

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

**Biomarkery oxidativního stresu využitelné při vyhodnocování testů
ekotoxicity nanočástic na roupici *Enchytraeus crypticus***

Bc. Eliška Konopáčová

Diplomová práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eliška Konopáčová**
Osobní číslo: **C15616**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Biomarkery oxidativního stresu využitelné při vyhodnocování testů ekotoxicity nanočástic na roupici *Enchytraeus crypticus***
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. Vypracujte literární rešerši shrnující problematiku mechanismů vzniku oxidativního stresu na buněčné úrovni. Diskutujte možné dopady zvýšeného výskytu volných radikálů a reaktivních forem kyslíku (ROS) či dusíku (RNS) na jednotlivé biochemické procesy v buňkách. Zvláštní důraz věnujte procesům, které jsou charakteristické pro organismus kroužkovců.
2. Popište hlavní biomarkery prakticky využitelné pro hodnocení míry oxidativního stresu a míry poškození buněk vyvolané tímto procesem. Popište principy stanovení těchto biomarkerů. Zvláštní pozornost věnujte problematice přípravy a zpracování vzorků tkání kroužkovců.
3. Pokuste se navrhnout metodiku hodnocení biomarkerů oxidativního stresu prakticky využitelnou v rámci testů ekotoxicity nanomateriálů prováděných na kroužkovci *Enchytraeus crypticus* kultivovaném v agarových živných médiích. Zdůvodněte výběr jednotlivých analytických postupů a diskutujte jejich metrologické vlastnosti (detekční limit, reprodukovatelnost, rozsah apod.).

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Miloslav Pouzar, Ph.D.**

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Konzultant diplomové práce: **Ing. Kateřina Hrdá**

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

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

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena 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 jinému 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Bc. Eliška Konopáčová

ANOTACE

Cílem předložené diplomové práce byl výběr a optimalizace ekonomicky nenáročných biochemických testů pro citlivou detekci oxidativního stresu způsobeného nanočásticemi ZnO. Teoretická část práce se zabývá využitím a možnou toxicitou nanočástic ZnO. Dále jsou v ní rozebrány mechanismy indukce oxidativního stresu a nejběžnější způsoby jeho detekce. Pozornost je věnována především biochemickým testům, které jsou použitelné pro půdní bezobratlé. Experimentální část práce se dělí na dvě důležité podkapitoly, jimiž jsou optimalizace vybraných biochemických metod (protein, celkový glutation, malondialdehyd) pro použití na roupicích *Enchytraeus crypticus* a testy toxicity rozpustného ZnCl₂ a nanočástic ZnO dispergovaných v agarovém médiu, při kterých je navržený zoptimalizovaný postup prakticky vyzkoušen.

KLÍČOVÁ SLOVA

Oxidativní stres, malondialdehyd, glutation, *Enchytraeus crypticus*, nanočástice

TITLE

Biomarkers of oxidative stress applicable within evaluating ecotoxicity tests of nanoparticles on annelid *Enchytraeus crypticus*

ANNOTATION

The aims of this diploma thesis were to select and optimize low cost biochemical methods for a sensitive detection of oxidative stress caused by ZnO nanoparticles. The theoretical part deals with the application and potential toxicity of ZnO nanoparticles. Furthermore, mechanisms of oxidative stress induction and the most common options of detection are discussed. The main focus is given on biochemical tests that are applicable to soil invertebrates. The experimental part consists of two important subchapters that are an optimization of selected biochemical methods (protein, total glutathione, malondialdehyde) for usage on soil worm *Enchytraeus crypticus* and toxicity tests soluble ZnCl₂ and ZnO nanoparticles dispersed in agar medium where the optimized procedures are practically tested.

KEYWORDS

Oxidative stress, malondialdehyde, glutathion, *Enchytraeus crypticus*, nanoparticles

OBSAH

ÚVOD.....	10
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1.1 Vnitřní redoxní systém organismu.....	11
1.2 Vnější vlivy a oxidativní stres organismu.....	12
1.2.1 Poškození DNA.....	13
1.2.2 Poškození proteinů.....	13
1.2.3 Peroxidace lipidů.....	14
1.2.4 Antioxidační mechanismy.....	15
1.2.4.1 Enzymatické mechanismy.....	15
1.2.4.2 Antioxidanty.....	16
1.3 Testy toxicity průmyslově vyráběných nanočástic.....	16
1.3.1 Nanočástice ZnO.....	19
1.3.2 Vliv nanočástic na oxidativní stres.....	22
1.3.2.1 Indukce oxidativního stresu prostřednictvím nZnO.....	25
1.4 Možnosti detekce oxidativního stresu u bezobratlých.....	26
1.4.1 Detekce peroxidace lipidů.....	28
1.4.2 Detekce poškození proteinů.....	29
1.4.3 Detekce glutationu.....	29
1.4.4 Detekce antioxidačních enzymů.....	30
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
2.1 Cíle experimentální práce.....	32
2.2 Chov roupic <i>Enchytraeus crypticus</i>	32
2.3 Optimalizace postupu stanovení jednotlivých biomarkerů.....	33
2.3.1 Stanovení celkového proteinu.....	34
2.3.1.1 Proces optimalizace stanovení celkového proteinu.....	35
2.3.1.2 Výsledný postup stanovení celkového proteinu.....	36

2.3.2	Stanovení celkového glutationu.....	37
2.3.2.1	Proces optimalizace stanovení celkového glutationu	38
2.3.2.2	Výsledný postup stanovení celkového glutationu	39
2.3.3	Stanovení lipidní peroxidace	40
2.3.3.1	Proces optimalizace stanovení lipidní peroxidace.....	40
2.3.3.2	Výsledný postup stanovení lipidní peroxidace.....	41
2.4	Stanovení biomarkerů oxidativního stresu v rámci testů toxicity různých forem Zn na <i>E. crypticus</i>	43
2.4.1	Testování toxicity ZnCl ₂	43
2.4.2	Testování toxicity nZnO	44
3	VÝSLEDKY A DISKUSE	47
3.1	Optimalizace stanovení proteinu.....	47
3.2	Optimalizace stanovení celkového glutationu	51
3.3	Optimalizace stanovení malondialdehydu	52
3.4	Testy toxicity ZnCl ₂ - 4 a 7 dní ZnCl ₂ (0,1; 0,5; 1,0 a 5,0 mg Zn/kg).....	56
3.4.1	Čtyřdenní test toxicity ZnCl ₂	56
3.4.2	Sedmidenní test toxicity ZnCl ₂	61
3.5	Testy toxicity nZnO - 7 dní nZnO (3 a 30 mg Zn/kg)	65
4	ZÁVĚR	69
	SEZNAM CITACÍ	70

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Varianty nanostruktur ZnO, které lze získat při změně podmínek syntézy z ZnO (s) (Wang, 2004).	20
Obrázek 2: Mechanismus indukce apoptózy vyvolané působením nZnO na buňku: (a) působení ROS, (b) interakce nZnO s buňkou (Mishra et al., 2017).	21
Obrázek 3: Nanočásticemi indukovaný oxidativní stres (Manke et al., 2013)	23
Obrázek 4: Shrnutí působení ROS na biomolekuly (Fu et al., 2014)	24
Obrázek 5: Cytotoxické mechanismy nZnO (Hou et al., 2018)	25
Obrázek 6: Komplex bílkoviny s mědí vznikající Biuretovou reakcí	35

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Změny hladin enzymů po vícedenní expozici 500 mg Zn/kg půdy (Xiong et al., 2013).	26
Tabulka 2: Využitelnost biomarkerů při testování toxicity látek na kroužkovicích	28
Tabulka 3: Příprava kalibrační řady pro BSA	36
Tabulka 4: Příprava kalibrační řady pro GSH	39
Tabulka 5: Příprava kalibrační řady pro MDA	42
Tabulka 6: Přepočítání testovaných koncentrací po zohlednění odpařené vody	46
Tabulka 7: Kalibrační řada pro test vhodného zředění vzorku pro analýzu proteinu	47
Tabulka 8: Absorbance různého zředění vzorku při měření celkového proteinu	47
Tabulka 9: Data kalibrační řady BSA pro určení LOD a LOQ	48
Tabulka 10: LOD a LOQ pro stanovení celkového proteinu	48
Tabulka 11: Mechanická homogenizace na vortexu	50
Tabulka 12: Homogenizace vzorku ultrazvukovým homogenizátorem	50
Tabulka 13: Kalibrační řada pro test zředění vzorku pro analýzu TG	51
Tabulka 14: Odezva různě zředěných vzorků z chovu při výběru nejvhodnějšího zředění	51
Tabulka 15: Kalibrační řada MDA při vlnové délce 532 nm a při vypočítané korigované hodnotě absorbance	52
Tabulka 16: Hodnoty LOD a LOQ pro stanovení MDA z grafu závislosti absorbance na koncentraci při vlnové délce 532 nm	53
Tabulka 17: Výsledky absorbance vzorku při změně jeho množství vstupujícího do reakce	54
Tabulka 18: Hladina TG u vzorků roupic exponovaných 4 dny ZnCl ₂ (0,5 a 5,0 mg Zn/kg)	58

Tabulka 19: Průměrná hodnota MDA pro roupičice exponované 4 dny ZnCl ₂ (0,5 a 5,0 mg Zn/kg).....	59
Tabulka 20: Hladina TG u vzorků roupičic exponovaných 7 dní ZnCl ₂ (0,5 a 5,0 mg Zn/kg)...	62
Tabulka 21: Průměrná hodnota MDA pro roupičice exponované 7 dní ZnCl ₂ (0,5 a 5,0 mg Zn/kg).....	63
Tabulka 22: Hladina TG u vzorků roupičic exponovaných 7 dní nZnO (3 a 30 mg Zn/kg)	65
Tabulka 23: Průměrná hodnota MDA pro roupičice exponované 7 dní (3 a 30 mg Zn/kg).....	66

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Zobrazení LOD a LOQ v grafu kalibrace BSA.....	49
Graf 2: Zobrazení LOD a LOQ v grafu kalibrace pro MDA.....	53
Graf 3: Degradace MDA při opakovaném zvýšení teploty v mrazicím boxu	55
Graf 4: Viabilita roupičic (%): expozice 4 dny ZnCl ₂ (0,1; 0,5 a 1,0 a 5,0 mg Zn/kg).....	57
Graf 5: Koncentrace TG u <i>E. crypticus</i> exponovaných 4 dny ZnCl ₂ o koncentracích 0,5 a 5,0 mg Zn/kg.....	58
Graf 6: Hladina MDA (vypočtená z absorpance při 532 nm) u <i>E. crypticus</i> u exponovaných 4 dny ZnCl ₂ o koncentraci 0,5 a 5,0 mg Zn/kg.....	60
Graf 7: Hladina MDA (vypočtená z korigované absorpance) u <i>E. crypticus</i> u exponovaných 4 dny ZnCl ₂ o koncentraci 0,5 a 5,0 mg Zn/kg.....	60
Graf 8: Viabilita roupičic (%): expozice 7 dní ZnCl ₂ (0,1; 0,5; 1,0 a 5,0 mg Zn/kg)	61
Graf 9: Koncentrace TG u <i>E. crypticus</i> exponovaných 7 dní ZnCl ₂ o koncentracích 0,5 a 5,0 mg Zn/kg.....	62
Graf 10: Hladina MDA (vypočtená z absorpance při 532 nm) u <i>E. crypticus</i> u exponovaných 7 dní ZnCl ₂ o koncentraci 0,5 a 5,0 mg Zn/kg.....	64
Graf 11: Hladina MDA (vypočtená z korigované absorpance) u <i>E. crypticus</i> u exponovaných 7 dní ZnCl ₂ o koncentraci 0,5 a 5,0 mg Zn/kg.....	64
Graf 12: Viabilita roupičic (%): 7 dní nZnO (3 a 30 mg Zn/kg agaru)	65
Graf 13: Koncentrace TG u <i>E. crypticus</i> exponovaných 7 dní nZnO o koncentraci 3 a 30 mg Zn/kg.....	66
Graf 14: Hladina MDA (vypočtená z absorpance při 532 nm)) u <i>E. crypticus</i> u exponovaných 7 dní nZnO o koncentraci 3 a 30 mg Zn/kg.....	67
Graf 15: Hladina MDA (vypočtená z korigované absorpance) u <i>E. crypticus</i> u exponovaných 7 dní ZnCl ₂ o koncentraci 3 a 30 mg Zn/kg.....	67

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

4-HNE	trans-4-hydroxy-2-noneal
ATP	Adenosintrifosfát
BSA	Fetální bovinní sérum
CAT	Kataláza
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
<i>E.</i>	<i>Enchytraeus</i>
EC ₅₀	Koncentrace vyvolávající konkrétní efekt u 50 % exponovaných jedinců
GC	Plynová chromatografie
GPx	Glutation peroxidáza
GR	Glutation reduktáza
GRAS	Všeobecně považovaný za bezpečný
GSH	Glutation redukovaný
GSSG	Glutation oxidovaný
GST	Glutation-S-transferáza
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s buzením v indukčně vázaném plazmatu
KOR	Hodnota absorbance vypočítaná z korigované rovnice
LC ₅₀	Koncentrace, při níž uhynie 50 % exponovaných jedinců
LOD	Mez detekce

LOQ	Mez stanovitelnosti
LPO	Lipidní peroxidace
MDA	Malondialdehyd
MS	Hmotností spektrometrie
NADPH	Nikotinamidadeninindinukleotidfosfát
NPs	Nanočástice
nZnO	Nanočástice oxidu zinečnatého
OECD	Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj
PBS	Fosfátový pufr
PUFA	Polynenasycená mastná kyselina
RDS	Relativní směrodatná odchylka
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RNS	Reaktivní formy dusíku
SD	Směrodatná odchylka
SOD	Superoxid dismutáza
TBA	Thiobarbituová kyselina
TG	Celkový glutation
TNB	5-thio-2-nitrobenzoová kyselinu

ÚVOD

Průmyslově vyráběné nanočástice se postupem času stávají běžnou součástí životního prostředí. Je proto důležité vytvořit vhodné ekotoxikologické testy, které by napomohly pochopit mechanismus působení jednotlivých nanočástic. Při standardizování expozičního média a postupu jednotlivých stanovení by bylo snazší porovnávat výsledky jednotlivých studií, což by značně urychlilo proces pochopení působení jednotlivých nanočástic na živé organismy.

Hlavním cílem této diplomové práce byl výběr a optimalizace biochemických testů pro stanovení míry oxidativního stresu na modelovém organismu roupici *Enchytraeus (E.) crypticus*. V teoretické části práce jsou popsány způsoby technického využití nanočástic oxidu zinečnatého (nZnO) a potenciální mechanismy jejich toxického účinku. Dále jsou zde zmíněny postupy testování toxicity nanočástic ZnO a metody stanovení míry oxidativního stresu. Pozornost je věnována především těm postupům, které jsou použitelné pro půdní bezobratlé a jsou ekonomicky nenáročné. Je zde zdůvodněn výběr testovacího média i výběr konkrétních biomarkerů pro praktickou část.

V praktické části je popsána příprava chovného i testovacího agarů, postup výběru jedinců pro test a jejich homogenizace pro biochemickou analýzu. Stanovovány byly dva biochemické markery, a to celkový glutation (TG) a lipidní peroxidace (LPO). K těmto biomarkerům bylo nutné stanovit zároveň hodnotu celkového proteinu. Všechna tato stanovení byla stanovení spektrofotometrická. Výsledná hodnota jednotlivých biomarkerů byla udávána jako nmol látky na mg proteinu ve vzorku.

K optimalizaci stanovení byly použity vzorky roupic z chovu. Úpravou postupu došlo ke zkvalitnění homogenizace vzorku, při úpravě kalibračního rozmezí deklarovaného kitem byla stanovena mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ).

Po optimalizaci postupů stanovení vybraných biomarkerů oxidativního stresu a celkového proteinu byly tyto postupy použity pro vyhodnocování reálných vzorků z testů ekotoxicity ZnCl₂ a nZnO. V těchto testech byly roupice exponovány 0,1; 0,5; 1,0 a 5,0 mg Zn/kg ZnCl₂ a 3 a 30 mg Zn/kg nZnO dispergovaným v agarózovém gelu. Kromě TG a LPO byla v případě obou látek hodnocena i změna viability. Viabilita roupic i změna hladin biomarkerů byla sledována v závislosti na zvyšující se koncentraci ZnCl₂ či nZnO. U ZnCl₂ byla tato změna posuzována i při prodloužení času expozice ze 4 na 7 dní.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Vnitřní redoxní systém organismu

Funkční redoxní systém buněk je důležitý pro udržení celkové homeostázy organismu. Základem tohoto redoxního systému je redoxní reakce, při které jedna látka elektron ztrácí a jiná látka elektron přijímá. Látka, která při tomto procesu elektron ztrácí je oxidována a nazývá se redukční činidlo, látka tento elektron přijímající je tímto procesem redukována a nazývá se činidlo oxidační. Chemicky mezi oxidační činidla řadíme veškeré látky, které jsou schopné přijmout elektron a tím se sami redukovat (Kohen and Nyska, 2002).

Za fyziologických podmínek buňka udržuje redoxní rovnováhu prostřednictvím generování a eliminace kyslíkatých či dusíkatých radikálů. Radikály jsou takové částice, které obsahují jeden či více nepárových elektronů. Důsledkem přítomnosti tohoto nepárového elektronu je jejich vysoká nestabilita a reaktivita.

Ke vzniku radikálů v organismu dochází v rámci mnoha fyziologických pochodů, jako jsou např. mitochondriální respirace či zánětlivé reakce. Dalším zdrojem těchto částic jsou také procesy v mikrozomech a peroxisomech, při kterých vzniká především H_2O_2 . Zdrojem reaktivních forem kyslíku (ROS) jsou i membránové vázané enzymy nikotinamidadeninukleotidfosfát (NAD(P)H) oxidáza, cytochrom c oxidáza a xantin oxidáza. K produkci ROS může vést i přítomnost volných redoxně aktivních kovů jako jsou železo či měď (Trachootham et al., 2007, Chaitanya et al., 2016, Kohen and Nyska, 2002). V průběhu zánětlivé reakce vznikají ROS při oxidativním vzplanutí makrofágů (monocytů a neutrofilů). Makrofágy se významně podílejí na likvidaci nebezpečných patogenů (Manke et al., 2013). Udržení homeostázy je zajišťováno prostřednictvím eliminace ROS pomocí složitých antioxidačních mechanismů (Trachootham et al., 2007, Chaitanya et al., 2016, Kohen and Nyska, 2002).

Mezi fyziologicky se vyskytující ROS řadíme především radikál superoxidový ($O_2^{\cdot-}$) a hydroxylový (OH^{\cdot}). Dále je do této skupiny zahrnován i peroxid vodíku (H_2O_2), který svou podstatou radikálem není, avšak je velmi reaktivní. Mezi reaktivní formy dusíku (RNS) patří oxid dusný (NO^{\cdot}) a peroxyinitrit (ONOO) (Trachootham et al., 2007).

Jako majoritní zdroj endogenních ROS se uvádí proces redukce molekulárního kyslíku při mitochondriální respiraci. Při tomto procesu je téměř všechen molekulární kyslík redukován na H_2O za vzniku adenosintrifosfátu (ATP) (Manke et al., 2013). Určitá část

kyslíku ovšem podléhá neúplné redukci, čímž vzniká radikál $O_2^{\cdot-}$. Tento radikál se enzymem superoxid dismutázou (SOD) přeměňuje na H_2O_2 a O_2 , což může iniciovat vznik dalších kyslíkových radikálů. V přítomnosti redukováného přechodného kovu může být H_2O_2 přeměněn na vysoce reaktivní radikál OH^{\cdot} (Trachootham et al., 2007).

1.2 Vnější vlivy a oxidativní stres organismu

Vznik ROS či RNS může být kromě vnitřních procesů indukován i vlivy vnějšími. Mezi exogenní příčiny, vyvolávající vznik radikálů, patří toxické látky či ultrafialové záření (Manke et al., 2013). V důsledku působení těchto vlivů může docházet k nadměrné produkci ROS, což vede k nerovnováze fyziologického redoxního stavu buňky. Antioxidační mechanismy nestíhají vychytávat radikály a napravovat poškození jimi způsobené. Takto vzniklá nerovnováha mezi produkcí ROS a RNS a antioxidační obranou organismu se nazývá **oxidativní stres** (Trachootham et al., 2007, Chaitanya et al., 2016).

Vlivem oxidativního stresu postupně dochází k mnoha patologickým procesům, jak na úrovni buněčné, tak na úrovni organismu. Na úrovni buněčné je to například poškození genetického materiálu a buněčných funkcí. Dochází k oxidativním změnám proteinů, které vedou k vytvoření proteinových radikálů a iniciaci lipidní peroxidace. Všechny tyto procesy mohou vyústit až v buněčnou smrt. Na úrovni organismu sledujeme vznik zánětů, fibrózy tkání či indukci karcinogeneze (Fu et al., 2014).

Důležité je zmínit, že radikály se svou schopností poškozovat buňku prostřednictvím oxidativních procesů liší, a to na základě své reaktivity a poločasu života. Jejich toxicita však nemusí být vždy přímo úměrná jejich reaktivitě. V mnoha případech může být částice s delším poločasem života více toxická než látka s vyšší reaktivitou. Tato skutečnost je způsobena dostatečným časem pro difuzi, během které se látka dostane i do vzdálených lokací v buňce, kde může interagovat a působit oxidativní poškození.

Například velmi reaktivní radikál OH^{\cdot} má velmi krátký poločas života. To znamená, že při svém vzniku v mitochondrii dokáže oxidativně poškozovat biomolekuly pouze v mitochondrii, nedokáže se však dostat do jádra. Pokud se v danou chvíli v okolí nenachází žádný vhodný biologický cíl, radikál oxidativní poškození vůbec nezpůsobí.

Naopak v případě $O_2^{\cdot-}$, který je reaktivní méně, ale má delší poločas života než OH^{\cdot} , má tento radikál dostatek času na to prostupovat skrz mitochondriální membránu do mitochondriálního genomu a tam působit poškození deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Stejně tomu je

i v případě vzniku H_2O_2 v mitochondrii, ze které se tato částice dokáže dostat do cytoplasmy či jádra (Kohen and Nyska, 2002).

1.2.1 Poškození DNA

ROS poškozují buněčné makromolekuly jako jsou lipidy, proteiny a nukleonové kyseliny. Poškození jaderné a mitochondriální DNA je jedním z hlavních mechanismů jejich působení. ROS či RNS způsobují zlomy a cross-linking DNA. Pokud je tvorba ROS vyvolána přítomností nanočástic, může být DNA poškozena i samotnou interakcí NPs s genetickým materiálem.

$OH\cdot$ je schopen způsobovat zlomy jednořetězcové DNA za vzniku **8-hydroxy-2'-deoxyguanosin** DNA produktu. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin se běžně používá jako marker oxidativního poškození DNA (Manke et al., 2013, Fu et al., 2014).

Oxidativní poškození DNA je u lidí spojováno s rozvojem mutagenese, karcinogeneze a s nemocí spojenými se stárnutím jako jsou amyotrofická laterální skleróza, artritida, kardiovaskulární onemocnění, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, diabetes či rakovina (Fu et al., 2014).

1.2.2 Poškození proteinů

Poškození proteinů je způsobováno především radikálem $OH\cdot$ a RNS. Radikály H_2O_2 a $O_2\cdot^-$ poškození proteinů nezpůsobují. Výjimkou jsou proteiny obsahující SH skupinu, takové proteiny mohou být oxidativně poškozeny kromě $OH\cdot$ a RNS i peroxidem vodíku.

Poškození proteinů zahrnuje zejména jejich peroxidaci, změnu terciální struktury, degradaci či fragmentaci. Následkem oxidativního poškození proteinů dochází ke snížení enzymatické aktivity, narušení buněčných funkcí či změně typu a koncentrace buněčných proteinů (Kohen and Nyska, 2002). Aminokyselina tyrosin může reakcí s peroxynitritem či oxidem dusičitým podléhat nitraci (Ho et al., 2013). Charakteristický je také vznik **karbonylových derivátů (aldehydů a ketonů)**, které vznikají oxidativním štěpením proteinových skeletů. Tyto deriváty mohou vznikat například oxidativní deaminací lysinu či glutamátu. Mimo to mohou karbonylové deriváty vznikat také Michaelovou adicí aldehydických produktů peroxidace lipidů, při které se tyto produkty mohou vázat na zbytky aminokyselin lysinu, cysteinu či histidinu.

Dalšími významnými produkty oxidativního poškození proteinů jsou takzvané **konečné produkty glykoxidace**. Konečné produkty glykoxidace jsou heterogenní skupinou molekul

vznikajících neenzymatickou reakcí redukováných cukrů s proteiny, aminokyselinami lipidů či DNA molekulami. Vznikají například reakcí zbytků lysinu či argininu s karbohydráty. Tento proces probíhá běžně jako součást fyziologického metabolismu, avšak během hyperglykémie, hyperlipidémie či při působení oxidačního stresu, je mnohonásobně výraznější (Frijhoff et al., 2015).

1.2.3 Peroxidace lipidů

Lipidy jsou oxidovány třemi rozdílnými mechanismy: enzymaticky, neenzymaticky pomocí volných radikálů a neenzymaticky bez pomoci volných radikálů. Vzniklé produkty poté mohou dále reagovat a poškozovat proteiny a buněčnou DNA (Niki et al., 2005, Marnett, 2002).

Pokud se budeme soustředit pouze na oxidaci pomocí volných radikálů, radikály reagují se zbytky polynenasycených mastných kyselin (PUFA z anglického polyunsaturated fatty acid) a reakce probíhá ve třech stupních, které jsou zobrazeny níže. Mezi důležité PUFA patří především linoleová a arachidonová kyselina.

Tři stupně reakce radikálů s PUFA:

1. **Iniciace** – Přítomnost dvojné vazby v PUFA oslabuje vazbu mezi sousedním uhlíkem a vodíkem. Díky této skutečnosti dokáže ROS H^+ z molekuly odejmout. Vzniklá molekula s jedním nepárovým elektronem se pro zvýšení stability přeskupí do formy konjugovaného dienu.
2. **Propagace** – Následuje reakce s kyslíkem, při které se formuje $ROO\cdot$ radikál. Tento radikál je schopen odebrat H^+ sousední PUFA molekule a způsobit takto řetězovou reakci. V tomto kroku se $ROO\cdot$ může rozkládat za vzniku aldehydu a dalších produktů.
3. **Terminace** – Řetězová reakce je zastavena interakcí dvou $ROO\cdot$ radikálů či reakcí $ROO\cdot$ radikálu s antioxidantem, například s tokoferolem (Kohen and Nyska, 2002).

Během této řetězové reakce může vzniknout mnoho různých, elektrofilně reaktivních, produktů jako jsou například epoxidy a aldehydy (Marnett, 2002, Sigma-Aldrich, MAK085). Za přítomnosti přechodného kovu vzniká z lipidových hydroxyperoxidů lipidový peroxiradikál ($LOO\cdot$) či alkoxyradikál ($LO\cdot$). Postupnou cyklizací či degradací těchto lipidových radikálů vznikají aldehydy. V závislosti na PUFA podstupující peroxidaci vznikají různé produkty. Jsou jimi například **trans-4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)**, **malondialdehyd**

(MDA) či akrolein (Frijhoff et al., 2015). Peroxidací kyseliny arachidonové vznikají isoprostany (Ho et al., 2013).

MDA patří k hlavním biomarkerům používaným pro určení stupně peroxidace lipidů ve tkáních. Je to molekula tělu přirozená, vzniká také jako meziprodukt při biosyntéze prostaglandinů. Ve vysoké koncentraci je to ale molekula mutagenní a karcinogenní a díky svým elektrofilním vlastnostem reaguje s nukleofily uvnitř buněk. MDA může také kondenzovat za vzniku MDA oligomerů, které mohou být taktéž mutagenní. S DNA reaguje za vzniku produktů deoxyguanosinu, deoxyadenosinu a deoxycytidinu. Regulační mechanismus buňky tuto porušenou DNA zpětně opravuje, avšak pokud je v závislosti na vnějších podmínkách zátěž lipidní peroxidací vysoká, může situace vést až k rozvoji rakoviny, Alzheimerovy choroby, aterosklerózy, diabetu, či dalších chorob. Uvádí se, že MDA společně s dalšími produkty LPO patří mezi hlavní endogenní příčiny poškození DNA v lidském těle (Marnett, 2002, Sigma-Aldrich, MAK085).

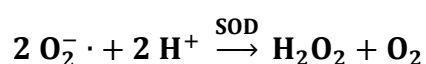
1.2.4 Antioxidační mechanismy

Jako obranu proti oxidativnímu poškození způsobenému nadměrnou produkcí ROS mají buňky vyvinuty antioxidační mechanismy enzymatické i neenzymatické povahy. Tento složitý komplex mechanismů byl pravděpodobně evolučně vyvinut jako obrana proti měnící se koncentraci vzdušného kyslíku v atmosféře (Kohen and Nyska, 2002).

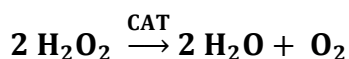
1.2.4.1 Enzymatické mechanismy

Mezi nejvýznamnější enzymy, které jsou součástí antioxidačních mechanismů, patří především NADPH dependentní flavoenzymy: **superoxid dismutáza (SOD)**, **glutathion peroxidáza (GPx)**, a **kataláza (CAT)** (Trachootham et al., 2007). Mezi další enzymy antioxidačního aparátu se řadí také glutathion-S-transferáza (GST), glutathion reduktáza (GR), systém thiredoxin/thioreduktáza a další (Chaitanya et al., 2016, Bernard et al., 2015).

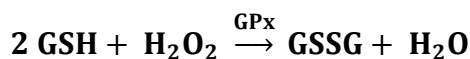
Enzym SOD se vyskytuje v cytosolu i mitochondriích a působí katalyticky při reakci superoxidového radikálu za vzniku peroxid vodíku. Rovnice této reakce je znázorněna níže:



Konečný produkt reakce H_2O_2 následně podléhá reakci za katalýzy enzymem katalázou, při které se rozkládá na kyslík a vodu. Tato reakce však probíhá pouze za vysoké koncentrace H_2O_2 . Reakce je zobrazena zde:



Při nižší koncentraci H_2O_2 je regulace jeho hladiny ovlivňována především reakcí katalyzovanou enzymem glutation peroxidázou. Při této reakci je donorem elektronu nízkomolekulární látka glutation, který patří mezi antioxidanty (Kohen and Nyska, 2002). Reakce je znázorněna zde:



1.2.4.2 Antioxidanty

Není známá žádná dostačující enzymatická obrana, která by mohla v buňkách snížit hladinu hydroxylového radikálu. Jediná obrana organismů proti tomuto radikálu jsou nízkomolekulární látky zvané antioxidanty, které působí jako redukční činidla (Trachootham et al., 2007). Mezi takovéto látky řadíme například glutation, prolin, α -tokoferol, karotenoidy a flavonoidy (Bernard et al., 2015).

Velmi důležitou molekulou ochraňující buňku je **glutation**. Jeho vysoká intracelulární koncentrace (mmol/l) je velmi důležitou součástí antioxidační ochrany. Glutation patří společně s tripeptidy (g-glutamylcysteinylglycin) k hlavním volným thiolům v živých buňkách. Hraje důležitou roli v procesu redukce oxidačního stresu. Glutation se v buňkách nachází převážně v redukované formě (90–95 %). Redoxní reakcí redukovaného glutationu (GSH) s ROS dochází ke vzniku oxidované formy glutation disulfidu (GSSG). ROS se tímto procesem redukuje na méně reaktivní formy. Tato redoxní reakce je reakce vratná. Pomocí GSSG reduktázy a za přítomnost NADPH může docházet k redukci GSSG zpět na 2 molekuly GSH (Sigma-Aldrich, CS0260, Frijhoff et al., 2015).

1.3 Testy toxicity průmyslově vyráběných nanočástic

Jako nanočástice (NPs) jsou definovány takové částice, které mají všechny tři rozměry menší než 100 nm. NPs se vyznačují vysokým specifickým povrchem a jsou charakteristické celou řadou unikátních fyzikálně-chemických vlastností. Ty umožňují jejich čím dál častější využití v moderních oborech jako jsou například biotechnologie, elektronika, letecké inženýrství, kosmetika či medicína.

Lidé jsou nanomateriálům vystavováni od dětství, neboť se jich mnoho vyskytuje v životním prostředí přirozeně. S rozvojem nanotechnologií se ale i průmyslově vyráběné NPs stávají

takřka běžnou součástí prostředí, což může zvyšovat riziko poškození lidského zdraví (Bahadar et al., 2016).

K expozici NPs nejčastěji dochází cestou inhalační, kožní či injekční. Chemické látky v podobě NPs mají často odlišné toxikologické vlastnosti než jejich analogy, které jsou rozpustné v biologických tekutinách. Klíčem k posouzení toxicity jednotlivých NPs je jejich fyzikálně chemická charakterizace, při níž se mimo jiné hodnotí např. velikost, tvar, struktura, povrchový náboj a chemické složení. Malý průměr zajišťuje NPs snazší průnik do buňky, kde mohou katalyzovat různé reakce či sami reagovat s biomolekulami (Manke et al., 2013, Fu et al., 2014). NPs s průměrem menším než 10 nm mohou snadno prostupovat skrze tkáňové bariéry a jejich chování se dá připodobnit k chování plynu. Studie na zvířatech i lidech ukázaly že po inhalaci či perorálním podání, jsou NPs distribuovány kromě plic a gastrointestinálního traktu také do jater, srdce, sleziny a mozku (Bahadar et al., 2016).

Nanostruktura, díky které je látka reaktivnější, může vést k rozvoji oxidativního stresu za vzniku volných kyslíkových radikálů (ROS) (Manke et al., 2013). Z hlediska indukce oxidativního stresu je důležitá i interakce NPs s jednotlivými součástmi imunitního systému. (Bahadar et al., 2016). Zvýšení produkce ROS bylo prokázáno například u NPs oxidů SiO_2 a TiO_2 (Manke et al., 2013).

Nejčastějšími cestami vstupu průmyslově vyráběných NPs do životního prostředí jsou imise do ovzduší či odpadních vod při jejich výrobě, skladování či transportu. Osud NPs v půdě, jako jsou míra jejich rozpuštění, aglomerace či agregace, je dán jak vlivem prostředí (pH, podíl organické a anorganické složky půdy), tak vlastnostmi samotných NPs (velikost, tvar, náboj, povrchová úprava). Veškeré tyto faktory ovlivňují následnou toxicitu NPs pro půdní organismy (Tourinho et al., 2012).

Dodnes nebyl v odborné komunitě nastaven žádný standardní postup pro studium toxicity NPs. Z toho důvodu je velmi složité porovnávat již existující studie. V mnoha případech se studie významně rozcházejí ve výsledcích a klíčová data pro možné porovnání v nich chybí (Tourinho et al., 2012, Li et al., 2011).

Jako modelový organismus pro testování toxicity NPs jsou často vybíráni **půdní bezobratlí**, kteří hrají významnou roli v půdním ekosystému. Kroužkovci tvoří 60–80 % půdní biomasy. Zajišťují rozklad a recyklaci organické složky půdy a její kypření (Bernard et al., 2015).

Pro praktickou část této diplomové práce byly vybrány v ekotoxikologii hojně využívané půdní roupice *Enchytraeus crypticus*.

Půdní ekotoxikologické testy jsou nejčastěji prováděny v **modelových půdách** jako je například uměle vytvořená půda Organizací pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD uměle vytvořená půda). Druhou možností je využití půd reálných, kam patří například přírodní půda LUFA St. 2.2 (Tourinho et al., 2012, Amorim et al., 2005).

Je třeba vzít v úvahu, že jak modelová, tak přírodní půda představuje velmi komplexní systém. Látky v půdě mohou měnit povrchový náboj nanočástice a ovlivňovat tím jejich chování. Komplexní povaha půd a široké spektrum možných interakcí NPs s půdními komponentami a také velmi obtížná fyzikálně-chemická charakterizace NPs v půdním prostředí jsou hlavními příčinami nízké reprodukovatelnosti a konzistence ekotoxikologických dat (Tourinho et al., 2012).

Porovnáním vlivu použité půdy na biomarkery oxidativního stresu se zabýval tým Howcroft et al. (2008). V rámci experimentu na *E. albidus* kultivované ve dvou různých půdách (OECD uměle vytvořená půda, LUFA 2.2 přírodní půda) po dobu 2 dnů či 3 týdnů, bylo zjištěno, že hladiny biomarkerů GST, CAT, GPx, GR, LPO byly ovlivňovány typem použité půdy. V případě OECD půdy byly tyto biomarkery také ovlivněny časem kultivace, přičemž v LUFA 2.2 přírodní půdě se jejich hodnoty s prodlouženou dobou expozice neměnily.

Další možností je sledování toxicity NPs ve **vodném roztoku**. Tato metoda nabízí snazší charakterizaci NPs. Úskalím této metody je problém s aglomerací NPs. U nZnO ve vodném roztoku byla prokázána aglomerace za vzniku téměř desetkrát větších agregátů, než byla původní velikost nanočástic. Dále je také nutné se zamyslet nad relevancí těchto dat, neboť vodné prostředí je od komplexního půdního prostředí značně odlišné (Tourinho et al., 2012, Li et al., 2011).

Neboť mají oba systémy své výhody i nevýhody, byl navržen systém další, který se snaží skloubit to nejlepší z obou metod. Jedná se o testování NPs v **agarózovém médiu**. Tento systém nabízí snazší charakterizaci NPs a při správné přípravě také nižší míru jejich aglomerace, než je tomu ve vodném systému. Zároveň je to systém svou strukturou bližší půdnímu, proto se předpokládá, že chování NPs v agaru se bude blížit chování v půdě více, než je tomu tak u systému vodného.

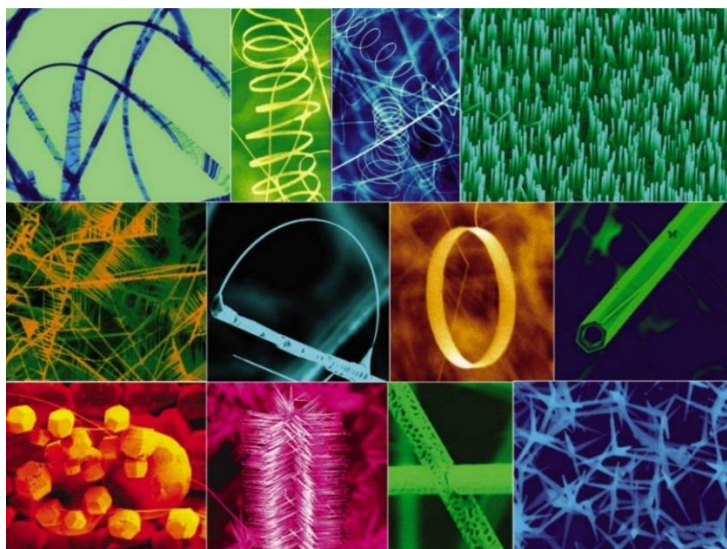
Pro lepší pochopení mechanismu toxicity se ekotoxikologické testy provádí zároveň s odpovídajícími kovovými solemi. Tím jsou získána data, ze kterých lze posoudit do jaké míry je toxicita způsobena ionty tvořenými rozpuštěním NPs a do jaké míry je výsledná toxicita ovlivněna samotnými NPs (Tourinho et al., 2012).

1.3.1 Nanočástice ZnO

Nanočástice oxidu zinečnatého (nZnO) se využívají v mnoha odvětvích, mezi něž patří například textilní či automobilový průmysl. V kosmetice se nZnO využívají jako součást opalovacích krémů pro svou schopnost absorbovat zdraví škodlivé ultrafialové záření.

V medicíně jsou nZnO využívány jako součást nanosenzorů či jako nosiče pro cílený transport farmakologicky aktivních látek a genů do tkání (Zhang et al., 2013, Mirzaei and Darroudi, 2017). Zinečnaté ionty hrají roli při procesu syntézy a sekreci inzulínu. Proto by nZnO mohly být potenciálně využitelné při léčbě diabetu. Zároveň jsou těmto NPs přisuzovány antibakteriální, antifungální a protirakovinné účinky, které souvisí s jejich fotokatalytickou aktivitou. Fotokatalytická aktivita oxidu zinečnatého je dána jeho významnou absorpcí ultrafialového záření a je popisována jako zářením indukovaný oxidativní proces, vedoucí ke vzniku ROS. Vysoká hladina ROS vede k překročení antioxidační kapacity buněk a následně k jejich programované smrti apoptóze (Alaraby et al., 2015, Mishra et al., 2017, Sirelkhatim et al., 2015).

Různorodost aplikací nZnO v mnoha odvětvích vedla ke zvýšení intenzity vývoje metod pro jejich syntézu. Kontrolovanými podmínkami je možné docílit rozdílné struktury a velikosti nZnO (Obrázek 1), čímž se jejich vlastnosti přizpůsobují požadavkům pro konkrétní využití.



Obrázek 1: Varianty nanostruktur ZnO, které lze získat při změně podmínek syntézy z ZnO (s) (Wang, 2004).

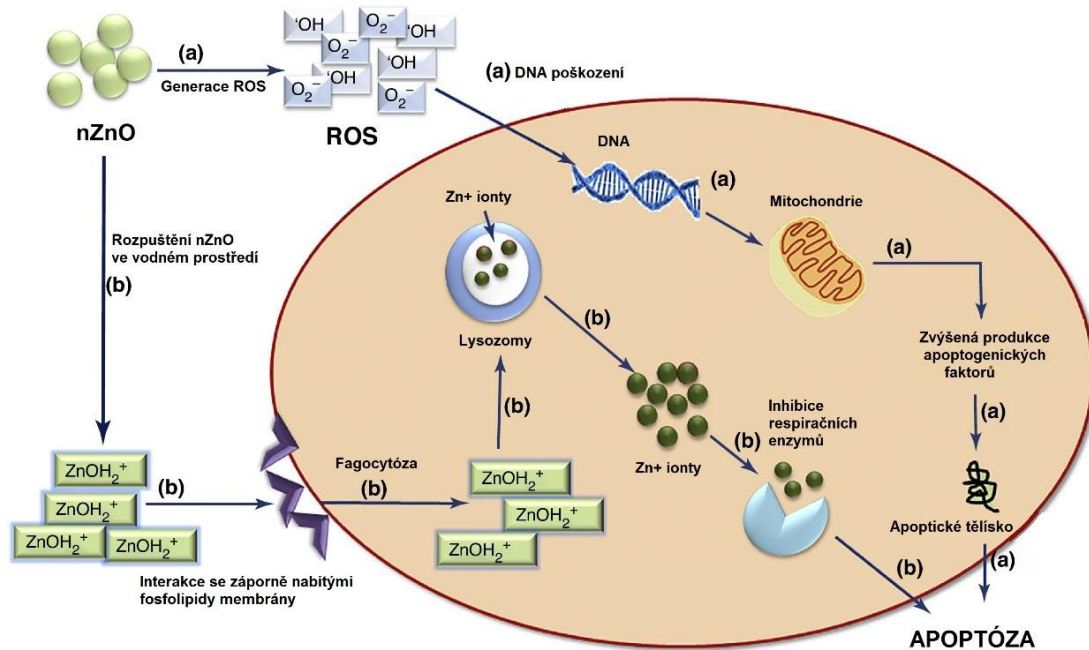
V nízkých koncentracích je zinek považován za esenciální prvek. Určitá koncentrace zinku v těle je nutná pro správnou syntézu proteinů a DNA, funkci imunitního systému, vývoj sítnice, proces srážení krve, funkci jater atd. Pokud je ale přítomen ve vysokých koncentracích, může vyvolávat toxické účinky (Bernard et al., 2015, Ng et al., 2017). Obsah zinku v přírodních půdách se pohybuje v rozmezí od 10 do 300 mg/kg půdy (Yausheva et al., 2016).

Oxid zinečnatý patří do skupiny látek, všeobecně považovaných za bezpečné (GRAS – z anglického generally recognized as safe). Toto označení je udělováno americkou agenturou pro kontrolu potravin a léčiv – U.S. Food and Drug Administration. Otázka, zda by mohla být mezi GRAS látky řazena i nanoforma tohoto oxidu, zůstává stále otevřená (Alaraby et al., 2015).

Vyšší toxicitu nZnO oproti mikročasticím ZnO ovlivňují zejména dva níže uvedené faktory:

- a. Nerozpuštěné nZnO částice mají velký specifický povrch s **vysokým počtem katalyticky aktivních center**, která způsobují zvýšenou tvorbu ROS.
- b. nZnO mají oproti větším částicím ZnO **vyšší rozpustnost ve vodě**. Zvýšená rozpustnost má za následek zvýšenou koncentraci volných iontů Zn^{2+} . Tyto ionty jsou sice pro tělo esenciální, avšak ve vyšších koncentracích jsou považovány za toxické (Leitner, 2016, Ng et al., 2017).

Tyto dva mechanismy působení nZnO jsou znázorněny na Obrázku 2.



Obrázek 2: Mechanismus indukce apoptózy vyvolané působením nZnO na buňku: (a) působení ROS, (b) interakce nZnO s buňkou (Mishra et al., 2017).

Odborné studie, zabývající se toxicitou nZnO, se svými výsledky často liší. Mnoho studií na zvířatech i rostlinách detekuje cytotoxicitu a genotoxicitu nZnO a to jak při testech akutních tak při testech chronických (Choudhury et al., 2017). Některé studie uvádí, že toxicita nZnO je ve větší míře vyvolána rozpuštěnými Zn²⁺ ionty než samotnou částicí (Hou et al., 2018). Jiné studie tvrdí, že hlavní roli v toxicitě hraje schopnost generovat ROS. Mimo tyto dva hlavní faktory hraje roli i velikost NPs či jejich povrchový náboj (Ng et al., 2017).

In vitro studie týmu Rozsakové et al. (2016) na lidských bronchiálních buňkách zaznamenala značné poškození DNA v případě, kdy byly buňky vystavené působení nZnO. V případě stejně dlouhé expozice mikročásticím ZnO nebylo DNA poškození zaznamenáno. Zvýšený nepříznivý vliv nZnO byl sledován i při studiích *in vivo*. Při použití myši jako modelových organismů docházelo po expozici nZnO ke zvýšeným ztrátám hmotnosti a aktivaci antioxidantního aparátu (Mishra et al., 2017).

Brunner et al. (2006) exponoval linii lidských fibroblastů a mezoteliálních buněk nanočásticím ZnO. Při koncentraci 49 mg/ml nZnO byla detekována téměř 100% mortalita u obou buněčných linií. V další *in vitro* studii byly po expozici nZnO pozorovány morfologické změny buněk, poškození DNA či změna mitochondriální aktivity. Dalšími

experimenty (*in vivo* i *in vitro*) byla po expozici nZnO zaznamenána také zvýšená genotoxicita (Bahadar et al., 2016).

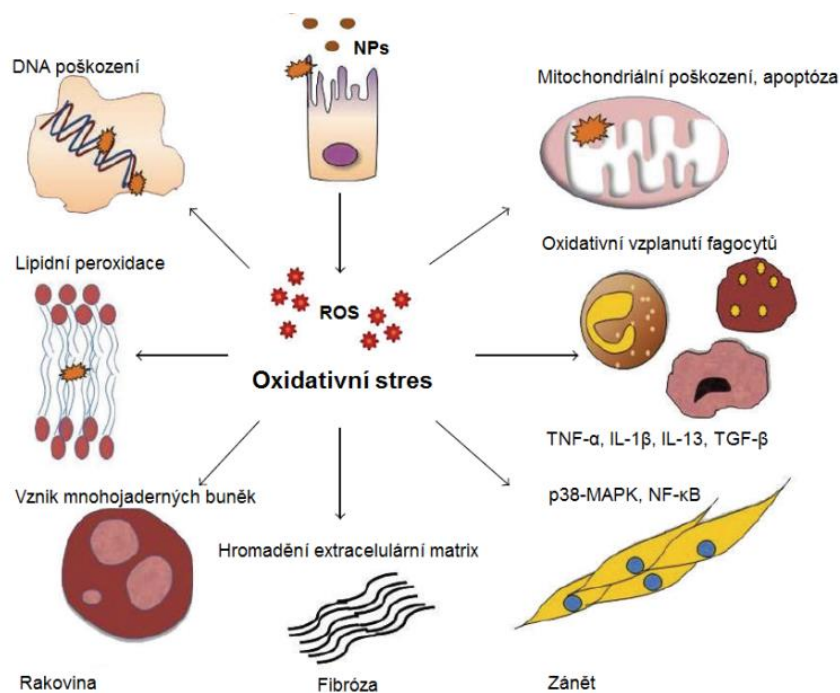
Ve studii Bacchetta et al., (2017) byly hrotnatky *Daphnia magna* vystaveny působení 0,1 a 0,3 mg/l nZnO (~ 50 nm) a 0,1 a 0,3 mg/l Zn₂SO₄ po 21 dní. Dalších 21 dní byla pozorována schopnost organismů zregenerovat. Pouze při působení nZnO byla po 21 dnech po ukončení působení látek pozorována redukce velikosti Daphnií, což může být znakem jejich narušené schopnosti regenerace (Bacchetta et al., 2017).

Hooper et al. (2011) exponoval žížaly *Eisenia veneta* v prostředí půdy a vody 250 a 750 mg Zn/kg (ml) po dobu 24 hodin či 21 dní. Hodnoty poté porovnával s působením ZnCl₂ za stejných podmínek. Hodnocena byla reprodukční schopnost a aktivace imunitního systému. V obou případech byla zaznamenána vyšší toxicita ZnCl₂ než nZnO.

1.3.2 Vliv nanočástic na oxidativní stres

Po expozici NPs dochází u buněk a tkání k rozvoji oxidačního stresu a tím i k nastartování obraných antioxidačních mechanismů. Pokud je oxidační zátěž mírná, antioxidační mechanismy dokáží svým působením snížit riziko poškození buněk. Dle stupně zatížení organismu dochází průběžně k poškozování DNA, peroxidaci lipidů a aktivaci signálních cest buňky. Na úrovni organismu dochází ke zpomalení buněčného růstu, fibróze tkání a rozvoji rakovinového bujení.

Pokud je zátěž ROS vysoká, může docházet k úplnému vyčerpání antioxidačních enzymů. Hladina ROS poté stoupá. Následkem toho dochází k depolarizaci mitochondriální membrány, jejímu poškozování či úplné disfunkci. Schopnost vyvolat apoptózu mechanismem poškození mitochondriální membrány byla prokázána například u NPs Zn, Cu, Ti, a Si (Manke et al., 2013). Stručný přehled možností negativního vlivu nadměry ROS v organismu je zobrazen na Obrázku 3.



Obrázek 3: Nanočásticemi indukovaný oxidativní stres (Manke et al., 2013)

Toxicita se v případě jednotlivých typů NPs velmi liší. Bylo by nepřesné předpokládat, že veškerá toxicita NPs musí být způsobena pouze prostřednictvím generace ROS, neboť některé studie dokládají přímou toxicitu NPs bez souběžného vzniku ROS.

Hlavní principy NPs-indukovaného oxidativního stresu jsou:

a. Přímá oxidativní schopnost NPs

Přímý prooxidační efekt NPs lze přičíst jejich fyzikálně – chemickým vlastnostem jako jsou povrchová reaktivita, velikost částice, její náboj, chemické složení či případná přítomnost přechodového kovu.

Stejně velké a tvarově podobné NPs mohou mít rozdílnou cytotoxicitu v důsledku rozdílných povrchových vlastností. Například při porovnání stejně velkých nanočástic ZnO a SiO₂ jsou nZnO více chemicky aktivní a způsobují vyšší produkci O₂^{·-} v exponovaných buňkách.

NPs s menší velikostí prokazatelně indukují tvorbu ROS intenzivněji. Je tomu tak díky jejich vysokému specifickému povrchu a vysokému povrchovému náboji. Velikost částice určuje počet reaktivních skupin na jejím povrchu. Větší povrchová plocha znamená, že převážná většina molekul či atomů je situována na vnějším povrchu NPs a pouze minoritní část je uvnitř částice (Manke et al., 2013). Díky této skutečnosti má částice na svém povrchu vysoký počet aktivních center, což vede k indukci ROS (Li et al., 2011).

b. Oxidativní schopnost generovaných radikálů

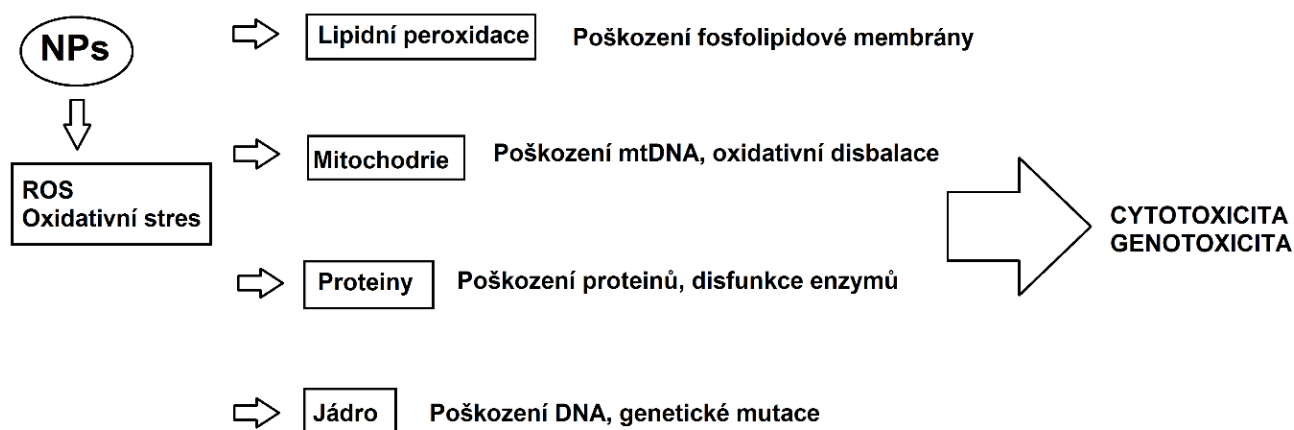
Kromě přímého působení NPs na buňku, mohou mít NPs schopnost generovat ROS. ROS následně způsobují rozvoj oxidativního stresu a s tím spojenou zvýšenou aktivitu antioxidantních mechanismů. Dochází k aktivaci imunitních buněk, mitochondriální respirace či NADPH oxidázového systému. Mimo ROS mohou NPs přispívat i k produkci RNS.

Takový mechanismus byl sledován například u kovových NPs Zn, Ti, Si, Fe, a Ce. Kovové NPs indukují produkci ROS, které následně způsobují oxidativní poškození buněčných makromolekul, jako jsou proteiny, lipidy a DNA.

Hlavními následky je poškození buněčných membrán, denaturace proteinů či změna hladiny vápníku. U NPs oxidů kovů Ti, Cu, Si, a Fe bylo sledováno poškození tkání zapříčiněné peroxidací lipidů. Vzniklé ROS aktivují buněčné signální cesty a transkripční faktory, zasahují do produkce cytokinů a způsobují apoptózu. Neustálá aktivace signálních cest a nerovnováha redoxního systému může vést k patofyziologickým jevům, jako jsou porušení genetické informace, záněty, fibrózy či rakovina.

Pokud se NPs dostane do buňky, může být aktivován imunitní systém. To vede k dalšímu vzniku ROS za pomoci fagocytujících buněk – neutrofilů a makrofágů. Také dochází k depolarizaci a narušení mitochondriální membrány, kde se následně tvoří další volné radikály.

NPs přechodových kovů způsobují chromosomální aberace, DNA zlomy, oxidativní poškození DNA a mutace (Manke et al., 2013).

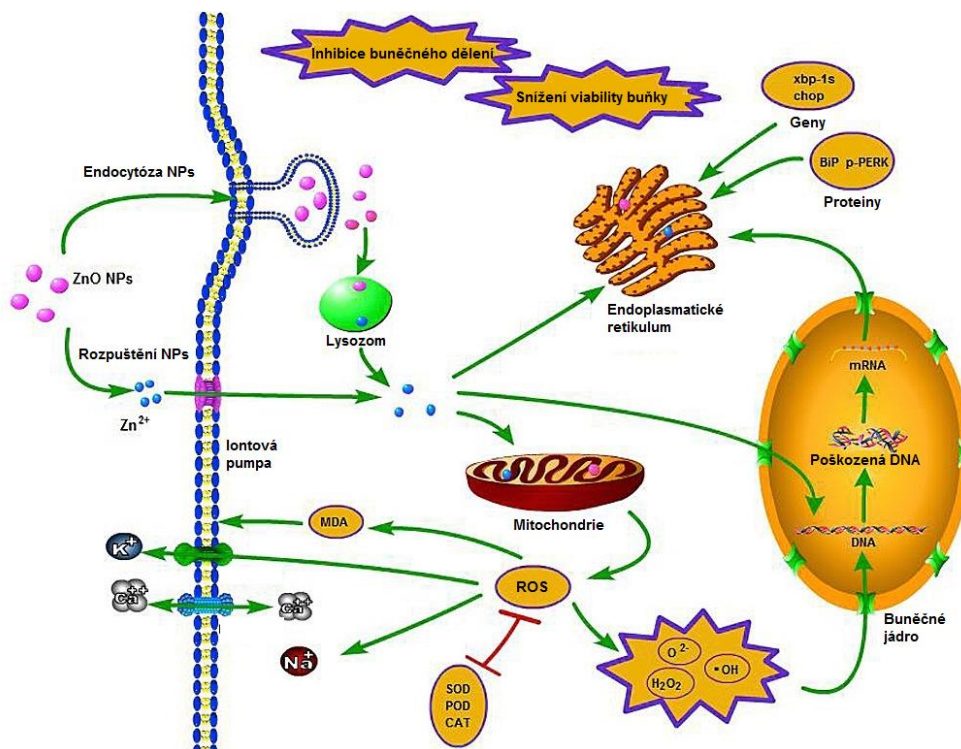


Obrázek 4: Shrnutí působení ROS na biomolekuly (Fu et al., 2014)

1.3.2.1 Indukce oxidativního stresu prostřednictvím nZnO

Stejně jako další NPs oxidů kovů i nZnO indukují vznik ROS a RNS. Díky této schopnosti bývají nZnO používány jako antibakteriální činidla. Mechanismus působení nZnO na buňku je zobrazen na Obrázku 5. Část nZnO je vstřebána endocytózou, část je rozpuštěná ve formě Zn^{2+} iontů. Obě tyto formy se akumulují v buněčných mitochondriích, kde způsobují vznik ROS. Jejich přítomnost vede k aktivaci antioxidantních mechanismů a při nedostačující antioxidantní ochraně také k poškozování buněčné DNA. To vede k celkovému snížení viability a schopnosti reprodukce zasažených buněk. Celý proces způsobuje vyplavení apoptotických hormonů, vznik apoptotických tělísek a může vyústit až v programovanou smrt buňky apoptózu (Mishra et al., 2017, Hou et al., 2018).

Povrchový náboj nZnO částice je obvykle negativní. V prostředí nízkého pH se na povrch navazují protony z okolního prostředí, což mění náboj částice na pozitivní ($ZnOH_2^+$). Takto pozitivně nabitě částice interagují s negativně nabitými fosfolipidy v buněčné membráně, díky čemuž se NPs dokáže dostat dovnitř buňky. Zde se nZnO dostanou do lysozomů, kde se rozpouští za vzniku zinečnatého kationtu. Zn^{2+} ionty interagují s thiolovými skupinami enzymů respiračního systému a inhibují tak jejich působení (Mishra et al., 2017).



Obrázek 5: Cytotoxické mechanismy nZnO (Hou et al., 2018)

Dle výsledků *in vitro* studie týmu Ng et al. (2017) jsou nZnO schopny vyvolat oxidativní poškození DNA a genotoxicitu lidských lymfoblastoidních buněk.

Pro oxidativní stres organismu je důležitá i fotokatalytická aktivita nZnO. Je dokázáno, že při působení ultrafialového záření na nZnO ve vodném prostředí dochází k produkci ROS H_2O_2 a $O_2^{\cdot-}$ (Sirelkhatim et al., 2015).

Existuje jen málo studií soustřeďujících se na oxidativní působení nZnO na organismy z čeledě kroužkoců, avšak nalezneme mnoho prací zabývajících se toxicitou mikročástic ZnO. Jednou z takových studií je například studie prováděná týmem Xiong et al. (2013). V této studii byly při expozici *Eisenia fetida* zinku sledovány významné změny v hladinách CAT a GPx, a to především při nejvyšší testované koncentraci (koncentrační rozmezí testu: 0–500 mg Zn/kg půdy). Test byl prováděn v půdním systému po dobu 15 dní, během kterých se aktivita enzymů analyzovala každých 5 dní. Změny hladin enzymů SOD a CAT při expozici 500 mg Zn/kg půdy jsou znázorněny v Tabulce 1. Z tabulky je patrné, že GPx se aktivuje dříve než CAT a SOD. Pro vybuzení aktivity těchto dvou enzymů byl potřeba delší stresový stimul (15 dní, 500 mg Zn/kg půdy) (Xiong et al., 2013).

Tabulka 1: Změny hladin enzymů po vícedenní expozici 500 mg Zn/kg půdy (Xiong et al., 2013).

Počet dní expozice	Změna hladiny		
	SOD	CAT	GPx
5	-	-	↑
10	-	↓	↓
15	↑	↑	-

1.4 Možnosti detekce oxidativního stresu u bezobratlých

Přímá detekce ROS v tak komplexním systému jako je živý organismus představuje velmi složitý analytický proces. Stanovení komplikuje vysoká reaktivita ROS a jejich krátký poločas života. ROS se navíc nevyskytují v celé buňce ve stejné koncentraci, ale jejich koncentrace se v jednotlivých kompartmentech buňky liší (Shulaev and Oliver, 2006).

Jak již bylo zmíněno, organismy mají na ochranu proti ROS vyvinut složitý antioxidační systém. Pokud se systém následkem střetu s toxickou látkou dostane do nerovnováhy, hladina antioxidantů a antioxidačních enzymů se vychýlí od normálu (Gomes et al., 2012). V ekotoxikologii se této skutečnosti využívá a detekce hladin těchto látek se stává běžnou

součástí ekotoxikologických testů. Tyto látky jsou nazývány **biomarkery oxidativního stresu** (Bernard et al., 2015).

Biomarker je obvykle definován jako jakákoliv charakteristika, která je objektivně měřitelná a uznávaná jako indikátor normálních biologických či patologických procesů nebo odpovědí na terapeutickou intervenci (Ho et al., 2013). Pro biomarker využívaný v rámci (eko)toxikologických studií je důležité, že jeho hladina kolísá v důsledku odklonu sledovaných fyziologických procesů od normálního stavu.

Biomarkery oxidativního stresu dělíme na dvě hlavní skupiny:

- a) **Biomolekuly, které jsou interakcí s ROS modifikovány:** DNA, lipidy včetně fosfolipidů, proteiny a karbohydráty.
- b) **Molekuly antioxidačního systému,** jejichž hladina je oxidačním stresem snížena či zvýšena (Ho et al., 2013).

Výběr vhodných biomarkerů pro testování toxicity nZnO na *E. crypticus* v experimentální části této diplomové práce vycházel z dostupných dat pro testování toxicity chemických látek na kroužkovicích. Tato data jsou shrnuta v Tabulce 4. Z tabulky je patrné, že TG i LPO patří mezi jedny z nejčastěji využívaných biomarkerů pro testování toxicity na kroužkovicích.

Vzhledem k tomu, že pro analýzu biomarkerů v praktické části této diplomové práce byly z ekonomických a technických důvodů vybrány spektrofotometrické metody stanovení, je i při výčtu možností detekce jednotlivých analytů pozornost věnována především metodám spektrofotometrickým.

Tabulka 2: Využitelnost biomarkerů při testování toxicity látek na kroužkocích

Studie	(Gomes et al., 2012)	(Ribeiro et al., 2015)	(Howcroft et al., 2009)	(Brown et al., 2004)	(Novais et al., 2011)	(Zhang et al., 2017)	(Wang et al., 2016)	(Chen et al., 2017)	(Dongxing et al., 2016)	(Zheng et al., 2013)
CAT	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
SOD	×		×		×	×	×		×	×
LPO	×	×	×		×		×	×	×	
TG	×	×	×		×			×		
GSH	×									
GR	×	×	×		×					
GSTs	×	×	×		×	×	×	×	×	
GPx	×	×	×		×			×	×	
aChEs	×				×				×	×
Metalotionein		×						×		
Ethoxyresorufin-o-deetyláza				×						
Karboxylesteráza						×				
Peroxidáza						×			×	
Poškození DNA						×	×			
Karboonylové deriváty proteinů								×		
Vitamin E									×	
Celuláza										×

1.4.1 Detekce peroxidace lipidů

Lipidy se stávají cílem oxidace díky přítomnosti reaktivních dvojných vazeb ve své struktuře. Mezi nejčastěji využívané biomarkery LPO patří isoprostanáty, MDA a 4-HNE. Jako další markery lze uvést například lipidové hydroxyperoxydy, fluorescenční produkty lipidní peroxidace či oxysteroly.

Isoprostanáty vznikají peroxidací kyseliny arachidonové. Enzymem fosfolipázou jsou isoprostanáty uvolňovány z buněčné membrány do cirkulace. Mohou být detekovány ve tkáních, krvi i moči. K jejich detekci se nejčastěji využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s detekcí hmotnostním spektrometrem (MS), imunoenzymatická metoda ELISA (z anglického enzyme-linked immuno sorbent assay) a radioimunologické metody (Ho et al., 2013, Sigma-Aldrich, MAK085, Frijhoff et al., 2015).

MDA může být stanovován reakcí s thiobarbiturovou kyselinou (TBA). Vzorek je inkubován s TBA za vysoké teploty, za které vzniká barevný produkt TBA-MDA. Ten může být

detekován spektrofotometricky měřením absorpance při 532 nm. Detekce je značně nespecifická, neboť TBA reaguje i s dalšími látkami přítomnými ve vzorku. Těmi mohou být další aldehydy, karbohydráty, žlučové kyseliny či prostaglandiny (Urso and Clarkson, 2003).

Produkt reakce s TBA může být detekován i pomocí HPLC či metodou ELISA (Ho et al., 2013, Sigma-Aldrich, MAK085, Frijhoff et al., 2015).

MDA i **4-HNE** je možné detekovat také imunocytochemickými a imunohistochemickými metodami (Frijhoff et al., 2015).

1.4.2 Detekce poškození proteinů

Pro detekci poškození proteinů může být využita molekula **volného nitrotyrosinu**, který vzniká po reakci RNS s tyrosinem. Metody využívané pro toto stanovení jsou například tandemová hmotnostní spektrometrie, plynová chromatografie (GC), HPLC či imunohistochemické metody (Ho et al., 2013).

Další metodou je detekce **karbonylových derivátů**. K jejich stanovení je nejčastěji využívána derivatizační reakce s 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNP). Konečný karbonyl-2,4-dinitrofenylhydrazinový produkt může být detekován následujícími metodami: spektrofotometricky, metodou ELISA pomocí specifické protilátky anti-DNP, Western Blotem, imunohistochemickými či cytochemickými metodami či pomocí HPLC.

K detekci dalších látek, **konečných produktů glykooxidace**, se využívá především imunochemických metod či HPLC. Z důvodu strukturní heterogenity konečných produktů glykooxidace je jejich měření velmi komplikované a obecně použitelná metoda pro jejich detekci zatím nebyla vyvinuta (Frijhoff et al., 2015).

1.4.3 Detekce glutationu

Stavy spojené s nadměrným působením ROS vedou ke změně hladiny **celkového glutationu (TG)** či změně fyziologického **poměru GSH/GSSG**. Ty se tak stávají poměrně citlivými ukazateli vitality buňky a její schopnosti obrany před toxickými látkami. Vysoká koncentrace TG může indikovat patologické změny v buňce. Jeho nízká koncentrace naopak může značit vyčerpání antioxidačních mechanismů.

K detekci TG i poměru GSH/GSSG lze využít spektrofotometrické metody, enzymatické metody, GC či HPLC (Frijhoff et al., 2015). Spektrofotometrické stanovení glutationu je založeno na redukci přidané 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB), Množství

vzniklého barevného produktu 5-thio-2-nitrobenzoové kyseliny (TNB) je měřeno kineticky při 412 nm (Sigma-Aldrich, CS0260, Frijhoff et al., 2015).

1.4.4 Detekce antioxidantních enzymů

Antioxidanční enzymy jsou stanovovány nepřímo, na základě reakcí, které katalyzují. Reakci je možné detekovat buď kontinuálně či tzv. metodou „end-point“, při které se detekuje až konečný stav reakce. Detekovat lze změnu hladiny některého z výchozích substrátů či některého z produktu. Látka vhodná pro spektrofotometrickou detekci musí mít významné absorpční či emisní (fluorescenční) maximum v UV/VIS či infračerveném spektru (dle absorpčního maxima je vybrán přesný typ spektrofotometrické detekce). Při vlnové délce tohoto maxima by zároveň neměla významně absorbovat či emitovat jiná látka obsažená ve vzorku, neboť ta by stanovení rušila. Pokud se v absorpčním spektru některého ze substrátů či produktů neobjevuje vhodné absorpční maximum bez interference, lze využít tzv. chromogenních substrátů. Podstatou takového chromogenního substrátu je, že jeho přeměnou během reakce či jeho kondenzací s analytem vzniká barevný produkt s výrazným absorpčním maximem, který lze poté lépe detekovat.

Kataláza

Hladina CAT může být měřena spektrofotometricky Clairbornovou metodou. Podstatou této reakce je heterolytické štěpení přidaného H_2O_2 katalázou obsaženou ve vzorku. Měří se pokles absorbance štěpeného H_2O_2 za minutu. Měření probíhá při vlnové délce 240 nm.

Superoxid dismutáza

Spektrofotometrické měření SOD je založeno na schopnosti enzymu inhibovat produkci superoxidů. Sledována je změna absorbance za minutu při inhibici redukce chromogenního substrátu (tetrazoliové soli, cytochrom C, pyrogallol) na jejich barevné produkty. Čím vyšší je koncentrace SOD, tím menší změna je zaznamenána (Gomes et al., 2015, Souid et al., 2013).

Glutathion reduktáza

Pro stanovení GR je využívána Carlberg-Mannervikova metoda, která je založena na měření změny absorbance za minutu při úbytku NADPH. Reakce se monitoruje kineticky při vlnové délce 340 nm (Gomes et al., 2015).

Další možností stanovení GR je sledování vzniklého GSH. Aby bylo vzniklé GSH detekovatelné, je zviditelněno reakcí s Ellmanovým činidlem. Na principu stejné reakce funguje stanovení celkového glutationu.

Glutation peroxidáza

Aktivita GPx je stanovena na základě měření změny absorbance za minutu při úbytku NADPH při přeměně GSH na GSSG.

Glutation-S-transferáza

GST je stanovováno Habigovou metodou. Měří se změna absorbance za minutu při vlnové délce 340 nm. Jako substrát pro tuto reakci slouží 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (Gomes et al., 2015).

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Cíle experimentální práce

Základní cíle experimentální části této diplomové práce byly dva. Prvním bylo **vybrat a optimalizovat metody stanovení biomarkerů oxidativního stresu** u roupic *E. crypticus*, které by byly snadno použitelné v nízkonákladové laboratoři. Tímto jsme chtěli dosáhnout zvýšení citlivost detekce toxického působení nZnO u roupic *E. crypticus*, neboť doposud byla v naší laboratoři jako konečný výstup testu posuzována pouze mortalita.

Druhým cílem bylo **vyzkoušet tyto optimalizované postupy na vzorcích exponovaných roupic** a sledovat jejich odezvu se zvyšující se koncentrací toxické látky a s prodlužujícím se časem expozice.

2.2 Chov roupic *Enchytraeus crypticus*

Jako modelový organismus pro testování ekotoxicity nZnO byly vybrány půdní roupice *E. crypticus*. Roupice pro chov byly získány z Centra pro výzkum toxických látek v prostředí (RECETOX) na Masarykově univerzitě v Brně. Roupice byly chovány na agaru v plastových Petriho miskách s ventilací (PS aseptické, 90 mm x 14,2 mm, Fisherbrand).

Agar pro chov roupic byl připravován navážením 3,4 g potravinářského agaru (ZVC Dr. Hoffmann) do 400ml kádinky. K vážení byly použity analytické váhy (ABT 220 – 4M, Kern). K tomu bylo převedeno: 193 ml demineralizované H₂O; 1,5 ml roztoku NaHCO₃ (30175-APO, Lach-Ner, s.r.o.); 1,6 ml roztoku KCl (30076-APO, Lach-Ner, s.r.o.); 2 ml roztoku CaCl₂·2H₂O (120307E, PENTA) a 2 ml roztoku MgSO₄ (30175-APO, Lach-Ner, s.r.o.). Kádinka byla přikryta aluminiovou fólií a roztok byl sterilizován v tlakovém hrnci (Barazzoni 5 l) po dobu 30 minut. Poté byl agar rozlit do 1/3 výšky Petriho misek a po jeho zatuhnutí do něj byly vytvořeny tenké vrypy, pro usnadnění pohybu roupic. Misky byly uzavřeny, popsány a použity na přesazování chovu.

Misky s roupicemi byly uchovávány ve tmě v termostatu (Heratherm, Fisher Scientific) při teplotě (21 ± 2) °C. Jednou za 4–6 týdnů byly roupice přesazovány do nových misek. Krmení bylo prováděno dvakrát týdně namletými ovesnými vločkami. Vločky byly sterilizovány jednou měsíčně v horkovzdušné sušárně (SingleDISPLAY, Memmert UN55) po dobu 2 hodin při 180 °C.

2.3 Optimalizace postupu stanovení jednotlivých biomarkerů

Pro hodnocení míry oxidativního stresu byly vybrány dva biomarkery, a to celkový glutation (TG) a malondialdehyd (MDA), jako konečný produkt lipidní peroxidace (LPO). K těmto markerům bylo třeba zároveň stanovit celkové množství proteinu ve vzorku, na které bylo množství TG a MDA vztaženo. Kromě toho, že byly jednotlivé biomarkery vybírány tak, aby byly citlivější než konečná mortalita, byl kladen důraz i na to, aby od sebe byly biomarkery co nejvíce odlišné a poskytly nám tak detailnější informace o mechanismu toxicity.

Celkový glutation, je důležitá nízkomolekulární látka, která je součástí antioxidačních mechanismů organismu, a popisuje schopnost buňky odolávat oxidativnímu stresu. Při nadměře oxidativního stresu glutation redukuje volné radikály za vzniku redukovaného glutationu. Při oxidativním stresu se může jeho hodnota, jak snižovat (TG se spotřebovává při redukcí radikálů), tak zvyšovat (dlouhodobé působení oxidativního stresu navodí zvýšení produkce TG v buňkách). Stanovení glutationu tedy monitoruje odpověď organismu na oxidativní stres.

Stanovení MDA oproti tomu popisuje skutečnou míru poškození organismu způsobeného vlivem toxické látky. Koncentrace MDA nám dává bližší náhled na to, jak toxické látky dokáží narušovat fyziologicky významné biomolekuly, lipidy. Koncentrace MDA by se se zvyšující oxidativní zátěží měla zvyšovat.

Pro lepší porovnatelnost s jinými studii byly hodnoty obou biomarkerů vztaženy na množství celkového proteinu ve vzorku.

Vzhledem k laboratorním podmínkám byly pro obě stanovení biomarkerů i pro stanovení celkového proteinu vybrány spektrofotometrické metody. Jejich výhodou byla relativně nízká pořizovací cena a snadné a rychlé provedení. Nevýhodou byla nižší specifita a citlivost proti jiným metodám (např. HPLC, imunochemickým metodám).

Spektroskopická stanovení obou biomarkerů oxidativního stresu a celkového proteinu byla v první fázi práce založena na využití analytických kitů od firmy Sigma-Aldrich. Postupy stanovení popsáné v návodech k jednotlivým kitům byly postupně optimalizovány pro použití na roupicích *E. crypticus*. Po vypotřebování reagentů z kitů byly následně dokoupeny další reagentie od firmy Sigma-Aldrich či od jiných výrobců. Tyto reagentie byly vybírány tak, aby byly během skladování co nejstabilnější. Druhým parametrem byla jejich pořizovací cena. Výsledný postup stanovení celkového proteinu je uveden v kapitole 2.2.2.3, výsledný postup

stanovení celkového glutationu v kapitole 2.2.3.2 a výsledný postup stanovení lipidní peroxidace v kapitole 2.2.4.2.

Pro optimalizaci stanovení proteinu, stejně tak jako dalších dvou metod, byly použity živé dospělé roupice z chovu. K experimentům byli vybíráni jedinci, kteří se po mechanickém stimulu pohybovali a u kterých byl opasek s vajíčky viditelný pouhým okem. Odběr roupic byl prováděn vlhkým štětečkem. Roupice byly opláchnuty vodou a pokládány na Petriho misku. Živé roupice byly přesunuty do mikroskopické kumavky (0030125.215, 1000 Eppendorf Tubes[®]), zváženy a co nejrychleji přesunuty do mrazicího boxu (-80 °C), kde byly uchovávány do dalšího použití, nejdéle však jeden týden.

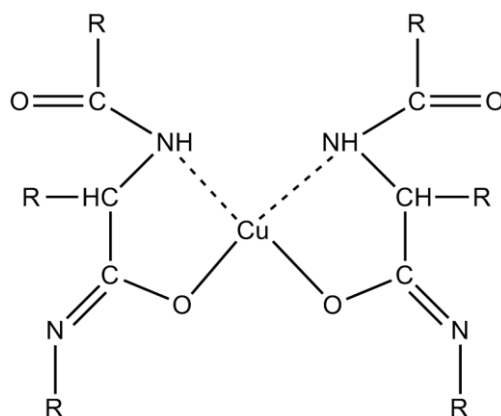
Pro další postup bylo potřeba tkáňové vzorky roupic homogenizovat. Bylo nutné zvolit homogenizační pufr a jeho objem tak, aby byl homogenát použitelný pro všechna tři stanovení. Jako homogenizační roztok byl na základě diplomové práce Šutekové (2006) použit fosfátový pufr (PBS) o pH 7,2. Ten byl připraven navážením 4 g NaCl (0,8 %), 0,1 g KCl (0,02 %) 1,45 g Na₂HPO₄·12H₂O (0,02 %) a 0,1 g Na₂HPO₄·2H₂O (0,02 %).

Jako nejvhodnější homogenát, který byl použit pro stanovení množství celkového proteinu, TG i LPO, byl vybrán **homogenát 10 mg sesbírané mokré hmoty/ 100 µl PBS**. Zhomogenizovaný vzorek byl ihned použit pro stanovení proteinu a biomarkerů.

2.3.1 Stanovení celkového proteinu

Jako první bylo přistoupeno k optimalizaci stanovení celkového proteinu. Hodnotu celkového proteinu ve vzorku bylo pro stanovení biomarkerů nezbytné zjistit z toho důvodu, neboť koncentrace samotných biomarkerů se na ní vztahují. Bez této hodnoty by vzhledem k odlišnosti postupů mezi studii nebylo možné výsledné koncentrace markerů porovnávat.

Stanovení proteinu bylo založeno na Lowryho reakci, která probíhá ve dvou krocích. Prvním krokem je Biuretova reakce, ve které měďnaté kationty Biuretova činidla reagují s peptidovými vazbami proteinu. Měď se v tomto kroku redukuje z Cu²⁺ na Cu¹⁺. Vzniklý komplex bílkoviny s mědí je znázorněn na Obrázku 6. Reakce probíhá v alkalickém prostředí. V dalším kroku dochází k redukci Folin & Ciocalteova fenolového činidla, přičemž se měď oxiduje zpět na Cu²⁺. Tímto krokem vzniká barevný produkt měřitelný v oblasti absorpance 500–800 nm.



Obrázek 6: Komplex bílkoviny s mědí vznikající Biuretovou reakcí

2.3.1.1 Proces optimalizace stanovení celkového proteinu

V prvním kroku byl pořízen kit pro stanovení celkového proteinu od firmy Sigma Aldrich (TP0300). Výchozí návod přiložený v kitu byl postupně optimalizován pro použití na vzorcích *E. crypticus*. Kit byl určen pro zkumavkové provedení. Vzhledem k malému objemu vzorku byly objemy jednotlivých reagensů upraveny tak, aby bylo možné provést stanovení v mikrotitrační destičce. Tím bylo zároveň dosaženo snížení spotřeby jednotlivých reagensů. Na základě diplomové práce Šutekové (2006) a proměření absorpčního spektra vzorků z chovu byla vybrána vhodná vlnová délka pro měření absorbance barevného produktu a to 680 nm.

Spektrofotometr byl kalibrován s využitím standardu fetálního bovinního séra (BSA) v koncentračním rozmezí doporučeném výrobcem kitu (50–400 μg BSA/ml). Rozsah kalibrační křivky byl následně rozšířen do nižších hodnot, a to z důvodu zjednodušení přípravy kalibrační řady (příprava dvojkovým zředěním). Konečný rozsah kalibrační řady byl **25–400 μg BSA/ml**. Použitelnost této úpravy byla ověřena určením limitu detekce a stanovitelnosti. Následně byl hledán nejvhodnější způsob ředění reálného vzorku tak, aby byla jeho odpověď v rozmezí této kalibrační křivky. Jako nejvhodnější ředění základního homogenátu pro určení proteinu bylo vybráno **zředění 50 \times** . Proces výběru vhodného zředění je popsán v kapitole 3.1.

Po optimalizaci postupu stanovení celkového proteinu byla opakovaným měřením vzorků z chovu ověřena účinnost homogenizační techniky. Při výpočtu směrodatné odchylky (SD) několikanásobného změření téhož vzorku bylo zjištěno, že vzorek nemá v celém svém objemu stejnou odezvu, a tudíž není dostatečně homogenní. Jako výsledný způsob homogenizace, který byl uveden ve výsledném postupu stanovení, byla vybrána homogenizace za pomoci

ultrazvukového homogenizátoru (D1000-E, Benchmark). Proces výběru vhodného způsobu homogenizace je popsán v kapitole 3.1.

Zásobní látky obsažené v kitu:

- Lowryho roztok (L 3540, Sigma Aldrich, Inc.)
- Folin & Ciocalteovo fenolové činidlo (F 9252, Sigma Aldrich, Inc.)
- BSA Standard (P 5619, Sigma Aldrich, Inc.)

Zásobní látky obsažené v kitu nebylo nutné nijak měnit ani nahrazovat.

2.3.1.2 Výsledný postup stanovení celkového proteinu

Příprava roztoků:

Lowryho roztok – Do nádoby s 2 g Lowryho roztoku bylo přidáno 40 ml H₂O. Celkového rozpuštění bylo docíleno za pomoci ultrazvuku (Sonorex digitec, Bandelin). Roztok byl skladován při pokojové teplotě.

Folin & Ciocalteovo fenolové činidlo – Folin & Ciocalteovo fenolové činidlo (18 ml) bylo převedeno do lahve z tmavého skla (100 ml). Roztok byl doplněn 80 ml H₂O, promíchán a skladován při pokojové teplotě.

BSA Standard (400 µg/ml) – Standard byl připraven přidáním 5 ml destilované H₂O k 2 mg BSA. Roztok standardu byl skladován v mrazáku při -20 °C. Doba expirace při této teplotě byla 3 měsíce.

Postup:

1. Ze zásobního roztoku BSA (400 µg/ml) byla do mikrotitrační destičky (Thermo Scientific) připravena kalibrační řada dle Tabulky 3.

Tabulka 3: Příprava kalibrační řady pro BSA

Jamka	K₁	K₂	K₃	K₄	K₅	
Koncentrace BSA (µg/ml)	400	200	100	50	25	
BSA 400 µg/ml (µl)	200	100 z K ₁	100 z K ₂	100 z K ₃	100 z K ₄	100 z K ₆ → odpad
H₂O (µl)	0	100	100	100	100	

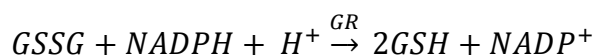
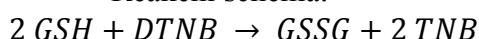
2. Předem zhomogenizovaný vzorek byl pozvolna rozmražen.
3. Poté byl vzorek promíchán a 50x zředěn: 10 µl vzorku do 490 µl destilované H₂O.
4. Takto zředěný vzorek byl v objemu 100 µl pipetován do jamky destičky.
5. Do další jamky bylo napipetováno 100 µl destilované H₂O jako blank.
6. Do jamek se standardy, vzorky i blankem bylo přidáno 100 µl Lowryho roztoku.
7. Vzorky byly inkubovány 20 minut na třepačce (Vibromax 100, Heidoph).
8. Po uplynutí inkubační doby bylo přidáno 50 µl Folin & Ciocalteova fenolového činidla. Vzorky byly důkladně promíchány.
9. Destička byla inkubována na třepačce **přesně** 30 minut při pokojové teplotě.
10. Absorbance byla měřena spektrofotometrem (Epoch, BioTek Instrumetns, Inc., software Gen5 3.02) při vlnové délce 680 nm.
11. Výsledná koncentrace proteinu ve vzorku byla vypočítána z rovnice regrese kalibrační křivky BSA standardů.

2.3.2 Stanovení celkového glutationu

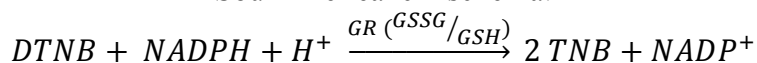
Před samotnou analýzou celkového množství glutationu bylo nutné vzorek zbavit přítomných proteinů. Proces odstranění proteinů se v návodu kitu lišil dle konkrétního vzorku (buňky, tkáň, plasma). Tyto postupy však byly obecné a žádný z nich se nám nezdál úplně vhodný pro použití na našich vzorcích. Na základě dat z diplomové práce: Zavedení a optimalizace metod pro vybrané biomarkery půdních bezobratlých (Šuteková, 2006), která vznikla na toxikologickém pracovišti RECETOX v Brně, byla pro deproteinizaci vzorku vybrána 5% sulfosalicylová kyselina (SSA).

Principem stanovení byla kinetická reakce, při níž GSH obsažený ve vzorku zapříčinil kontinuální redukci 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) na 5-thio-2-nitrobenzoovou kyselinu (TNB) a GSSG. Vzniklé GSSG bylo obnovováno pomocí glutation reduktázy a NADPH. Množství vzniklého TNB bylo měřeno jako změna absorbance za minutu při 412 nm (Sigma-Aldrich, CS0260).

Reakční schéma:



Souhrnné reakční schéma:



2.3.2.1 Proces optimalizace stanovení celkového glutationu

Pro toto stanovení byl použit kit pro spektrofotometrickou detekci hladiny celkového glutationu (CS0260, Sigma Aldrich, Inc.) s koncentrační řadou od 50 – 3,125 $\mu\text{mol/l}$.

Během práce došlo k vypotřebování některých reagensů či k jejich degradaci (NADPH). Pro snížení pořizovacích nákladů jsme se rozhodli dokupovat reagenzie jednotlivě, neboť některé v kitu obsažené látky nebyly pro naše účely využitelné (nejsou uvedeny) a bylo by tak neekonomické je pořizovat. Zároveň došlo k nahrazení některých reagensů jejich alternativami v jiných formách, které byly snadněji uskladnitelné a měly delší expirační dobu. Zdůvodnění jednotlivých změn a jejich provedení je uvedeno v kapitole 3.2.

Dále byl změněn způsob přípravy roztoku DTNB z původního rozpuštění v dimethyl sulfoxidu (DMSO) na rozpuštění v reakčním pufru. Zásobní roztok DTNB se připravoval v DMSO pro zvýšení jeho stability při dlouhodobém uchovávání. Jelikož jsme se ale rozhodli připravovat roztok DTNB vždy čerstvý, nebylo potřeba DMSO použít.

Zásobní látky obsažené v kitu:

- GR - 400 jednotek/ml z pekařského droždí (G2424, Sigma Aldrich, Inc.)
- GSH standard – redukovaný l-glutation (G4544, Sigma Aldrich, Inc.)
- DTNB (D8130, Sigma Aldrich, Inc.)
- DMSO (D8418, Sigma Aldrich, Inc.)
- NADPH (N6505, Sigma Aldrich, Inc.)
- SSA (S2130, Sigma Aldrich, Inc.)
- 5x pufr pro GSH stanovení (A5103, Sigma Aldrich, Inc.)

Zásobní látky dokoupené z dalších zdrojů:

- GSH standard (G4251, Sigma Aldrich, Inc.)
- NADPH (R.AE14.1, P-LAB a.s.)
- DTBN (D8130, Sigma Aldrich, Inc.)
- GR (G3664, Sigma Aldrich, Inc.)
- EDTA (EDS, Sigma Aldrich, Inc.)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (71649, Sigma Aldrich, Inc.)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (71500, Sigma Aldrich, Inc.)

2.3.2.2 Výsledný postup stanovení celkového glutationu

Příprava roztoků:

Reakční pufr (100mM fosfátový pufr; pH 7,0; 1mM EDTA): Pro přípravu 250 ml pufru bylo do odměrné baňky naváženo 17,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 7,625 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 0,0731 g EDTA. Obsah byl doplněn destilovanou H_2O do objemu 250 ml.

Zásobní roztok DTNB (1,5 mg/ml): 8 mg DTNB bylo rozpuštěno v 5,33 ml reakčního pufru. Roztok byl připravován pokaždé nově.

5% roztok SSA: 2,5 g SSA bylo rozpuštěno v 50 ml H_2O . Roztok byl skladován při 2–8 °C.

GSH Standard zásobní roztok (10 mM): Roztok byl připraven navážením 3 mg do 1 ml H_2O .

Enzymový roztok GR (6 jednotek/ml; 0,25 ml): 2 μl GR (400 jednotek/ml) bylo přidáno do 132 μl reakčního pufru.

NADPH roztok (0,75 mM): Bylo naváženo 2,8 mg NADPH do 5 ml reakčního pufru.

Pracovní roztok (8 ml): Do 4 ml reakčního pufru bylo přidáno 114 μl zředěného enzymového roztoku GR (6 jednotek/ml) a 114 μl zásobního roztoku DTNB (1,5 mg/ml). Pracovní roztok byl uchováván při pokojové teplotě, ne déle než 3 hodiny.

Postup:

1. Přidáním 2,5 μl zásobního roztoku GSH standardu do 500 μl 5% SSA byl připraven výchozí roztok GSH standardu o koncentraci 50 μM GSH.
2. Následně z něj byly připraveny roztoky kalibrační řady dle Tabulky 4.

Tabulka 4: Příprava kalibrační řady pro GSH

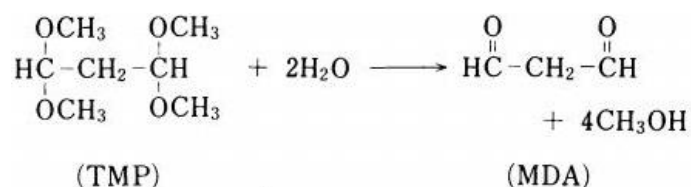
Jamka	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	
Koncentrace GSH ($\mu\text{mol/l}$)	50	25	12,5	6,25	3,125	
50 μM zásobní roztok GSH (μl)	50	25 z K ₁	25 z K ₂	25 z K ₃	25 z K ₄	25 z K ₅ → odpad
5% SSA (μl)	0	25	25	25	25	
nmol GSH přímo v jamce	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	

3. Do mikrozkuřavky bylo napipetováno 40 μl vzorku a 20 μl 5% SSA.
4. Vzorky byly řádně promíchány na vortexu (Vortex 3, IKA®) a inkubovány 10 minut v chladničce.

5. Následně byly vzorky centrifugovány (MPW – 150R, MPW Med. Instrument) za podmínek: 10 000 x g, 10 min, 4 °C.
6. Vzniklý supernatant byl odebrán pro reakci.
7. Na spektrofotometru bylo nastaveno kinetické měření reakce po dobu 5 minut. Intervaly mezi měřeními byly 1 minuta a vlnová délka 412 nm.
8. Do mikrotitrační destičky bylo jednotlivě napipetováno 10 µl 5 % SSA (blank), 10 µl vzorku a 10 µl standardů. Vše bylo provedeno ve dvou replikách.
9. Do každé jamky bylo přidáno 150 µl pracovního roztoku. Vše bylo řádně promícháno.
10. Roztoky byly inkubovány 5 minut při pokojové teplotě.
11. Poté bylo přidáno 50 µl zředěného roztoku NADPH. Vše bylo promícháno na třepačce a následně byla měřena absorbance.
12. Koncentrace byla vypočtena z kalibračního grafu závislosti ΔA/min na koncentraci.

2.3.3 Stanovení lipidní peroxidace

Principem reakce byl vznik barevného produktu MDA-TBA při inkubaci vzorku za tepla s přidanou TBA. Tento produkt byl detekován spektrofotometricky při 532 nm. Z důvodu nestability MDA byl jako standard pro toto stanovení využit 1,1,3,3-tetrametoxypren. Ten se v kyselém prostředí přeměňuje na MDA dle reakčního schéma:



2.3.3.1 Proces optimalizace stanovení lipidní peroxidace

Peroxidace lipidů byla stanovována s využitím kitu pro lipidní peroxidaci (MAK085) firmy Sigma Aldrich. Během optimalizace základního postupu z kitu bylo upravováno množství výchozího vzorku a byl přidán krok extrakce produktu MDA-TBA do butanolu. Dále byly přidány dvě další vlnové délky, při kterých byl vznikající produkt měřen a to 485 a 560 nm. Absorbance při těchto vlnových délkách a při vlnové délce 532 nm byly využity pro výpočet takzvané korigované absorbance (KOR) pomocí Allenovy korekce. Rovnice pro výpočet korigované absorbance byla přejata z práce Kand'ár et. al, 2002 a je uvedena níže. Allenovou korekcí se eliminuje nespecifičnost reakce, neboť s TBA reagují kromě MDA i další látky přítomné ve vzorku (např. prostaglandiny, žlučová barviva...).

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

Stejně jako u stanovení TG byly i v tomto případě dokupovány potřebné reagenty jednotlivě. Zároveň byl hned zpočátku dokoupen n-butanol pro extrakci vzorku a koncentrovaná kyselina octová pro přípravu TBA. Tyto dvě látky byly pro stanovení nutné, avšak nebyly v kitu obsaženy. Jednotlivé kroky optimalizace postupu jsou zmíněny v kapitole 3.3.

Zásobní látky obsažené v kitu:

- BTH, 100x (MAK085C, Sigma Aldrich, Inc.)
- TBA (MAK085D, Sigma Aldrich, Inc.)
- 4,17M MDA standard (MAK085E, Sigma Aldrich, Inc.)

Zásobní látky dokoupené z dalších zdrojů:

- BTH (B1378, Sigma Aldrich, Inc.)
- TBA (T5500, Sigma Aldrich, Inc.)
- MDA standard (108383, Sigma Aldrich, Inc.)
- n-butanol (8.22262, Sigma Aldrich, Inc.)
- Koncentrovaná CH₃COOH (27225-M, Sigma Aldrich, Inc.)
- NaCl (16610-31000, PENTA s.r.o.)

2.3.3.2 Výsledný postup stanovení lipidní peroxidace

Příprava roztoků:

Roztok TBA: 25 mg TBA bylo rozpuštěno v 7,5 ml koncentrované kyseliny octové. K úplnému rozpuštění byl použit ultrazvuk. Objem byl doplněn 17,5 ml H₂O na 25 ml. Tento roztok byl skladován při pokojové teplotě nejdéle 1 týden.

MDA standard 100 μmol/l (1,1,3,3-tetramethoxypropen): Do 100 μl destilované H₂O bylo napipetováno 8,3 μl TMP. Takto byl připraven roztok MDA o koncentraci 500 μmol/l. Z tohoto roztoku byl odebrán 1 ml a doplněn destilovanou H₂O do celkového objemu 5 ml.

Postup:

1. Kalibrační řada byla připravena dvojkovým ředěním zásobního roztoku 100 $\mu\text{mol/l}$ MDA:

Tabulka 5: Příprava kalibrační řady pro MDA

Jamka	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	
Koncentrace MDA ($\mu\text{mol/l}$)	100	50	25	12,5	6,25	
MDA 2mmol/l (μl)	400	200 z K ₁	200z K ₂	200z K ₃	200z K ₄	200 z K ₆ → odpad
H ₂ O (μl)	0	200	200	200	200	
nmol přímo v jamce	20	10	5	2,5	1,25	

2. Ke stanovení bylo použito 200 μl nezředěného homogenátu. K němu byly přidány 3 μl BHT proti oxidaci při zahřívání vzorku.
3. Ke vzorkům, blanku a roztokům kalibračních řad v objemu 200 μl bylo přidáno 600 μl TBA.
4. Takto připravené vzorky byly promíchány na vortexu, jehlou byla proděravěna víčka proti vzniku přetlaku uvnitř zkumavky při zahřívání.
5. Vzorky byly inkubovány po dobu 60 minut při $(95 \pm 5) ^\circ\text{C}$. Zahřívání bylo prováděno v digestoři.
6. Vzorky byly posléze schlazeny na pokojovou teplotu.
7. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 300 μl n-butanolu, vzorky byly promíchány a centrifugovány při 16 000 x g 3 minuty.
8. Po centrifugaci bylo pro stanovení odebíráno 150 μl butanolové vrstvy s MDA-TBA adduktem.
9. V případě, kdy se neobjevilo jasné rozhraní vrstev voda/butanol bylo ke vzorku přidáno 100 μl 5M NaCl, vzorek byl promíchán a znovu centrifugován za stejných podmínek.
10. Poté se rozhraní vrstev vyjasnilo a 150 μl butanolové vrstvy bylo možné odebrat.
11. Absorbance byla měřena současně při 532 nm, 485 nm a 560 nm.
12. Koncentrace byla vypočítána dvěma způsoby. Z kalibrační křivky pro 532 nm a z kalibrační křivky pro korigovanou absorbanci vypočtenou z rovnice:

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

2.4 Stanovení biomarkerů oxidativního stresu v rámci testů toxicity různých forem Zn na *E. crypticus*

Po optimalizaci postupů pro stanovení celkového proteinu, TG a LPO na vzorcích roupic z chovu, jsme mohli přistoupit k ověření použitelnosti navržených postupů pro vyhodnocování testů toxicity. Až tímto krokem jsme si mohli ověřit, zda jsou námi vybrané biomarkery vhodné pro testování toxicity nZnO na roupicích *E. crypticus*. MDA a LPO totiž mohou být stanovitelné, ale jejich odezva se se zvyšujícím časem expozice či zvyšující koncentrací toxické látky nemusí měnit.

Testovány byly dvě formy zinku, a to ZnCl₂ a nanočástice ZnO. ZnCl₂ je po převedení do živného média zcela disociováno a slouží pro odhad toxicity Zn²⁺ kationtů. Nanočástice ZnO rovněž uvolňují do živného média Zn²⁺ kationt, ale velká část aplikované dávky přichází do kontaktu s buňkami experimentálního organismu ve formě částic. Porovnání výsledků testů toxicity ZnCl₂ a nZnO nám může poskytnout komplexnější náhled na to, jak toxicitu sloučenin zinku ovlivňuje jejich forma a rozpustnost.

Testované koncentrace obou forem Zn vychází z poznatků diplomové práce Novákové (2017), která stanovila LC₅₀ pro *E. crypticus* při čtyřdenní expozici v agaru u **ZnCl₂ na 14 mg Zn/kg agaru** a u **nZnO na 43,7 mg Zn/kg**. Koncentrace byly zvoleny tak, aby roupiče v převážné míře expozici přežily a v živých roupicích mohly být stanoveny příslušné biomarkery oxidativního stresu.

2.4.1 Testování toxicity ZnCl₂

Testované koncentrace ZnCl₂ (1807240715, PENTA) odpovídaly 0,1; 0,5; 1,0 a 5,0 mg Zn/kg agaru. Expozice *E. crypticus* ZnCl₂ probíhala po dobu 4 a 7 dní. Pro dosažení dostatečného množství vzorku byly od každé koncentrace připraveny vždy čtyři misky. Na každou z nich bylo nasazeno 30 dospělých roupic z chovu. Z těchto 4 misek byl na konci expoziční doby vytvořen směsný vzorek. Takto nastavený test byl proveden ve třech opakováních.

Pro přípravu 1,5% agarů s výše uvedenými koncentracemi bylo do Erlenmeyerových baněk o objemu 500 ml naváženo 7,5 g agaru. K naváženému agaru bylo přidáno 450 ml destilované vody. Do jednotlivých Erlenmeyerových baněk bylo přidáno příslušné množství ZnCl₂ ze společného zásobního roztoku tak, aby výsledné koncentrace odpovídaly výše uvedené koncentrační řadě. Pomocí předem připravených fosfátových pufrů o pH 6 a 8 bylo upraveno pH roztoku agarů na 7 (pH metr 110, VWR International). Destilovanou vodou byl objem

doplněn na 500 ml. Baňky byly uzavřeny aluminiovou fólií a na magnetickém míchadle (Verkon C – Mag serie MS/HS, IKA[®]) zahřáty na (95 ± 5) °C. Při této teplotě byly udržovány podobu 30 minut. Do etanolem vytřené digestoře byly vyskládány sterilní Petriho misky, do jejichž dna i víček byl v souvislé vrstvě rozlit připravený agar. Při rozlévání byl agar neustále promícháván. Po ztuhnutí byly do agaru vytvořeny tenké vrypy, pro usnadnění pohybu rousic. Misky byly uzavřeny a popsány na víčko. Po vychladnutí byly do misek přesunuty dospělé rousice z chovu (vždy 30 na misku) Za dospělé byly považovány takové rousice, u kterých byl opasek s vajíčky viditelný pouhým okem. Misky byly inkubovány příslušný počet dní za stejných podmínek jako rousice chovu.

Pro spektrofotometrické stanovení biomarkerů byly vybrány koncentrace ZnCl_2 0,5 a 5,0 mg Zn/kg agaru. Koncentrace byly vybrány tak, aby byly od sebe dostatečně vzdálené a byl tak zřetelně vidět rozdíl v odpovědi biomarkerů. U koncentrace 0,5 mg Zn/kg nás zajímalo, zdali budou biomarkery citlivé i při takto relativně nízké koncentraci, při které nám hodnota celkové viability mnoho neprozrazuje. Nemohli jsme si být ale jistí, zda při takto nízké koncentraci zinku bude odpověď biomarkerů viditelná. Proto byla zvolena koncentrace 5,0 mg Zn/kg. U této koncentrace byla předpokládána viditelnější změna hladiny vybraných biomarkerů. Zároveň byly s každou sérií testu nasazeny misky s nulovou koncentrací zinku, které sloužily jako negativní kontrola.

2.4.2 Testování toxicity nZnO

Po provedení testů toxicity se ZnCl_2 jsme přistoupili k testování nZnO. Pro nZnO byly vybrány koncentrace 3 a 30 mg Zn/kg agaru. Tyto testované koncentrace vycházely, stejně tak jako testované koncentrace ZnCl_2 , z poznatků diplomové práce: Optimalizace složení agarového kultivačního média pro testy ekotoxicity nanočástic na kroužkovci *Enchytraeus crypticus* (Nováková, 2017). Navíc bylo předpokládáno, že u nZnO bude v agaru méně uvolněných zinečnatých kationtů, tudíž toxicita by neměla být příliš vysoká. Z toho důvodu jsme provedli expozici sedmidenní.

Pro testování byly použity krystalické nZnO (Bochemie Group a.s) o průměru 10 nm (s rozsahem 5–50 nm) a čistotě 99,5 %. Způsob vnášení NPs do živné půdy a jejich dispergace v zásobním roztoku pomocí sonifikace vycházela z poznatků experimentální části diplomové práce: Testy ekotoxicity nanomateriálů dispergovaných v agarózovém gelu (Hrdá, 2015).

Jako první byl vytvořen zásobní roztok pyrofosforečnanu sodného (SYNPO, a. s.), který sloužil pro stabilizaci NPs. Zásobní roztok 0,1% $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ byl připraven smícháním 0,2 g $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ s 200 ml destilované H_2O .

Dále byl do 100ml odměrné baňky připraven zásobní roztok $n\text{ZnO}$, k němuž bylo před přidáním destilované vody po rysku přidáno 20 ml 0,1% $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml. Takto vytvořený koloidní roztok byl vložen do ultrazvuku na 45 minut (vhodná délka sonifikace pro dispergaci NPs v roztoku byla experimentálně zjištěna), přičemž byl za tuto dobu několikrát promíchán. Poté bylo ze zásobního roztoku odpipetováno příslušné množství do odměrných baněk o objemu 200 ml. Do těchto baněk bylo dále přidáno 20 ml roztoku $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ a objem byl doplněn do 200 ml.

Do Erlenmeyerových baněk o objemu 500 ml bylo naváženo 7,5 g agaru. Dále bylo přidáno 220 ml destilované vody a 30 ml 0,1% roztoku $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. Stejně jako v případě agaru pro ZnCl_2 bylo upraveno pH na 7. Objem byl destilovanou vodou doplněn do 300 ml.

Nádobky s agarem byly uzavřeny aluminiovou fólií a na magnetickém míchadle ohřáty na $(95 \pm 5)^\circ\text{C}$. Mezitím byly roztoky $n\text{ZnO}$ sonifikovány po dobu 15 minut. Po 15 minutách od dosažení teploty 95°C , byly do agaru zvolna přidány jednotlivé roztoky $n\text{ZnO}$. Celá směs byla poté udržována při $(95 \pm 5)^\circ\text{C}$ dalších 15 minut. Postup rozlévání a vnášení roupic na misku byl shodný s postupem rozlévání u agarů pro ZnCl_2 .

Při postupu přípravy agarů pro ZnCl_2 a $n\text{ZnO}$ nebylo zohledněno odpařování vody během vaření a chladnutí agaru. Objem odpařované vody byl zjištěn tak, že byl agar v objemu 500 ml připraven do odměrného válce a bylo sledováno, jak se jeho objem zmenší. Tímto způsobem byl získán přepočtový faktor 0,963, s jehož pomocí byly vypočítány koncentrace zinku po odpaření vody. Tyto hodnoty jsou znázorněny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Přepočet testovaných koncentrací po zohlednění odpařené vody

Teoretická koncentrace zinku v agaru (mg Zn/kg)	Koncentrace zinku v agaru po odpaření vody (mg Zn/kg)
0,1	0,10
0,5	0,52
1,0	1,04
5,0	5,19
3	3,12
30	31,15

Reálná koncentrace zinku v připraveném expozičním médiu byla ověřována pomocí optické emisní spektrometrie s buzením v indukčně vázaném plazmatu (ICP-OES). Pro tuto analýzu byly odebírány vzorky na konci expozičního testu. Okolo 7 g agaru (přesná váha byla zaznamenána) bylo odebíráno z různých misek se stejnou koncentrací do 25ml plastové zkumavky. K agaru byla přidána 65% HNO₃ (Lach-Ner s.r.o.) pro jeho rozpuštění a objem byl doplněn destilovanou vodou na 25 ml. Takto připravený vzorek byl analyzován pomocí ICP-OES a koncentrace zinku byla vypočítána na základě kalibrační křivky standardních roztoků zinku (CPI, Santa Rosa, USA). Zjištěná reálná koncentrace zinku v agaru se od teoretické koncentrace nelišila o více než 5 %. Pro zjednodušení je v dalším textu zmiňována pouze koncentrace teoretická.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Optimalizace stanovení proteinu

Stanovení bylo prováděno na základě protokolu z kitu pro celkový protein od firmy Sigma Aldrich (TP0300). Kalibrační řada byla dle protokolu vytvořena v rozsahu 25–400 µg/ml. V prvním kroku bylo nutné určit vhodné zředění základního homogenátu (10 mg mokré hmoty/ 100 µl PBS) tak, aby se odpověď vzorků pohybovala v rámci doporučené kalibrační řady. K tomu byly použity roupice z chovu. Vyzkoušeno bylo několik různých variant zředění základního homogenátu.

V první sérii testování bylo vyzkoušeno zředění 100×, 200×, 1000×, a 2000×. Vzorky různých zředění byly vytvořeny vždy ve třech replikách. Absorbance jamek homogenátu s ředěním 200×, 1000×, a 2000× vycházely velmi nízké, jamka homogenátu s ředěním 100× sice vycházela v rámci kalibrační křivky, avšak blížila se k její spodní hranici, tudíž bylo v dalším kroku vyzkoušeno zředění nižší.

Při výběru těchto koncentrací bylo předpokládáno, že tělo roupice se skládá více jak z 80 % z vody. Nebyl ovšem zohledněn fakt, že roupice se před vážením nesmí zcela osušit, neboť by tak mohly být ovlivněny hodnoty biomarkerů oxidativního stresu. Váha před zamražením tedy přesně neodpovídá mokré váze roupice a nelze z ní takto vycházet.

V druhé sérii testování bylo zvoleno ředění nižší a to 50×, 10× a 0×. S přihlédnutím k tomu, že roupice v chovu mají nejpříhodnější podmínky k životu, a tudíž se dá předpokládat, že po expozici toxické látky se bude koncentrace celkového proteinu snižovat, bylo vybráno ředění s hodnotou absorbance zhruba v polovině kalibrační křivky a to **ředění 50×**. Hodnoty absorbancí kalibrační řady a vzorků při různém zředění jsou znázorněny v Tabulkách 7 a 8.

Tabulka 7: Kalibrační řada pro test vhodného zředění vzorku pro analýzu proteinu

c (µg/ml)	400	300	200	100	50
A	0,838	0,704	0,504	0,350	0,218

Tabulka 8: Absorbance různého zředění vzorku při měření celkového proteinu

Zředění homogenátu	Průměrná A	Zředění homogenátu	Průměrná A
2000×	0,114	50×	0,524
1000×	0,086	10×	1,796
200×	0,128	0×	1,992
100×	0,272		

V rámci zjednodušení a urychlení postupu při stanovení proteinu byly upraveny hodnoty kalibrační řady v kitu (400; 300; 200; 100 a 50 µg/ml) tak, aby mohla být připravována dvojkovým ředěním (400; 200; 100; 50 a 25 µg/ml).

To, zda může být rozsah kalibrační řady změněn muselo být ověřeno stanovením analytických parametrů meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ). LOD je hodnota, která udává hranici kvalitativního stanovení látky. LOQ udává hranici kvantitativního stanovení látky. LOD a LOQ byly vypočítány na základě následujících rovnic:

$$\text{LOD} = A_0 + 3 \times \text{SD}$$

$$\text{LOQ} = A_0 + 10 \times \text{SD}$$

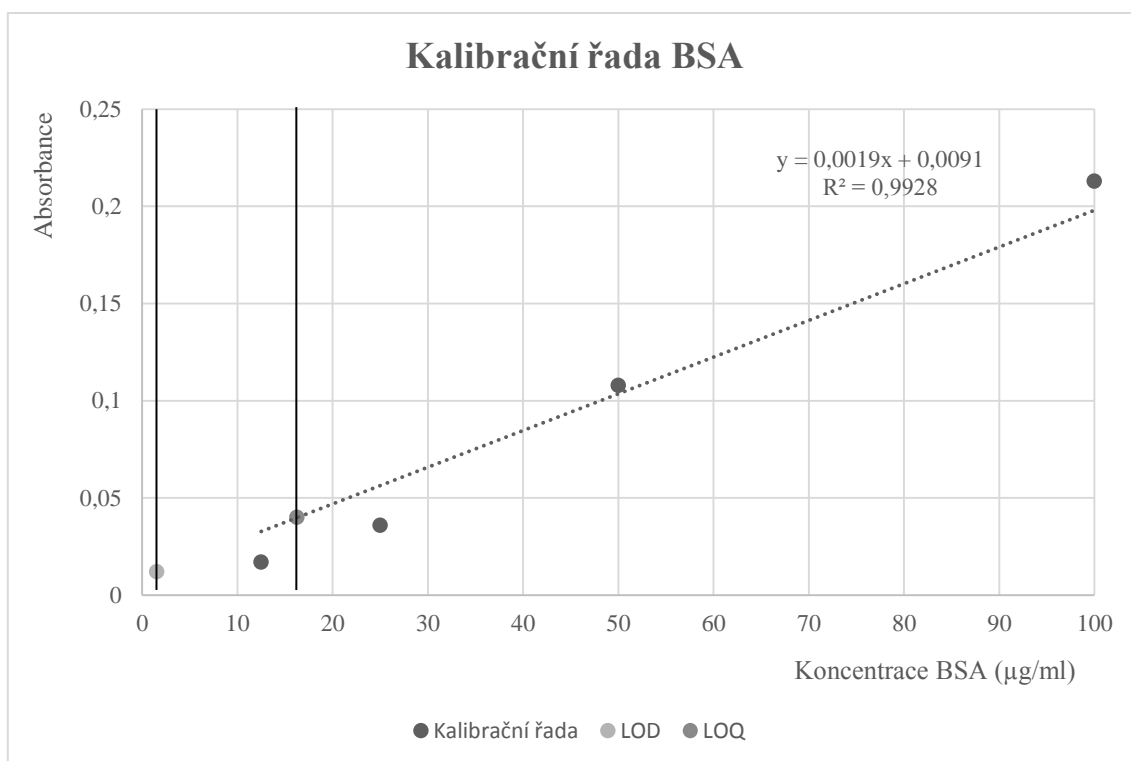
V obou rovnicích A_0 zastupuje průměrnou hodnotu absorbance 10 x změřeného blanku a SD směrodatnou odchylku.

Tabulka 9: Data kalibrační řady BSA pro určení LOD a LOQ

Kalibrační řada BSA – data						
Koncentrace (µg/ml)	400	200	100	50	25	12,5
Absorbance	0,743	0,425	0,213	0,108	0,036	0,017

Tabulka 10: LOD a LOQ pro stanovení celkového proteinu

Průměrná absorbance blanku	0,141
Směrodatná odchylka	±0,004
LOD (µg/ml)	1,5
LOQ (µg/ml)	16,3



Graf 1: Zobrazení LOD a LOQ v grafu kalibrace BSA

Jelikož se nejnižší hodnota kalibrační řady (25 µg/ml) nacházela nad LOQ, mohla se takto upravená řada pro stanovení proteinu použít.

Během optimalizace stanovení celkového proteinu došlo **ke změně způsobu homogenizace vzorku**. Účinnost homogenizační metody byla vyhodnocována z opakovaného měření celkového proteinu v homogenizovaném vzorku roupic z chovu. Odebráno a zhomogenizováno bylo 5 vzorků. Jako homogenizační roztok byl použit PBS pufr. Každý homogenát vzorku byl poté analyzován ve třech replikách a posuzována byla hodnota SD. Předpokladem tohoto měření bylo, že pokud by byl vzorek zcela zhomogenizován, hodnota směrodatné odchylky opakovaného stanovení proteinu ve stejném homogenátu by měla být co nejnižší.

První pokus o homogenizaci byl prováděn s přidáním skleněných kuliček do vzorku. Vzorek s pufrém byl vortexován v několika cyklech na vortexu. Vytvořit homogenát tímto způsobem trvalo poměrně dlouho a vzorek bylo nutné mezi cykly chladit na (4–8) °C, jelikož se během procesu zahříval. Pokud by vzorek nebyl během procesu chlazen, mohlo by dojít ke zkreslení hodnot biomarkerů. Z výsledků měření opakovatelnosti mechanické homogenizace na vortexu bylo usouzeno, že tento postup není dostačující a jeho výsledkem není dostatečně homogenní vzorek. Z Tabulky 11, kde jsou znázorněny výsledky měření celkového proteinu

po mechanické homogenizaci na vortexu, je zřetelné, že výsledné hodnoty celkového proteinu ve stejném vzorku se při opakovaném měření v jednotlivých případech velmi lišily. Hodnota SD (resp. relativní směrodatné odchylky (RSD) by měla být co nejmenší. V tomto případě se pohybovala mezi $\pm (92,6 - 413,6)$ $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ homogenitu (9 – 30 % RSD).

Tabulka 11: Mechanická homogenizace na vortexu

Opakování	c (μg proteinu/ 100 μl homogenátu)			SD (μg proteinu/ 100 μl homogenátu)	RSD (%)
1	877	1122	932	$\pm 105,0$	10,7
2	1000	928	1150	$\pm 92,6$	9,0
3	922	1162	927	$\pm 112,0$	11,2
4	1000	1944	1155	$\pm 413,6$	30,3
5	1064	714	1525	$\pm 332,2$	30,2

Na základě tohoto zjištění byl zakoupen ruční ultrazvukový homogenizátor, s kterým bylo provedeno stejné měření opakovatelnosti stanovení celkového proteinu. Bylo zjištěno, že tímto způsobem homogenizace lze získat o poznání lépe zhomogenizovaný vzorek než způsobem prvním. Výsledné hodnoty celkového proteinu po provedení homogenizace ručním ultrazvukovým homogenizátorem jsou znázorněny v Tabulce 12. Takto provedená homogenizace byla značně účinnější než homogenizace se skleněnými kuličkami, hodnoty směrodatné odchylky byly nižší a pohybovaly se mezi $\pm (20,5 - 36,7)$ $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ homogenátu. Jelikož byla tato metoda značně účinnější a RSD se pohybovaly do 4 %, byla tato metoda posouzena jako vhodná pro další použití.

Tabulka 12: Homogenizace vzorku ultrazvukovým homogenizátorem

Opakování	c (μg proteinu/ 100 μl homogenátu)			SD (μg proteinu/ 100 μl homogenátu)	RSD (%)
1	811	850	889	$\pm 31,8$	3,7
2	1144	1122	1172	$\pm 20,5$	1,8
3	978	900	978	$\pm 36,7$	3,9
4	924	904	956	$\pm 21,4$	2,3
5	1109	1160	1163	$\pm 24,8$	2,2

Po celkovém optimalizování postupu stanovení pro provedení v mikrotitrační destičce, včetně způsobu homogenizace, bylo přistoupeno ke stanovení průměrné hodnoty celkového proteinu v dospělých roupicích chovu. Pro tuto hodnotu bylo zanalyzováno 10 vzorků z různých misek chovu. Průměrná hodnota celkového proteinu v chovu byla stanovena na **(1,004 ± 0,12) mg/10 mg mokrého vzorku**.

3.2 Optimalizace stanovení celkového glutationu

Vhodné ředění vzorku pro toto stanovení bylo vybíráno při kroku deproteinizace, kdy bylo k 40 µl nezředěného homogenátu přidáváno vždy různé množství 5% SSA (60, 40, 20 µl). Vzorky s různým zředěním byly vytvořeny vždy ve třech replikách. Nejvhodnějšího výsledku, kdy odezva vzorku byla v oblasti kalibrační křivky a zároveň bylo dosaženo deproteinace vzorku, bylo dosaženo při zředění 40 µl homogenátu vzorku s 20 µl 5% SSA. Změna absorbance za minutu roztoků kalibrační řady a vzorků s různým zředěním je znázorněna v Tabulkách 13 a 14.

Tabulka 13: Kalibrační řada pro test zředění vzorku pro analýzu TG

c (µmol/l)	50	25	12,5	6,25	3,125
Průměrná Δ A/min	0,045	0,024	0,010	0,005	0,002

Tabulka 14: Odezva různě zředěných vzorků z chovu při výběru nejvhodnějšího zředění

Množství 5% SSA přidané k 40 µl homogenátu (µl)	Průměrná Δ A/min
60	0,008
40	0,011
20	0,013

V průběhu praktické práce jsme narazili na komplikaci v podobě degradace NADPH. NADPH z kitu bylo skladováno ve formě hydrátu, neboť v kitu byla obsažená jen jedna originální lahvička NADPH, která musela být připravena naráz. Připravený roztok NADPH byl rozpípetován do alikvotů a uložen při -20 °C. Domníváme se, že během otevírání mrazicího boxu se v něm teplota několikrát zvýšila a NADPH tak mohlo být částečně rozmrazeno. Po 2 měsících takového skladování vodného roztoku NADPH tento roztok postupně změnilo barvu z bezbarvého roztoku na žlutý až naoranžovělý, což naznačuje jeho oxidaci. Takovéto NADPH již nebylo možné použít, kinetická reakce při jeho použití

neprobíhala. Pro další testování bylo dokoupeno NADPH nové s odlišnými skladovacími podmínkami, které jsme v rámci laboratorní práce byli schopní zajistit. Odlišné skladovací podmínky byly dané tím, že dokoupené NADPH již šlo jednorázově navázat, a proto bylo skladováno v dodané pevné formě bez přítomnosti vody v chladničce při teplotě 4–8 °C.

Dále byl upraven postup přípravy DTNB, kde bylo DMSO pro jeho rozpuštění nahrazeno reakčním pufrem. Tato změna mohla být provedena, jelikož po dokoupení nového DTNB byl roztok DTNB před každým stanovením připravován nově. Při použití DTNB z výchozího kitu tomu tak nemohlo být, neboť DTNB bylo předem připraveno v originálních lahvičkách, do nichž bylo následně přilito DMSO. Celá tato lahvička tedy musela být připravována naráz a roztok byl poté skladován při -20 °C. Během tohoto skladování však DTNB v roztoku DMSO ztrácelo svou aktivitu. Proto bylo v dalším postupu přistoupeno k jeho přípravě vždy těsně před stanovením.

Po zoptimalizování podmínek stanovení byla stanovena hodnota TG u dospělých roupic z chovu. Tato hodnota byla **(19,1 ± 1,8) nmol TG/ mg proteinu** ve vzorku.

3.3 Optimalizace stanovení malondialdehydu

Prvním krokem optimalizace byla změna rozsahu kalibrační křivky z původních 100–20 µmol/l MDA na 100 – 1,56 µmol/l MDA. Takováto kalibrační křivka mohla být připravována dvojkovým ředěním a byla tak usnadněna její příprava. Stejně jako u stanovení proteinu musela být vhodnost této úpravy ověřena určením LOD a LOQ. Tyto limitní hodnoty byly stanovovány z grafu kalibrační křivky při vlnové délce 532 nm (Graf 2) a jsou uvedeny v Tabulce 16.

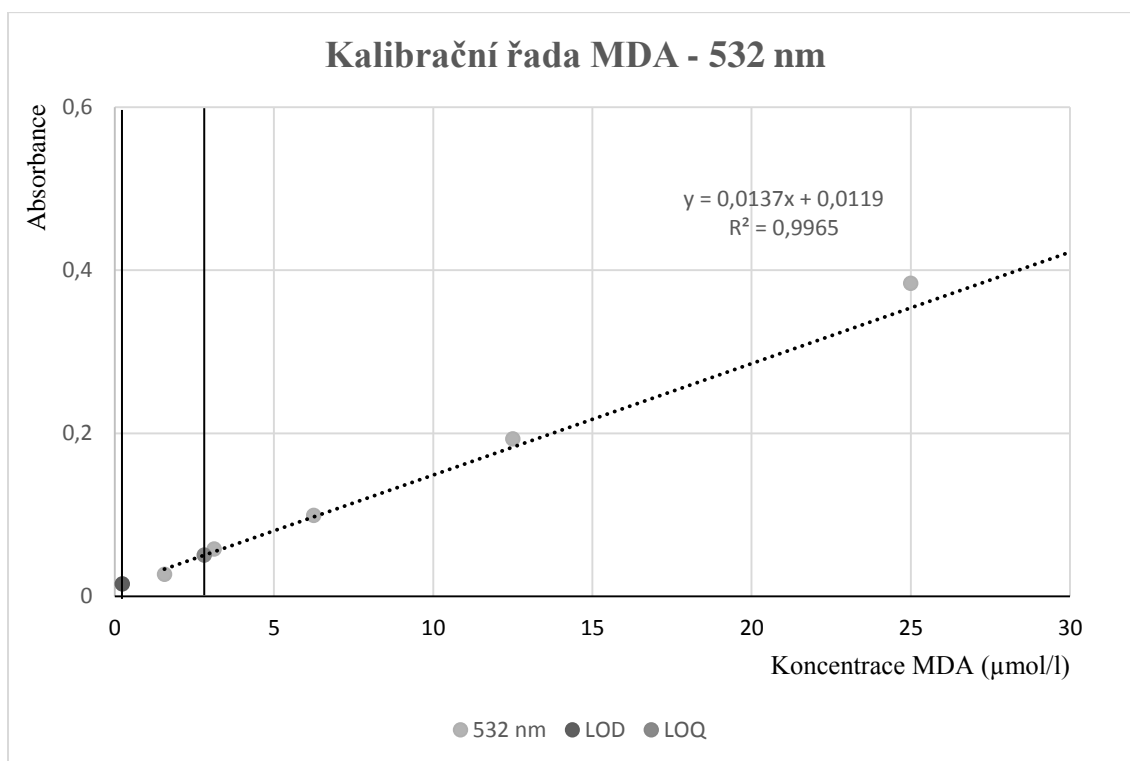
Tabulka 15: Kalibrační řada MDA při vlnové délce 532 nm a při vypočítané korigované hodnotě absorbance

c MDA (µmol/l)	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56
A ₅₃₂	1,401	0,636	0,384	0,193	0,099	0,058	0,042
A _{kor}	1,264	0,580	0,350	0,175	0,086	0,053	0,032

Tabulka 16: Hodnoty LOD a LOQ pro stanovení MDA z grafu závislosti absorbance na koncentraci při vlnové délce 532 nm

Průměrná absorbance blanku	0,055
Směrodatná odchylka	0,005
LOD (μmol/l)	0,23
LOQ (μmol/l)	2,81

Z Grafu 2 je patrné, že poslední bod námi vytvořené kalibrace (1,56 μmol/l) se nacházel pod hodnotou LOQ. To značí, že MDA je v kalibračním roztoku sice detekováno (hodnota je nad LOD), ale nemůžeme si být zcela jistý měřenou odpovědí tohoto roztoku. Další kalibrační bod (3,125 μmol/l) se již nachází nad limitem stanovitelnosti. Kalibrační řada by v optimálním případě neměla mít méně než 5 kalibračních bodů. Tuto podmínku námi nastavená kalibrační řada splňuje i po vynechání nejméně koncentrovaného bodu. Konečný rozsah kalibrační křivky pro stanovení celkového množství MDA byl tedy nastaven na **100 – 3,125 μmol/l MDA**.



Graf 2: Zobrazení LOD a LOQ v grafu kalibrace pro MDA

Současně se stanovením LOD a LOQ bylo vybíráno vhodné množství homogenátu vstupujícího do reakce. Pro určení vhodného množství vzorku byly využity vzorky z chovu. Bylo vyzkoušeno 200; 100 a 50 μl nezředěného homogenátu. Vzorky všech ředění byly

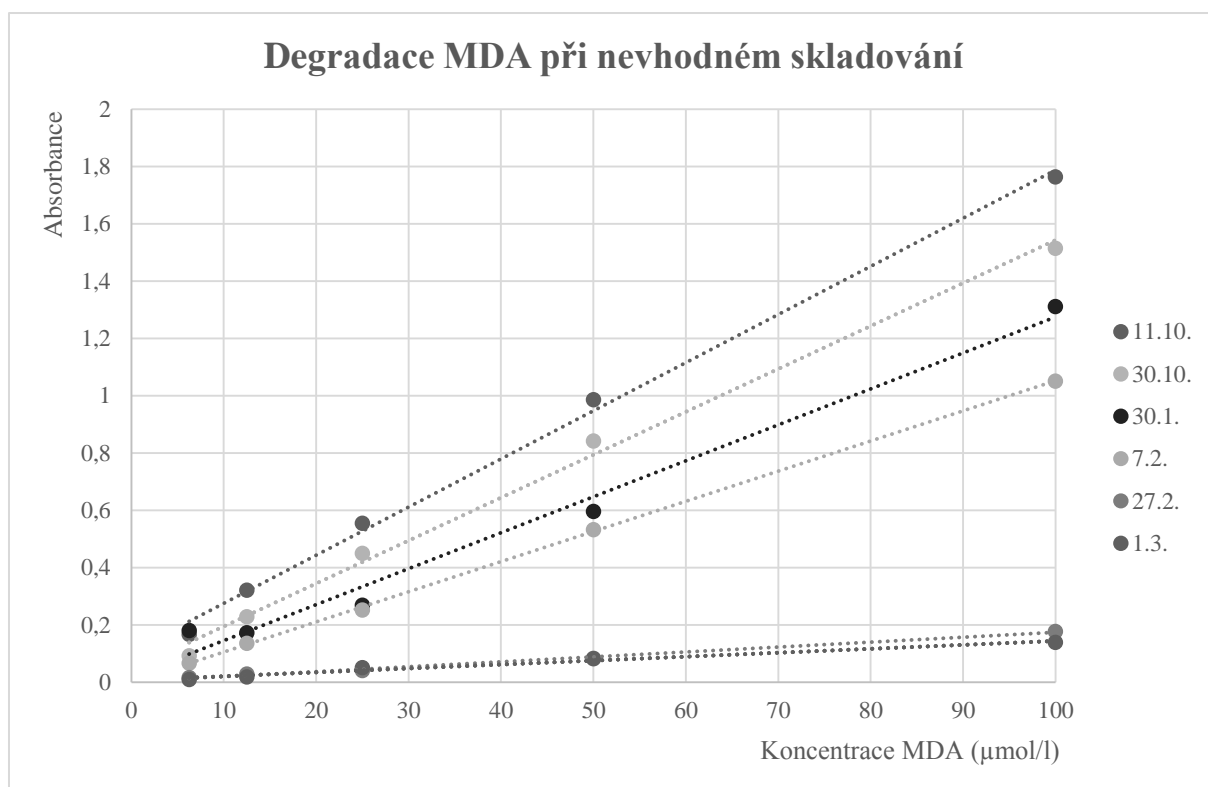
vytvořeny ve třech replikách. Hodnoty absorbance kalibrační řady jsou uvedeny v Tabulce 15, hodnoty absorbancí a jednotlivých homogenátů jsou uvedeny v Tabulce 17.

Tabulka 17: Výsledky absorbance vzorku při změně jeho množství vstupujícího do reakce

Množství homogenátu (μmol)	A (532 nm)	A (korigovaná)
200	0,095	0,059
100	0,048	0,030
50	0,023	0,014

Absorbance při použití 50 či 100 μl homogenátu se pohybovaly mimo kalibrační křivku (100 – 3,125 μmol/l MDA), tudíž tyto hodnoty nelze pro výpočet koncentrace malondialdehydu využít. Při použití 200 μl homogenátu se absorbance pohybovala v rámci kalibrační křivky. Z důvodu celkového množství vzorku však nebylo možné zvýšit objem homogenátu více, než na 200 μl. Za předpokladu, že hodnota MDA u vzorků z chovu by měla být nižší než u exponovaných vzorků, bylo možné toto množství využít.

MDA standard dodávaný v kitu lipidní peroxidace by měl být dle ke kitu přiložených instrukcí skladován při -20 °C. Při našem skladování došlo z technických důvodů opakovaně ke zvýšení teploty v mrazícím boxu až na -5 °C. Domníváme se, že právě tato skutečnost zapříčinila degradaci MDA. Tato degradace je znázorněna v Grafu 9. V grafu je patrné snížení sklonu kalibrační křivky s prodlouženým časem skladování. Pro vyřešení tohoto problému byl dokoupen nový MDA standard s jinými skladovacími podmínkami (pokojová teplota), které jsme byli schopni splnit.



Graf 3: Degradace MDA při opakovaném zvýšení teploty v mrazicím boxu

Po dosažení optimálního postupu pro stanovení MDA bylo nejprve stanoveno průměrné množství MDA v chovu. Průměrná hodnota MDA v chovu byla stanovena na **(0,93 ± 0,11) nmol MDA/ mg proteinu** při měření absorbance při 532 nm a na **(0,66 ± 0,09) nmol MDA/ mg proteinu** při výpočtu z korigované hodnoty absorbance. Výsledek korigované absorbance by měl být přesnější, neboť vychází z výpočtu, ve kterém se zbavujeme vlivu absorpce dalšími látkami ve vzorku.

Současně s optimalizací jednotlivých stanovení byl upravován i výchozí objem homogenizačního pufru pro společný směsný homogenát. Objem bylo nutné nastavit tak, aby byl homogenát snadno použitelný pro všechna tři spektrofotometrická stanovení. PBS homogenizační pufr byl přidáván v různém množství (10 mg mokré hmoty do 50 μl, 100 μl, 200 μl a 1000 μl PBS) pro vytvoření různě koncentrovaného homogenátu. Jako nejvhodnější homogenát, který byl použit pro stanovení koncentrace celkového proteinu, TG i LPO, byl vybrán **homogenát 10 mg mokré hmoty/ 100 μl PBS**. Při nižším množství PBS nebylo dosaženo dostatečného množství vzorku pro veškerá stanovení. Navíc z důvodů malého objemu PBS probíhala homogenizace obtížně. Při vyšším ředění bylo dosaženo lepší homogenizace, avšak koncentrace TG a MDA byla příliš nízká pro detekci pomocí námi použitých spektroskopických metod.

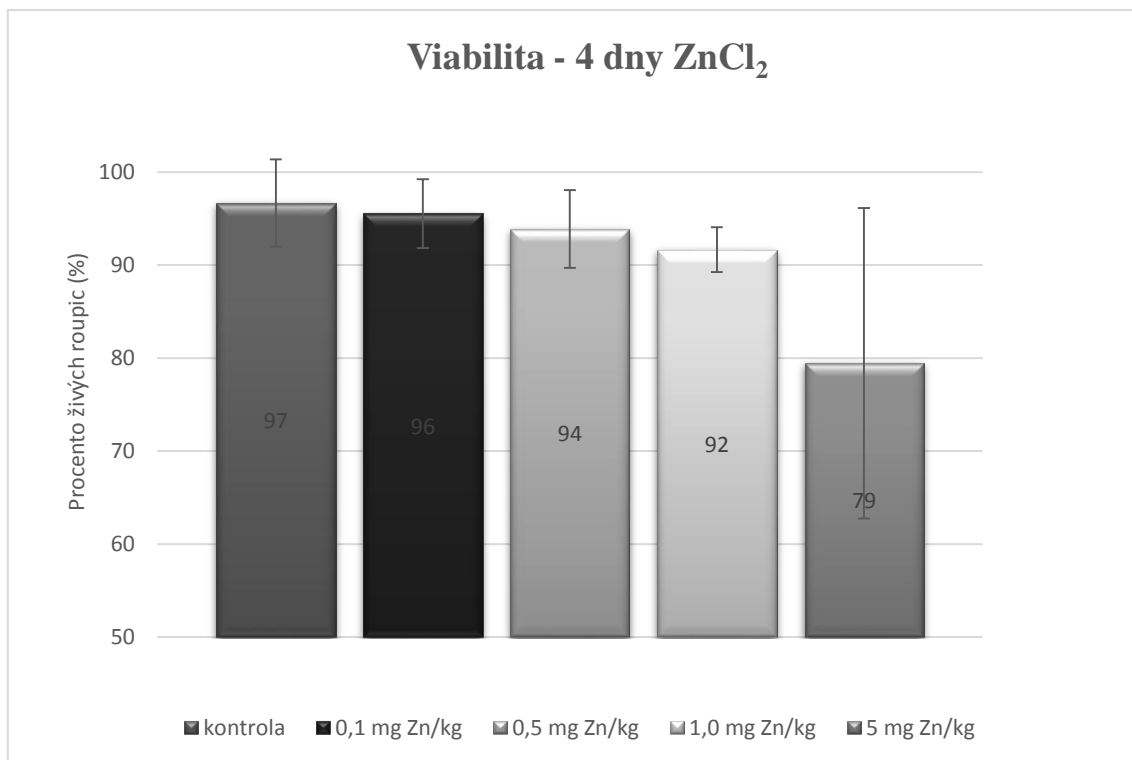
3.4 Testy toxicity ZnCl₂ - 4 a 7 dní ZnCl₂ (0,1; 0,5; 1,0 a 5,0 mg Zn/kg)

Roupice byly vystaveny ZnCl₂ o koncentracích 0; 0,1; 0,5; 1,0 a 5,0 mg Zn/kg agaru po dobu 4 a 7 dní. Viabilita roupic byla testována ve třech sériích po čtyřech miskách pro každou koncentraci. Za mrtvé byly považovány roupice, které nereagovaly na mechanický stimul. Úmrtnost v kontrolní skupině nepřesáhla 20 %. Ve všech testovaných miskách byla stanovena procentuální viabilita roupic a v miskách s koncentracemi 0; 0,5 a 5,0 mg Zn/kg agaru byly stanoveny hodnoty biomarkerů a proteinu.

3.4.1 Čtyřdenní test toxicity ZnCl₂

Z výsledků znázorněných v Grafu 4 je patrné, že viabilita roupic se zvyšující koncentrací ZnCl₂ postupně klesá. Rozdíl ve viabilitě mezi jednotlivými koncentracemi však není příliš výrazný. Z takového výsledku nelze zjistit žádné bližší informace o míře poškození roupic při expozici jednotlivým koncentracím. Právě pro takovéto bližší posouzení byla vyvinuta snaha o optimalizaci a zavedení biochemických testů markerů oxidativního stresu.

U testu toxicity ZnCl₂ a následně i u testů s nZnO byl zaznamenán vzestupný trend hodnoty SD při zvyšující se koncentraci těchto látek. Tento fakt je pravděpodobně zapříčiněn tím, že při zvyšující se koncentraci toxické látky v agaru se roupice snažily z takového prostředí co nejrychleji uniknout (tzn. únikové chování roupic). Přeživší roupice v miskách s vysokými koncentracemi se nacházely převážně na okrajích misky a agaru, kde nemuselo docházet k expozici roupice na celém jejím povrchu. Tyto roupice zátěž vysokou koncentrací většinou přežily. Roupice, které se pohybovaly v agaru byly exponovány více, a tudíž mezi nimi bylo nalezeno více mrtvých jedinců. Toto chování bylo zaznamenáno již dříve, a to ve větší míře, neboť v dřívějších testech byl agar rozlíván jen do misky a ne na víčko. Rozlíváním agaru na víčko byl tento efekt značně potlačen, avšak z výsledků SD pro jednotlivé koncentrace plyne, že jistý efekt únikového chování roupic na testování je zde neustále.



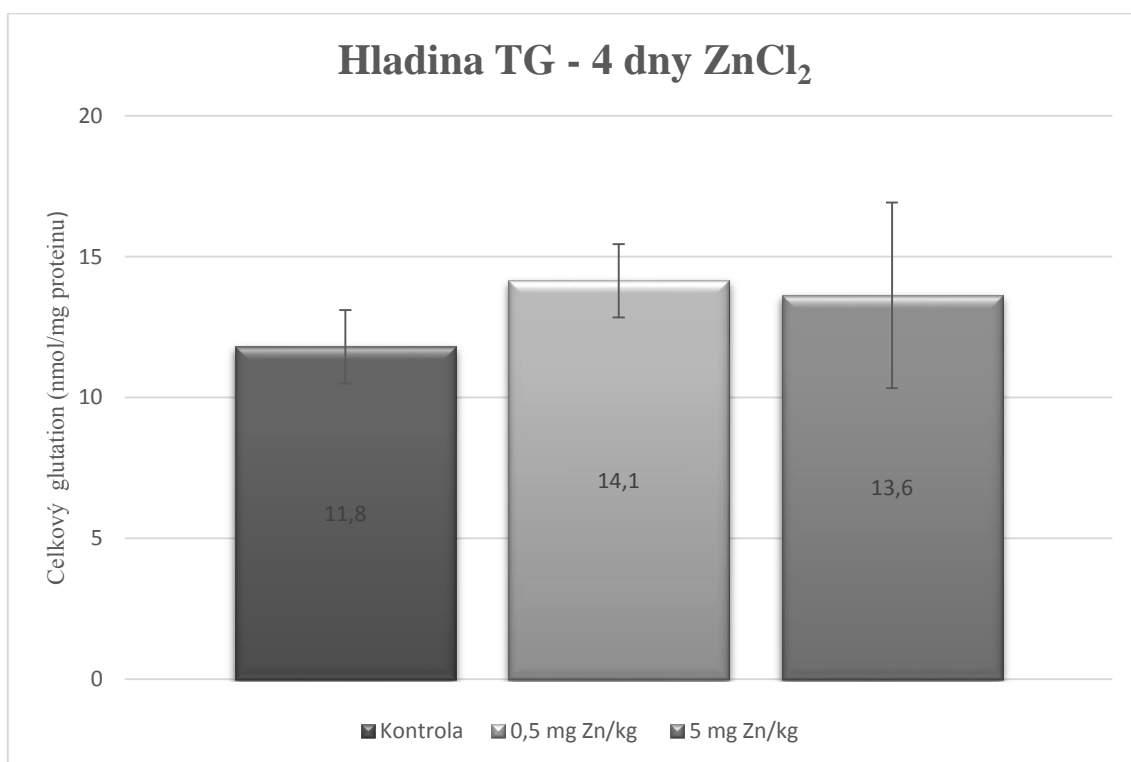
Graf 4: Viabilita roupic (%): expozice 4 dny $ZnCl_2$ (0,1; 0,5 a 1,0 a 5,0 mg Zn/kg)

Naměřené hodnoty TG jsou shrnuty v Tabulce 18 a graficky znázorněny v Grafu 5. Z výsledků je zřejmé, že po čtyřdenní expozici roupic $ZnCl_2$ nevykazují střední hodnoty TG při porovnání s kontrolou žádný trend. Vzhledem k hodnotám RSD je pozorovaný rozdíl v hladině TG statisticky nevýznamný. Velikost RSD u nejvíce exponované skupiny s nejnižší viabilitou je téměř dvojnásobná, než u neexponované a první exponované skupiny.

Zajímavý je poměrně velký rozdíl mezi koncentracemi TG u roupic z chovu a u roupic odebraných z negativní kontroly. Hodnota TG u roupic z chovu byla stanovena na $(19,1 \pm 1,8)$ nmol TG/ mg proteinu. Hodnota TG u roupic z negativních kontrol testů byla značně nižší, pohybovala se mezi 11–12 nmol TG/ mg proteinu. Hodnota biomarkeru TG může klesat jako odpověď na mechanické zacházení s roupicemi při jejich přenášení do testu a vybírání z agaru. Tento krok by mohl zapříčinit snížení hladiny TG oproti kontrole. Nastává ale otázka, zda odpověď je daného biomarkeru skutečně odpovědí na oxidativní stres způsobený $ZnCl_2$ či $nZnO$ či zda se systém organismu po stresové mechanické stimulaci pouze postupně navrácí do fyziologického stavu. Tuto otázku nejsme bez dalšího testování schopni zodpovědět. U MDA nebyl tento trend zaznamenán.

Tabulka 18: Hladina TG u vzorků roupic exponovaných 4 dny $ZnCl_2$ (0,5 a 5,0 mg Zn/kg)

	TG 4 dny (nmol/mg proteinu)	SD	Rel. SD (%)
Kontrola	11,8	± 1,3	11,0
0,5 mg Zn/kg	14,1	± 1,3	9,5
5,0 mg Zn/kg	13,6	± 3,3	24,3



Graf 5: Koncentrace TG u *E. crypticus* exponovaných 4 dny $ZnCl_2$ o koncentracích 0,5 a 5,0 mg Zn/kg

Data měření MDA jsou shrnuta v Tabulce 19 a graficky znázorněna v Grafech 6 (532 nm) a 7 (korigovaná absorbance). Střední hodnoty hladin MDA nevykazují ani trend ani rozdíl mezi nexponovanou a exponovanými skupinami, hodnota RSD v nejvíce exponované skupině je nejmenší. Při porovnání dat získaných při 532 nm a dat získaných výpočtem z rovnice pro korigovanou absorbanci je zřejmé, že část odezvy vzorků je dána jinými látkami než malondialdehydem.

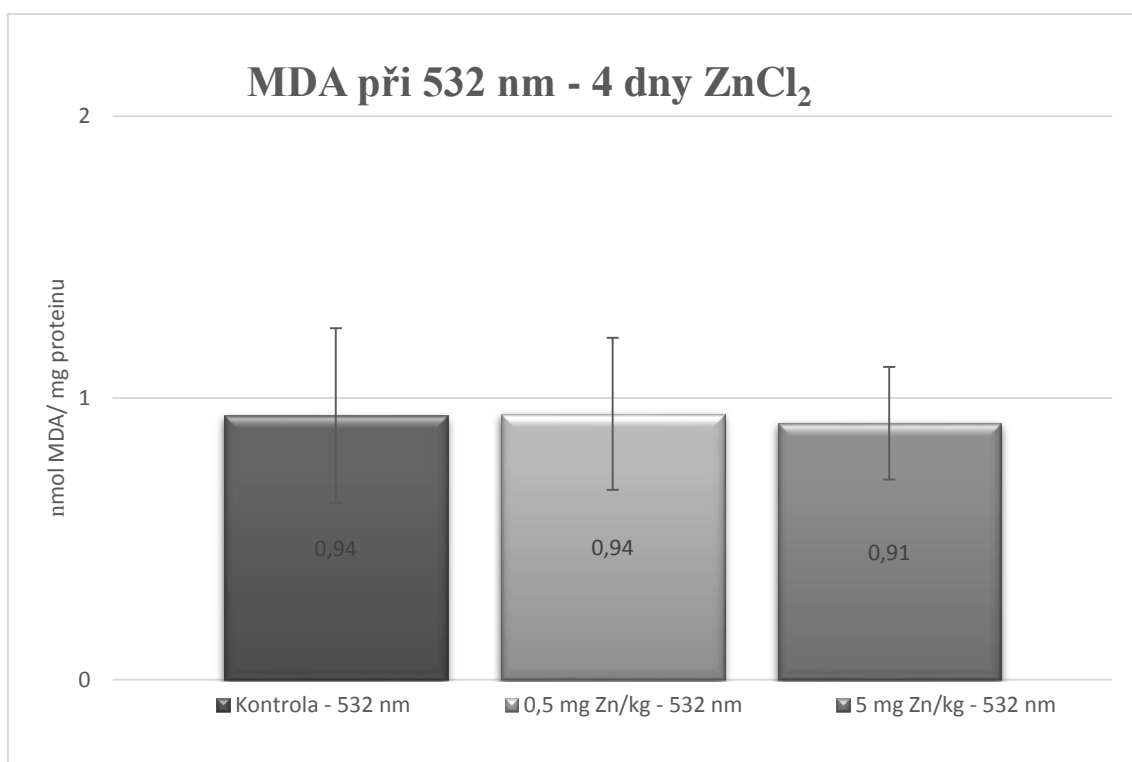
Je těžké určit, zda jsou hodnoty MDA téměř neměnné na základě toho, že proces lipidní peroxidace v našich vzorcích neprobíhá, či zda je námi nastavený test nefunkční. Je možné, že námi nastavené stanovení funguje, ale proces lipidní peroxidace potřebuje pro svou aktivaci delší působení toxické látky či nemusí u *E. crypticus* vůbec probíhat. Zároveň může zinek tyto procesy v roupicích aktivovat až při působení vyšších koncentrací.

Bez dalších testů jsme nebyli schopni říci, zda je tento biomarker pro použití na *E. crypticus* vhodný či nikoliv. Pro další postup bylo zvažováno buď zvýšení testované koncentrace zinku či prodloužení času jeho působení. Vybrána byla varianta druhá, a to prodloužení času působení. Čas expozice byl v dalším kroku prodloužen ze 4 na 7 dní. Výsledky tohoto sedmidenního měření jsou shrnuty v následující kapitole (3.4.2).

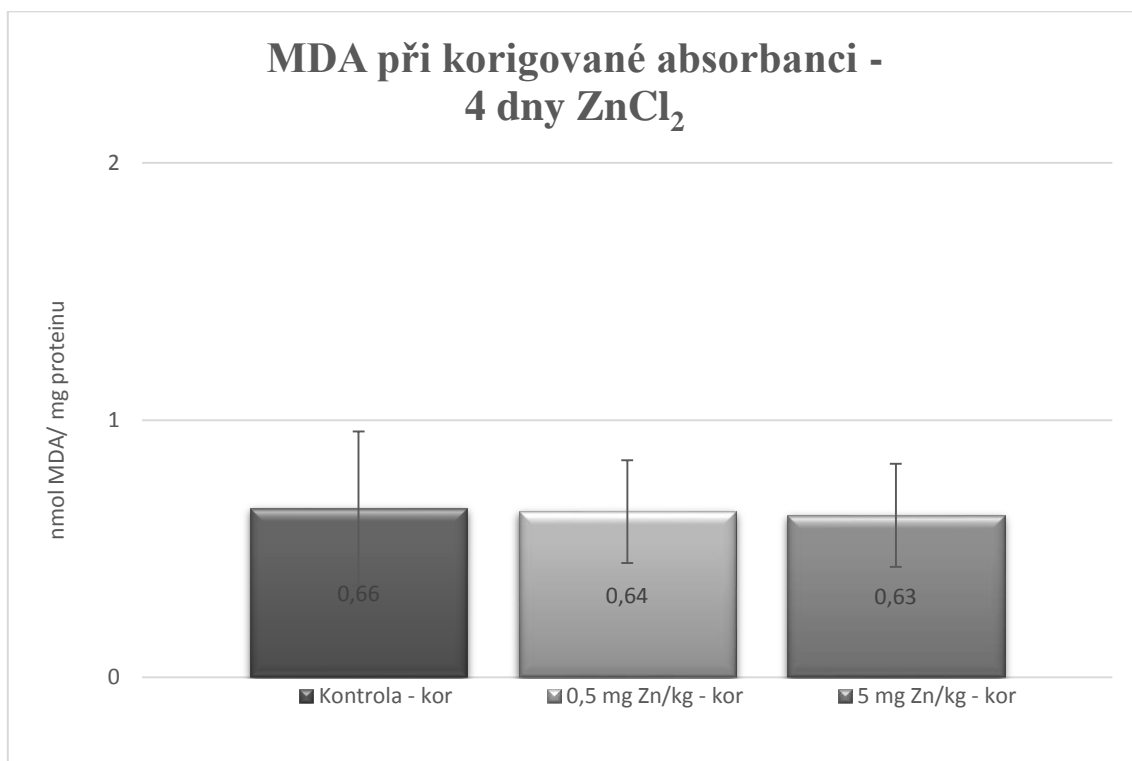
Pro svou neměnnou hodnotu při zvyšující se koncentraci $ZnCl_2$ byly oba biomarkery shledány jako nedostačující pro analýzu vzorků roupic po čtyřdenní expozici 0,5 a 5 mg Zn/kg.

Tabulka 19: Průměrná hodnota MDA pro roupice exponované 4 dny $ZnCl_2$ (0,5 a 5,0 mg Zn/kg)

Vzorek	MDA ₅₃₂ (nmol/mg proteinu)	SD	Rel. SD (%)
Kontrola	0,94	± 0,08	8,5
0,5 mg Zn/kg	0,94	± 0,10	10,8
5,0 mg Zn/kg	0,91	± 0,02	2,1
	MDA_{KOR} (nmol/mg proteinu)		
Kontrola	0,66	± 0,07	11,4
0,5 mg Zn/kg	0,64	± 0,10	15,2
5,0 mg Zn/kg	0,63	± 0,04	6,3



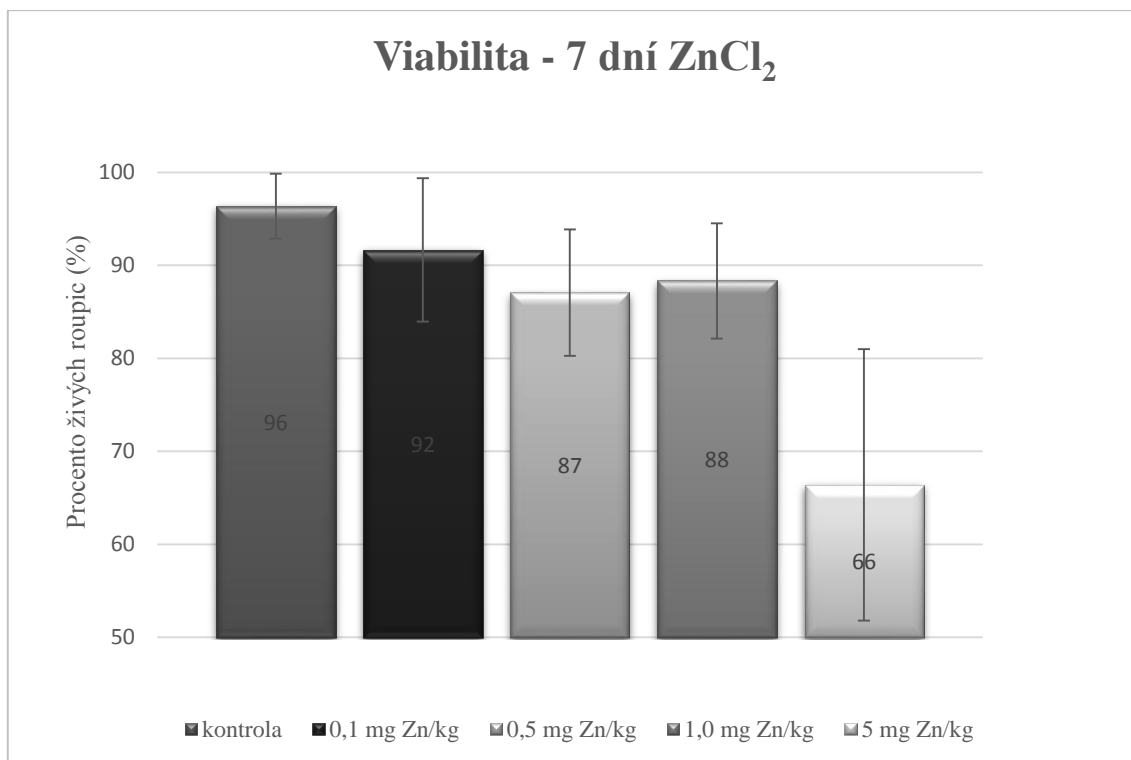
Graf 6: Hladina MDA (vypočtená z absorbance při 532 nm) u *E. crypticus* u exponovaných 4 dny ZnCl₂ o koncentraci 0,5 a 5,0 mg Zn/kg



Graf 7: Hladina MDA (vypočtená z korigované absorbance) u *E. crypticus* u exponovaných 4 dny ZnCl₂ o koncentraci 0,5 a 5,0 mg Zn/kg

3.4.2 Sedmidenní test toxicity ZnCl₂

Z Grafu 8, ve kterém je vyobrazena viabilita roupic po sedmidenní expozici ZnCl₂ o koncentracích 0; 0,1; 0,5; 1,0 a 5,0 mg Zn/kg agaru, je zřejmé, že celková viabilita roupic s prodloužením času expozice klesá.



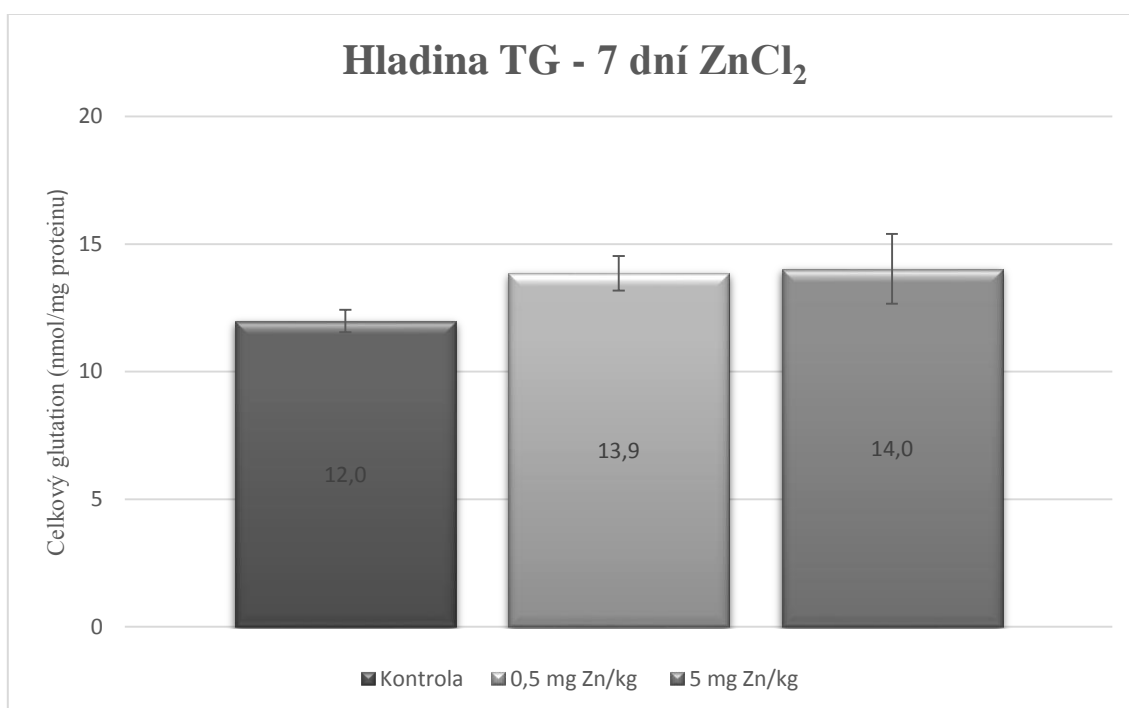
Graf 8: Viabilita roupic (%): expozice 7 dní ZnCl₂ (0,1; 0,5; 1,0 a 5,0 mg Zn/kg)

Data měření TG pro sedmidenní expozici ZnCl₂ jsou shrnuta v Tabulce 19 a graficky znázorněna v Grafu 9. Na rozdíl od čtyřdenního testu, po sedmidenní expozici ZnCl₂ nacházíme v naměřených hodnotách TG viditelný vzestupný trend mezi exponovanými skupinami a kontrolou. Tento trend se dá považovat za hraničně statisticky významný. Stanovení TG mají v daných skupinách výrazně nižší hodnotu RSD, než tomu bylo u čtyřdenního testu. V případě čtyřdenního testu bude patrně hodnota RSD projevem individuálních rozdílů v dynamice odezvy na stresový podnět. Zdá se, že po 7 dnech přestávají být tyto individuální rozdíly podstatné a projevuje se celkový účinek stresoru na populaci roupic.

Zvýšení TG u exponovaných roupic by mohlo značit, že se jako odpověď na oxidativní stres způsobený ZnCl₂ v organismu aktivovala zvýšená syntéza glutationu. Jelikož v životním prostředí dochází k expozici spíše nízkými koncentracemi po delší dobu, bylo by pro další práci zajímavé čas působení ZnCl₂ prodloužit a hladinu TG dále sledovat.

Tabulka 20: Hladina TG u vzorků roupic exponovaných 7 dní ZnCl₂ (0,5 a 5,0 mg Zn/kg)

	TG 7 dní (nmol/mg proteinu)	SD	Rel. SD (%)
Kontrola	12,0	± 0,44	3,7
0,5 mg Zn/kg	13,9	± 0,68	4,9
5,0 mg Zn/kg	14,0	± 1,37	9,8



Graf 9: Koncentrace TG u *E. crypticus* exponovaných 7 dní ZnCl₂ o koncentracích 0,5 a 5,0 mg Zn/kg

Data měření MDA po sedmidenní expozici ZnCl₂ jsou shrnuta v Tabulce 21 a graficky znázorněna v Grafech 10 (absorbance při 532 nm) a 11 (korigovaná absorbance).

Střední hodnoty MDA při použití nekorigované absorbance se sice liší, ale díky vysoké hodnotě SD (případně RSD) nejsou tyto rozdíly statisticky významné. Na hodnoty RSD mohou mít vliv jak biologické faktory (rozdíl v odolnosti jedinců vůči dopadům oxidativního stresu) tak i analytické faktory (vliv přípravy vzorků).

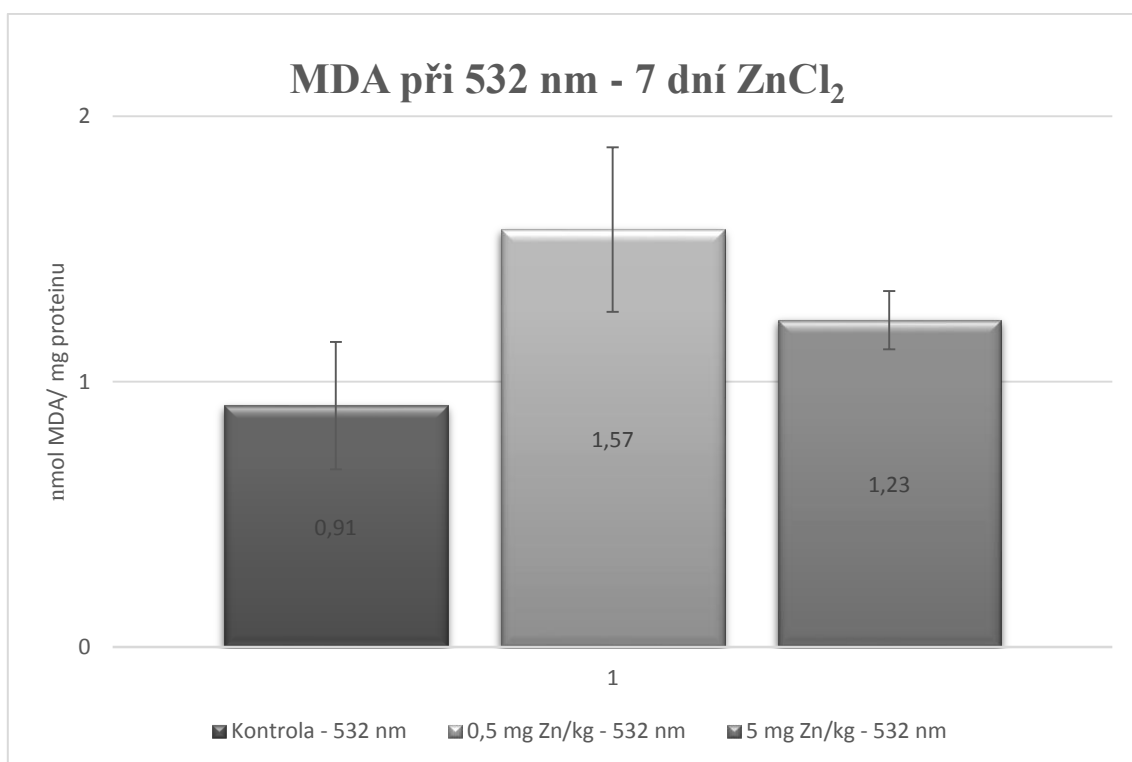
Při vyhodnocení s použitím korigované hodnota MDA se hodnota RSD snižuje. To by mohlo dokazovat, že se při použití korigované hodnoty skutečně odstraňuje vliv interferujících látek na výsledek stanovení. Výsledky vykazují vzrůstající trend pro hodnotu MDA u exponovaných roupic v porovnání s negativní kontrolou. Tyto výsledky můžeme považovat

za statisticky významné. Zvýšení hladiny MDA po sedmidenní expozici $ZnCl_2$, může být dáno tím, že lipidní peroxidace je komplexní proces probíhající v mnoha krocích. Proto je možné, že potřebuje pro svou aktivaci delší časový úsek a po čtyřdenní expozici ještě nebyla dostatečně aktivována.

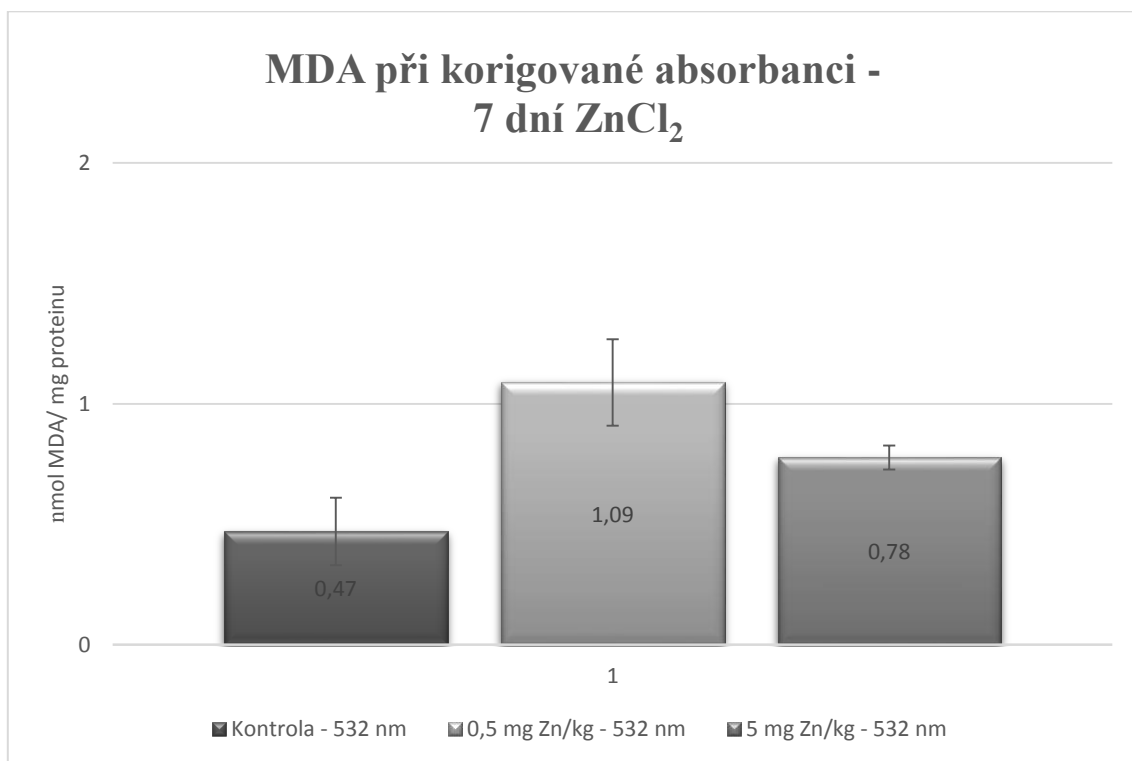
Hladina MDA byla zvýšena v případě obou testovaných koncentrací, avšak jeho vyšší hodnota byla při nižší koncentraci $ZnCl_2$ (Tabulka 21). Redoxní systém organismu a antioxidační mechanismy jsou velmi komplexní, a ne vždy musí být odpověď biomarkeru lineární se zvyšující se koncentrací chemické látky. Stejně tomu je například ve studii Li et al. (2011), kde při 96 h expozici *Eisenia fetida* $nZnO$ na filtračním papíře byl při koncentraci 50 mg $nZnO/l$ aplikovaného roztoku zaznamenán nárůst aktivity SOD oproti kontrole, přičemž při koncentraci 100 mg/l tato aktivita opět klesala (Li et al., 2011).

Tabulka 21: Průměrná hodnota MDA pro rouspice exponované 7 dní $ZnCl_2$ (0,5 a 5,0 mg Zn/kg)

Vzorek	MDA ₅₃₂ (nmol/mg proteinu)	SD	Rel. SD (%)
Kontrola	0,91	± 0,24	26,3
0,5 mg Zn/kg	1,57	± 0,31	19,8
5,0 mg Zn/kg	1,23	± 0,11	9,3
	MDA _{KOR} (nmol/mg proteinu)		
Kontrola	0,47	± 0,14	29,3
0,5 mg Zn/kg	1,09	± 0,18	16,6
5,0 mg Zn/kg	0,78	± 0,05	7,0



Graf 10: Hladina MDA (vypočtená z absorbance při 532 nm) u *E. crypticus* u exponovaných 7 dní ZnCl₂ o koncentraci 0,5 a 5,0 mg Zn/kg

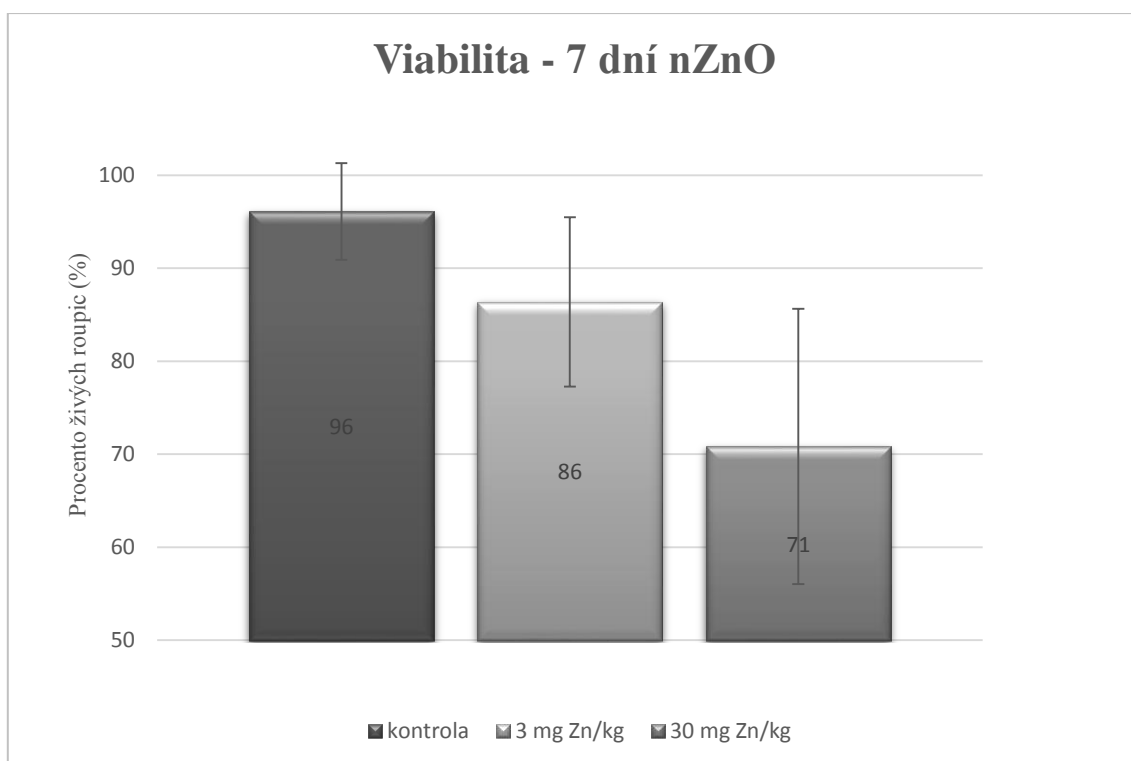


Graf 11: Hladina MDA (vypočtená z korigované absorbance) u *E. crypticus* u exponovaných 7 dní ZnCl₂ o koncentraci 0,5 a 5,0 mg Zn/kg

3.5 Testy toxicity nZnO - 7 dní nZnO (3 a 30 mg Zn/kg)

Při výběru testovaných koncentrací nZnO jsme stejně jako u ZnCl₂ vycházeli z LC₅₀, která je při čtyřdenní expozici nZnO 43,7 mg Zn/kg. Testovány byly koncentrace 3 a 30 mg Zn/kg agaru po dobu 7 dnů.

Toxicita nZnO je pravděpodobně v největší míře způsobena rozpuštěnými ionty. Jelikož je však ZnO méně rozpustný než ZnCl₂, je výsledná toxicita ZnCl₂ vyšší. Proto se LC₅₀ nZnO a z něho vycházející testování toxicity nZnO pohybují ve vyšších koncentracích.

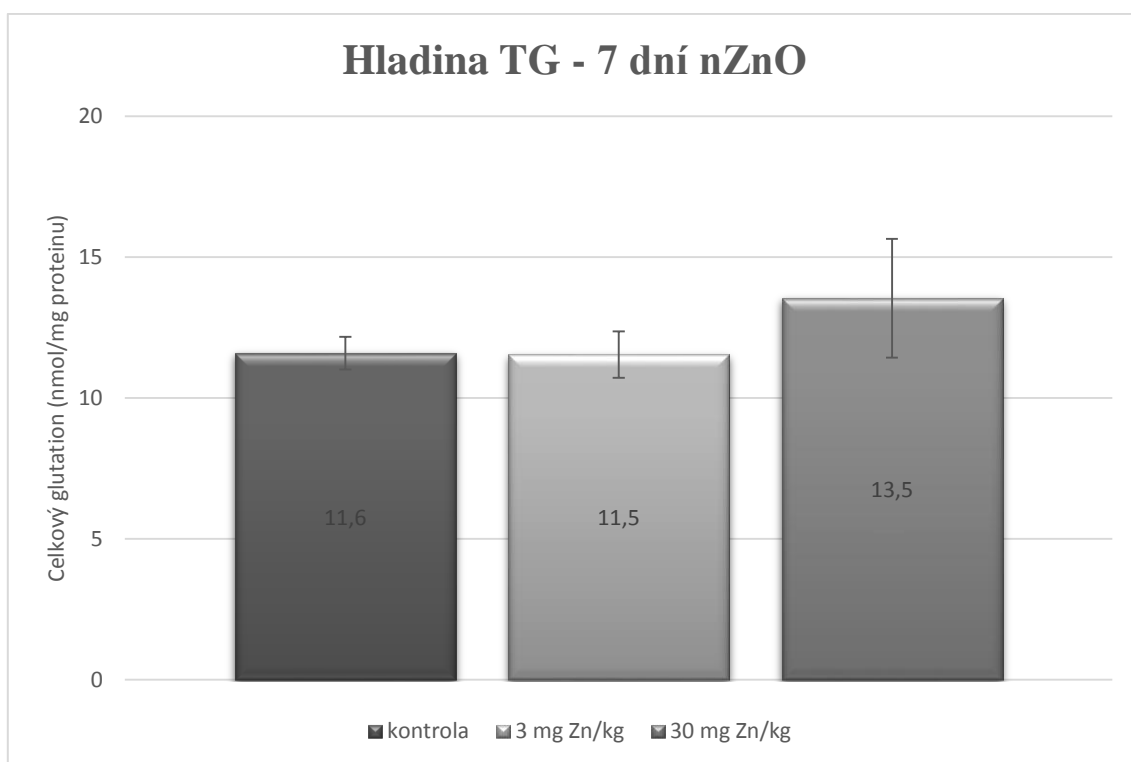


Graf 12: Viabilita roupic (%): 7 dní nZnO (3 a 30 mg Zn/kg agaru)

Data měření TG po sedmidenní expozici nZnO jsou shrnuta v Tabulce 22 a graficky znázorněna v Grafu 13. Pozorované rozdíly ve středních hodnotách TG nejsou statisticky významné. Stejně jako u testování toxicity ZnCl₂ roste s mírou expozice hodnota RSD. To může být dáno vnitrodruhovou variabilitou testovaných organismů.

Tabulka 22: Hladina TG u vzorků roupic exponovaných 7 dní nZnO (3 a 30 mg Zn/kg)

	TG 7 dní (nmol/mg proteinu)	SD	Rel. SD (%)
Kontrola	11,6	± 0,58	5,0
3 mg Zn/kg	11,5	± 0,82	7,1
30 mg Zn/kg	13,5	± 2,11	15,6

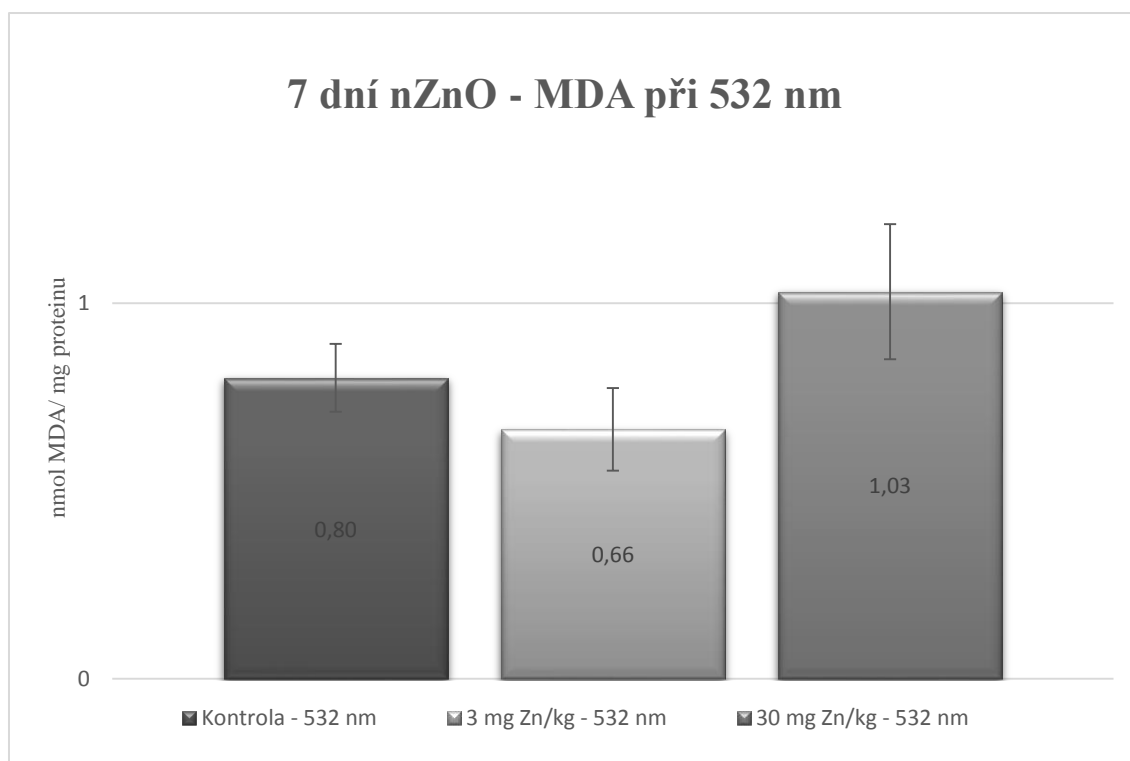


Graf 13: Koncentrace TG u *E. crypticus* exponovaných 7 dní nZnO o koncentraci 3 a 30 mg Zn/kg

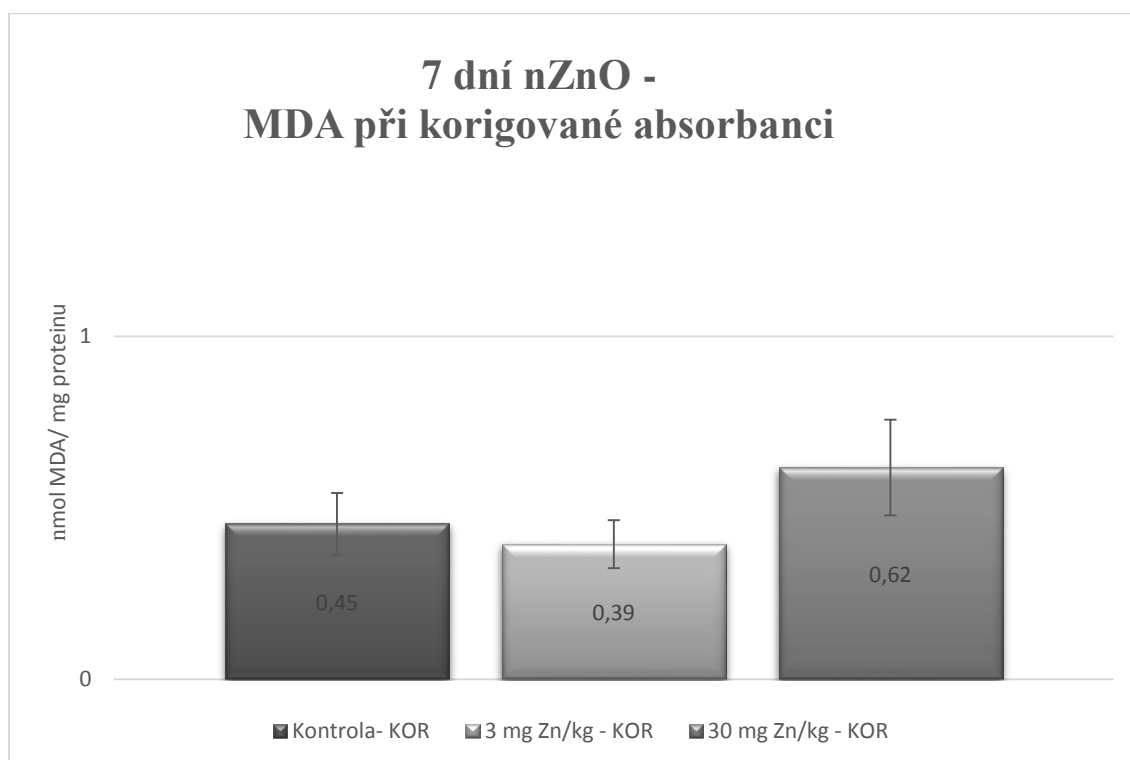
Data měření MDA po expozici nZnO jsou shrnuta v Tabulce 23 a graficky znázorněny v Grafech 14 (532 nm) a 15 (KOR). V obou případech (u nekorigované i korigované absorbance) je viditelný náznak mírného (ovšem statisticky nevýznamného) zvýšení MDA při nejvyšší testované dávce. Použití korigované absorbance však oproti výsledkům sedmidenních testů se ZnCl₂ tentokrát nevedlo ke snížení RSD. Mohl by se tu projevat interference nanočástic.

Tabulka 23: Průměrná hodnota MDA pro roupice exponované 7 dní (3 a 30 mg Zn/kg)

Vzorek	MDA ₅₃₂ (nmol/mg proteinu)	SD	Rel. SD (%)
Kontrola	0,80	± 0,09	10,7
0,5 mg Zn/kg	0,66	± 0,11	16,3
5,0 mg Zn/kg	1,03	± 0,18	17,4
	MDA_{KOR} (nmol/mg proteinu)		
Kontrola	0,45	± 0,09	20,8
0,5 mg Zn/kg	0,39	± 0,07	18,4
5,0 mg Zn/kg	0,62	± 0,14	23,4



Graf 14: Hladina MDA (vypočtená z absorbance při 532 nm) u *E. crypticus* u exponovaných 7 dní nZnO o koncentraci 3 a 30 mg Zn/kg



Graf 15: Hladina MDA (vypočtená z korigované absorbance) u *E. crypticus* u exponovaných 7 dní ZnCl₂ o koncentraci 3 a 30 mg Zn/kg

Statisticky významné zvýšení hladin TG a MDA bylo zaznamenáno u sedmidenní expozice ZnCl₂. U stejně dlouhé expozice nZnO statisticky významné výsledky zaznamenány nebyly.

Tento fakt může poukazovat na to, že pro organismus *E. crypticus* je toxicitější látkou $ZnCl_2$ než nZnO. Je pravděpodobně způsoben rozpustností jednotlivých látek, kdy $ZnCl_2$ je oproti ZnO značně rozpustnější a do agaru uvolňuje víc zinečnatých kationtů. Ty jsou pravděpodobně hlavními činiteli při vzniku oxidativního poškození organismu. Jelikož v životním prostředí dochází k expozici spíše nízkými koncentracemi po delší dobu, bylo by pro další práci zajímavé čas působení zinku prodloužit a hladinu TG dále sledovat.

V práci týmu Hu et al. (2011) bylo sledováno působení nZnO na *Eisenia fetida* v koncentračním rozmezí 0,1 – 5,0 mg Zn/kg půdy. Po sedmidenní expozici byla zaznamenána zvýšená genotoxicita a oxidativní stres již při 1,0 mg Zn/kg půdy. V našem případě byl možný oxidativní stres detekován až při koncentraci nZnO 30 mg Zn/kg agaru. Jelikož byl při naší studii použit jiný půdní bezobratlý (*E. crypticus*) s rozdílnými vlastnostmi a expozice byla prováděna v jiném médiu, nelze tyto výsledky zcela porovnávat.

Porovnávání s dalšími studii nebylo možné, neboť nebyla nalezena žádná studie analyzující toxicitu nZnO dispergovaných v agarovém médiu na roupicích *E. crypticus* pomocí biomarkerů oxidativního stresu.

4 ZÁVĚR

Průmyslově vyráběné nanočástice, včetně nZnO se v současné době stávají takřka běžnou součástí životního prostředí. Pro bližší pochopení jejich interakce se živou hmotou je důležité vytvořit vhodné ekotoxikologické testy, které by napomohly pochopit mechanismus působení jednotlivých nanočástic.

Testovaným organismem v této práci byly roupice *Enchytraeus crypticus*, které byly exponovány koncentracím 0,1; 0,5; 1,0 a 5,0 mg Zn/kg agaru v podobě ZnCl₂ a 3 a 30 mg Zn/kg agaru. Test byl u obou látek proveden testování s expozičním časem 7 dnů, u ZnCl₂ byl navíc proveden test na 4 dny.

Sledována byla viabilita roupic a biochemická odpověď markerů oxidativního stresu malondialdehydu a glutationu. Stanovována byla i hladina celkového proteinu ve vzorku, ke které se množství biomarkerů vztahovalo. Během praktické části práce se všechna tři biochemická stanovení podařilo zoptimalizovat pro spektrofotometrickou analýzu vzorků roupic *E. crypticus*. Pro každé stanovení byl vytvořen výsledný optimalizovaný postup stanovení využitelný v testech ekotoxicity nZnO i dalších průmyslově vyráběných nanočástic na roupicích *E. crypticus*.

Z výsledků plyne, že přeživší roupice ze skupin s nižší viabilitou vykazují vyšší, i když ne vždy statisticky významnou střední hodnotu hladiny námi vybraných biomarkerů oxidativního stresu (TG, MDA). Hladiny testovaných biomarkerů mají u roupic ze skupin s nižší viabilitou často vyšší hodnotu RSD. Tento fakt mohl být zapříčiněn vlivem únikového chování, individuální odolností apod. Statisticky významné zvýšení hladin TG a MDA bylo zaznamenáno u sedmidenní expozice ZnCl₂. U stejně dlouhé expozice nZnO statisticky významné výsledky nebyly zaznamenány.

Z našich výsledků plyne, že oxidativní stres je jedním z mechanismu účinku obou testovaných forem zinku.

Pro další testování by bylo vhodné prodloužit čas expozice roupic *E. crypticus*. Dále by bylo zajímavé provést měření biomarkerů s větším rozsahem koncentrací pro vytvoření křivky dávka – účinek. Dalším krokem by mohlo být přidání dalších biomarkerů oxidativního stresu, například velmi často využívané katalázy či superoxid dismutázy.

SEZNAM CITACÍ

- ALARABY, M., ANNANGI, B., HERNÁNDEZ, A., CREUS, A. & MARCOS, R. 2015. A comprehensive study of the harmful effects of ZnO nanoparticles using *Drosophila melanogaster* as an in vivo model. *Journal of Hazardous Materials*, 296, 166-174.
- AMORIM, M. J. B., RÖMBKE, J., SCHEFFCZYK, A. & SOARES, A. M. V. M. 2005. Effect of different soil types on the enchytraeids *Enchytraeus albidus* and *Enchytraeus luxuriosus* using the herbicide Phenmedipham. *Chemosphere*, 61, 1102-1114.
- BACCHETTA, R., SANTO, N., MARELLI, M., NOSENGO, G. & TREMOLADA, P. 2017. Chronic toxicity effects of ZnSO₄ and ZnO nanoparticles in *Daphnia magna*. *Environmental Research*, 152, 128-140.
- BAHADAR, H., MAQBOOL, F., NIAZ, K. & ABDOLLAHI, M. 2016. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iranian Biomedical Journal*, 20, 1-11.
- BERNARD, F., BRULLE, F., DUMEZ, S., LEMIERE, S., PLATEL, A., NESSLANY, F., CUNY, D., DERAM, A. & VANDENBULCKE, F. 2015. Antioxidant responses of Annelids, Brassicaceae and Fabaceae to pollutants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, 273-303.
- BROWN, P. J., LONG, S. M., SPURGEON, D. J., SVENDSEN, C. & HANKARD, P. K. 2004. Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. *Chemosphere*, 57, 1675-1681.
- DONGXING, Z., YUCUI, N., JIABIN, L., JIE, D., GUOHUA, R., BILIGE, S. & YIJUN, L. 2016. Effects of oxidative stress reaction for the *Eisenia fetida* with exposure in Cd(2). *Environ Sci Pollut Res Int*, 23, 21883-21893.
- FRIJHOFF, J., WINYARD, P. G., ZARKOVIC, N., DAVIES, S. S., STOCKER, R., CHENG, D., KNIGHT, A. R., TAYLOR, E. L., OETTRICH, J., RUSKOVSKA, T., GASPAROVIC, A. C., CUADRADO, A., WEBER, D., POULSEN, H. E., GRUNE, T., SCHMIDT, H. H. H. W. & GHEZZI, P. 2015. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 23, 1144-1170.
- FU, P. P., XIA, Q., HWANG, H.-M., RAY, P. C. & YU, H. 2014. Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22, 64-75.
- GOMES, S. I., NOVAIS, S. C., GRAVATO, C., GUILHERMINO, L., SCOTT-FORDSMAND, J. J., SOARES, A. M. & AMORIM, M. J. 2012. Effect of Cu-nanoparticles versus one Cu-salt: analysis of stress biomarkers response in *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta). *Nanotoxicology*, 6, 134-143.
- GOMES, S. I. L., HANSEN, D., SCOTT-FORDSMAND, J. J. & AMORIM, M. J. B. 2015. Effects of silver nanoparticles to soil invertebrates: Oxidative stress biomarkers in *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*, 199, 49-55.
- HO, E., KARIMI GALOUGAHI, K., LIU, C.-C., BHINDI, R. & FIGTREE, G. A. 2013. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice(). *Redox Biology*, 1, 483-491.
- HOU, J., WU, Y., LI, X., WEI, B., LI, S. & WANG, X. 2018. Toxic effects of different types of zinc oxide nanoparticles on algae, plants, invertebrates, vertebrates and microorganisms. *Chemosphere*, 193, 852-860.
- HOWCROFT, C. F., AMORIM, M. J. B., GRAVATO, C., GUILHERMINO, L. & SOARES, A. M. V. M. 2009. Effects of natural and chemical stressors on *Enchytraeus albidus*: Can oxidative stress parameters be used as fast screening tools for the assessment of different stress impacts in soils? *Environment International*, 35, 318-324.

- HRDÁ, K. 2015. *Testy ekotoxicity nanomateriálů dispergovaných v agarózovém gelu*. Univerzita Pardubice.
- CHAITANYA, R. K., SHASHANK, K. & SRIDEVI, P. 2016. Oxidative Stress in Invertebrate Systems. In: AHMAD, R. (ed.) *Free Radicals and Diseases*. Rijeka: InTech.
- CHEN, X., WANG, X., GU, X., JIANG, Y. & JI, R. 2017. Oxidative stress responses and insights into the sensitivity of the earthworms *Metaphire guillelmi* and *Eisenia fetida* to soil cadmium. *Science of The Total Environment*, 574, 300-306.
- CHOUDHURY, S. R., ORDAZ, J., LO, C.-L., DAMAYANTI, N. P., ZHOU, F. & IRUDAYARAJ, J. 2017. From the Cover: Zinc oxide Nanoparticles-Induced Reactive Oxygen Species Promotes Multimodal Cyto- and Epigenetic Toxicity. *Toxicological Sciences*, 156, 261-274.
- KOHEN, R. & NYSKA, A. 2002. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 30, 620-650.
- LEITNER, S. 2016. PŘÍPRAVA, VLASTNOSTI A VYUŽITÍ NANOSTRUKTUROVANÉHO ZnO *Chemické listy*, 110, 406-417.
- LI, L.-Z., ZHOU, D.-M., PEIJNENBURG, W. J. G. M., VAN GESTEL, C. A. M., JIN, S.-Y., WANG, Y.-J. & WANG, P. 2011. Toxicity of zinc oxide nanoparticles in the earthworm, *Eisenia fetida* and subcellular fractionation of Zn. *Environment International*, 37, 1098-1104.
- MANKE, A., WANG, L. & ROJANASAKUL, Y. 2013. *Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity*.
- MARNETT, L. J. 2002. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 181, 219-222.
- MIRZAEI, H. & DARROUDI, M. 2017. Zinc oxide nanoparticles: Biological synthesis and biomedical applications. *Ceramics International*, 43, 907-914.
- MISHRA, P. K., MISHRA, H., EKIELSKI, A., TALEGAONKAR, S. & VAIDYA, B. 2017. Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. *Drug Discovery Today*, 22, 1825-1834.
- NG, C. T., YONG, L. Q., HANDE, M. P., ONG, C. N., YU, L. E., BAY, B. H. & BAEG, G. H. 2017. Zinc oxide nanoparticles exhibit cytotoxicity and genotoxicity through oxidative stress responses in human lung fibroblasts and *Drosophila melanogaster*. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1621-1637.
- NIKI, E., YOSHIDA, Y., SAITO, Y. & NOGUCHI, N. 2005. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338, 668-676.
- NOVAIS, S. C., GOMES, S. I. L., GRAVATO, C., GUILHERMINO, L., DE COEN, W., SOARES, A. M. V. M. & AMORIM, M. J. B. 2011. Reproduction and biochemical responses in *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta) to zinc or cadmium exposures. *Environmental Pollution*, 159, 1836-1843.
- NOVÁKOVÁ, D. 2017. *Optimalizace složení agarového kultivačního média pro testy ekotoxicity nanočástic na kroužkovci Enchytraeus crypticus*. Univerzita Hradec Králové.
- RIBEIRO, M., MARIA, V., SCOTT-FORDSMAND, J. & AMORIM, M. 2015. Oxidative Stress Mechanisms Caused by Ag Nanoparticles (NM300K) are Different from Those of AgNO₃: Effects in the Soil Invertebrate *Enchytraeus Crypticus*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12, 9589.

- SHULAEV, V. & OLIVER, D. J. 2006. Metabolic and Proteomic Markers for Oxidative Stress. New Tools for Reactive Oxygen Species Research. *Plant Physiology*, 141, 367-372.
- SIGMA-ALDRICH, I. CS0260. Glutathione Assay Kit. 2013.
- SIGMA-ALDRICH, I. MAK085. Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit. 2016.
- SIRELKHATIM, A., MAHMUD, S., SEENI, A., KAUS, N. H. M., ANN, L. C., BAKHORI, S. K. M., HASAN, H. & MOHAMAD, D. 2015. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Letters*, 7, 219-242.
- SOUID, G., SOUAYED, N., YAKTITI, F. & MAAROUFI, K. 2013. Effect of acute cadmium exposure on metal accumulation and oxidative stress biomarkers of *Sparus aurata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 89, 1-7.
- ŠUTEKOVÁ, E. 2006. *Zavedení a optimalizace metod pro vybrané biomarkery půdních bezobratlých*. Master, Masaryk University.
- TOURINHO, P. S., VAN GESTEL, C. A., LOFTS, S., SVENDSEN, C., SOARES, A. M. & LOUREIRO, S. 2012. Metal-based nanoparticles in soil: fate, behavior, and effects on soil invertebrates. *Environ Toxicol Chem*, 31, 1679-92.
- TRACHOOTHAM, D., LU, W., OGASAWARA, M. A., VALLE, N. R. D. & HUANG, P. 2007. *Redox Regulation of Cell Survival*, Antioxid Redox Signal. 2008 Aug;10(8):1343-74. doi:10.1089/ars.2007.1957.
- URSO, M. L. & CLARKSON, P. M. 2003. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189, 41-54.
- WANG, J., WANG, J., WANG, G., ZHU, L. & WANG, J. 2016. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in the earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, 144, 510-517.
- WANG, Z. L. 2004. Nanostructures of zinc oxide. *Materials Today*, 7, 26-33.
- XIONG, W., SUN, Y., ZOU, M. & MUHAMMAD, R.-U.-H. 2013. Molecular cloning, characterization of CAT, and eco-toxicological effects of dietary zinc oxide on antioxidant enzymes in *Eisenia fetida*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 1746-1755.
- YOUSHEVA, E., SIZOVA, E., LEBEDEV, S., SKALNY, A., MIROSHNIKOV, S., PLOTNIKOV, A., KHLOPKO, Y., GOGOLEVA, N. & CHERKASOV, S. 2016. Influence of zinc nanoparticles on survival of worms *Eisenia fetida* and taxonomic diversity of the gut microflora. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 13245-13254.
- ZHANG, Y., NAYAK, T. R., HONG, H. & CAI, W. 2013. *Biomedical Applications of Zinc Oxide Nanomaterials*, *Curr Mol Med*;13(10):1633-45.
- ZHANG, Y., ZHANG, L., FENG, L., MAO, L. & JIANG, H. 2017. Oxidative stress of imidacloprid on earthworm *Eisenia fetida*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 191, 1-6.
- ZHENG, K., LIU, Z., LI, Y., CUI, Y. & LI, M. 2013. Toxicological responses of earthworm (*Eisenia fetida*) exposed to metal-contaminated soils. *Environ Sci Pollut Res Int*, 20, 8382-90.