizace NPs.....	25
1.2.3.4 Koncentrace testovaných NPs a doba expozice	26
1.2.3.5 Typ testu a experimentální podmínky	27
1.2.3.6 Typ buněčné linie využité pro testování.....	28
1.3 V SOUČASNOSTI POUŽÍVANÉ IN VITRO METODY STUDIA GENOTOXICITY NPS	29
1.3.1 Testy buněčné životaschopnosti.....	29
1.3.1.1 Testy proliferace buňky	29
1.3.1.2 Testy nekrózy	32
1.3.1.3 Testy apoptózy	32
1.3.2 Testy genotoxického mechanismu	34

1.3.2.1	Testy poškození DNA	34
1.3.2.2	Testy oxidativního stresu.....	37
1.3.3	Testy buněčného vychytávání a dalších charakteristik NPs.....	41
1.4	STRATEGIE TESTOVÁNÍ GENOTOXICITY NANOČÁSTIC	42
1.4.1	Výhody a nevýhody testů in vitro	42
1.4.2	Základní součásti prakticky využitelné strategie testování	43
1.4.3	Doporučené postupy strategie in vitro testování	44
1.4.3.1	Doporučení před testováním	44
1.4.3.2	Doporučený postup samotného testování	47
2	PRAKTICKÁ ČÁST	48
2.1	PŘÍPRAVA AGARÓZOVÉHO GELU S PŘÍDAVKEM ZN NPS	48
2.2	ÚPRAVA MODELOVÉHO ORGANISMU PŘED TESTOVÁNÍM.....	48
2.3	BIOCHEMICKÉ TESTY.....	49
2.3.1	Stanovení celkového proteinu	49
2.3.2	Stanovení celkového glutathionu	51
2.3.3	Stanovení lipidové peroxidace	54
2.4	VÝSLEDKY A HODNOCENÍ.....	58
2.4.1	Stanovení celkového glutathionu	58
2.4.2	Stanovení lipidové peroxidace	59
2.5	ZÁVĚR	60
3	POUŽITÁ LITERATURA.....	61

SEZNAM ZKRATEK

AB	Alamar Blue – Alamarová modř
AFM	Atomic Force Microscopy – Mikroskopie atomárních sil
BrdU	5-brom-2-deoxyuridin
BSO	Buthionine sulfoximine
CAD	Caspase-activated DNase – Kaspázou aktivovaná DNáza
CdK	Cyklin-dependentní Kináza
CNTs	Carbon Nanotubes – Uhlíkové nanotrubičky
DCFH-DA	2,7-dichlorfluorescein diacetát
DEPMPO	5-(diethoxyfosforyl)-5-methyl-1-pyrrolin-N-oxid
DEVD	Peptid s pořadím aminokyselin: kyselina aspargová, kyselina glutamová, valin a kyselina aspargová
DIC	Differential Interference Contrast – Diferenciální interferenční kontrast
DLS	Dynamic Light Scattering – Dynamický rozptyl světla
DLS	Dynamic Light Scattering – Dynamický rozptyl světla
DMF	Dimethylformamide
DMPO	5,5'-dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid
DTNB	5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoová kyselina
ENMs	Engineered Nanomaterials – Průmyslově vyráběné nanomateriály
ENPs	Engineered Nanoparticles – Průmyslově vyráběné nanočástice
EPR	Electron Paramagnetic Resonance – Elektronová paramagnetická rezonance
FITC	Fluorescein isothiokyanát
FPG	Formamidopyrimidin DNA glykosyláza
FS	Fluorescence Spectroscopy – Fluorescenční spektroskopie
FTIR	Fourier Transformation Infrared Spectroscopy – Infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPRT	Hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza

ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry – Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
INT	2-p-jodfenyl-3-p-nitrofenyl-5-fenyltetrazolium chloride
MRI	Magnetic Resonance Imaging – Magnetické rezonance
MRI	Magnetic Resonance Imaging – Magnetická rezonance
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NBT	Nitro Blue Tetrazolium chlorid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance – Nukleární magnetická rezonance
NR	Neutral Red – Neutrální červeň
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development – Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
PANAM	Polyamidaminy
PBN	N-terc-butyl-fenylnitron
PBS	Phosphate Buffered Saline – Fosfátový pufr
PI	Propidium-Iodid
PLGA	Polylactic-co-glycolic acid – Kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny glykolové
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship – Kvantitativní vztah struktury a aktivity látky
RH-123	Rhodamin-123
RNS	Reactive Nitrogen Species – Reaktivní sloučeniny dusíku
ROS	Reactive Oxygen Species – Reaktivní sloučeniny kyslíku
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RS	Reactive Species – Reaktivní sloučeniny
SANS	Small-Angle Neutron Scattering – Maloúhlový rozptyl neutronů
SCGE	Single Cell Gel Electrophoresis – Jednobuněčná gelová elektroforéza
SEM-EDS	Scanning Electron Microscopy-Electron Dispersion Spectrometry – Skenovací elektronový mikroskop v kombinaci s elektronově disperzním spektrometrem
SLS	Static Light Scattering – Statický rozptyl světla
SOD	Superoxiddismutáza
STM	Scanning Tunneling Microscope – Skenovací tunelová mikroskopie
TB	Trypan Blue – Trypanová modř
TEM	Transmission Electron Microscopy – Transmisní elektronová mikroskopie
TEMP	2,2,6,6-tetramethylpiperidin

TEMPONE-H	1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxopiperidin
WST-1	Sodium-4-[2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)tetrazol-2-ium-5-yl]benzene-1,3-disulfonate
XRD	X-Ray Diffraction – Rentgenová difrakce
XRF	X-ray Fluorescence – Rentgenová fluorescenční spektroskopie
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilide

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1- Porovnání velikostí NPs s mikroskopickými a makroskopickými objekty.....	15
Obrázek 2 – Mechanismy primární genotoxicity vyvolané NPs.....	17
Obrázek 3 - Mechanismy primární nepřímé a sekundární genotoxicity vyvolané NPs.....	20
Obrázek 4 - Viabilita Jurkatových buněk v závislosti na koncentraci Ag NPs.....	26
Obrázek 5 - Životaschopnost buněk HBEC po expozici Ag (A), Au (B) a Pt NPs (C).....	31
Obrázek 6 - Aktivita kaspázy-3 (Jurkatovy buňky) v závislosti na koncentraci Ag NPs	33
Obrázek 7- Buňka bez poškození DNA (vlevo) a buňka s poškozenou DNA (vpravo) obarvené akridinovou oranží po elektroforéze	35
Obrázek 8 - Dvoujádrová a monojádrové buňky bez mikrojader (A) a dvoujádrové buňky s mikrojádry (B) obarvené dle Giemsy	36
Obrázek 9 – Produkty lipidové peroxidace	39
Obrázek 10 - Přístupy k testování toxicity nanomateriálů	43
Tabulka 1 - Shrnutí NPs indukujících ROS v deseti rozdílných buněčných liniích	28
Tabulka 2 - Reprezentativní buněčné linie využitelné pro analýzu toxického potenciálu NPs dle NanoTESTu	46
Tabulka 3 - Počet přeživších roupic vystavených daným koncentracím Zn NPs	48
Tabulka 4 - Příprava roztoků kalibrační řady BSA (celkový protein)	49
Tabulka 5 - Hodnoty absorbance roztoků kalibrační řady BSA (celkový protein).....	50
Tabulka 6 - Hodnoty absorbance vzorků (celkový protein).....	50
Tabulka 7 – Příprava roztoků kalibrační řady GSH (celkový GSH).....	51
Tabulka 8 - Hodnoty absorbance roztoků kalibrační řady GSH (celkový GSH).....	52
Tabulka 9 - Hodnoty změny absorbance vzorků za minutu (celkový GSH).....	53
Tabulka 10 - Příprava roztoků kalibrační řady MDA (lipidová peroxidace).....	54
Tabulka 11 - Hodnoty absorbance roztoků kalibrační řady adduktu TBA-MDA (lipidová peroxidace)	55
Tabulka 12 - Hodnoty absorbance vzorků (lipidová peroxidace).....	55

Tabulka 13 - Hodnoty korigované absorbance roztoků kalibrační řady adduktu TBA-MDA (lipidová peroxidace).....	57
Tabulka 14 - Hodnoty korigované absorbance vzorků (lipidová peroxidace)	57
Graf 1 - Kalibrační řada BSA (celkový protein)	50
Graf 2 - Kalibrační řada GSH (celkový GSH)	53
Graf 3 - Kalibrační řada adduktu TBA-MDA (532 nm) (lipidová peroxidace).....	56
Graf 4 - Kalibrační řada adduktu TBA-MDA (Allenova korekce) (lipidová peroxidace).....	57
Graf 5 - Koncentrace GSH v závislosti na koncentraci Zn NPs	58
Graf 6 - Koncentrace MDA v závislosti na koncentraci Zn NPs	59

ÚVOD

V dnešní době nacházejí nanomateriály a nanočástice uplatnění v celé řadě aplikačních oblastí (ve zdravotnictví, strojírenství, vojenském, automobilovém či kosmickém průmyslu, elektronice a mnoha dalších). S rostoucím využitím těchto částic vzrůstají rovněž i rizika poškození zdraví. Dnes už jsou známy základní principy mechanismů genotoxického účinku a existuje mnoho studií popisujících toxické účinky konkrétních nanočástic na lidské zdraví. Tyto studie jsou však nesourodé, především kvůli rozmanitosti fyzikálně-chemických vlastností nanočástic, jako je velikost, jejich povrchová plocha a další, jež ovlivňují úroveň toxicity, ale i rozdílným parametřům prostředí, v němž je testování prováděno.

Nedostatkem těchto studií je i volba správné metody testování. V současnosti je především snaha co nejvíce zjednodušit a zefektivnit testování genotoxického potenciálu a vyhnout se etickým problémům vzniklým při použití zvířecích modelů. Baterie *in vivo* testů se tedy doplňuje o testy *in vitro*. Tyto testy však mají omezené možnosti při stanovení toxikokinetických dějů ve srovnání s *in vivo* testy.

Pomocí doporučení, jež označujeme jako strategie testování, lze popsané problémy eliminovat. Řada autorů se snaží přijít s dalšími doporučeními, jimiž by zaručila jednotnost při posouzení výsledků jednotlivých testů. Kompletní testovací strategie použitelná pro všechny známé typy nanomateriálů však dosud nebyla zformulována.

Cílem této práce je tedy obecný popis a shrnutí dosud známých mechanismů genotoxického účinku a nejdůležitějších fyzikálně-chemických vlastností nanočástic a parametrů prostředí ovlivňujících míru genotoxického efektu nanočástic, aktuálních *in vitro* postupů testování a samotných *in vitro* testů při studiu nanočástic s tímto účinkem a doporučení pro prakticky využitelnou strategii testování genotoxicity.

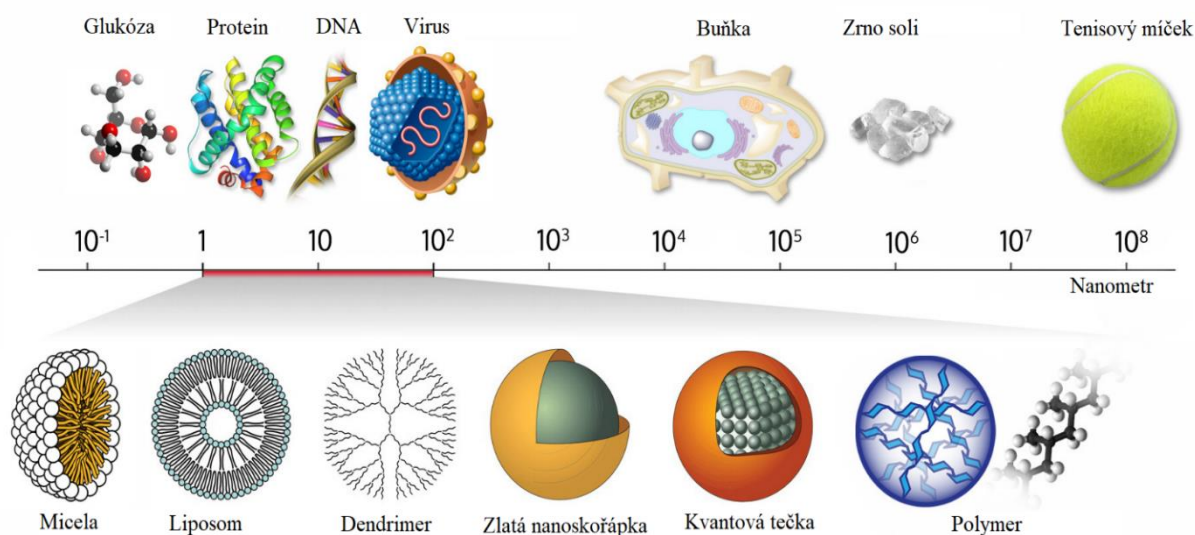
1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Nanočástice

Definice nanomateriálů (NMs) obecně říkají, že jde o hmotné útvary, jejichž rozměry (jeden, ale i více) se pohybují v řádech 1–100 nanometrů ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{ m}$). Nanočástice (NPs) mají pak všechny tři rozměry v uvedeném rozmezí. ^[1] Dalším strukturálním parametrem, který je společný pro všechny NPs je výjimečně velká hodnota měrného povrchu (povrch/hmotnost). Tento parametr zajišťuje vysokou reaktivitu těchto částic. Další, ať už strukturální parametry či fyzikálně-chemické vlastnosti, které by byly společné všem NMs či NPs nejsou známy. U většiny NMs však najdeme polovodičovou strukturu, pro níž jsou charakteristické následující vlastnosti: změna elektrické vodivosti v závislosti na teplotě, fotovodivost, generování a rekombinace nosičů náboje a další. ^{[2]; [3]}

Nanočástice se dělí podle mnoha kritérií. Na základě původu je dělíme na přírodní a průmyslově vyráběné (ENPs). NPs lze dále dělit na základě fyzikálně-chemických, ale i biologických vlastností (dělení dle chemické povahy, struktury, velikosti, biologické aktivity a dalších), příp. na základě oblastí jejich použití. ^[1]

Některé NPs mohou mít toxický účinek díky vlastnostem, kvůli kterým jsou v daném oboru využívány. ^[4] U některých typů NPs jsou toxické účinky již prokázány, avšak dané NPs jsou stále využívány. Příkladem jsou nanočástice stříbra (Ag NPs), které se využívají kvůli antibakteriálnímu účinku, ačkoliv byl prokázán jejich cytotoxický efekt (zvýšení hladiny ROS a rozrušení mitochondriální membrány), který má za následek apoptózu buněk. ^{[5]; [17]}



Obrázek 1- Porovnání velikostí NPs s mikroskopickými a makroskopickými objekty (přeloženo, upraveno) ^[27]

Přestože existuje řada *in vivo* a *in vitro* modelů a metod pro studium toxicity, neexistuje žádný univerzální postup či metoda, jež lze využít pro všechny NPs. Díky velkému spektru vlastností může být odlišný i mechanismus toxického účinku NPs. Právě z tohoto důvodu existuje mnoho testů, jejichž koncové body se liší a odhalují tak rozdílné mechanismy působení (např. Amesův test slouží k průkazu mutací genů a EPR spektroskopie, kterou lze prokázat přítomnost superoxidových radikálů) ^{[1]; [4]}

1.2 Mechanismy genotoxického účinku nanočástic

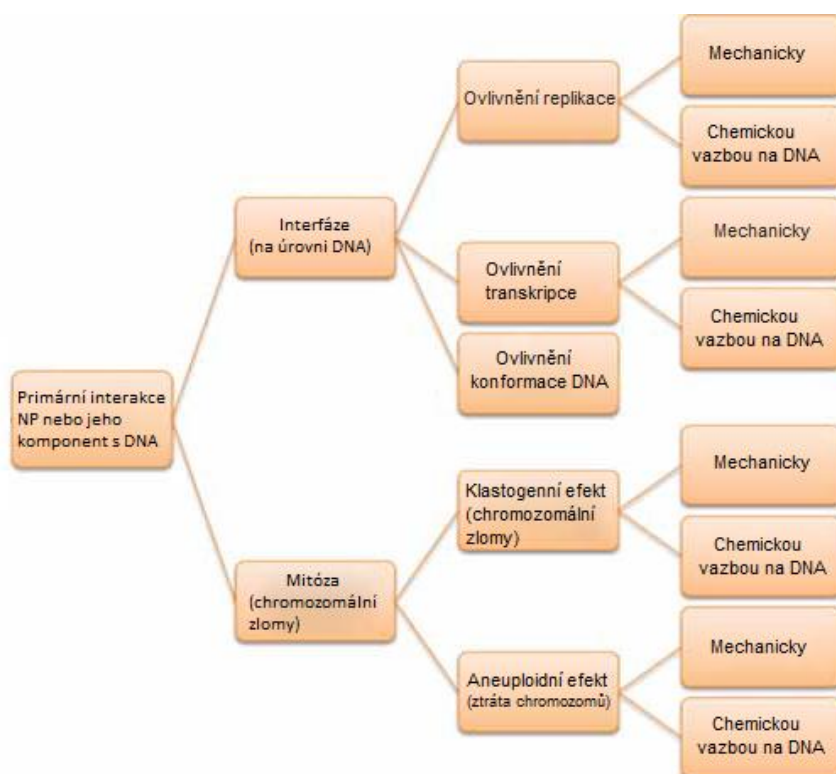
1.2.1 Genotoxicita nanočástic

I přes velké množství metod sloužících ke studiu působení NMs a NPs na lidský organismus, existují některá poškození buněk, jejichž mechanismus vzniku není přesně znám. ^[4] K základním mechanismům genotoxického účinku NPs patří jejich přímá interakce s genetickým materiálem a jeho ovlivnění, nebo poškození DNA v důsledku tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS), případně dusíku (RNS). ^[8] ROS způsobují oxidaci purinových či pyrimidinových bází a následné zlomy či rozštěpy DNA. Dojít může i k tvorbě aduktů těchto radikálů s DNA/RNA, nebo k jiným strukturálním změnám v ribonukleové kyselině. Nejčastějším efektem je však oxidace DNA, konkrétně purinových bází, přičemž častěji dochází k oxidaci guaninu na 8-oxoguanin. Tato oxidovaná forma se nejen hůře páruje s thyminem během replikace, ale je i vysoce mutagenní, a tedy potenciálně karcinogenní.

Některé nanočástice mohou dokonce deformovat jádro, což může nepříznivě ovlivnit proces mitózy, fyzicky bránit správnému oddělení chromozómů, či mechanicky poškodit chromozomy. ^[4]

1.2.1.1 Přímé primární mechanismy genotoxického účinku

Jak je popsáno v kapitole 1.2.2.1, některé (především menší) NPs pronikají přímo do jádra buněk, kde mohou interagovat přímo s molekulou DNA a později ovlivnit transkripci genetické informace z DNA do RNA. Na tomto principu jsou založeny přímé primární mechanismy účinku NMs. K interakci s DNA, resp. chromozómy, může docházet i během mitózy, kdy je DNA náchylnější k poškození a NPs snadněji vnikají do nitra buněk. [8] Tímto působením může docházet nejen ke změně struktury chromozomů (klastogenní efekt), ale i vynechání celého chromozomu během replikace DNA (aneuploidní efekt). Byl zaznamenán i vznik chemické vazby mezi NPs, případně jejichmi povrchovými adukty a chromozomy. [4]



Obrázek 2 – Mechanismy primární genotoxicity vyvolané NPs (přeloženo, upraveno) [4]

1.2.1.2 Nepřímé primární mechanismy genotoxického účinku

V případě uplatnění nepřímých primárních mechanismů je genetická informace poškozena v důsledku interakce NPs s některými jadernými proteiny (uplatňující se při replikaci, či transkripci). Dochází ke změně struktury těchto proteinů a jejich následné inaktivaci. Při styku NPs s mitotickým vřeténkem, centriolou nebo jeho asociovanými proteiny dochází k poškození samotných chromozomů během mitózy (klastogenní nebo aneuploidní efekt). Ovlivněny mohou být i cyklin-dependentní kinázy (CdK), tvořící komplexy s cykliny. Tyto komplexy katalyzují fosforylaci bílkovinných substrátů, čímž dochází k jejich enzymatické aktivaci a k interakci s jinými proteiny v tzv. kontrolních bodech buněčného cyklu a umožňují tak buňce přechod do další fáze cyklu. Jsou-li CdK či cykliny poškozeny dochází k narušení přechodu buňky do další fáze cyklu. Mezi hlavní regulační komplexy patří cyklin E-CdK2, který reguluje vstup buňky do S fáze nebo cyklin B-CdK1, který reguluje vstup dané buňky do mitózy. [4]

Při studiích s nanočásticemi větších rozměrů bylo zjištěno oxidační poškození DNA, či jiné typy genotoxického efektu, a to i přes omezení vstupu těchto částic do jádra buňky. To vedlo k dalším studiím, které prokázaly, že NPs mohou poškozovat i buněčné struktury, které byly dříve považovány za nepodstatné z hlediska genotoxického efektu. Příkladem těchto struktur jsou mitochondrie, jejichž funkci mohou NPs do nich vstupující také ovlivnit. [3] V mitochondriích pak v důsledku narušení mitochondriálního respiračního řetězce dochází k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), případně k inhibici syntézy ATP. To ale není jediný efekt. V zasažených organelách, případně i v cytoplazmě buněk může docházet k uvolňování iontů, převážně přechodných kovů (Fe^{2+} , Ag^+ , Cu^+ , Mn^{2+} , Cr^{5+} a Ni^{2+}), ale i jiných specifických skupin z rozpustných NPs (jako je peroxynitrit, produkty homolytického rozkladu lipidových hyperperoxidů atd.). Tyto ionty ovlivňují danou buněčnou strukturu nebo pronikají do jádra zcela samostatně a následně vytváří adukty s DNA, případně mohou také přispívat k produkci intracelulárních ROS/RNS prostřednictvím tzv. Fentonovy reakce:



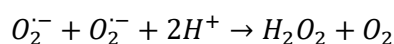
Tento typ reakce patří k nejčastějším způsobům vzniku volných radikálů, mluvíme-li o nepřímých mechanismech genotoxického účinku. [3]; [4]

Za primární nepřímý mechanismus lze rovněž považovat inaktivaci specifických proteinů opravujících poškozenou DNA, která byla prokázána především při působení ENPs kovového charakteru. Vyskytují-li se mutace v oblastech DNA kódujících proteiny, mohou se objevit chyby v expresi genů a tím dochází k tvorbě defektních proteinů, příp. k tvorbě proteinů vůbec nedochází. Mutace ale nevznikají pouze v těchto sekvencích. Akumulace mutací v celé šíři DNA může mít za následek apoptózu nebo buněčnou transformaci. Funkce opravného mechanismu však nemusí být narušena. DNA může být poškozena prostřednictvím jiného genotoxického mechanismu, přičemž funkční opravný systém buňky není schopen toto poškození již opravit. Poškození DNA totiž může být natolik rozsáhlé, že tento mechanismus není dostatečně účinný, aby došlo k opravě všech částí poškozené DNA. [3]; [4]

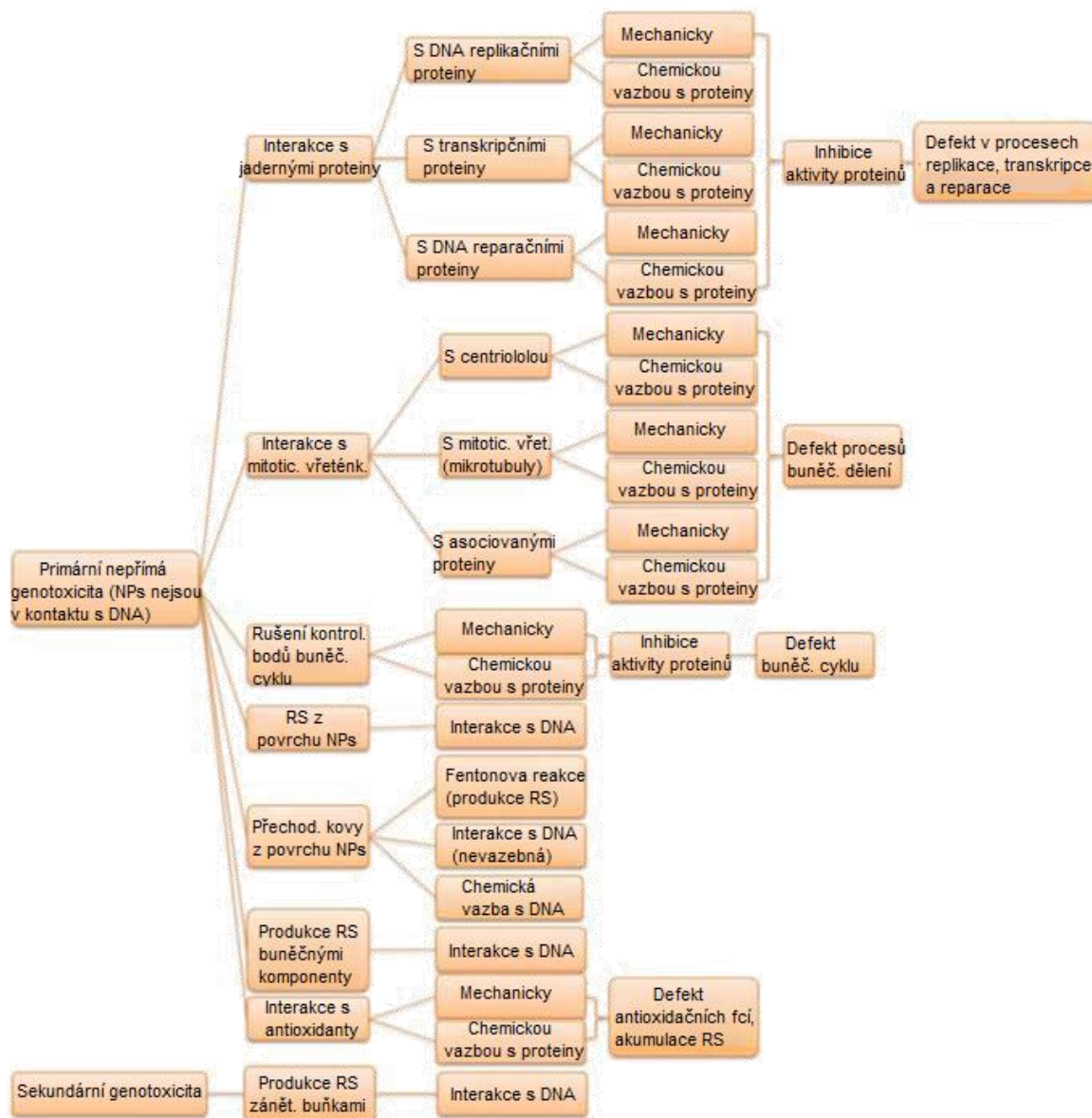
1.2.1.3 Sekundární mechanismy genotoxického účinku

Narušení oxidační rovnováhy buněk, nebo-li oxidační stres, vede k produkci ROS (superoxidu, hydroxylového radikálu, peroxyradikálu a peroxidu vodíku), případně RNS (oxidu dusnatého, peroxyinitritového aniontu, kyseliny peroxyinitrové a nitrosoperoxykarbonátového aniontu). V určité koncentraci jsou tyto látky tělu prospěšné, protože hrají důležitou roli v rámci různých typů buněčných signálních systémů a při indukci mitogenních reakcí. V případě nadbytku je ale jejich vliv na buňky negativní. Nadbytečné množství a akumulace reaktivních sloučenin (RS) může způsobovat poškození buněčného vývoje a funkce, oxidaci proteinů, narušení řetězce DNA (poškození chromozomální struktury – delece, duplikace, inverze či translokace nebo změny v počtu chromozomů) a jiné poškození, které vede až buněčné smrti. RS jsou spojeny i s několika degenerativními onemocněními. Za fyziologického stavu dochází k redukci volných radikálů pomocí antioxidantů či antioxidačních enzymů. NPs však mohou způsobovat inaktivaci, či inhibici tvorby těchto látek bílkovinné povahy, např. glutathionu (GSH), superoxiddismutázy (SOD), aj. Neschopnost redukce reaktivních látek způsobí jejich nadměrnou akumulaci, a tím se zvýší potenciál genotoxického efektu. [2]; [4]

Za normálních fyziologických podmínek jsou ROS produkovány i aktivovanými fagocyty (makrofágy a neutrofilly). Zvýšená aktivita těchto buněk, resp. enzymu NADPH-oxidázy, jež tyto buňky obsahují, vede k nárůstu buněčné spotřeby kyslíku a k následnému uvolnění oxidantů, jako jsou $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (ROS):



Tyto reaktivní sloučeniny reagují s dalšími látkami, které jsou uvolňovány fagocyty při zánětu (hlavně myeloperoxidázou (MPO), oxidem dusnatým, aj.). Popsaná řetězová reakce má za následek tvorbu dalších ROS a RNS. Jak již bylo řečeno, jedná se v určitém slova smyslu o „fyziologický stav“. Je-li v těle zánět či je aktivován imunitní systém z jiného důvodu, dochází právě k sledu těchto reakcí za vzniku ROS/RNS jako obranného mechanismu. Vlivem RS mimo jiné dochází k poškození okolních buněk a jejich genetické informace, což je jeden z nejdůležitějších sekundárních mechanismů genotoxicity. [3]; [8]



Obrázek 3 - Mechanismy primární nepřímé a sekundární genotoxicity vyvolané NPs (přeloženo, upraveno) [4]

1.2.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti ovlivňující genotoxicitu nanomateriálů

Mechanismy genotoxicity mohou být ovlivněny celou řadou parametrů daných NPs. Některé fyzikálně-chemické vlastnosti NPs se mění v závislosti na fyzikálně-chemických parametrech prostředí, v němž jsou tyto částice dispergovány (působení světla, pH prostředí atd.).^[4] K vlastnostem, které nejvíce ovlivňují genotoxicitu NPs patří velikost a plocha povrchu dané nanočástice, její tvar, náboj a stupeň agregace či aglomerace.^[6]

1.2.2.1 Velikost a tvar nanočástic

Velikost je velmi důležitý, dokonce lze říci nejdůležitější, parametr ovlivňující genotoxicitu NPs. Stejně typy částic lišící se svou velikostí mají velmi často rozdílnou úroveň toxicity. V zásadě platí, že čím menší částice, tím je genotoxický účinek silnější. Toto tvrzení dokládá Gurr (2005) ve studii zabývající se genotoxickým potenciálem NPs TiO₂ o různých velikostech (konkrétně 10, 20 a 200 nm). Částice o menší velikosti (10 a 20 nm) vyvolávaly vyšší míru poškození DNA způsobenou oxidativním stresem, než částice větší (200 nm).^{[4], [33]} Velikost souvisí i s povrchem NPs. Čím menší totiž částice je, tím větší je její měrný povrch a dochází tak ke zvýšení reaktivity této částice.^{[5]; [6]} Poland (2008) zjistil, že vícečetné uhlíkové nanotrubic (MWCNTs) mající stejný tvar a velikost jako nanovlákná azbestu způsobily stejné poškození v abdominální dutině myši jako zmíněná nanovlákná. Tato studie tedy potvrzuje, že částice podobné svou velikostí a tvarem vykazují podobné genotoxické účinky, i přes lišící se chemické složení.^{[4], [34]}

Velikost NPs ovlivňuje především jejich průnik do buňky, resp. do jádra (příp. i mitochondrie) dané buňky. Menší nanočástice prochází do jádra, příp. mitochondrie, prostřednictvím difúze přes jadernou (příp. mitochondriální) membránu nebo skrze jaderné póry, kdežto větší NPs přes jaderné póry neprojdou.^{[2]; [4]} Tato skutečnost má za následek i změnu mechanismu genotoxického účinku NPs. Mechanismus genotoxického účinku menších NPs je tedy zpravidla přímý primární, kdežto poškození způsobené většími částicemi tohoto typu je založeno na nepřímém primárním, popř. sekundárním mechanismu. Zjištěna byla i závislost mezi velikostí a farmakokinetikou NPs. Menší nanočástice (<50 nm) jsou krevním řečištěm velmi rychle a snadno transportovány do určitých tkání a snadno difundují do okolí, kdežto větší nanočástice (v rozmezí 100–200 nm) jsou převážně vychytávány retikuloendoteliálním systémem (RES). NPs s velikostí přesahující 500 nm nejsou schopny procházet skrze buněčnou membránu ani do cytoplasmy buněk.^[4] Při vystavení větším NPs dochází tedy převážně k poškození buněk RES. Velikost NPs tedy ovlivňuje nejen průnik skrze buněčné membrány ale i jejich celkovou farmakokinetiku.^{[5]; [6]}

Velikost (resp. celková plocha povrchu) NPs také ovlivňuje produkci tzv. volných radikálů (převážně ROS), na čemž je založen nepřímý primární mechanismus genotoxicity. Tyto reaktivní sloučeniny kyslíku pak ochotně reagují převážně s genetickým materiálem buněk a způsobují narušení či změnu struktury nukleových kyselin.

Další vlastností ovlivňující genotoxicitu je tvar. Tvarem je ovlivněna především rychlost vstupu NPs do buňky skrze membránu. U některých tvarů může dojít k upřednostnění při endocytóze či fagocytóze buňkou. Například sférické částice prochází skrze membránu buňky daleko snadněji než NPs vláknitého tvaru. ^[2] Jedná-li se o radikální rozdíly ve tvaru, může docházet k rozdílné úrovni toxicity (částice se může stát i netoxickou). Příkladem je krystalický oxid křemičitý, který je prokazatelný lidský karcinogen, ale jeho amorfní forma je používána jako potravinářská přísada. Nejdůležitější charakteristikou je v tomto případě poměr stran. Čím vyšší tento poměr je, tím je toxicita dané částice vyšší. ^[6]

Při změně velikosti dochází často i k změnám dalších důležitých vlastností částic (vodivost, magnetické vlastnosti, reaktivita, biologická aktivita, aj.), což může mít vliv i na genotoxicitu NPs. ^[4]

1.2.2.2 Povrchový náboj

Genotoxicita NPs je podmíněna i povrchovým nábojem. Selektivní adsorpce, koloidní chování, vazba na plazmatické proteiny nebo membránová propustnost jsou interakce, které jsou ovlivněny právě povrchovým nábojem. Přičemž NPs s kladným povrchovým nábojem jsou více toxické než NPs s neutrálním či záporným nábojem. NPs s kladným nábojem totiž vykazují vyšší reaktivitu vůči plazmatickým proteinům a jsou schopny snadněji interagovat se záporně nabitou molekulou DNA, příp. RNA. Gato (2014) dále uvádí, že kladně nabitě částice mohou mít i hemolytický účinek. To dokládá i jím citovaná studie Goodmanové a spol. (2004) v rámci, které byla posuzována toxicita Au NPs s kladným i záporným nábojem. Výsledkem této studie bylo mimo jiné zjištění hemolytického účinku kladně nabitých Au NPs způsobeného agregací trombocytů. V této studii byla dále zjištěna vyšší míra toxicity právě u kladně nabitých Au NPs, přičemž záporně nabitě NPs vykazovaly minimální toxický potenciál. ^{[6]; [7]} Genotoxicita podmíněná nábojem je popisována i u dalších NPs (např. Si NPs, či polyamidaminů (PANAM)). ^{[35], [36]} Kladně nabitě částice mají dokonce větší tendenci procházet skrze hematoencefalickou bariéru, či prostupovat skrze buněčné membrány, a to hlavně díky negativnímu náboji daných buněčných struktur, způsobenému vysokým obsahem fosfolipidů. ^[5] Genotoxicita je dále ovlivněna i velikostí povrchového náboje. Čím vyšší je náboj, tím silnější je úroveň genotoxického účinku dané nanočástice. To platí např. pro NPs Fe₃O₄. Tyto nanočástice potažené polyethyleniminem mají vyšší povrchový náboj oproti nanočásticím potaženým polyethylenglykolem, přičemž částice s vyšším nábojem vykazují nejen větší cytotoxicitu ale i zvýšenou indukci tvorby ROS ^[2]

1.2.2.3 Další fyzikálně-chemické vlastnosti

K vlastnostem, které již v menší míře ovlivňují genotoxicitu NPs, patří také krystalická struktura a chemické složení. NPs s rozdílnou krystalickou strukturou se liší svojí genotoxicitou. Krystalická struktura některých NPs se mění i při interakci s vodou či jiným rozpouštědlem. Např. struktura ZnS NPs se ve vodném prostředí mění, a stává se více uspořádanou. ^[6] Také rozpustnost NPs je v tomto ohledu důležitá vlastnost. Ve většině případů se se zvyšující rozpustností, zvyšuje i genotoxicita NPs. Některé NPs, především NPs oxidů kovů, se v biologických tekutinách rozpouští a kontinuálně uvolňují kovové ionty. Dané ionty pak mohou narušit metabolismus nebo indukovat tvorbu RS, jak je popsáno v kapitole 1.2.1.2. ^[4] Horie (2011) popisuje toxicitu NPs, mikročástic (0,1-2,5 μm) a rozpustných forem CuO pro kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, přičemž NPs tohoto typu vykazují vyšší toxické účinky než mikročástice CuO. Tyto účinky byly však velmi podobné rozpustnému CuSO₄. Stejně výsledky poskytly i testy s NiO částicemi. Účinky CuO NPs se téměř shodovaly s toxicitou rozpustného NiCl₂, ovšem cytotoxicita byla vyšší již při použití nižších dávek NPs. ^{[4]; [22]; [26]}

Vazba některých ligandů, či specifických skupin (převážně kovových iontů ^[2]) na povrchu NPs je také faktorem ovlivňujícím genotoxický účinek. Tyto ionty indukují tvorbu RS stejně jako samotné NPs daného typu (na základě Fentonovy reakce). ^{[6]; [11]} Genotoxicita je ovlivněna i čistotou NMs. Některé ENPs jsou již z výroby značně znečištěny a obsahují volné ionty, či neutrální částice (opět převážně kovového charakteru), které nejen, že ovlivňují míru genotoxického efektu, ale dokonce mohou být hlavním důvodem genotoxicity těchto materiálů. Singh (2009) popsal, že i přes stále se zdokonalující techniky syntéz a postprodukčního zpracování ENPs tvořil obsah znečišťujících látek až 15 %. Zvolení vhodné metody čištění ENPs je také důležité. Při volbě špatného činidla, či metody pro daný typ NPs dochází k narušení či změně krystalické struktury ENPs. ^[5]

Schopnost aglomerace není podmíněna jen povrchovým nábojem, ale i vztahem NPs k vodnému prostředí. Velká část ENPs je hydrofobní, a tudíž mají větší tendenci k tvorbě aglomerátů. V závislosti na míře aglomerace dochází k nárůstu celkové velikosti NPs a tím může být míra genotoxického účinku na úrovni přímého primárního mechanismu naopak snížena. ^{[5]; [4]}

1.2.3 Podmínky ovlivňující výsledky studií genotoxicity

Kromě fyzikálně-chemických vlastností podmiňujících genotoxicitu NPs, existují i podmínky/faktory ovlivňující výsledky konkrétních studií. Mezi tyto faktory patří především typ média využitého při zpracování NMs, typ buněčné linie využitý ve studii nebo řada experimentálních podmínek, které mají za následek variabilitu ve výsledcích daných testů, jež mohou být mylně interpretovány jako pozitivní, příp. negativní. ^[4]

1.2.3.1 Způsob syntézy NPs

Existuje řada technik pro syntézu NPs, jako jsou chemické, elektrochemické, fyzikální i biologické techniky (tzv. zelená cesta). Mollick (2015) i Ahmed (2017) se však shodují, že většina z těchto technik (kromě biologických) je energeticky i finančně náročná, a navíc se při nich využívá různých chemických látek a činidel, které mohou ovlivňovat toxicitu takto syntetizovaných ENPs. Během biologických metod syntézy jsou však používány mikroorganismy, enzymy a rostliny nebo rostlinné extrakty. Syntetizované NPs nejsou během těchto metod syntézy v kontaktu s látkami, které se při chemických či fyzikálních metodách výroby používají a jsou toxické. Navíc je biologická syntéza NPs i ekologičtější alternativou k chemickým či fyzikálním metodám. Při biosyntéze totiž vzniká podstatně méně chemického odpadu. ^{[17]; [25]} Mollick (2015) při své analýze antiproliferačních účinků Ag NPs raději využil pro syntézu těchto NPs AgNO_3 a extraktu z Ibiškovce jedlého (lat. *Abelmoschus esculentus*). Extrakt z této rostliny obsahuje fytochemikálie, jež při syntéze sloužily jako redukční a stabilizační činidlo. Takto syntetizované NPs vykazovaly vůči rakovinovým buňkám cytotoxicitu závislou na dávce. ^[17] Ahmed a spol. (2017) pak ve své studii porovnávají sférické Ag NPs o průměru 20-60 nm, které byly syntetizovány také zelenou cestou (z AgNO_3 pomocí extraktu z *Azadirachta indica*) a chemicky syntetizovaných sférických Ag NPs s průměrnou velikostí 90 nm získaných z AgNO_3 pomocí citrátu sodného. Genotoxicita a cytotoxicita byla testována na lidských dermálních fibroblastech (HDFa) a buňkách nemalobuněčného karcinomu plic. Výsledky testu prováděného s využitím rakovinových buněk byly obdobné jako ve studii Mollicka (2015). Vůči zdravé lidské tkáni (HDFa) vykazovaly chemicky syntetizované Ag NPs větší genotoxický i cytotoxický efekt než biosyntetizované Ag NPs. Chemicky syntetizované NPs navíc také vyvolaly hemolýzu erytrocytů. Výsledky tedy ukazují na nižší genotoxický potenciál biosyntetizovaných NPs vůči zdravé tkáni a zároveň antiproliferační účinek vůči buňkám rakovinným. ^[25]

1.2.3.2 Typ použitého média a jeho složení

Ve fázi přípravy NMs, resp. NPs pro testování se velmi často přistupuje i k disperzi daných NPs v různých typech disperzních činidel (nejčastěji voda či buněčné kultivační médium). Znalost typu tohoto činidla, resp. jeho složení je však také nezbytná pro vyhodnocování genotoxicity testovaného NPs. Stejně NPs se stejnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi se chovají odlišně při disperzi v různých disperzních činidlech. (např. NPs TiO₂ nebo ZnO mají větší velikost v PBS než ve vodě). Toxicita dané NPs může dokonce být v daném disperzním činidle eliminována vlivem změn ve vychytávání, buněčné lokalizaci či biotransformaci. ^{[4]; [6]} Stejný problém je charakteristický i pro syntézu ENMs, popř. jejich čištění, kdy se také využívá řady rozpouštědel a činidel, které mohou ovlivnit genotoxický potenciál. Zde, jak popisuje Singh (2009), ale nedochází k ovlivnění toxicity na základě dočasného působení činidla, ale reakce s činidlem, která má za následek nevratnou změnu celé, či části krystalické struktury ENMs. ^[5]

Výsledky testů mohou být ovlivněny i ionty uvolněnými při rozpuštění NPs v daném rozpouštědle. Zjištěný genotoxický účinek pak může být vyvolán přítomností těchto iontů, přičemž dané NPs vůbec genotoxický potenciál mít nemusí. ^{[4]; [11]; [26]}

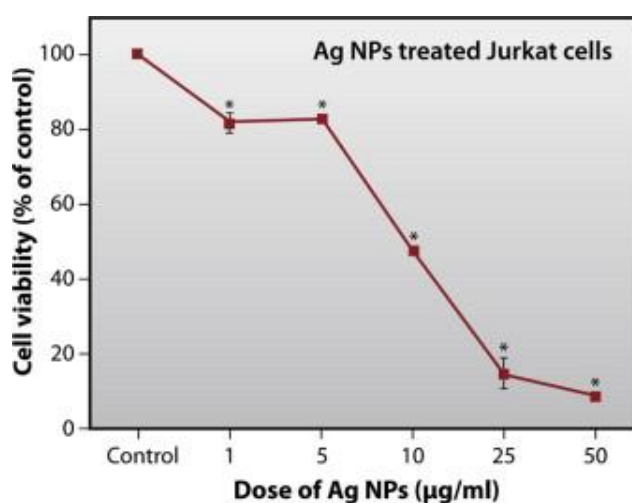
1.2.3.3 Stabilizace NPs

NPs podléhající aglomeraci, jsou při *in vitro* testech stabilizovány pomocí bílkovin, které bývají součástí použitého živného média či disperzního činidla. Méně častěji se pak využívají i lipidy. V případě využití čisté vody, která neobsahuje bílkoviny, resp. lipidy je k stabilizaci používán především uměle přidaný hovězí sérový albumin. Princip inhibice aglomerace je pak takový, že dané bílkoviny vytvoří na povrchu NPs tzv. koronu, jež zabrání interakci a aglomeraci jednotlivých částic. Tato skutečnost je ale dle Magdolenovy (2014) a Donaldsona (2010) důvodem změny farmakokinetiky dané NPs a tím i falešně genotoxického potenciálu s následným ovlivněním výsledku testů. Donaldson (2010) dále uvádí, že struktura bílkovin tvořících koronu se liší v důsledku interakce s různými tkáněmi (např. při interakci s endoteliálními či krevními buňkami je korona tvořena sérovými proteiny, kdežto při interakci s buňkami respiračního epitelu tvoří koronu složky surfaktantu ^[30]). Zdrojem chyb při testech genotoxicity mohou být i koncentrace těchto bílkovin. Zatímco při *in vitro* testech se koncentrace přidaných proteinů (FBS, BSA) pohybuje od 0 do cca 10 %, v živých tkáních, resp. *in vivo* modelech může být koncentrace daleko větší. ^{[3]; [4]}

Pro stabilizaci koloidních systémů s NPs může být využit i ultrazvuk (sonifikace). To dokládá Magdolenova (2012) svojí studií TiO₂ NPs. Dispergované TiO₂ NPs bez přidané stabilizační bílkoviny a s minimálním využitím ultrazvuku (3 minuty) vytvořily velké aglomeráty, které indukovaly poškození DNA v lidských lymfoblastech (TK6), lidských embryonálních epiteliálních buňkách (EUE) a fibroblastech opičích ledvin (Cos-1). Stejně částice tvořící vlivem FBS a sonifikace po dobu 15 minut menší aglomeráty (menší než 200 nm) toto poškození nezpůsobovaly. ^[15] Nevýhodou daného postupu ale může být oxidativní působení ultrazvuku, které vede až k tvorbě RS na povrchu NPs. ^[4] Toto působení bylo zjištěno například u NPs typu SiC, jejichž povrchové atomy byly při působení ultrazvukových vln oxidovány na oxidy křemíku s následnou tvorbou RS. ^[14] Hanot-Roy a spol. využili pro stabilizaci TiO₂ také FBS i sonifikaci (10 minut přerušovaně), přičemž velikost aglomerátů činila 400 nm a genotoxický potenciál (produkce ROS) prokázán byl. ^[18]

1.2.3.4 Koncentrace testovaných NPs a doba expozice

Koncentrace, resp. dávka NPs je další důležitý faktor ovlivňující výsledek testů genotoxicity (viz obrázek 4). Z důvodu menší citlivosti některých *in vitro* testů jsou často hodnoceny velmi vysoké tudíž fyziologicky či environmentálně irelevantní koncentrace NPs. NPs ve vyšších koncentracích mohou vykazovat genotoxický potenciál, přičemž koncentrace, se kterou člověk přichází do styku tento potenciál vykazovat nemusí. Koncentrace NPs je také dalším parametrem podmiňujícím rychlost aglomerace. Vysoká koncentrace znamená výskyt více NPs, jež jsou blíže u sebe a tím jsou jejich ne vazebné interakce (především van der Waalsovy síly), na kterých je aglomerace založena, účinnější. Pro studium genotoxicity by se tedy měly využívat koncentrace menší, při kterých jsou disperzní systémy NPs stabilnější. ^{[4]; [30]}



Obrázek 4 - Viabilita Jurkatových buněk v závislosti na koncentraci Ag NPs ^[17]

Dalším parametrem, který ovlivňuje výsledky testů genotoxicity NPs, je doba expozice. Některé NPs nemusí při krátkodobém působení vykazovat genotoxický potenciál vůbec, avšak chronická expozice těchto částic může vyvolat genotoxické poškození v důsledku akumulace NPs v organismu. Např. toxické účinky NPs oxidů kovů (TiO_2 nebo NiO) jsou spojeny především s jejich dlouhodobou expozicí. ^{[4]; [22]} Závislost nejen na dávce, resp. koncentraci, ale i čase expozice popisuje Hanot-Roy pro TiO_2 NPs na buňkách alveolokapilární bariéry. Zatímco u buněčných linií A549 a HPMEC-ST1.6R byla tvorba ROS pozorována již po 4 hodinové inkubaci s TiO_2 NPs, u buněčné linie THP-1 byla pozorována tvorba ROS až po 24 hodinové inkubaci se stejnými NPs o totožné koncentraci. ^[18]

1.2.3.5 Typ testu a experimentální podmínky

K ovlivnění výsledku může dojít i v důsledku typu využitého testu a jeho koncového bodu. Limitujícím faktorem některých testů je také jejich nespecifičnost. Například testy životaschopnosti se při výzkumu genotoxického potenciálu běžně využívají, ačkoliv poukazují pouze na cytotoxický, nikoli na genotoxický potenciál NPs. ^[4]

Důležitá je i řada dalších vlastností a faktorů použitých kultivačních médií, které by měly být voleny tak, aby co nejvíce odpovídaly reálným podmínkám v živém organismu. ^[11] Jedním z těchto faktorů je pH prostředí, v němž jsou NPs dispergovány. Bylo prokázáno, že při nižším pH jsou NPs ve větší míře schopny indukovat tvorbu ROS (převážně hydroxylových radikálů). Fu (2014) uvádí, že nanočástice Fe_2O_3 tvoří největší množství ROS v prostředí o pH 1,2. Naopak nejmenší množství je tvořeno při neutrálním pH, které je bližší hodnotě pH lidské krve. ^[2] Výsledky testování může ovlivnit i působení světla (především z oblasti UV). Interakce s UV zářením je významná především u NMs s polovodičovou strukturou (např. TiO_2 , ZnO , popř. C_{60}). Vlivem světelné energie dochází ve struktuře těchto NPs k excitaci elektronů, které následně mohou reagovat s povrchově vázanými molekulami (převážně s molekulárním kyslíkem, případně vodou) za vzniku ROS. Důležitá je i teplota prostředí. Se zvyšující se teplotou totiž může vzrůstat míra disperze některých NPs. ^{[2]; [4]}

1.2.3.6 Typ buněčné linie využití pro testování

Cytotoxicita, resp. genotoxicita NPs závisí také na typu buňky použité při testování. Pro každou tkáň jsou charakteristické určité metabolické dráhy, povrchové receptory, koncentrace a typy antioxidantů, přítomnost různých enzymů či hormonů a mnoho dalších faktorů vyvolávajících změnu biologické aktivity (změnu v expozici, farmakokinetice a interakci NPs s daným typem buňky). Tato biologická aktivita NPs tedy bývá ve většině případů specifická pro konkrétní buněčnou linii či konkrétní tkáň, popř. úzkou skupinu tkání a buněk. Interakce s jinou buněčnou linií může pak vést k útlumu či úplnému vymizení biologické aktivity, a tedy i genotoxicity. ^{[4]; [11]} Rozdílnou biologickou aktivitu stejných NPs vůči rozdílným buněčným liniím potvrzuje i studie Krollové (2011), která testovala třiatdvacet typů NPs a mimo jiné sledovala míru tvorby ROS na deseti charakteristicky rozdílných buněčných liniích. Konkrétně se jednalo o čtyři linie lidských buněk, a to buňky plicní tkáně (A549, CaLu3), kůže (HaCaT) a tračníku (CaCo2) a šest linií zvířecích buněk, včetně buněk plicního epitelu (RLE-6TN), fibroblastů (NIH-3T3), makrofágů (RAW264.7) a tří různých epiteliálních buněčných linií ledvinové tkáně (MDCK, MDCK II, NRK52E). Šest z daných NPs indukovalo ROS v pěti nebo více buněčných liniích (viz obrázek 5). NPs uhlíkové černi indukovaly jako jediné tvorbu ROS ve všech buněčných liniích ^[13] K rozdílné interpretaci výsledků analýz dochází i při použití buněk prokaryotických (bakteriálních). Stavba prokaryotické buňky je oproti eukaryotické jednodušší. Jaderná DNA není v prokaryotické buňce oddělena druhou (jadernou) membránou a k poškození DNA tedy může dojít snadněji. Důležitými faktory jsou i přítomnost buněčné (bakteriální) stěny tvořící pro některé NPs nepropustnou bariéru či bakteriostatický, popř. baktericidní účinek testovaného NMs. ^{[4]; [11]}

	A549	CaCo2	CaLu3	HaCaT	MDCK	MDCK II	NIH-3T3	NRK52E	RAW264.7	RLE-6TN
	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB	CB
Oxidativní stres (fluorescence sondy DCF)	TiO ₂ 3	TiO ₂ 3	TiO ₂ 3	TiO ₂ 3	TiO ₂ 3		TiO ₂ 3	TiO ₂ 3	TiO ₂ 3	TiO ₂ 3
	Ti-Zr 3	CeO ₂ A		Ti-Zr 3	Ti-Zr 3		Ti-Zr 3	Ti-Zr 3	Ti-Zr 3	Ti-Zr 3
	CeO ₂ A	CeO ₂ C		CeO ₂ A	CeO ₂ A		CeO ₂ A	CeO ₂ A	CeO ₂ A	CeO ₂ A
	CeO ₂ C			CeO ₂ B	CeO ₂ B		CeO ₂ B	CeO ₂ B	CeO ₂ B	CeO ₂ C
				CeO ₂ C	CeO ₂ C		CeO ₂ C	CeO ₂ C	CeO ₂ C	

Tabulka 1 - Shrnutí NPs indukujících ROS v deseti rozdílných buněčných liniích (přeloženo, upraveno) ^[13]

Hodnoty fluorescence sondy DCF lišící se od kontroly jsou odlišeny barvami: černá:> 200 % kontroly; tmavě šedá: 150-200 % kontroly; světle šedá: 120-50 % kontroly; bílá:> 100-120 % kontroly.

1.3 V současnosti používané *in vitro* metody studia genotoxicity NPs

V současnosti se využívá celá řada *in vitro* metod a testů, kterými lze stanovit toxický potenciál NPs. Jak již bylo popsáno v kapitole 1.2.3.5, existují různé testy, které se liší koncovým bodem. Na základě této odlišnosti jsou pak *in vitro* testy děleny do dvou základních kategorií. Jednu kategorii testů tvoří testy zaměřující se na životaschopnost buňky. Pozitivní výsledky těchto testů ukazují pouze na poškození buňky, které však může být způsobeno celou řadou mechanismů. Nejedná se tedy o testy přímo charakterizující genotoxický potenciál, dnes jsou ovšem nedílnou součástí baterií zaměřených na testování genotoxicity. Oproti tomu, testy charakterizující mechanismus genotoxického účinku (druhá kategorie) stanovují přímo genotoxický potenciál testovaných materiálů.^{[9]; [10]} Existují i *in vitro* testy pomocí nichž lze sledovat buněčné vychytávání NPs, tvořící spíše samostatnou kategorii. Tyto testy nám však poskytují informace o buněčné kinetice testovaných NMs, což je také parametr, který je velice důležitý při výzkumu ENMs nejen obecně, ale i z hlediska jejich genotoxického účinku.^[9] Arora (2012) mimo již zmíněné testy dále uvádí stanovení hemolýzy *in vitro*. Tento test však nemá prioritní význam pro studium genotoxického potenciálu a používá se jen zřídka pouze pro stanovení toxicity NPs obecně (např. Chattopadhyay a spol. při testování toxicity CoO (2015)). Výsledky poukazují pouze na biokompatibilitu testovaných NMs a to především s lidskými erytrocyty.^[11]

1.3.1 Testy buněčné životaschopnosti

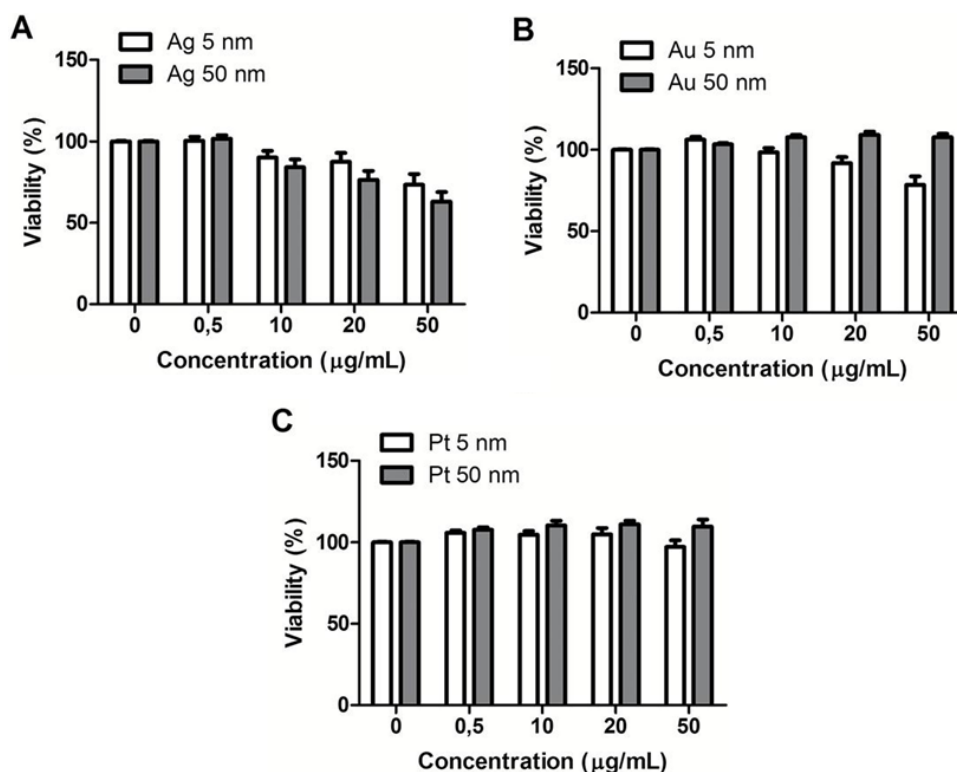
Při hodnocení vlivu NPs na lidské zdraví mají stěžejní roli testy, pomocí nichž je vyhodnocován vliv NPs na životaschopnost buněk, které se v dnešní době staly nedílnou součástí testování genotoxického potenciálu.^[10]

1.3.1.1 Testy proliferace buňky

Prvními a velmi důležitými *in vitro* testy jsou testy proliferace buňky, které jsou založeny na redukci tetrazoliových solí za produkce formazanových barviv, jako jsou například XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid), MTT (využívající žlutý 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) nebo WST-1. Absorbance vznikajících barviv (stanovená spektrofotometricky) pak odpovídá míře mitochondriální aktivity, resp. míře aktivity mitochondriálních dehydrogenáz dané buňky^{[9]; [10]}. Relativní jednoduchost, minimální fyzická manipulace s modelovými buňkami, rychlé a reprodukovatelné výsledky jsou parametry, které dělají z testů buněčné proliferace jedny z nejpoužívanějších testů současnosti. Tento test je ale dost náchylný ke změnám některých charakteristik prostředí, jako je například pH. Absorpční maximum

MTT se totiž v závislosti na pH značně liší, což vede k rozdílným výsledkům mezi jednotlivými testy. Dalšími vlivnými parametry jsou také obsah D-glukózy v růstovém médiu nebo buněčná koncentrace pyridinových nukleotidů. Problém činí také interakce NPs se samotnými barvivy, na což upozorňuje ve své studii Krollová (2009) v souvislosti s testováním jednotěnných uhlíkových nanotrubic (SWCNT).^{[9]; [10]} Jeden z těchto testů (konkrétně MTT test) použili ve své studii Mollick a spol. (2015). V této studii byly testovány antiproliferační účinky Ag NPs na buněčné linii lidských T-lymfomů, Jurkatových buňkách. Cytotoxické účinky Ag NPs byly testovány pro koncentrace 1, 10, 25 a 50 µg/ml Ag NPs. Po 24 hodinové inkubaci Jurkatových buněk s danými koncentracemi NPs při teplotě 37 °C a následně 4 hodinové inkubaci s MTT bylo množství životaschopných buněk stanoveno spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm. Výsledky analýzy ukázaly snížení buněčné proliferace při expozici všem zmíněným koncentracím Ag NPs (o 52,6 %, 85,4 % a 91,6 % při koncentracích 10, 25 a 50 µg/ml)^[17] Dalšími, kdo využili i testy proliferace (MTT a MTS) byli Chattopadhyay a spol. při testování toxicity CoO NPs (2015), nebo Hanot-Roy a spol. při testování oxidativního stresu vyvolaného expozicí TiO₂ NPs (2016). Cytotoxický efekt obou typů NPs byl prokázán.^{[18]; [21]}

Další test, díky kterému lze sledovat metabolickou aktivitu buňky je založen na redukcí Alamarové modři (AB) za vzniku resorufinu, který má fluorescenční vlastnosti.^[9] Tento test byl využit Lebedovou a spol. (2018) jako součást baterie testů při testování genotoxického potenciálu třech NPs významných vzácných kovů (Au, Ag a Pt). Genotoxický potenciál byl testován na bronchiálních epitelálních buňkách (HBEC). Analyzovány byly částice o velikosti 5 a 50 nm, přičemž všechny NPs byly potaženy citrátem. HBEC buňky byly vystaveny daným NPs v koncentracích od 0,5 do 50 µg/ml po dobu 48 hodin. Poté byly buňky inkubovány další 2 hodiny spolu s 10% AB za stejných podmínek. Fluorescence AB byla měřena při 590 nm. Po odečtení výsledků následovalo promytí buněk a další inkubace s čerstvým kultivačním médiem bez NP po dobu 24 hodin. Po opětovné inkubaci s AB byla znovu měřena fluorescence. Ag NPs o velikosti 5 i 50 nm indukovaly po první inkubaci mírné snížení životaschopnosti buněk při použití nejvyšší testované koncentrace (konkrétně 87% a 90% životaschopnost). Výraznější snížení životaschopnosti bylo zjištěno při druhé kultivaci (73% a 63% životaschopnost). Naproti tomu Au NPs indukovaly po druhé inkubaci snížení životaschopnosti pouze u buněk vystavených NPs o velikosti 5 nm (78% životaschopnost). Podobný výsledek byl pozorován i u Pt NPs, přičemž životaschopnost byla snížena pouze u buněk vystavených NPs o průměru 50 nm (97% životaschopnost) (viz obrázek 5).^[20]



Obrázek 5 - Životaschopnost buněk HBEC po expozici Ag (A), Au (B) a Pt NPs (C) ^[20]

Posledním důležitým testem, který lze zařadit jak mezi testy proliferace buňky, tak mezi testy nekrózy, je průkaz neutrální červeně (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochlorid; NR). Toto barvivo vstupuje do buněk difúzí skrze buněčnou membránu a dochází k jeho akumulaci v lysozomech. V životaschopné buňce (resp. fungujících lysozomech) dochází k protonaci této neutrální látky (vlivem kyselého prostředí), která následně absorbuje při 540 nm. Průkaz barevného produktu svědčí o životaschopné buňce, kdežto jeho nepřítomnost poukazuje na nekrotické poškození. ^[10] Negativem je interakce některých NPs s NR nebo jeho protonovanou formou. ^[11] Ivask a spol. (2015) studovali životaschopnost buněk po vystavení 11 kovovým oxidům (konkrétně Al₂O₃, Fe₃O₄, MgO, SiO₂, TiO₂, WO₃, CuO, ZnO, Sb₂O₃, Mn₃O₄ a Co₃O₄) připravených metodou pyrolýzy plamenem (spalování kovových organických prekurzorů ve směsi CH₄ a O₂). Dané buněčné linie (lidské alveolární epitelální buňky (A549), lidské epitelální kolorektální buňky (CaCo2) a myší fibroblasty (Balb/c3T3)) byly vystaveny po dobu 24 hodin suspenzím daných NPs o koncentracích 3 až 100 µg/ml při 37 °C a 5 % CO₂. Buněčná životaschopnost byla vyhodnocena právě za použití NR. Po promytí buněčných linií pomocí PBS byla přidána NR a buňky byly kultivovány další 3 hodiny za stejných podmínek. U osmi kovových oxidů (Al₂O₃, Fe₃O₄, MgO, SiO₂, TiO₂, WO₃, Mn₃O₄ a Co₃O₄) nebyly prokázány toxické účinky při koncentracích menších než 100 µg/ml. Pro zbylé tři typy NPs byly na základě výsledků stanoveny střední inhibiční koncentrace (IC₅₀) (16,4 µg/ml pro CuO, 22,4 µg/ml pro ZnO a 57,3 µg/ml pro Sb₂O₃). ^[19]

1.3.1.2 Testy nekrózy

Dalšími *in vitro* testy, kterými lze posuzovat životaschopnost buňky jsou tzv. testy nekrózy. Tyto testy jsou založeny na sledování příjmu supravitálních barviv (nejběžněji trypanová modř či propidium-jodid), jež prochází do buněk pouze skrze poškozenou buněčnou membránu. Trypanová modř (TB) je stanovován spektrofotometricky při vlnové délce 605 nm a propidium-jodid (PI), vmezeřený mezi poškozená vlákna DNA, pak fluorometricky při 617 nm. ^[9]

Nekrózu lze charakterizovat i pomocí kolorimetrického stanovení laktát dehydrogenázy (LDH), která se při nekrotickém poškození buněčných membrán uvolňuje z cytosolu buňky do okolního prostoru. Tento test je sice také založen na redukcí tetrazoliové soli (konkrétně 2-p-jodfenyl-3-p-nitrofenyl-5-fenyltetrazoliumchloridu známého pod zkratkou INT) za vzniku červeného formazanového barviva, jako testy životaschopnosti, nicméně princip redukce je odlišný. Tato redukce INT totiž probíhá za katalýzy již zmíněného enzymu LDH. Využití tohoto barviva je ale omezené. Vysoké pH totiž způsobí jeho nestabilitu, a v kyselém prostředí naopak dochází k inaktivaci LDH. Dále bylo prokázáno, že kovové ionty s tímto barvivem ochotně interagují a ovlivňují tak výsledky tohoto testu. ^{[10]; [24]}

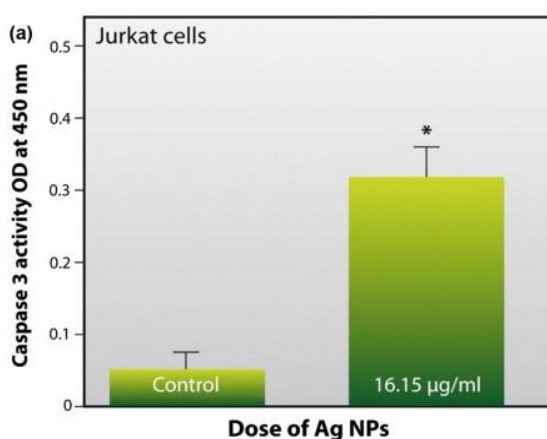
1.3.1.3 Testy apoptózy

Posledním typem testů životaschopnosti jsou *in vitro* testy apoptózy, jež zahrnují například kontrolu morfologických změn buňky během buněčné smrti. Tato metoda je sice finančně a instrumentálně nejméně náročná (vyžaduje pouze světelný mikroskop), avšak v nanotoxikologii se nikterak zvlášť nevyužívá vzhledem k její časové náročnosti, a především kvůli nutnosti praxe.

Dalším *in vitro* testem apoptózy je Annexin-V test. Annexin-V je protein nacházející se v krvi, jehož struktura umožňuje vazbu s fosfatidylserinem, který je ukotven na vnitřní (intracelulární) straně cytoplazmatické membrány. Při specifické restrukturalizaci buněčné membrány, probíhající pouze při apoptóze, dochází k přesunu tohoto glycerolfosfolipidu na extracelulární stranu cytoplazmatické membrány. Annexin-V navázaný na fosfatidylserin je značen pomocí fluorescenčního barviva (nejčastěji fluoresceinthiokyanátu) a apoptizující buňky jsou pak detekovány pomocí fluorescenčního mikroskopu, nebo průtokové cytometrie. Často je tento test doprovázen i testem nekrózy využívajícím PI. Při nekróze totiž dochází k narušení buněčné integrity, což umožní průchod Annexinu-V do nitra buňky, a následnou interakci s fosfatidylserinem, který zůstává ukotven na vnitřní straně membrány. Bez odlišení nekrotických buněk od apoptických by test vykazoval falešně pozitivní výsledky. ^{[9]; [10]} Tento test využili i Hanot-Roy a spol. (2016) jako jeden z testů při své studii oxidativního stresu vyvolaného expozicí TiO₂ NPs. Pro získání komplexnějších informací o genotoxicitě těchto NPs byla studována nejen životaschopnost daných buněk, ale i tvorba ROS (viz kapitola 1.3.2.2).

Protože primární cestou vstupu TiO₂ NPs do organismu je dýchací trakt, byly pro tuto analýzu vybrány buněčné linie A549, alveolárních makrofágů (THP-1) a lidských plicních mikrovaskulárních endotelových buněk (HPMEC-ST1.6R). Při daném testu byla sledována i modulace obsahu endogenního glutathionu (GSH). Před expozicí NPs byla část buněk těchto linií vystavena buthionin sulfoximinu (BSO), inhibitoru enzymu nezbytného pro syntézu GSH, spolu s dimethylfumarátem (DMF), který vyčerpá obsah GSH v buňkách. Snížení koncentrace GSH výrazně omezilo schopnost buněk detoxikovat ROS. Buněčné linie byly vystaveny působení TiO₂ NPs o koncentracích 5, 200 a 800 µg/ml po dobu 24 hodin. Část každé buněčné linie byla promyta PBS a 10 minut inkubována se směsí Annexinu V značeného FITC a PI. K detekci byla využita průtoková cytometrie. Nekróza buněk nebyla prokázána u žádné z daných buněčných linií. Naproti tomu apoptóza byla detekována u buněčné linie HPMEC-ST1.6R v závislosti na koncentraci NPs bez ohledu na předešlou inkubaci s DMF/BSO, a u linie THP-1 pouze po předešlé inkubaci s DMF/BSO. [18]

Dle Krollové (2009) lze k průkazu apoptózy využít také detekci důležitého markeru apoptózy tzv. kaspázy-3. Jedná se o jednu z buněčných proteáz, která štěpí peptidovou vazbu za aspartátem. K aktivaci kaspázy-3 dochází vlivem apoptické kaskády, která je velice složitá a pro zjednodušení lze říci, že reakce, které jsou součástí dané kaskády zapříčiní zvýšení propustnosti vnitřní mitochondriální membrány pro cytochrom C, který působí jako aktivátor již zmíněného enzymu. Aktivita kaspázy-3 je detekována štěpením substrátu tohoto enzymu (nejpoužívanějšími jsou peptidy s řadou DEVD) označeného fluoroforem. Tato proteáza navíc aktivuje i enzym kaspázou aktivovanou DNázu (CAD). Působením tohoto enzymu dochází k typickému štěpení DNA (DNA laddering), které lze pozorovat pomocí gelové elektroforézy po obarvení fluorochromem ethidiumbromidem. [9]; [10] Při studiu antiproliferačních účinků Ag NPs měřili Mollick a spol. (2015) mimo jiné hladinu kaspázy-3 pomocí metody ELISA. Po 24 hodinové expozici Ag NPs o koncentraci 16,15 µg/ml byla aktivita kaspázy-3 v Jurkatových buňkách měřena při vlnové délce 450 nm. Hladina kaspázy-3 byla významně zvýšena v buňkách vystavených působení daných NPs (viz obrázek 6), což ukazuje na úlohu Ag NPs při apoptóze testovaných buněk. [17]



Obrázek 6 - Aktivita kaspázy-3 (Jurkatovy buňky) v závislosti na koncentraci Ag NPs [17]

1.3.2 Testy genotoxického mechanismu

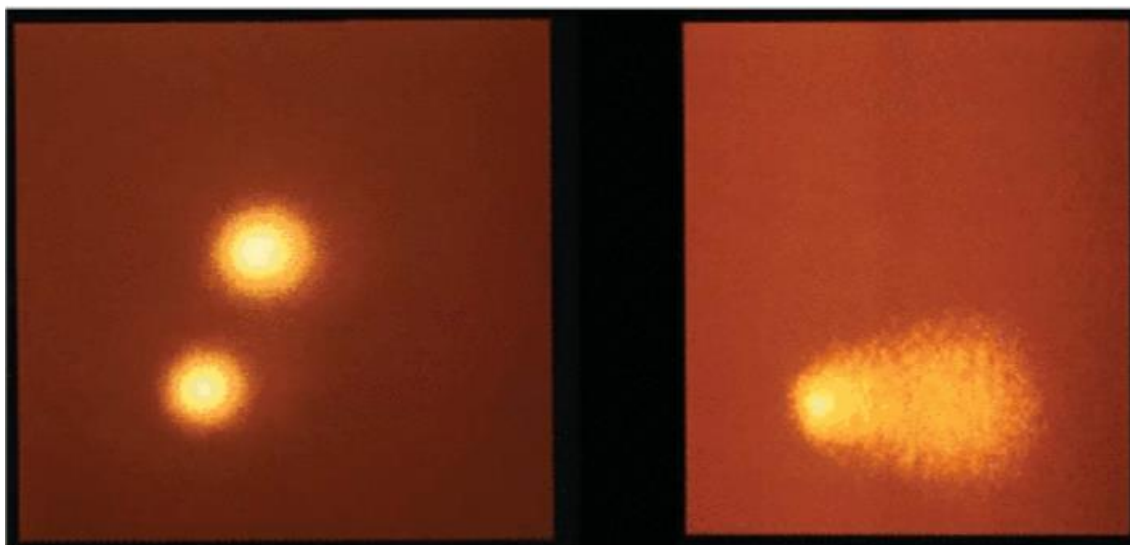
Řada *in vitro* testů je určena k detekci genotoxického potenciálu NPs. Vzhledem k tomu, že genotoxický účinek NPs může být vyvolán několika různými mechanismy, je třeba provádět testy schopné detekovat konkrétní mechanismus. Hlavním a charakteristickým primárním mechanismem genotoxického účinku nanomateriálů je poškození DNA, a proto spadá většina *in vitro* testů právě do této kategorie. Existují však i testy zaměřené na průkaz oxidativního stresu, tedy převážně na aktivitu ROS či RNS, což je další významný mechanismus genotoxického účinku. ^[9]

1.3.2.1 Testy poškození DNA

Zřejmě nejznámějším *in vitro* testem využívaným ke zjišťování genotoxicity je Amesův test, který je jedním z několika testů bakteriálních reverzních mutací. Tato metoda je založena na vzniku zpětné mutace. Konkrétně je sledován histidin auxotrofní kmen bakterie *Salmonella typhimurium*, jejíž gen umožňující syntézu aminokyseliny histidinu je zmutovaný. Daný kmen je inkubován na živné půdě neobsahující histidin, který je pro tuto bakterii životně důležitý. Po expozici testované látky (NPs) se sleduje, zda došlo k zpětné mutaci (mutaci zmutovaného genu) a bakterie je opět schopná růstu, čímž se prokáže genotoxický potenciál zkoumané látky. Pro tento typ testu je nutná předešlá znalost struktury testovaných NPs. Jak již bylo popsáno výše, velikost je nejdůležitější parametr ovlivňující prostupnost NPs skrze buněčné membrány, což znamená, že tento test nelze využít pro velké NPs, které by buněčnou membránou bakterií neprostoupily. Dalším negativem testování reverzní mutace je možnost, že NPs budou ovlivňovat produkci histidinu i bez mutagenních účinků. ^[4] Limitujícím faktorem je také problém s interpretací výsledků vůči eukaryotické buňce (viz kapitola 1.2.3.6). ^[11]

Dalším běžně používaným testem genotoxického mechanismu je kometový test neboli jednobuněčná gelová elektroforéza (SCGE). Při tomto testu jsou exponované buňky v agaru inkubovány v hypertonickém prostředí (nejčastěji v prostředí Tritonu X-100 spolu s vysokou koncentrací solí), čímž se zajistí jejich lýza a rozpuštění některých buněčných komponent (včetně membrán, některých organel a histonů). Zůstávají jen řetězce DNA ve formě nukleoidů, vykazujících tzv. nadšroubovicové vinutí (supercoiling). Dnes je nejběžněji používanou variantou tohoto testu alkalická verze. Při elektroforéze za alkalického pH (>13) dochází vlivem probíhajícího proudu k migraci poškozených vláken DNA k anodě, přičemž nepoškozená vlákna stále tvoří nadšroubovicové vinutí. Po elektroforéze následuje neutralizace a barvení nejčastěji pomocí fluorescenčních barviv. Výsledkem je pak struktura podobná kometě, jejíž hlavu tvoří nepoškozená DNA a ocas volné (poškozené) konce DNA (viz obrázek 7). Obraz lze pozorovat pomocí fluorescenční mikroskopie. Mimo DNA zlomů lze identifikovat i poškozené (nejčastěji oxidované) báze DNA.

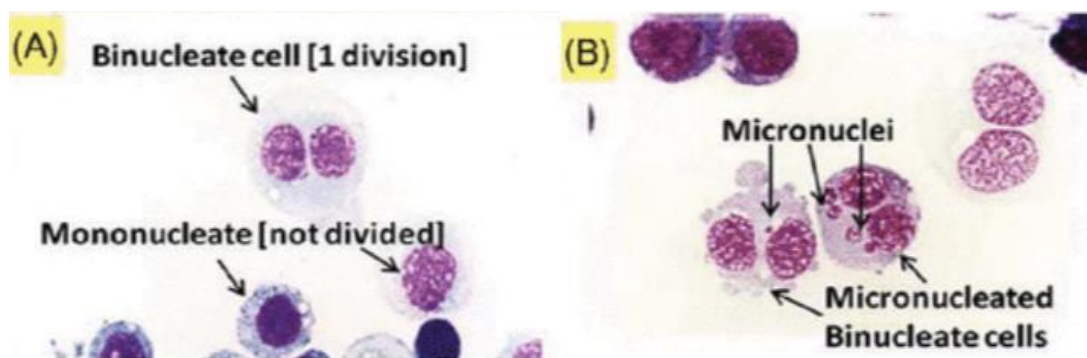
V místech poškozených bází totiž dochází ke štěpení a vzniku nukleoidů při použití endonukleáz, případně formamidopyrimidin DNA glykosylázy, (FPG). [4]; [24]



Obrázek 7- Buňka bez poškození DNA (vlevo) a buňka s poškozenou DNA (vpravo) obarvené akridinovou oranží po elektroforéze [32]

Dále existuje poměrně nová verze tohoto testu tzv. minigelový alkalický kometový test, který se liší pouze použitím menšího objemu agarového gelu či analýzou menšího množství buněk. [24] Tento test použila Lebedová a spol. (2018) jako jeden ze sady testů při testování genotoxického potenciálu NPs vzácných kovů (Au, Ag a Pt) o velikosti 5 a 50 nm. Buněčná linie HBEC byla inkubována spolu s danými NPs o koncentracích 1, 10 a 20 $\mu\text{g/ml}$ po dobu 48 hodin. Lýza buněk probíhala na ledu pomocí pufru Triton X-100 po dobu 1 hodiny ve tmě. Po 40 minutovém odležení buněk v alkalickém pufru, byla prováděna elektroforéza při 29 V po dobu 30 minut. Následně byly vzorky neutralizovány, sušeny a další den fixovány v metanolu. DNA byla obarvena pomocí fluorescenčního barviva SYBR-green a k vyhodnocení byl použit fluorescenční mikroskop. Ag NPs indukovaly zvýšenou tvorbu komet po expozici všem zmíněným koncentracím (8-9% zvýšení pro NPs o velikosti 5 nm a 4-11% pro NPs o velikosti 50 nm). Poškození DNA po expozici Au NPs bylo pozorováno jen u buněk exponovaných částicím o velikosti 5 nm (3,3; 5,6 a 7,2% zvýšení). Zvýšená tvorba komet byla pozorována i po expozici větším Pt NPs (5,5% zvýšení po expozici 10 i 20 $\mu\text{g/ml}$). [20] Nevýhodou této metody je především možnost interakce NPs s nukleoidy během testování, což může vést k nedostatečné migraci poškozených vláken k anodě. Karlsson (2015) udává i možnou interakci NPs s FPG nebo ovlivnění výsledků při testování polovodičových NPs (např. TiO_2). [24]

Dalším významným testem je mikrojaderný test (micronucleus assay), který je poměrně rychlý a citlivý. Fragment, popř. fragmenty poškozené DNA označované jako mikrojádra jsou nejlépe pozorovatelné v cytoplazmě buněk během interfáze buněčného dělení. K tvorbě těchto mikrojaderek dochází během anafáze z fragmentů, nebo celých chromozomů, které nebyly rozděleny mezi dceřiné buňky. Po cytokinezi mohou být výsledkem dvě dceřiné buňky, z nichž jedna má vizuálně normální jádro (genetická informace může být narušena) a druhá má dvě, popř. více jader, z nichž jedno je vizuálně normální a ostatní menší (mikrojádra). Tato mikrojádra se nejčastěji obarvují stejně jako jádra klasická a poté je lze pozorovat pomocí světelného mikroskopu. ^[4] Tento způsob využil Sadiq a spol. (2016). Po 24 hodinové inkubaci opičí ledvinové buněčné linie (CHS-20) s Fe_2O_3 a Al_2O_3 NPs o koncentracích 10; 25; 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$ a Cu NPs o koncentracích 2,5; 5; 10 a 25 mg/ml byly buňky promyty studeným PBS a inkubovány s cytochalasinem B po dobu 24 hodin. Buňky byly opět promyty PBS a fixovány směsí metanolu a kyseliny octové (3:1). Buněčné suspenze byly přeneseny na podložní sklíčko, vysušeny na vzduchu a barveny akridinovou oranží po dobu 10 až 15 minut. Hodnoceno bylo 1000 buněk každého preparátu. Test neprokázal genotoxický efekt Fe_2O_3 a Al_2O_3 NPs, ale v případě Cu NPs byla tvorba mikrojaderek indukována po expozici nejvyšší testované dávce (25 $\mu\text{g/ml}$). ^[23] Hodnocení lze však provést i jinými způsoby. Například pomocí dvojitého barvení (pro odlišení mezi apoptickými a nekrotickými buňkami) a průtokové cytometrie. Také tuto metodu použili Lebedová a spol. (2018) při testování genotoxického potenciálu Au, Ag a Pt NPs, přičemž pro barvení byly použity ethidium monoazid a SYTOX green. ^[20] Arora (2012) tvrdí, že poměrně vysoké procento různorodých NPs zvyšuje tvorbu mikrojaderek, čehož lze využít pro screeningové testování genotoxicity nanočástic. ^[11] Hayashi (2016) ve svém článku zabývajícím se problematikou mikrojaderného testu srovnává tuto metodu s testem chromozomálních aberací, přičemž udává následující výhody: 1) pro test lze využít jakoukoliv dělicí se buněčnou populaci, 2) výsledek může být posuzován i po delším časovém období a 3) není potřeba využití mitotických jedů, které by mohly ovlivnit výsledek analýzy. Autor také popisuje, že je možno získat přesné a konkrétní výsledky, nicméně to nepokládá za výhodu oproti testu chromozomálních aberací, protože mikrojaderný test je zaměřen pouze na konkrétní poškození DNA (tvorbu mikrojaderek). ^[12]



Obrázek 8 - Dvoujádrová a monojadrové buňky bez mikrojaderek (A) a dvoujádrové buňky s mikrojadry (B) obarvené dle Giemsy ^[32]

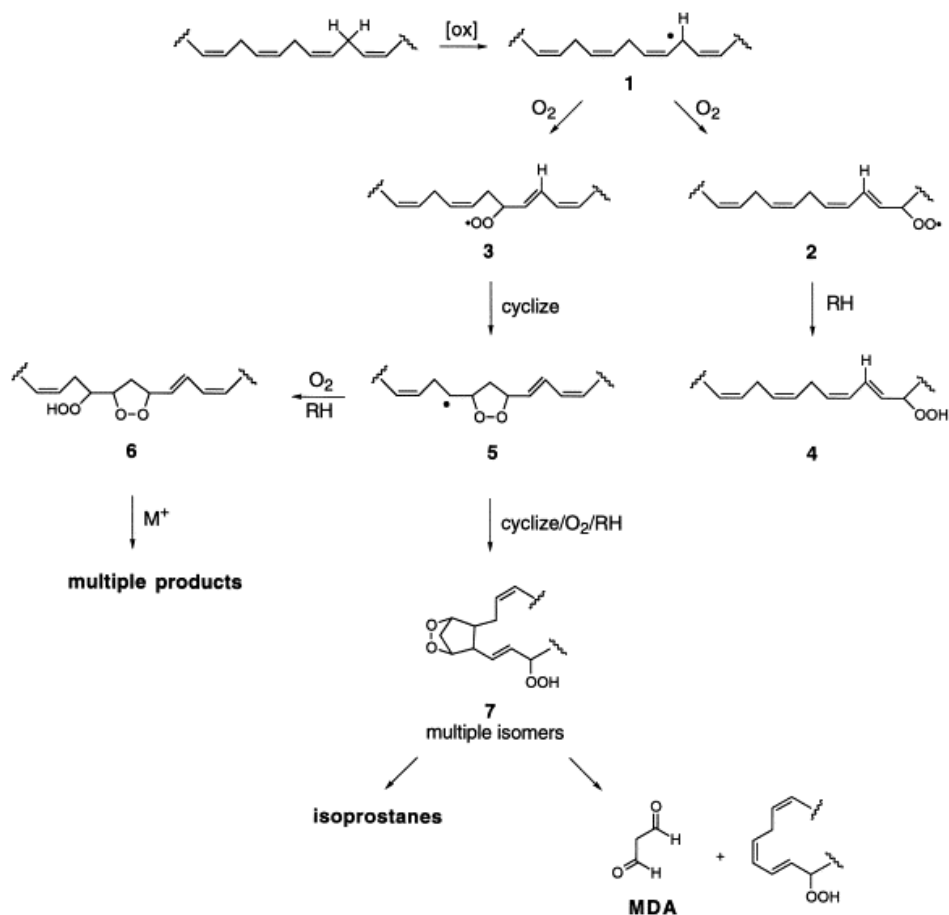
Menší význam při testování genotoxicity mají the high-content screening assay (HSA), test TUNEL, test chromozomálních aberací, či analýza HPRT genů. The high-content screening assay (HSA) je vysoce výkonná technika, jejíž hlavní využití je v oblasti biologického výzkumu látek, které se podílejí na změně fenotypu buněk (jako jsou léky, drogy, peptidy, ale i NPs). Fenotypové změny mohou zahrnovat nejen zvýšení nebo pokles tvorby důležitých proteinů ale i změny ve struktuře buňky. Základem této metody je inkubace buněk s testovanou látkou a poté analýza struktur či složek těchto buněk, které mohou být změněny, či poškozeny, pomocí počítačové analýzy mikroskopických obrazů (např. NIS-Elements). Principem testu TUNEL je průkaz dvouřetězcových zlomů ve struktuře DNA. S využitím exogenní DNA polymerázy I a nejčastěji 5-brom-2-deoxyuridinu (BrdU), který je označen FITC, je poškozená DNA opravena, přičemž fyziologicky zastoupený deoxythimidin je v místech zlomů nahrazen již zmíněným BrdU. Výhodou této metody je především její citlivost. Nevýhodou ale zůstává finanční a časová náročnost. Při *in vitro* testu chromozomálních aberací jsou buňky vystaveny NPs, přičemž se blokuje metafáze buněčného dělení (pomocí mitotického jedu kolcemid), kdy jsou chromozomy nejvíce patrné. Chromozomy těchto buněk jsou následně pozorovány mikroskopicky.^[9]

1.3.2.2 Testy oxidativního stresu

K testům schopným poskytnout informace týkající se genotoxického účinku látek dále řadíme i testy oxidativního stresu. V daném kontextu hraje významnou roli analytická metoda s názvem elektronová paramagnetická rezonanční spektroskopie (EPR spektroskopie). Principem EPR spektroskopie je rezonanční absorpce vysokofrekvenčního mikrovlnného záření a následná změna spinového stavu elektronů s nepárovými spiny v prostředí stejnosměrného magnetického pole. Většina ROS i RNS patří mezi nestabilní radikály, které lze jen těžko měřit přímo. K jejich stabilizaci se využívá tzv. metoda spinového záchytu (spin trapping), kdy nestabilní RS reagují s nitrosoloučeninami nebo nitrony za vzniku stabilnějších radikálů. Mezi nejčastěji využívané molekuly patří např. 2,2,6,6-tetramethylpiperidin (TEMP), 5,5'-dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO), 5-(diethoxyfosforyl)-5-methyl-1-pyrrolin-N-oxid (DEPMPO), N-terc-butyl-fenylnitron (PBN) nebo 1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxopiperidin (TEMPONE-H). Výhodou této metody je skutečnost, že je specifická právě pro částice paramagnetické povahy čili částice obsahující ve své valenční vrstvě nepárové elektrony. Další výhodou je také vysoká citlivost této metody a možnost charakterizace struktury analyzovaných volných radikálů. Nicméně se jedná o metodu instrumentálně a finančně náročnou, a proto se s ní v praxi lze setkat jen zřídka.^[9]

Pro získání informací o produkci RS lze využít i molekuly fluorescenčních sond, se kterými se v praxi setkáváme daleko častěji. Tyto sondy jsou ale nespecifické pro konkrétní radikály. Při jejich použití může docházet k interakci s řadou reaktivních sloučenin, jejichž strukturu nelze touto metodou rozeznat. Jednou z těchto sond je 2',7'-dichlorfluorescein diacetát (DCFH-DA), který je buňkou deacetylován a následně oxidován (v přítomnosti ROS) na fluorescenční barvivo 2',7'-dichlorfluorescein (DCF).^{[3]; [9]} Tuto sondu použili při testování antiproliferačních účinků Ag NPs Mollick a spol. (2015), kteří kromě buněčné viability Jurkatových buněk ověřovali i tvorbu ROS. Jurkatovy buňky byly inkubovány 24 hodin s Ag NPs o koncentraci 16,15 µg/ml, promyty a následně 30 minut inkubovány s danou fluorescenční sondou při 37 °C. Intenzita emitovaného fluorescenčního záření byla sledována při 520 nm. Výsledky analýzy prokázaly vyšší množství ROS uvnitř buněk, byly vystaveny dané koncentraci Ag NPs (intenzita fluorescence byla zvýšena o 60,9 % oproti kontrolnímu roztoku).^[17] Tuto sondu také použili jako součást sady testů i Ivask a spol. (2015) při testování 11 kovových oxidů, nebo Chattopadhyay a spol. (2015) při studiu toxicity CoO.^{[19]; [21]} Existuje i chlormethylový derivát sondy DCFH-DA (CM-H₂DCF-DA), který sice vykazuje lepší buněčnou retenci a je vhodný k déle trvajícím studiím, nicméně je citlivý na vzduch, světlo a teplotu, což vyžaduje dodržení náročnějších podmínek při práci. Tuto sondu použili Hanot-Roy a spol. (2016) v rámci dalšího testování při studiu oxidativního stresu vyvolaného expozicí TiO₂ NPs. Dané buněčné linie byly inkubovány a ošetřeny stejným způsobem, který byl již popsán výše (viz kapitola 1.3.1.3). Zásobní roztok CM-H₂DCF-DA byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO) a poté zředěn teplým PBS (kvůli teplotní citlivosti dané sondy) na výslednou koncentraci pracovního roztoku (10 µM). Po inkubaci s testovanými NPs byly buňky inkubovány s pracovním roztokem sondy po dobu 5 minut. Po celou dobu inkubace byly buněčné linie chráněny před světlem. Intenzita emitovaného fluorescenčního záření byla sledována při 530 nm. Zvýšení tvorby ROS u buněk THP-1 bylo pozorováno pouze po 24 hodinové inkubaci s NPs (o 82,5 % a 166,3 % při expozici 200 a 800 µg/ml). U buněčných linií A549 a HPMEC-ST1.6R bylo také pozorováno zvýšení tvorby ROS, ovšem již po 4 hodinové inkubaci (o 239,5 % u buněk A549 a o 206,6 % u buněk HPMEC-ST1.6R po expozici 800 µg/ml NPs). Test také potvrdil, že předběžná inkubace buněk s DMF/BSO vyvolala zvýšení tvorby intracelulárních ROS.^[18] Další látkou, kterou lze využít k testování tvorby RS je dihydrorhodamin, jenž podléhá oxidaci v přítomnosti ROS, či RNS za vzniku rhodaminu-123 (RH-123). RH-123 pak vykazuje fluorescenční vlastnosti (emise záření o vlnové délce 529 nm). Nevýhodou použití těchto barviv, respektive jejich prekurzorů, je také možná interakce s mitochondriálním enzymem cytochromem C, což má za následek falešně pozitivní výsledky. Proto je nutné nejprve využít některý z testů apoptózy/nekrózy.^[9]

Další možností *in vitro* stanovení oxidačního stresu, resp. konkrétních účinků způsobených akumulací RS, je stanovení typických biomarkerů buněčného poškození. Například při peroxidaci polyneenasycených lipidů dochází mimo jiné i k tvorbě malondialdehydu (MDA) (viz obrázek 9), který kondenzuje s kyselinou thiobarbiturovou, příp. 1-methyl-2-fenylindolem, za vzniku fluorescenčně aktivní látky, kterou lze spektrometricky stanovit. ^[9] Pomocí této metody byl odhadnut rozsah peroxidace v případě testování toxicity CoO NPs (2015) připravených metodou tepelného rozkladu $\text{CoCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Toxicita těchto částic o koncentracích 1, 5, 10, 25 a 50 $\mu\text{g/ml}$ byla stanovována na lidských lymfocytech získaných ze vzorků čerstvé krve. Dané lymfocyty byly s NPs inkubovány 24 hodin při 37 °C a 5 % CO_2 . K exponovaným buňkám byl po odstranění NPs přidán dodecylsulfát sodný (SDS) a následně 20% kyselina octová a kyselina thiobarbiturová. Poté byl buněčný koloid 60 minut inkubován ve vroucí vodní lázni. Po inkubaci byla ke směsi přidána destilovaná voda, roztok butanol-pyridinu (15: 1) a směs byla centrifugována. Absorbance supernatantu byla měřena při 530 nm. Výsledky tohoto testu prokázaly že míra peroxidace lipidů se zvyšuje se zvyšující se koncentrací CoO. ^[21] Pomocí HPLC s fluorescenční detekcí lze stanovit i lipidové hydroperoxy, jež vznikají při lipidové peroxidaci působením RS. K jejich značení se pak nejčastěji používá fluorochrom N-acetyl-3,7-dihydroxyfenoxazin, známý pod značkou Amplex Red. ^[9]



Obrázek 9 – Produkty lipidové peroxidace ^[28]

Existují i komerčně dostupná činidla, s jejichž pomocí lze nejen stanovit přítomnost RS v buňkách, ale určit i konkrétní místo účinku RS. Například MitoSOX Red je směs hydroethidinu (prekurzoru fluorescenčního barviva 2-hydroxyethidium, k jehož oxidaci dochází v přítomnosti O_2^-) a hexyltrifenylofosfonia. Tato směs se akumuluje především v mitochondriích, kde lze díky oxidaci hydroethidinu tuto reaktivní formu kyslíku prokázat. Pro zjištění lipidové peroxidace se používá lipofilní fluorescenční sonda známá pod komerčním názvem C11-BODIPY. Tato sonda obsahuje mimo jiné i polynenasycené butadienylové zbytky, které jsou v přítomnosti RS (konkrétně peroxidovaných lipidů) oxidovány a tím je posunuta vlnová délka záření emitovaného tímto barvivem (od 610 nm do 510 nm).^[9]

O oxidativním stresu vypovídají i změny v koncentracích antioxidačních látek, např. SOD či GSH, jejichž produkce je zvýšena z důvodu kompenzace nadbytečného množství RS. Navíc je GSH v přítomnosti ROS či RNS oxidován za vzniku glutathiondisulfidu (GSSG), čehož lze také využít. Sledování poměru GSH/GSSG v exponovaných buněčných kulturách lze provádět např. pomocí HPLC. Tato metoda je ale poměrně časově náročná a k oxidaci může docházet i během analýzy. Z tohoto důvodu se častěji stanovuje celkový GSH. GSSG je v přítomnosti NADPH redukován zpět na GSH za katalýzy glutathion-reduktázou. Koncentrace celkového GSH je následně stanovena pomocí reakce GSH s 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoovou kyselinou (DTNB), známé také jako Elmanovo činidlo. Vzniklá 5-thio-2-nitrobenzoová kyselina je spektrofotometricky stanovena při vlnové délce 412 nm. Existují i další *in vitro* metody stanovení jak GSH, tak i GSSG, avšak jejich citlivost je značně nižší, a proto se používají jen v krajních případech. SOD je enzym, který katalyzuje oxidaci O_2^- na H_2O_2 a O_2 . Inhibice oxidace O_2^- , jehož produkce je katalyzována enzymem xanthin-xanthin oxidázou z nitrotetrazoliové modři (NBT), se využívá pro nepřímé stanovení aktivity tohoto enzymu. Izoformy SOD (SOD-1 a SOD-2) mohou být stanoveny i blotovými technikami, kdy po jejich izolaci a elektroforetické separaci na polyakrylamidovém gelu intereagují s protilátkami konjugovanými nejčastěji s křenovou peroxidázou. Detekce je pak založena na sledování intenzity emitovaného záření při oxidaci luminolu nebo oxidací substrátu, při které vzniká barevný produkt.^[9]

1.3.3 Testy buněčného vychytávání a dalších charakteristik NPs

K testování genotoxického účinku NMs lze využít nejen testy genotoxického mechanismu, či životaschopnosti buňky vystavené působení NPs, ale i testy charakterizující místo účinku těchto částic, případně možnosti a rychlost jejich příjmu buňkami. Tyto testy využívají nejrůznější formy mikroskopie. Mezi nejpoužívanější metody k získání těchto charakteristik patří TEM, která poskytuje vcelku přesné informace právě o příjmu, ale i lokalizaci NPs v buňkách. Tato metoda má kromě výše popsaných charakteristik také velmi významné rozlišovací schopnosti, díky kterým je možno získat informace i o samotné morfologii zkoumaných NPs. ^{[4]; [9]} Této rozlišovací schopnosti využili i Mollick a spol. (2015), Ivask (2015) nebo Hanot-Roy a spol. (2016) a další, kdy mimo jiných testů použili TEM k získání morfologických parametrů testovaných NPs. ^{[17]; [18]; [19]} Nevýhodou této metody je její finanční náročnost. ^[9] Mimo TEM je velmi rozšířená i druhá varianta, a sice rastrová (skenovací) elektronová mikroskopie (SEM). SEM použili například Chattopadhyay a spol. (2015) při studiu struktury CoO NPs. ^[21] Další metodou pro získání informací o možnostech příjmu a distribuci NPs je fluorescenční spektroskopie (FS) využívající označení NPs pomocí fluorochromů. Tato metoda je oproti TEM či SEM finančně dostupnější. Její použití ale nese riziko změny chemických, biologických či fyzikálně-chemických vlastností NPs vlivem označení již zmíněnými fluorescenčními barvivy, která se vážou na povrch dané NPs. K ovlivnění může dojít i v důsledku použití záření určité vlnové délky. Změna těchto vlastností může ovlivnit farmakokinetiku NPs a tím i výsledky celého testování. Další nevýhodou je také fakt, že při práci s fluorochromy je nutno dodržovat určitá bezpečnostní opatření, protože většina těchto látek jsou prokazatelné karcinogeny. ^{[9]; [11]} K získání charakteristik buněčného, či tkáňového vychytávání NPs lze použít i mikroskopii s diferenciálním interferenčním kontrastem (DIC), skenovací elektronový mikroskop v kombinaci s elektronově disperzním spektrometrem (SEM-EDS), mikroskopii atomárních sil (AFM), magnetickou rezonanci (MRI) či skenovací tunelovou mikroskopii (STM). ^{[11]; [31]}

Před samotným testováním genotoxicity je nutno získat i další charakteristiky NPs. Chemické složení lze identifikovat pomocí Ramanovy spektroskopie, nukleární magnetické rezonance (NMR) či rentgenové fluorescenční spektroskopie (XRF). Pro popis pohybu a velikosti NPs v kapalném prostředí jsou používány metody dynamického, či statického rozptylu světla (DLS či SLS), fotonové korelační spektroskopie či maloúhlového rozptylu neutronů (SANS). Vhodných metod pro charakterizaci NPs je však mnoho a kompletní seznam doporučených metod dle Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) lze najít na webových stránkách této organizace (www.oecd.org). ^[31] Pro získání komplexnějších výsledků je doporučeno tyto metody kombinovat. Například Mollick a spol. (2015) ověřovali před testováním buněčnou viabilitu a tvorbu ROS stabilitu NPs pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR), velikost a pohyb NPs v médiu pomocí DLS, a nakonec krystalickou strukturu pomocí rentgenové difrakce (XRD). ^[17] Stejných technik, konkrétně DLS a FTIR použil i Chattopadhyay (2015) při testování toxicity NPs CoO. ^[21]

1.4 Strategie testování genotoxicity nanočástic

1.4.1 Výhody a nevýhody testů *in vitro*

Pro lepší pochopení úlohy *in vitro* technik je důležité porovnat jejich vlastnosti s technikami *in vivo*. Oproti *in vivo* technikám jsou techniky *in vitro* obvykle rychlejší, levnější a nenaráží na řadu etických problémů typických pro postupy využívající laboratorní zvířata. Díky tomu jsou tyto testy vhodné pro screening velkého množství vzorků v krátkém čase.^{[9]; [31]} Při použití *in vitro* metod lze také stanovit konkrétní (přímé) účinky testovaných NPs bez ovlivnění samotou aktivitou metabolicky aktivních buněk (např. zánět, či jiné fyziologické faktory), což lze považovat za výhodu. Takto zjištěné výsledky však mohou mít omezenou platnost, pokud jsou využity k odhadu účinků látek na mnohobuněčnou tkáň. Dalším pozitivním aspektem *in vitro* testů je i jejich ekologičtější charakter. Kromě úplné eliminace zvířat, jako pokusných objektů, je v rámci těchto testů vyprodukováno i daleko méně toxického a biologického odpadu.^[11] Nicméně *in vitro* testy mají i své nevýhody. Jak již bylo naznačeno, testování *in vitro* opomíjí biologickou aktivitu, kterou vykazují komplexní mnohobuněčné organismy. Zvířecí modely používané pro testování *in vivo* jsou totiž vybírány tak, aby se svými biologickými vlastnostmi (převážně metabolickou aktivitou) co nejvíce podobaly lidskému organismu. Mnohé děje typické pro fungování komplexního živého organismu lze s využitím postupů *in vitro* studovat jen s obtížemi či vůbec. Krollová (2009) i Arora (2012) uvádějí, že výsledky testů *in vitro* nejsou vhodné pro interpretaci farmakokinetiky a biodistribuce testované látky v lidském organismu.^{[10]; [11]}

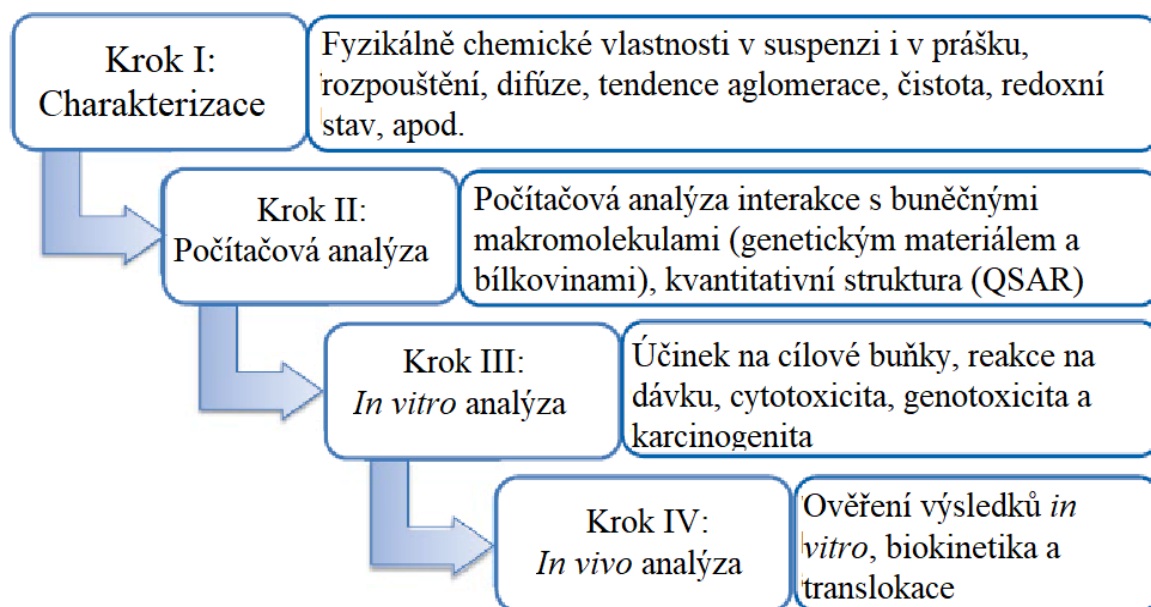
Magdolenova (2014) v dané souvislosti uvádí, že *in vitro* testy jsou nejvhodnější pro studium NPs působících genotoxické poškození především prostřednictvím primárních mechanismů, tedy přímou interakcí s DNA. Důvodem je, že v případě daného mechanismu nehraje tak významnou roli biologická aktivita zasažených tkání, což neplatí pro NPs způsobující poškození prostřednictvím sekundárních mechanismů (např. a následná tvorba RS).^{[4]; [11]} Dusinska (2017) pak doporučuje *in vitro* testy pro počáteční screening cytotoxicity a genotoxicity NMs.^[31]

1.4.2 Základní součásti prakticky využitelné strategie testování

Jak ukazuje obrázek 10, testování genotoxického potenciálu NPs je složitý proces, jenž by podle Kumara (2013) měl standardně zahrnovat čtyři základní kroky. V první řadě je důležité znát fyzikálně-chemické vlastnosti a chování testovaných částic v sypké i dispergované formě. ^[16] Doporučený seznam těchto vlastností (dle OECD) obsahuje celkem 26 vlastností a parametrů, mezi které patří velikost, tvar, aglomerace či agregace, jakožto parametry, které nejvíce ovlivňují toxicitu, ale i parametry jako je rozdělovací koeficient oktanol/voda, redox potenciál a potenciál tvorby radikálů. ^[30]

Známe-li tyto vlastnosti a strukturální parametry, jež prokazatelně ovlivňují toxicitu, lze pomocí modelů vztahu aktivity a struktury (QSAR) a dalších počítačových programů předpovědět mechanismy interakce daných částic s konkrétními tkáněmi. ^{[16]; [22]} Na základě údajů získaných těmito metodami lze doporučit vhodné testy pro potvrzení teoretických poznatků a částečně odhadnout i míru genotoxického potenciálu. ^[16]

Dalším krokem je samotné testování toxického potenciálu. Během tohoto kroku jsou využívány jak *in vitro*, tak i *in vivo* techniky. Vzhledem k poměrně zásadním výhodám *in vitro* testů je v dnešní době snaha o zvýšené využití a rozšíření alternativních *in vitro* technik na úkor technik *in vivo*. Možnosti *in vitro* testů jsou ale zatím omezené, a proto se pro ověření výsledků a získání dalších specifických parametrů, jako farmakokinetika a biodistribuce používá *in vivo* technik testování. ^{[16]; [31]}



Obrázek 10 - Přístupy k testování toxicity nanomateriálů (přeloženo, upraveno) ^[16]

1.4.3 Doporučené postupy strategie *in vitro* testování

1.4.3.1 Doporučení před testováním

Řada autorů se shoduje na tom, že základem testování toxického (geno-; imuno-; cyto- a dalších) potenciálu je charakterizace testovaných NPs. Sajid (2015) ale i další tvrdí, že výsledky testů NPs o stejném chemickém složení ovšem vykazujících rozdílné vlastnosti a strukturální parametry, nelze porovnávat, neboť tyto NPs, byť z chemického hlediska stejné, mohou v jednotlivých testech vykazovat (ve většině případů vykazují) jinou úroveň toxicity. Částečně je tato nekonzistence výsledků jednotlivých studií způsobena různými vlastnostmi a parametry NPs, ale i rozdílnými charakteristikami prostředí a vnějších podmínek ve kterých testování probíhá. Právě proto je nutná nejen charakterizace NPs, ale i daného prostředí (viz dále). Dusinska (2017) také zdůrazňuje, že je vhodné identifikovat a studovat i degradaci NPs v biologickém prostředí, protože uvolňování molekulárního odpadu by mohlo indukovat toxické účinky. Každé testování by tedy mělo zahrnovat kompletní charakterizaci NPs za použití kombinace dnes dostupných technik, jež jsou popsány v kapitole 1.3.3. ^{[3]; [16]; [29]; [30]; [31]}

Dusinska a další vytvořili projekt NanoTEST (2015), během kterého byla zkoumána toxicita různých NPs. Hlavním cílem tohoto projektu bylo zajistit lepší porozumění mechanismům interakce NPs s buňkami a tkáněmi, a nalezení (*in vitro*) alternativ testování toxicity, především k testům na zvířatech. Tyto informace pak byly použity k vytvoření řady doporučení pro vhodné strategie testování. Na základě tohoto projektu bylo doporučeno, aby suspenze testovaných NPs byla vždy čerstvě připravená, z důvodu stability, která je časově omezena. Ke stabilizaci bylo také doporučeno použití bílkovin, které brání aglomeraci (především BSA či FBS), tak aby využití médium, co nejvíce napodobovalo *in vivo* podmínky, či použití sonifikace (viz kapitola 1.2.3.3). Dusinska (2015) ale tvrdí, že proteinová korona i silná sonifikace mohou sice bránit aglomeraci, ale mohou i ovlivnit vlastnosti NPs. ^[30]

Autory projektu NanoTEST (2015) bylo dále doporučeno, aby byly koncentrace testovaných NPs uváděny nejméně ve dvou různých jednotkách. Mimo základní jednotky, tedy hmotnost, udávají tito autoři např. počet nebo plochu povrchu NPs v suspenzi. Důvodem je především snadnější porovnání výsledků rozdílných studií. Spolu s Magdolenovou (2014) se autoři dále shodují na tom, že ve většině případů jsou pro *in vitro* analýzy používány vysoké koncentrace NPs z důvodu nižší citlivosti daných testů, ovšem tyto koncentrace neodpovídají množství NPs, jemuž by mohl být člověk za normálních podmínek vystaven. Použité koncentrace NPs by tedy měli být relevantní. (viz kapitola 1.2.3.4) Jak bylo popsáno v již zmíněné kapitole, nejen koncentrace je důležitý faktor. Pro testování obyčejných chemikálií *in vitro* se doporučuje expozice 3-6 hodin a 24 hodin. Dle autorů NanoTESTu by ale NPs mohly potřebovat více času pro vstup do buněk. Navíc, vezme-li v úvahu primární mechanismus genotoxického účinku NPs (přímá reakce s DNA) je nutné si uvědomit,

že částice o větší velikosti nemusí projít skrze jadernou membránu (viz kapitola 1.2.2.1) a jejich účinek se projeví pouze během mitózy, kdy jaderná membrána zaniká. Koncový bod některých testů je dokonce závislý na průběhu buněčného cyklu (např. mikronukleový test). V obou případech je tedy delší expozice nutná, aby byly buňky v kontaktu s NPs během celého buněčného cyklu. ^{[4]; [30]}

O ovlivnění genotoxicity ionty přechodných kovů na povrchu NPs bylo také již hovořeno. Kovové nečistoty se však mohou nacházet nejen na povrchu NPs, ale i v použitém médiu, přičemž výsledek je stejný (tvorba RS na základě Fentonovy reakce). Při testování by tedy mělo být ověřeno, zda je genotoxické poškození způsobeno opravdu testovanými částicemi, nebo přítomností právě zmíněných kovových, ale i jiných nečistot. ^[11]

Jak je uvedeno v kapitole 1.2.3.6, některé NPs vykazují genotoxický potenciál jen vůči daným buněčným liniím. Dle Arory (2012) je vyhodnocování genotoxického potenciálu pomocí testování s jednou či dvěma buněčnými liniemi krajně nespolehlivé a zavádějící. Testy by měly prováděny na více buněčných liniích, které představují různé cílové orgány a zachovávají specifické funkce orgánů, jež představují. ^[11] S tímto doporučením souhlasí i autoři projektu NanoTEST, kteří navíc navrhli kritéria pro výběr nejvhodnějších buněčných linií, či primárních buněk. Tato kritéria zahrnují dobrou komerční dostupnost linií, jejich růst v kultivačních médiích s minimálním přídavkem růstových faktorů, jejich stabilitu za kultivačních podmínek a již zmíněnou expresi funkcí orgánů, jež použité linie reprezentují. Na základě těchto kritérií byla sestavena tabulka 2, kde jsou popsány nejvhodnější buněčné linie využitelné pro testování toxického potenciálu NPs.

Reprezentovaná buňka/tkáň	Buněčná linie	Komerční označení
Krev	Lidská lymfocytární buněčná linie	TK6
	Lidská krev (lymfocyty)	–
Endoteliální buňky	Potkání mozkové endoteliální buňky	EC219
	Myší plicní epitelální buňky	ECp23
	Lidské mozkové endoteliální buňky	HCEC
Játra	Potkání hepatocyty	–
	Potkání jaterní makrofágy (Kupfferovy buňky)	–
Plíce	Lidské plicní alveolární buňky	A549
	Lidské plicní bronchiální buňky	16HBE140
Placenta	Placentární choriokarcinomové buňky	BeWo b30
Centrální nervový systém	Potkání mozkové endoteliální buňky	EC219
	Lidské mozkové endoteliální buňky	HCEC
	Lidské buňky glioblastomu	LN229
Ledviny	Epiteliální buňky distálního tubulu	MDCK
	Epiteliální buňky proximálního tubulu	LLC-PK
	Opičí ledvinné buňky	COS-1
	Lidské ledvinné buňky	HEK 291

Tabulka 2 - Reprezentativní buněčné linie využitelné pro analýzu toxického potenciálu NPs dle NanoTESTu (přeloženo; upraveno) ^[30]

V důsledku rozvoje v oblasti nanotechnologií došlo během posledních několika desetiletí k radikálnímu nárůstu množství ENPs, jež vstupují do životního prostředí. S tímto nárůstem však vzrostla i rizika působení těchto NPs na živé organismy. Problémem však podle Sajida (2015) není jen jejich (geno)toxický efekt, ale i celkové působení na ekosystém. Jejich působením totiž dochází k ovlivnění atmosférické chemie, globálních klimatických změn a ke globální a regionální migraci biologických druhů a znečišťujících látek, což se z hlediska genotoxicity může zdát bezvýznamné, ovšem vlivem těchto změn může docházet i k ovlivnění lidského zdraví (včetně změn genetického materiálu). Analýza toxicity by se tedy měla zahrnovat i stanovení chování NPs a jejich cyklus v prostředí a vliv tohoto chování na lidské zdraví. ^[29]

1.4.3.2 Doporučený postup samotného testování

Testování toxicity NPs *in vitro* by mělo zahrnovat širokou řadu testů, jež se zaměřují na průkaz různých koncových bodů. Pro posouzení genotoxicity je totiž důležité charakterizovat nejen poškození genetické informace, ale i příjem a transport NPs v buňkách, životaschopnost buněk, oxidační stres, prozánětlivou odpověď a imunotoxicitu. ^[31]

Dle autorů NanoTESTu je po charakterizaci fyzikálně-chemických vlastností nejdůležitější stanovení cytotoxického potenciálu testovaných NPs (1), pomocí testů buněčné proliferace (především MTT, WST-1, či jiných) a jejich možnou indukci tvorby ROS, pomocí fluorescenčních sond (DCF-DA, CM-H₂DCF-DA). Známé-li cytotoxickou koncentraci NPs, lze zjistit míru příjmu a akumulace NPs danými buňkami, v případě expozice necytotoxické koncentrace (2). Tyto parametry lze získat pomocí TEM, či průtokové cytometrie. Jako další bod lze stanovit genotoxický potenciál testovaných NPs (3) pomocí testů genotoxických mechanismů, jež jsou uvedeny v kapitole 1.3.2.1. Vzhledem k širokému spektru poškození genetické informace (od různých lézí DNA, přes poškození genu, až po klastogenní a aneuploidní poškození chromozomů) je Dusinskou (2017) i ostatními autory NanoTESTu (2015) doporučeno, aby testy genotoxicity byly vybírány tak, aby byly pokryty všechny doposud známé primární mechanismy (přímé i nepřímé) genotoxického účinku (v případě projektu NanoTEST byly použity kometový test pro poškození DNA, analýza HPRT genů pro poškození konkrétního genu a mikrojaderný test pro poškození chromozomů). Předposledním krokem je pak testování imunotoxického potenciálu (4) vůči plné krvi, nebo buňkám periferní krve. Během tohoto kroku se testuje buněčná i humorální imunitní odpověď buněk po expozici daným NPs. Některé NPs mohou způsobit zánětlivou reakci a podráždit tak buňky imunitního systému, které ve značné míře začnou produkovat ROS/RNS (základ sekundárního mechanismu genotoxicity). NPs s tímto mechanismem poškození však nemusí vykazovat genotoxický efekt, který lze stanovit klasickými a nejpoužívanějšími *in vitro* testy genotoxicity ^[3]. Tento krok je tedy nezbytně důležitý a měl by být součástí každého testování genotoxicity. Jako poslední bod analýzy uvádí autoři NanoTESTu provedení selektivnějších testů vyžadovaných zvláštními vlastnostmi reprezentativních buněk (5), jako je produkce cytokinů či buněčná lokalizace NPs v buňkách pomocí mikroskopických technik aj. ^{[30]; [31]}

2 PRAKTICKÁ ČÁST

Cílem praktické části této práce bylo stanovit hladiny vybraných biomarkerů oxidativního stresu (celkového GSH a lipidové peroxidace) ve tkáních roupice *Enchytraeus crypticus* exponované ZnO NPs. Roupice byly chovány v agarovém kultivačním médiu a exponovány ZnO NPs o koncentracích 0,5 a 5 mg/kg po dobu 96 hodin za tmy. Pro stanovení zvolených biomarkerů byly využity spektrofotometrické metody stanovení celkového GSH a lipidové peroxidace.

2.1 Příprava agarového gelu s přídavkem Zn NPs

Bylo připraveno 1080 ml 1,5% agaru ve třech varných baňkách (360 ml v jedné baňce). Do první a druhé baňky byl přidán rozpuštěný $ZnCl_2$, tak aby výsledné koncentrace ZnO NPs v agarech byly 0,5 a 5 mg/kg. Obsah všech baňek byl okyselen fosfátovým pufrem na výsledné pH 7. Agar byl poté vařen při 95 °C po dobu 30 minut. Horký agar byl rozlit do 12 petriho misek, včetně víček (4 misky pro každou koncentraci Zn^{2+} + 4 misky pro kontrolu).

2.2 Úprava modelového organismu před testováním

Jako modelové organismy pro *in vitro* sledování oxidativního stresu (konkrétně sledování hladiny glutathionu a stanovení koncentrace MDA) byly použity roupice (konkrétně rod *Enchytraeus crypticus*). Do každé z 12 půd bylo přeneseno 30 roupic. Inkubace roupic se ZnO NPs probíhala 96 hodin za tmy v ledničce. Po inkubaci byly roupice spočítány, vymyty v destilované vodě, zváženy a uloženy na 24 hodin do mrazáku při teplotě -80 °C. Již počet přeživších roupic poukazuje na toxicitu daných NPs (viz tabulka 3).

Koncentrace Zn NPs [mg/kg]	Počet přeživších roupic [ks]	Hmotnost přeživších roupic [mg]
0 (kontrola)	119	115
0,5	116	107,5
5	69	48,4

Tabulka 3 - Počet přeživších roupic vystavených daným koncentracím Zn NPs

K pozvolna rozmraženým vzorkům byl přidán PBS (pH 7,2) v poměru 100 μ l/10 mg vzorku a vzniklá směs byla homogenizována pomocí homogenizéru.

2.3 Biochemické testy

Tři zhomogenizované vzorky byly poté podrobeny biochemickým testům, z jejichž výsledků lze odhadnout míru oxidačního stresu. Konkrétně se jednalo o stanovení hladiny GSH, jako jednoho z nejdůležitějších antioxidantů, jehož hladina se významně mění v závislosti na koncentraci RS, a MDA, jakožto koncového produktu lipidové peroxidace. Principy obou stanovení jsou popsány výše. Koncentrace těchto látek pak byly vztaženy na hladiny celkových proteinů jednotlivých vzorků, které byly rovněž stanoveny v rámci tohoto testu.

2.3.1 Stanovení celkového proteinu

Ke stanovení celkového proteinu v jednotlivých vzorcích roupic byly potřeba Lowryho reagensie, jež byly rozpuštěny ve vodě, Folin & Ciocalteu's fenolový pracovní roztok a roztok standardu BSA o koncentraci 400 µg/ml.

Z roztoku standardu BSA byla nejprve dvojkovým ředěním sestavena kalibrační řada. Ke 100 µl vody v 96jamkové mikrotitrační destičce byly napipetovány dané objemy standardu BSA (viz tabulka 4). Pro zachování stejného objemu kapaliny ve všech jamkách, bylo z jamky B6 odpipetováno 100 µl zředěného roztoku do odpadu.

Jamka	B1	B2	B3	B4	B5	B6
Množství standardu BSA [µl]	200	100 z B1	100 z B2	100 z B3	100 z B4	100 z B5
Množství H ₂ O [µl]	0	100	100	100	100	100
Koncentrace BSA [µg/ml]	400	200	100	50	25	12,5

Tabulka 4 - Příprava roztoků kalibrační řady BSA (celkový protein)

Po přípravě kalibrační řady byly jednotlivé vzorky roupic patřičně zředěny vodou (50x) a v objemu 100 µl napipetovány v duplikátu do jamek 96jamkové destičky. Jako blank byla použita destilovaná voda. Do jamek se standardy, vzorky i blankem bylo přidáno 100 µl Lowryho roztoku a vše bylo řádně promícháno během 20minutové inkubace na třepače pod víčkem obaleným alobalem. Poté bylo přidáno 50 µl Folin & Ciocalteu's fenolového pracovního roztoku a destička byla opět inkubována na třepače po dobu 30 minut. Po uplynutí inkubační doby byla změřena absorbance jednotlivých jamek při vlnové délce 680 nm pomocí spektrofotometrické čtečky mikrotitračních destiček (viz tabulka 5 a 6).

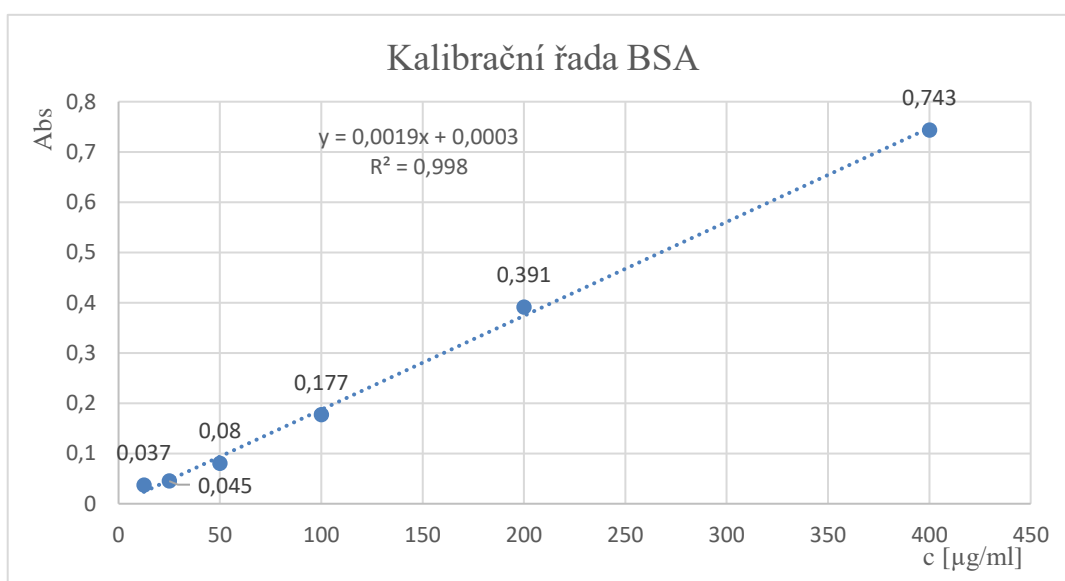
Koncentrace BSA [$\mu\text{g/ml}$]	400	200	100	50	25	12,5
Absorbance	0,743	0,391	0,177	0,08	0,045	0,037

Tabulka 5 - Hodnoty absorbance roztoků kalibrační řady BSA (celkový protein)

Koncentrace Zn NPs [mg/kg]	0 (kontrola)	0,5	5
Absorbance	0,164	0,160	0,188
	0,170	0,193	0,190
Průměr	0,167	0,177	0,189

Tabulka 6 - Hodnoty absorbance vzorků (celkový protein)

Z hodnot absorbancí roztoků kalibrační řady byl sestaven graf závislosti absorbance na koncentraci (viz graf 1), z jehož rovnice regrese byly následně dopočítány koncentrace celkového proteinu v jednotlivých vzorcích.



Graf 1 - Kalibrační řada BSA (celkový protein)

$$\text{Abs}_x = 0,0019 \cdot c_x + 0,0003$$

$$c_k = \frac{0,167 - 0,0003}{0,019} \cdot 50 = 4386,84 \mu\text{g/ml} \cong 4,39 \text{ mg/ml}$$

$$c_{0,5} = \frac{0,177 - 0,0003}{0,019} \cdot 50 = 4636,84 \mu\text{g/ml} \cong 4,64 \text{ mg/ml}$$

$$c_5 = \frac{0,189 - 0,0003}{0,019} \cdot 50 = 4965,79 \mu\text{g/ml} \cong 4,97 \text{ mg/ml}$$

2.3.2 Stanovení celkového glutathionu

Ke stanovení celkového GSH bylo potřeba 5% kyseliny 5-sulfosalicylové (SSA), roztok glutathion reduktázy (GR) o koncentraci 400 j/ml, roztok standardu GSH o koncentraci 10 mM, roztok 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoové kyseliny) (DTNB) v DMSO o koncentraci 1,5 mg/ml, NADPH o koncentraci 0,75 mM, a reakční pufr tvořený fosfátovým pufrem a EDTA (pH 7).

Před samotným testem bylo nejprve 40 μ l všech vzorků deproteinizováno pomocí 20 μ l 5% SSA. Vzniklý roztok byl 10 minut inkubován v ledničce a následně 10 minut centrifugován. K analýze hladiny GSH byl využit vzniklý supernatant. Dále byly připraveny roztoky potřebné ke stanovení hladiny GSH. Sypký standard GSH byl rozpuštěn v H₂O, NADPH v reakčním pufru a DTNB v DMSO, tak aby byly získány roztoky o požadované koncentraci daných látek. Dále byl naředěn enzymový roztok GR na koncentraci 6 j/ml pomocí reakčního pufru. Takto zředěný roztok byl využit k přípravě pracovního roztoku (4 ml reakčního pufru, 114 μ l zředěného roztoku GR a 114 μ l roztoku DTNB).

2,5 μ l standardu GSH o koncentraci 10 mM bylo naředěno 500 μ l 5% SSA na koncentraci 50 μ M. Takto naředěný roztok byl dále ředěn dvojkovým ředěním, tak aby vznikla kalibrační řada o šesti roztocích (viz tabulka 7). Pro zachování stejného objemu kapaliny ve všech mikrozkuvkách typu Eppendorf, bylo z poslední mikrozkuvky (E6) odpipetováno 25 μ l zředěného roztoku do odpadu.

Mikrozkuvka Eppendorf	E1	E2	E3	E4	E5	E6
Množství 50 μ M GSH [μ l]	50	25 z E1	25 z E2	25 z E3	25 z E4	25 z E5
Množství 5% SSA [μ l]	0	25	25	25	25	25
Koncentrace GSH [μ mol/l]	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56

Tabulka 7 – Příprava roztoků kalibrační řady GSH (celkový GSH)

Do 96jamkové mikrotitrační destičky byly v objemu 10 μ l napipetovány roztoky kalibrační řady. Dále bylo do destičky napipetováno 10 μ l vzorku a blanku (5% SSA) v duplikátu. Do jamek s danými roztoky bylo přidáno 150 μ l pracovního roztoku a vzniklá směs byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo přidáno 50 μ l roztoku NADPH o koncentraci 0,75 mM. Vše bylo promícháno na třepačce. Na spektrofotometrické čtečce mikrotitračních destiček bylo nastaveno kinetické měření reakce po dobu 5 minut, přičemž intervaly mezi měřeními byly 1 minuta a vlnová délka 412 nm. Na takto připravené čtečce byly měřeny absorbance jednotlivých roztoků (viz tabulka 8).

Koncentrace GSH [μmol/l]	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56
Absorbance (0. minut)	0,035	0,016	0,01	0,003	0,003	0,001
Absorbance (1. minut)	0,048	0,02	0,012	0,006	0,003	0,001
Absorbance (2. minut)	0,06	0,025	0,014	0,007	0,004	0,001
Absorbance (3. minut)	0,071	0,029	0,015	0,007	0,004	0,001
Absorbance (4. minut)	0,085	0,035	0,017	0,008	0,005	0,002
Absorbance (5. minut)	0,099	0,04	0,018	0,008	0,006	0,002

Tabulka 8 - Hodnoty absorbance roztoků kalibrační řady GSH (celkový GSH)

Z daných hodnot absorbance byly vypočítány změny hodnot absorbance za minutu pro roztoky kalibrační řady:

$$\Delta A/min_{50} = \frac{0,099 - 0,035}{5} = 0,0128$$

$$\Delta A/min_{25} = \frac{0,04 - 0,016}{5} = 0,0048$$

$$\Delta A/min_{12,5} = \frac{0,018 - 0,01}{5} = 0,0016$$

$$\Delta A/min_{6,25} = \frac{0,008 - 0,003}{5} = 0,001$$

$$\Delta A/min_{3,125} = \frac{0,006 - 0,003}{5} = 0,0006$$

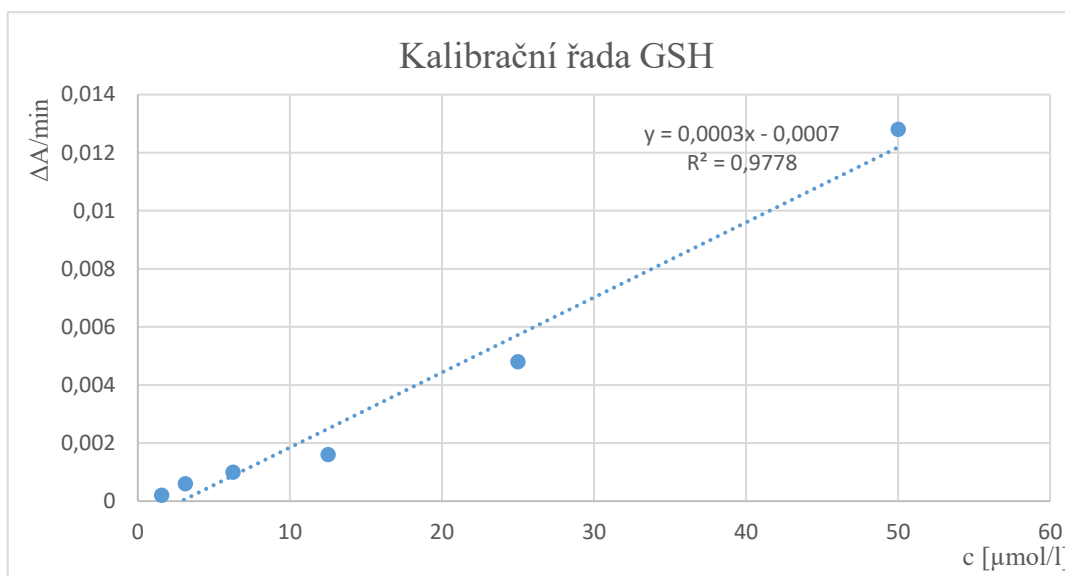
$$\Delta A/min_{1,56} = \frac{0,002 - 0,001}{5} = 0,0002$$

Stejným způsobem byly dopočítány i změny absorbancí roztoků jednotlivých vzorků za minutu (viz tabulka 9).

Koncentrace Zn NPs [mg/kg]	0 (kontrola)	0,5	5
$\Delta\text{Abs}/\text{min}$	0,0054	0,0048	0,0042
	0,0048	0,005	0,0048
Průměr	0,0051	0,0049	0,0045

Tabulka 9 - Hodnoty změny absorbance vzorků za minutu (celkový GSH)

Z vypočítaných hodnot změn absorbance pro roztoky kalibrační řady byl sestaven graf závislosti změny absorbance za minutu (viz graf 2).



Graf 2 - Kalibrační řada GSH (celkový GSH)

Pomocí rovnice regrese daného grafu a vypočtených hodnot změn absorbance pro vzorky byla spočtena koncentrace GSH v testovaných vzorcích:

$$\text{Abs}_x = 0,0003 \cdot c_x - 0,0007$$

$$c_k = \frac{0,0051 - 0,0007}{0,0003} \cdot \frac{60}{40} = 29 \mu\text{mol/l}$$

$$c_{0,5} = \frac{0,0049 - 0,0007}{0,0003} \cdot \frac{60}{40} = 28 \mu\text{mol/l}$$

$$c_5 = \frac{0,0045 - 0,0007}{0,0003} \cdot \frac{60}{40} = 26 \mu\text{mol/l}$$

Takto vypočtené hodnoty koncentrace byly převedeny na koncentrace $\mu\text{mol/ml}$ a vztaženy na mg proteinů jednotlivých vzorků:

$$c_k = \frac{0,029 \mu\text{mol/ml}}{4,39 \text{ mg/ml}} = 0,0066107 \mu\text{mol/mg} \cong 6,6107 \text{ nmol/mg}$$

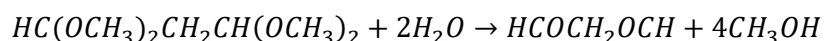
$$c_{0,5} = \frac{0,028 \mu\text{mol/ml}}{4,64 \text{ mg/ml}} = 0,0060386 \mu\text{mol/mg} \cong 6,0386 \text{ nmol/mg}$$

$$c_5 = \frac{0,026 \mu\text{mol/ml}}{4,97 \text{ mg/ml}} = 0,0052358 \mu\text{mol/mg} \cong 5,2358 \text{ nmol/mg}$$

2.3.3 Stanovení lipidové peroxidace

Ke stanovení míry lipidové peroxidace byly potřeba roztok kyseliny thiobarbiturové (TBA) v koncentrované kyselině octové, roztok 1,1,3,3-tetramethoxypropenu (TMP), roztok butylhydroxytoluenu (BHT) a roztok 1-butanolu.

Nejprve byl připraven reakční roztok TBA v koncentrované kyselině octové (25 mg pevného TBA na 7,5 ml kys. octové, doplněno H_2O na 25 ml). Poté byl připraven roztok standardu MDA o koncentraci $500 \mu\text{mol/l}$. Z důvodu nestability MDA bylo pro přípravu zásobního roztoku využito TMP (8,3 μl TMP na 100 ml H_2O), který se ve vodném prostředí přeměňuje na MDA podle následující rovnice:



Takto připravený roztok byl zředěn 1:4 destilovanou vodou na koncentraci $100 \mu\text{mol/l}$.

Z naředěného roztoku standardu MDA byla připravena kalibrační řada. Roztok MDA byl ředěn dvojkovým ředěním, tak aby vznikla kalibrační řada o šesti roztocích (viz tabulka 10). Pro zachování stejného objemu kapaliny ve všech mikrozkušavkách typu Eppendorf, bylo z poslední mikrozkušavky (E6) odpipetováno 200 μl zředěného roztoku do odpadu.

Mikrozkušavka Eppendorf	E1	E2	E3	E4	E5	E6
Množství standardu MDA [μl]	400	200 z E1	200 z E2	200 z E3	200 z E4	200 z E5
Množství H_2O [μl]	0	200	200	200	200	200
Koncentrace MDA [$\mu\text{mol/l}$]	100	50	25	12,5	6,25	3,125

Tabulka 10 - Příprava roztoků kalibrační řady MDA (lipidová peroxidace)

Ke stanovení MDA ve vzorcích bylo využito nezředěných homogenátů jednotlivých vzorků, které byly v objemu 200 μ l pipetovány zvlášť do mikrozkušavek. K tomuto objemu byly přidány ještě 3 μ l BHT jako antioxidačního činidla při zahřívání. Ke vzorkům, blanku (H_2O) a roztokům kalibrační řady bylo přidáno 600 μ l roztoku TBA. Všechny vzniklé směsi byly promíchány na vortexu a inkubovány při 95 °C po dobu 60 minut v digestoři. Po inkubaci a schlazení roztoků na pokojovou teplotu byla každá mikrozkušavka Eppendorf doplněna 300 μ l 1-butanolu a centrifugována při 16 000 \times g po dobu 3 minut. Ke stanovení bylo odebráno 150 μ l butanolové vrstvy, ve které byl extrahován barevný addukt MDA–TBA do 96jamkové mikrotitrační destičky. Absorbance byla opět měřena pomocí spektrofotometrické čtečky mikrotitračních destiček při vlnových délkách 532, 485 a 560 nm (viz tabulky 11 a 12).

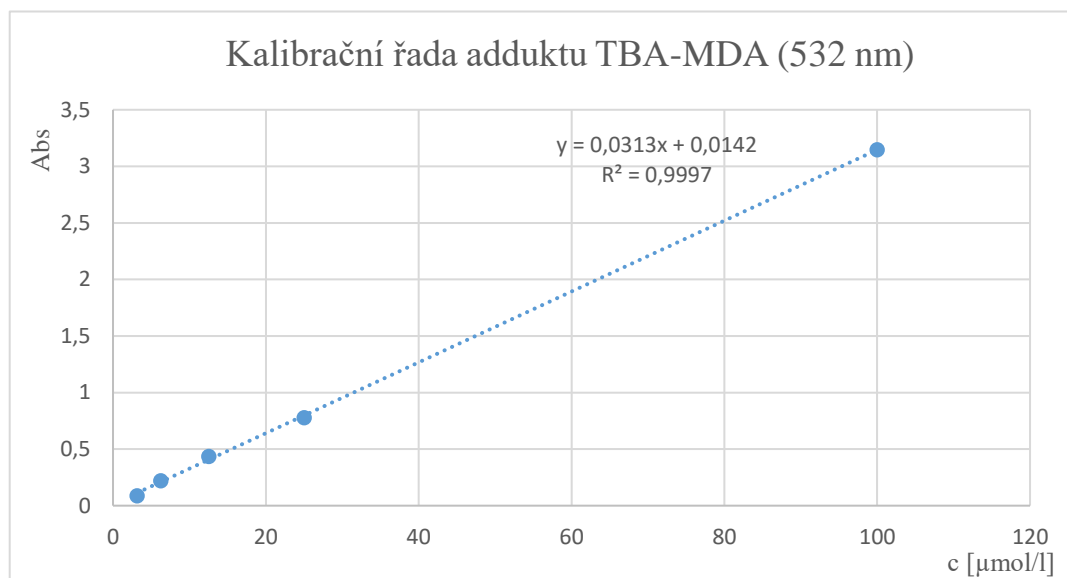
Koncentrace MDA [μ mol/l]	100	50	25	12,5	6,25	3,125
Absorbance (532 nm)	3,147	2,128	0,778	0,437	0,221	0,088
Absorbance (485 nm)	0,541	0,282	0,091	0,045	0,024	0,001
Absorbance (560 nm)	0,246	0,134	0,036	0,015	0,008	-0,009

Tabulka 11 - Hodnoty absorbance roztoků kalibrační řady adduktu TBA-MDA (lipidová peroxidace)

Koncentrace Zn NPs [mg/kg]	0 (kontrola)	0,5	5
Absorbance (532 nm)	0,060	0,076	0,091
Absorbance (485 nm)	0,037	0,045	0,061
Absorbance (560 nm)	0,001	0,006	0,026

Tabulka 12 - Hodnoty absorbance vzorků (lipidová peroxidace)

Z hodnot absorbancí roztoků kalibrační řady při vlnové délce 532 nm byl sestaven graf závislosti absorbance na koncentraci (viz graf 3), z jehož rovnice regrese byly následně dopočítány koncentrace MDA v jednotlivých vzorcích. Z důvodu vysoké odchylky hodnoty absorbance roztoku o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ od lineárního průběhu spojnice trendu, byla tato hodnota při tvorbě grafu a dalších výpočtech vynechána.



Graf 3 - Kalibrační řada adduktu TBA-MDA (532 nm) (lipidová peroxidace)

$$\text{Abs}_x = 0,0313 \cdot c_x + 0,0142$$

$$c_k = \frac{0,060 - 0,0142}{0,0313} = 1,463 \mu\text{mol/l}$$

$$c_{0,5} = \frac{0,076 - 0,0142}{0,0313} = 1,974 \mu\text{mol/l}$$

$$c_5 = \frac{0,091 - 0,0142}{0,0313} = 2,454 \mu\text{mol/l}$$

Takto vypočtené hodnoty koncentrace byly převedeny na koncentrace $\mu\text{mol/ml}$ a vztaženy na mg proteinů jednotlivých vzorků:

$$c_k = \frac{0,001463 \mu\text{mol/ml}}{4,39 \text{ mg/ml}} = 3,3326 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol/mg} \cong 333,26 \text{ pmol/mg}$$

$$c_{0,5} = \frac{0,001974 \mu\text{mol/ml}}{4,64 \text{ mg/ml}} = 4,2543 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol/mg} \cong 425,43 \text{ pmol/mg}$$

$$c_5 = \frac{0,002454 \mu\text{mol/ml}}{4,97 \text{ mg/ml}} = 4,9376 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol/mg} \cong 493,76 \text{ pmol/mg}$$

Vzhledem k nespecifičnosti reakce TBA s MDA (TBA reaguje i s dalšími látkami obsaženými ve vzorku, např. žlučovými barvivy) byla pro výpočet koncentrace MDA ve vzorcích využita i tzv. Allenova korekce, která danou nespecifičnost eliminuje. Pomocí této korekce byly vypočítány hodnoty korigovaných absorbancí pro roztoky kalibrační řady i vzorky (viz tabulka 13 a 14).

$$Abs_{kor} = Abs_{532} - [(Abs_{560} - Abs_{485}) \cdot 0,63 + Abs_{485}]$$

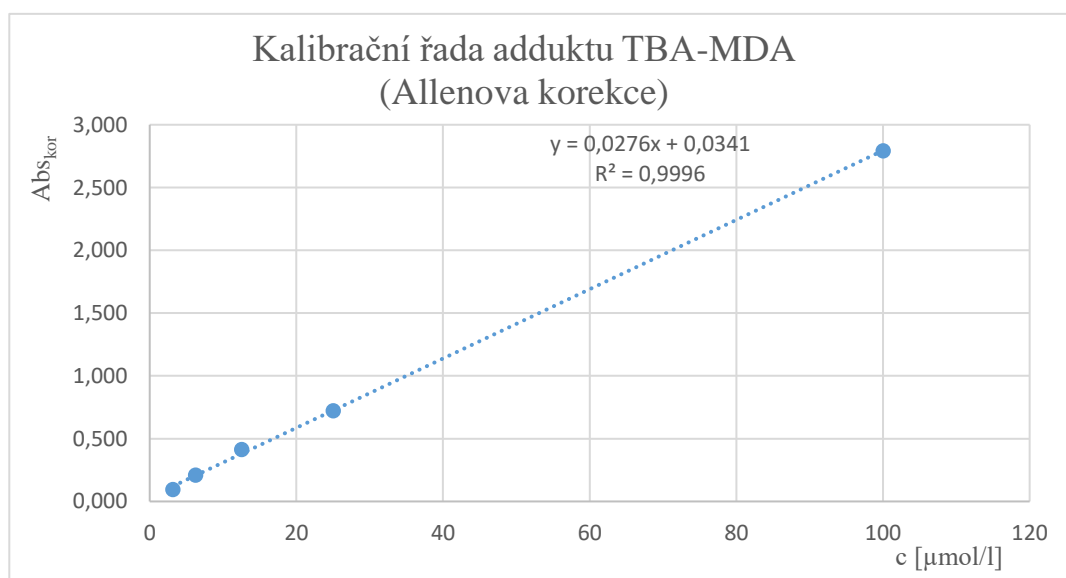
Koncentrace MDA [$\mu\text{mol/l}$]	100	25	12,5	6,25	3,125
Korigovaná absorbance	2,792	0,722	0,411	0,207	0,093

Tabulka 13 - Hodnoty korigované absorbance roztoků kalibrační řady adduktu TBA-MDA (lipidová peroxidace)

Koncentrace Zn NPs [mg/kg]	0 (kontrola)	0,5	5
Korigovaná absorbance	0,046	0,056	0,052

Tabulka 14 - Hodnoty korigované absorbance vzorků (lipidová peroxidace)

Z hodnot korigované absorbance roztoků kalibrační řady byl také sestrojen graf závislosti daných absorbancí na koncentraci (viz graf 4), z jehož rovnice regrese byly vypočteny hodnoty korigovaných koncentrací MDA ve vzorcích.



Graf 4 - Kalibrační řada adduktu TBA-MDA (Allenova korekce) (lipidová peroxidace)

$$\text{Abs}_x = 0,0276 \cdot c_x + 0,0341$$

$$c_k = \frac{0,046 - 0,0341}{0,0276} = 0,4312 \mu\text{mol/l}$$

$$c_{0,5} = \frac{0,056 - 0,0341}{0,0276} = 0,7779 \mu\text{mol/l}$$

$$c_5 = \frac{0,052 - 0,0341}{0,0276} = 0,6504 \mu\text{mol/l}$$

Tyto hodnot byly opět vztaženy na mg proteinů jednotlivých vzorků:

$$c_k = \frac{4,312 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol/ml}}{4,39 \text{ mg/ml}} = 9,822 \cdot 10^{-5} \mu\text{mol/mg} \cong 98,22 \text{ pmol/mg}$$

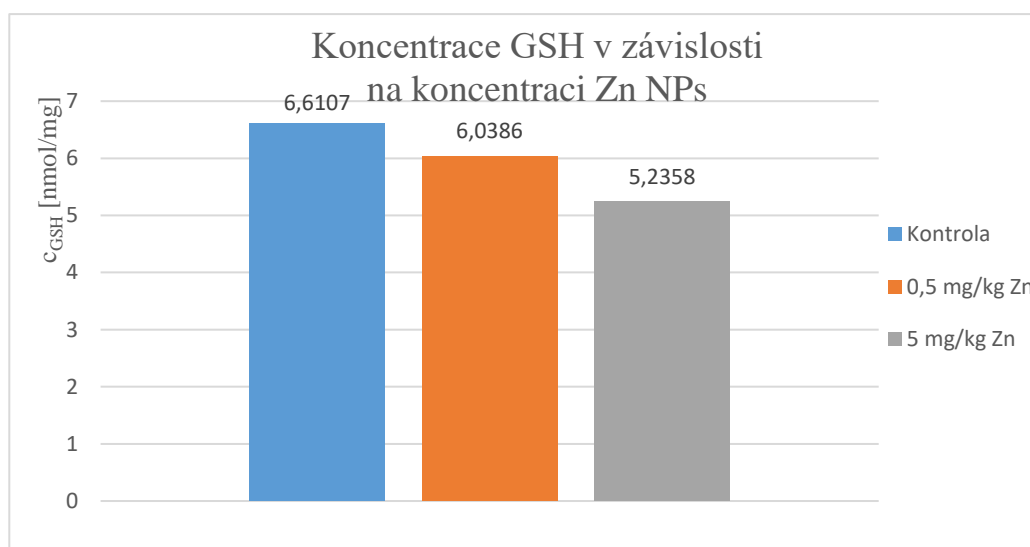
$$c_{0,5} = \frac{7,779 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol/ml}}{4,64 \text{ mg/ml}} = 1,6765 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol/mg} \cong 167,65 \text{ pmol/mg}$$

$$c_5 = \frac{6,504 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol/ml}}{4,97 \text{ mg/ml}} = 1,3087 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol/mg} \cong 130,87 \text{ pmol/mg}$$

2.4 Výsledky a hodnocení

2.4.1 Stanovení celkového glutathionu

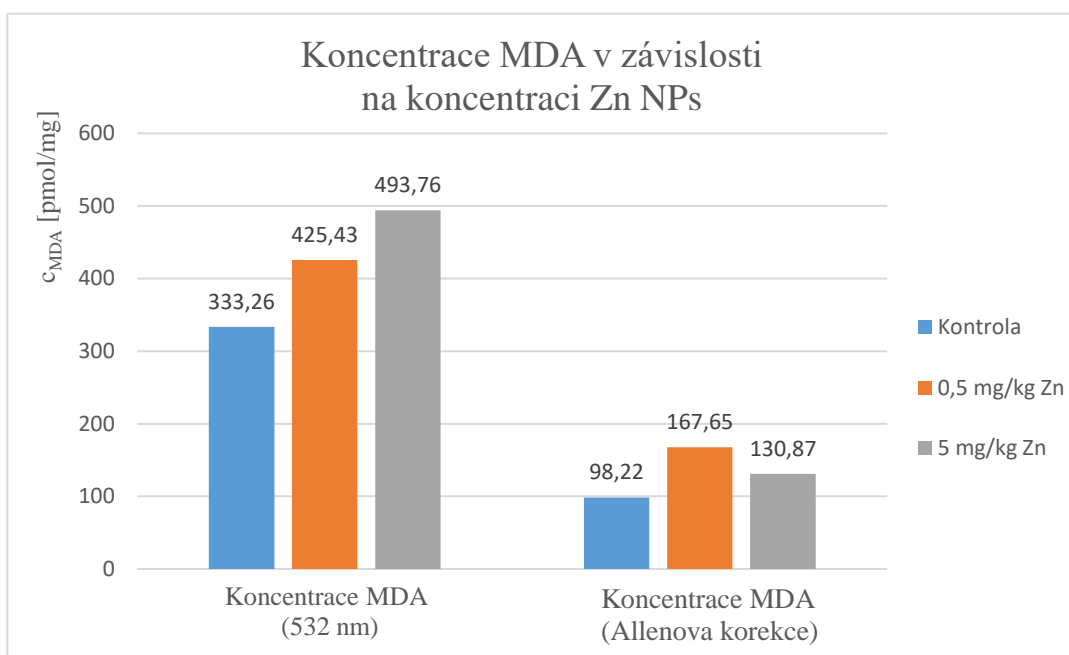
Jak ukazuje graf 5, koncentrace glutathionu v roupicích klesá v závislosti na koncentraci ZnO NPs v živné půdě. Při expozici ZnO NPs o koncentraci 0,5 mg/kg klesla koncentrace GSH o 8,65 %, při expozici desetinásobné koncentrace daných NPs (5 mg/kg ZnO NPs) klesla koncentrace GSH až o 20,8 %.



Graf 5 - Koncentrace GSH v závislosti na koncentraci Zn NPs

2.4.2 Stanovení lipidové peroxidace

Z grafu 6 je patrné, že expozice ZnO NPs indukuje zvýšení míry lipidové peroxidace. Vezmeme-li v úvahu hodnoty koncentrace MDA získané výpočtem z rovnice regrese kalibrační řady TBA-MDA (532 nm), pozorujeme zvýšení koncentrace MDA (zvýšení lipidové peroxidace) v závislosti na zvyšující se koncentraci ZnO NPs v živném médiu (o 27,65 % při expozici 0,5 mg/kg ZnO NPs a 48,16 % při expozici 5 mg/kg ZnO NPs vůči kontrolnímu vzorku). Je ovšem zapotřebí brát v úvahu tvorbu dalších barevných adduktů TBA s látkami obsaženými ve vzorku, jejichž koncentrace se může také měnit. Z tohoto důvodu byla použita Allenova korekce. Na základě koncentrací získaných pomocí této metody byl zjištěn nárůst lipidové peroxidace při expozici ZnO NPs, ovšem nikoliv v závislosti na zvyšující se koncentraci NPs. Koncentrace MDA při expozici 5 mg/kg Zn NPs byla nižší než koncentrace MDA při expozici 0,5 mg/kg Zn NPs. Obě hodnoty jsou ale vyšší než hodnota koncentrace MDA v kontrolním vzorku (o 70,69 % při expozici 0,5 mg/kg ZnO NPs a 33,24 % při expozici 5 mg/kg ZnO NPs).



Graf 6 - Koncentrace MDA v závislosti na koncentraci Zn NPs

2.5 Závěr

Tento test byl prováděn za účelem vyhodnocení toxicity ZnO NPs. Po 96 hodinové inkubaci *Enchytraeus crypticus* se ZnO NPs o koncentraci 0,5 a 5 mg/kg byla zjištěna zvýšená úmrtnost daných roupic v závislosti na koncentraci NPs (úmrtnost 2,52 % po inkubaci roupic se ZnO NPs o koncentraci 0,5 mg/kg a 42,02 % po inkubaci roupic se ZnO NPs o koncentraci 5 mg/kg ve srovnání s kontrolním vzorkem). Na základě biochemických testů bylo dále zjištěno, že po expozici NPs dochází k výraznému poklesu koncentrace GSH v závislosti na koncentraci NPs, a také ke zvýšení míry lipidové peroxidace. Na základě těchto výsledků lze jednoznačně říci, že expozice ZnO NPs je spojena se zvýšenou tvorbou ROS a tyto NPs tedy mají toxický účinek.

3 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] GUERARD, M., et al. Assessment of mechanisms driving non-linear dose–response relationships in genotoxicity testing. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2015, 763: 181-201.
- [2] FU, Peter P., et al. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *Journal of food and drug analysis*, 2014, 22.1: 64-75.
- [3] DONALDSON, Ken; POLAND, Craig A.; SCHINS, Roel PF. Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: criteria for improved test strategies. *Nanotoxicology*, 2010, 4.4: 414-420.
- [4] MAGDOLENOVA, Zuzana, et al. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, 2014, 8.3: 233-278.
- [5] SINGH, Neenu, et al. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 2009, 30.23: 3891-3914.
- [6] GATOO, Manzoor Ahmad, et al. Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations. *BioMed research international*, 2014, 2014.
- [7] GOODMAN, Catherine M., et al. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate chemistry*, 2004, 15.4: 897-900.
- [8] SCHINS, Roel. et al. Genotoxicity of nanoparticles. *Nanomaterials*, 2013, 60-64.
- [9] MARQUIS, Bryce J., et al. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. *Analyst*, 2009, 134.3: 425-439.
- [10] KROLL, Alexandra, et al. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. *European journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009, 72.2: 370-377.
- [11] ARORA, Sumit; RAJWADE, Jyutika M.; PAKNIKAR, Kishore M. Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicology and applied pharmacology*, 2012, 258.2: 151-165.
- [12] HAYASHI, Makoto. The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test—. *Genes and Environment*, 2016, 38.1: 18.
- [13] KROLL, Alexandra, et al. Cytotoxicity screening of 23 engineered nanomaterials using a test matrix of ten cell lines and three different assays. *Particle and fibre toxicology*, 2011, 8.1: 9.
- [14] BARILLET, S., et al. In vitro evaluation of SiC nanoparticles impact on A549 pulmonary cells: cyto-, genotoxicity and oxidative stress. *Toxicology letters*, 2010, 198.3: 324-330.

- [15] MAGDOLENOVA Z, BILANIČOVÁ D, POJANA G, HUDECOVA A, HASPLOVA K, et al. Impact of agglomeration and different dispersions of titanium dioxide nanoparticles on the human related in vitro cytotoxicity and genotoxicity. *J Environ Monit*, 2012, 14:455–464.
- [16] KUMAR, Ashutosh a Alok DHAWAN. Genotoxic and carcinogenic potential of engineered nanoparticles: an update. *Archives of Toxicology.Archiv Für Toxikologie*[online]. 2013, vol. 87, no. 11, s. 1883-900. ISSN 0340-5761.
- [17] MOLLICK, Md Masud Rahaman, et al. Studies on green synthesized silver nanoparticles using *Abelmoschus esculentus* (L.) pulp extract having anticancer (in vitro) and antimicrobial applications. *Arabian journal of chemistry*, 2015.
- [18] HANOT-ROY, Maïté, et al. Oxidative stress pathways involved in cytotoxicity and genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on cells constitutive of alveolo-capillary barrier in vitro. *Toxicology in vitro*, 2016, 33: 125-135.
- [19] IVASK, Angela, et al. Toxicity of 11 metal oxide nanoparticles to three mammalian cell types in vitro. *Current topics in medicinal chemistry*, 2015, 15.18: 1914-1929.
- [20] LEBEDOVÁ, Jana, et al. Size-dependent genotoxicity of silver, gold and platinum nanoparticles studied using the mini-gel comet assay and micronucleus scoring with flow cytometry. *Mutagenesis*, 2017, 33.1: 77-85.
- [21] CHATTOPADHYAY, Sourav, et al. Toxicity of cobalt oxide nanoparticles to normal cells; an in vitro and in vivo study. *Chemico-biological interactions*, 2015, 226: 58-71.
- [22] GAJEWICZ, Agnieszka, et al. Towards understanding mechanisms governing cytotoxicity of metal oxides nanoparticles: Hints from nano-QSAR studies. *Nanotoxicology*, 2015, 9.3: 313-325.
- [23] SADIQ, Rakhshinda, et al. In vitro toxicological assessment of iron oxide, aluminium oxide and copper nanoparticles in prokaryotic and eukaryotic cell types. *Drug and chemical toxicology*, 2015, 38.2: 152-161.
- [24] KARLSSON, Hanna L., et al. Can the comet assay be used reliably to detect nanoparticle-induced genotoxicity?. *Environmental and molecular mutagenesis*, 2015, 56.2: 82-96.
- [25] AHMED, Kausar B. Riaz, et al. Silver nanoparticles: significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. *Toxicology in Vitro*, 2017, 38: 179-192.
- [26] HORIE, Masanori; FUJITA, Katsuhide. Toxicity of metal oxides nanoparticles. In: *Advances in molecular toxicology*. Elsevier, 2011. p. 145-178.

- [27] WICH, Peter R. Size-comparison-Bio-nanoparticles nanometer scale comparison nanoparticle size comparison nanotechnology chart ruler. In: *WICHLab* [online]. [cit. 2018-02-18]. Dostupné z: <http://www.wichlab.com/nanometer-scale-comparison-nanoparticle-size-comparison-nanotechnology-chart-ruler-2/>
- [28] MARNETT, Lawrence J. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1999, 424.1: 83-95.
- [29] SAJID, Muhammad, et al. Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22.6: 4122-4143.
- [30] DUSINSKA, M., et al. Towards an alternative testing strategy for nanomaterials used in nanomedicine: lessons from NanoTEST. *Nanotoxicology*, 2015, 9.sup1: 118-132.
- [31] DUSINSKA, Maria, et al. Immunotoxicity, genotoxicity and epigenetic toxicity of nanomaterials: New strategies for toxicity testing?. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 109: 797-811.
- [32] GUPTA, Ramesh C. (ed.). 27.6.4 In vitro Micronucleus Assay. *Nutraceuticals: efficacy, safety and toxicity*. Academic Press, 2016. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt010V6491/nutraceuticals-efficacy/in-vitro-micronucleus>
- [33] GURR, Jia-Ran, et al. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, 2005, 213.1-2: 66-73.
- [34] POLAND, Craig A., et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nature nanotechnology*, 2008, 3.7: 423.
- [35] HEIDEN, Tisha C. King, et al. Developmental toxicity of low generation PAMAM dendrimers in zebrafish. *Toxicology and applied pharmacology*, 2007, 225.1: 70-79.
- [36] BHATTACHARJEE, Sourav, et al. Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity of organic monolayer-coated silicon nanoparticles towards macrophage NR8383 cells. *Particle and fibre toxicology*, 2010, 7.1: 25.