

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**  
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

**CHARAKTERIZACE PLICNÍ CYTOTOXICITY *IN VITRO***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**AUTOR PRÁCE:** Bc. Jana Báčová

**VEDOUCÍ PRÁCE:** doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

**KONZULTANT:** Mgr. Jiří Handl

2018

**UNIVERSITY OF PARDUBICE**

**FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**

DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**CHARACTERIZATION OF PULMONARY CYTOTOXICITY**  
***IN VITRO***

THESIS

**AUTHOR:** Bc. Jana Báčová  
**SUPERVISITOR:** doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.  
**CONSULTANT:** Mgr. Jiří Handl

2018

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

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana Báčová**  
Osobní číslo: **C16439**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Charakterizace plicní cytotoxicity in vitro**  
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 :

A. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na popis cytotoxicity in vitro se zaměřením na:

- 1) přehled buněčných linií využívaných v rámci studia plicní toxicity in vitro;
- 2) modelové toxiny, jež jsou ke studiu plicní toxicity in vitro využívány;
- 3) přehled principů vzniku plicní toxicity in vitro u nanomateriálů;
- 4) konkrétní roli glutathionu v protekci buněk proti buněčné toxicitě, včetně role při toxicitě nanočástic a nanomateriálů. Ke zpracování tohoto literárního přehledu využijte elektronické databáze (ScienceDirect, NCBI Pubmed, Web of Science).

B. V rámci praktické části:

- 1) využijte práci s buněčnými liniemi ke studiu plicní toxicity (např. buňky A549);
  - 2) optimalizujte stanovení buněčné viability, glutathionu a jaderné fragmentace ke studiu toxicity in vitro;
  - 3) zavedené metody využijte k charakterizaci role glutathionové deplece v rámci obecné cytotoxicity;
  - 4) uvedené výsledky a zavedené metody využijte při studiu případného toxického vlivu nanomateriálů v podmínkách in vitro.
- 3.) Získaná experimentální data zpracujte a diskutujte. Své výsledky následně porovnejte s výstupy jiných autorů.

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. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Jiří Handl**

Katedra biologických a biochemických věd

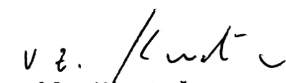
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

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 diplomovou práci na téma „Charakterizace plicní cytotoxicity *in vitro*“ 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.

V Pardubicích dne 2. 5. 2018

Jana Báčová

## Poděkování:

Tímto bych chtěla především poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D., Mgr. Janu Čapkovi, Mgr. Jiřímu Handlovi a paní laborantce Bc. Ivaně Fousové za odborné vedení, konzultace, vstřícný přístup a cenné rady, které mi při zpracování této diplomové práce věnovali. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za podporu, vstřícnost a zázemí, které mi během studia poskytla.

# SOUHRN

Plicní toxicita je termín pro jakékoliv škodlivé účinky, ke kterým dochází při vstupu cizorodé látky do dýchacích cest. Nanomateriály jsou stále častěji aplikovány zejména v oblasti medicíny, energetiky, elektrotechniky, stavebnictví, životního prostředí, kosmetiky a dalších. Nanomateriály pak mohou díky své reaktivitě potenciálně vést k toxicitě v důsledku škodlivých interakcí s buňkami. Cílem této práce proto bylo optimalizovat stanovení buněčné viability a glutathionu ke studiu toxicity *in vitro*. Zavedené metody jsme pak dále využili při studiu případného toxického vlivu různých typů nanomateriálů oxidu křemičitého v podmínkách *in vitro*.

K optimalizaci stanovení viability buněk, koncentrace glutathionu a testování toxicity nanomateriálů jsme použili buněčnou linii adenokarcinomu lidských plic A549. Vliv nanovláken na viabilitu buněk jsme posuzovali v závislosti na jejich koncentraci a době inkubace. Změnu životaschopnosti buněk po expozici nanovláken jsme hodnotili WST-1 testem. Fluorometrickou detekci pomocí fluorescenční sondy monochlorobiman jsme použili k detekci intracelulárního antioxidantu glutathionu. Poškození mitochondrií jsme sledovali pomocí fluorescenční sondy JC-1 za použití fluorescenční mikroskopie.

Buňky A549 jsme inkubovali 0, 1, 4 a 24 hodin s nanovláknem o různé koncentraci. Z výsledků WST-1 testu vyplývá, že toxicita nanovláken stoupá s rostoucí koncentrací nanovláken a dobou inkubace. Koncentrace glutathionu se snížila nejvíce po inkubaci buněk A549 s nanovláknem o nejvyšší koncentraci. K poklesu potenciálu mitochondriální membrány také došlo v závislosti na rostoucí koncentraci nanovláken po 24 hodinách inkubace.

## **KLÍČOVÁ SLOVA:**

A549, plicní toxicita, viabilita, glutathion, mitochondriální membránový potenciál, nanomateriály, nanočástice, nanovláknena.

## SUMMARY

Pulmonary toxicity is the term for any adverse health effects that occur when an exogenous substance enters the respiratory tract. Nanomaterials are increasingly being applied mainly in the fields of medicine, energy, electrical engineering, construction, the environment, cosmetics and others. Nanomaterials can potentially lead to toxicity due to their reactivity and adverse interactions within cells. The aim of this work was therefore to optimize the assay of cell viability and glutathione to study *in vitro* toxicity. We then used the introduced methods to study the potential toxic effects of different types of silica nanomaterials under *in vitro* conditions.

To optimize cell viability, glutathione concentration and nanomaterial toxicity testing, we used the human lung adenocarcinoma cell line A549. The influence of nanofibers on cell viability was assessed in relation to their concentration and incubation time. The change in cell viability after exposure of nanofibers was evaluated by the WST-1 test. Fluorometric detection using the monochlorobimane fluorescent probe was used to detect the intracellular glutathione antioxidant. Damage of mitochondria was monitored using a fluorescent probe JC-1 using fluorescence microscopy.

Cells A549 were incubated for 0, 1, 4, and 24 hours with nanofibers at various concentrations. The results of the WST-1 test showed that the toxicity of nanofibers increases with the increasing concentration of nanofibers and the incubation time. The concentration of glutathione decreased the most after incubation of A549 cells with the highest concentration of nanofibers. The decrease in the mitochondrial membrane potential also occurred in relation on the increasing concentration of nanofibers after 24 hours of incubation.

### KEYWORDS:

A549, pulmonary toxicity, viability, glutathione, mitochondrial membrane potential, nanomaterials, nanoparticles, nanofibers.



# OBSAH

1. ÚVOD.....	12
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	13
2.1 BUNĚČNÉ LINIE.....	13
2.1.1 Buněčná linie adenokarcinomu lidských plic A549.....	13
2.1.2 Další vybrané linie plicních buněk.....	15
2.2 PLICNÍ TOXICITA.....	16
2.2.1 Buněčná linie A549 a studium toxicity.....	17
2.3 NANOMATERIÁLY A TOXICITA.....	19
2.3.1 Mechanismus toxicity indukovaný nanomateriály.....	20
2.3.2 Význam a aplikace nanomateriálů.....	22
2.3.3 Přehled nanomateriálů a jejich toxicity.....	24
2.3.3.1 Nanočástice na bázi kovů.....	24
2.3.3.2 Nekovové nanomateriály.....	25
2.3.4 Buněčná linie A549 a nanomateriály.....	27
2.3.4.1 Nanomateriály na bázi uhlíku.....	27
2.3.4.2 Nanomateriály na bázi oxidu křemičitého.....	29
2.3.4.3 Nanočástice oxidu titaničitého.....	29
2.3.4.4 Nanočástice stříbra.....	31
2.3.5 Přehled testů pro stanovení toxicity nanomateriálů.....	32
2.4 GLUTATHION A JEHO FUNKCE V BUŇCE.....	33
2.4.1 Role glutathionu v buňce proti toxicitě nanomateriálů.....	34
2.4.2 Buněčná deplece glutathionu a jeho detekce.....	36
3. CÍL PRÁCE.....	37
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	38
4.1 POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	38
4.2 SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLÍ.....	39
4.3 KULTIVACE BUNĚK A549.....	39
4.4 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ.....	40
4.5 TESTOVÁNÍ TOXICITY NANOVLÁKEN SiO <sub>2</sub> .....	43
4.5.1 WST-1 test.....	43
4.5.2 Fluorimetrické stanovení hladiny glutathionu.....	45

4.5.3	Detekce membránového potenciálu mitochondrií .....	46
5.	VÝSLEDKY .....	48
5.1	TESTOVÁNÍ CYTOTOXICITY NANOMATERIÁLŮ SF5 A SF6.....	48
5.1.1	Porovnání viability buněk A549 po inkubaci se SF5 a SF6 .....	48
5.1.2	Změny hladin glutathionu po inkubaci se SF5 a SF6 .....	52
5.1.3	Detekce funkce mitochondrií po inkubaci se SF5 a SF6 .....	54
6.	DISKUZE .....	58
7.	ZÁVĚR.....	63
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	64

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ag-NPs	Stříbrné nanočástice
BSO	L-buthionin sulfoximin
CNT	<i>Carbon Nanotubes</i> – karbonové nanotrubičky
<i>Cis</i> -DPP (II)	<i>Cis</i> -diaminodichloroplatina (II)
<i>Cis</i> -[Pt(AF) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	<i>Cis</i> -bis(3-aminoflavon)dichloroplatina (II)
DEM	Diethylmalonát
GO	<i>Graphene Oxide</i> – oxidy grafenu
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
JC-1	5,5',6,6'-tetrachlóro-1,1',3,3'-tetraethyl- benzimidazolylkarbokyjanin jodid
MCB	Monochlorobimany
MMP	<i>Mitochondrial Membrane Potential</i> – mitochondriální membránový potenciál
NPs	<i>Nanoparticles</i> – nanočástice
NMs	<i>Nanomaterials</i> – nanomateriály
PEG	Polyethylenglykol
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> – reaktivní formy kyslíku
SF5	<i>Singles Fibers</i> – jednoduchá nanovlákna SiO <sub>2</sub> 5
SF6	<i>Singles Fibers</i> – jednoduchá nanovlákna SiO <sub>2</sub> 6
SiO <sub>2</sub> -NPs	Nanočástice oxidu křemičitého
TiO <sub>2</sub> -NPs	Nanočástice oxidu titaničitého

# 1. ÚVOD

Plíce jsou velmi častým cílem pro toxické působení široké škály látek především kvůli jejich velké kontaktní ploše a rozsáhlé vaskularizaci. Jako vhodný model pro studium funkce alveolárního epitelu plic a cytotoxicity byla vytvořena a charakterizována *in vitro* buněčná linie A549 adenokarcinomu lidských plic.

Nanomateriály jsou částice o velikosti, která se pohybuje v řádech nanometrů. Plicní toxicita indukovaná inhalovanými nanomateriály je významným problémem. Rychlý nárůst ve výrobě nanomateriálů vyžaduje zajistit kontrolu a ochranu proti jejich potenciálně nepříznivým účinkům na lidské zdraví, které mohou nastat během jejich výroby nebo používání. Linie A549 je jednou z populárních buněčných linií právě v toxikologických studiích různých druhů nanomateriálů.

Vysoká reaktivita nanomateriálů může potenciálně vést k toxicitě v důsledku škodlivých interakcí s biologickými systémy. Nanočástice a obecně nanomateriály mohou zvyšovat produkci reaktivních forem kyslíku i dalších oxidantů a zapříčiňovat tak oxidační stres.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Buněčné linie

Nádorové a immortalizované buněčné linie často nahrazují primární buňky ve výzkumu. Nabízejí několik výhod, např. jsou nákladově výhodnější, snadno použitelné, poskytují neomezené množství materiálu a obcházejí etické obavy spojené s použitím zvířecích nebo lidských tkání. Buněčné linie také produkují čistou populaci buněk a mohou tak poskytovat konzistentní vzorek a reprodukovatelné výsledky (*Kaur, Dufour, 2012*).

Buněčné linie by se měly svými funkčními vlastnostmi co nejvíce blížit primárním buňkám. Při genetické manipulaci s buněčnými liniemi může být pozměněn jejich fenotyp, přirozené funkce a schopnost reagovat na podněty. Dlouhodobé pasážování buněčných linií může tedy vést ke genotypové a fenotypové variabilitě. Genetický drift, neboli náhodné změny v genomu, mohou také způsobit heterogenitu v buněčných kulturách. Proto experimenty s buněčnými liniemi mohou vykazovat různé výsledky (*Kaur, Dufour, 2012; Geraghty et al., 2014*).

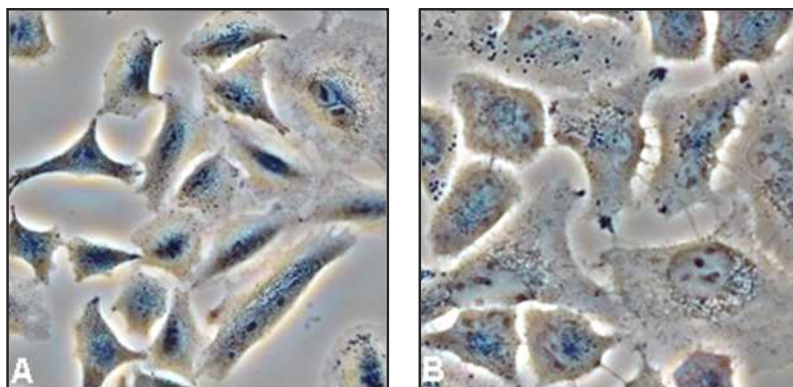
Plné pochopení výhod a nedostatků buněčných linií je nezbytné proto, aby výzkumník získal maximální užitek z jejich použití (*Gazdar et al., 2010*). Buněčné linie se využívají především při testování metabolismu a cytotoxicity léků, výrobě vakcín a protilátek, studiu funkce genů a syntéze biologických molekul, např. terapeutických proteinů (*Kaur, Dufour, 2012*).

#### 2.1.1 Buněčná linie adenokarcinomu lidských plic A549

V roce 1972 byla vytvořena a charakterizována *in vitro* buněčná linie adenokarcinomu lidských plic A549 (obr. 1), která se stala vhodným modelem pro studium funkce alveolárního epitelu. Tato kultura byla získána z karcinomu plic 58letého muže. Buňky A549 vytvářejí konfluentní monovrstvy, které mají charakteristickou morfolonii, která odpovídá pneumocytům typu II a po obarvení kyselinou tříslou lze nalézt typická lamelární tělíska. Buňky vyžadují ke své kultivaci základní buněčné médium, 10 % fetálního bovinního séra a některé další suplementy. Buňky se kultivují při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub> (*Foster et al., 1998*;

*Soto-Pantoja et al., 2009*). Doba potřebná ke zdvojnásobení populace těchto buněk je přibližně 22 hodin (*Changa et al., 2011*).

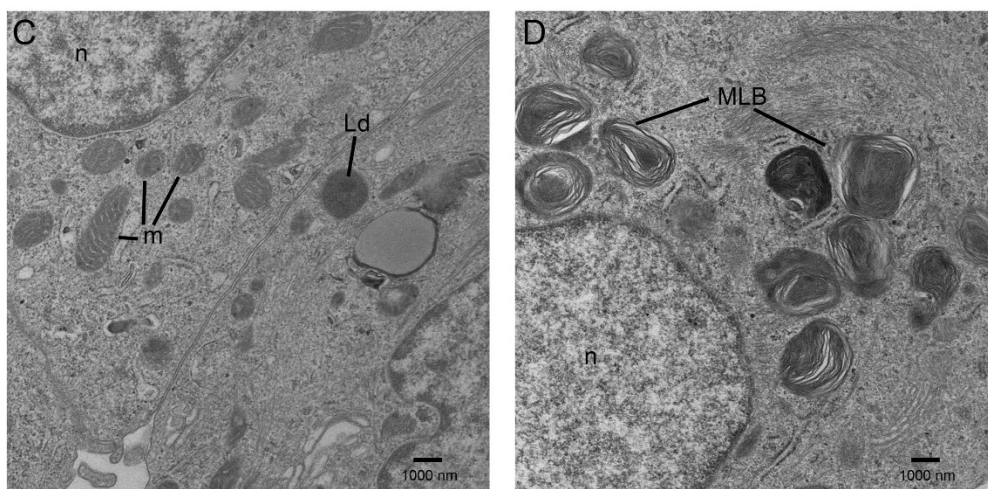
Bylo dokázáno, že buněčná linie A549 vykazuje stálé metabolické a transportní vlastnosti s pneumocyty typu II vyskytujícími se *in vivo*. Monovrstvy pneumocytů typu II zcela nenapodobují plicní epitel, kde společně koexistují buňky typu I a II, mohou ale i přesto být užitečné pro studium mechanismů transportu léčiv plicní cestou. Schopnost endocytózy a lokalizace systémů cytochromu P450 buněk A549 jsou převážně shodné s pneumocyty typu II. Nedostatečná vzájemná konfluence buněk linie A549 může omezovat její užitečnost při studiu transportu nízkomolekulárních léků a xenobiotik (*Foster et al., 1998*).



**Obr. 1: Charakteristická morfologie buněčné linie A549.** Fázový kontrast, zvětšení A: 200x, B: 400x.

Většina studií s buňkami A549 zahrnuje krátkodobou kultivaci proliferačních buněk. Byl testován předpoklad, že kultivační podmínky, které snižují proliferaci buněk A549, by mohly více podporovat jejich diferenciaci blíže fenotypu primárních alveolárních pneumocytů typu II. Byl zkoumán růst buněk A549 v různých médiích při dlouhodobé kultivaci. Analýzy ukázaly, že dlouhodobá kultivace v Hamově F12 médiu způsobila modulaci genů buněčného cyklu, což vedlo k populaci buněk se zvýšenou regulací autofagické, diferenciační a lipidogenní dráhy. To naznačuje charakter primárních alveolárních pneumocytů typu II a vývoj multilamelárních tělísek. Transmisní elektronová mikroskopie také potvrdila expresi multilamelárních tělísek v diferencovaných buňkách A549 (obr. 2). Tato práce mimo jiné definuje řadu

podmínek pro podporu diferenciaci buněk A549, které mohou být užitečné pro studie s touto buněčnou linií (Cooper *et al.*, 2016).



**Obr. 2: Elektronové snímky zobrazující expresi multilamelárních tělísek v buňkách A549 po 11 dnech (C) nebo 21 dnech (D) kultivace v Hamově F12 médiu. Lipidy (Lb), mitochondrie (m), jádra (n) a multilamelární tělíska (MLB). Měřítko = 1000 nm (Cooper *et al.*, 2016).**

### 2.1.2 Další vybrané linie plicních buněk

Existuje velké množství buněčných linií pocházejících z lidských malobuněčných a nemalobuněčných karcinomů plic. Nádory plic jsou obecně rozděleny do čtyř histopatologických podtypů, tj. adenokarcinom, karcinom skvamózních buněk, velkobuněčný karcinom a malobuněčný karcinom. Nádorové buněčné linie jsou široce rozšířeny a používány vědeckou komunitou po celém světě a významně se podílely na výzkumu nádorů plic. Mezi nádorové buněčné linie plic jsou zařazeny kromě A549 také buněčné linie např. LK-2, LU-65 a RERF-LC-MA (Gazdar *et al.*, 2010; Watanabe *et al.*, 2010).

Mezi nejznámější buněčné linie plic pocházející z normální tkáně se řadí například buněčné linie MRC-5, MRC-9 a WI-38 (Wu *et al.*, 2005; Wadman, 2013). Buňky WI-38 se staly prvními nenádorovými lidskými buňkami, které byly k dispozici vědeckým pracovníkům a průmyslu v téměř neomezeném množství. V důsledku toho se staly nejvíce popsány a studovány normálními lidskými buňkami dostupnými dodnes. Vakcíny vyrobené pomocí buněk WI-38 imunizovaly miliony lidí například proti zarděnkám, vzteklině, adenovirům nebo spalničkám (Wadman, 2013). V tabulce č. 1 je uveden přehled nádorových a nenádorových lidských buněčných linií plic. Nádorové buněčné linie jsou zde rozděleny do čtyř histopatologických podtypů (Watanabe *et al.*, 2010).

**Tab. 1: Přehled buněčných linií plic** (Upraveno dle: Bookman et al., 1983; Fujita et al., 1997; Landsiedel et al., 2014; Lewinski et al., 2008; Wadman, 2013; Watanabe et al., 2010; Wu et. al, 2005).

Název	Buněčný typ	Histopatologický podtyp
<b>Nádorové buněčné linie</b>		
A549	Epitel	Adenokarcinom
LK-2	Skvamózní buňky	Karcinom skvamózních buněk
LU-65	-	Velkobuněčný karcinom
RERF-LC-MA	-	Malobuněčný karcinom
<b>Nenádorové buněčné linie</b>		
BEAS-2B	Epitel	-
IMR-90	Fibroblast	-
MRC-5	Fibroblast	-
MRC-9	Fibroblast	-
WI-38	Fibroblast	-

## 2.2 Plicní toxicita

Plicní toxicita je termín pro jakékoliv nepříznivé účinky pro zdraví, ke kterým dochází při vstupu cizorodé látky do dýchacích cest (Roman, 2015). Plicce jsou častým cílem pro toxické působení různých látek, především kvůli jejich velké kontaktní ploše. Mohou být i místem pro metabolizování mnoha látek. Léky mohou indukovat specifické reakce v respiračním traktu, nebo mohou být součástí generalizované reakce organismu (Schwaiblmair et al., 2012).

Mnoho léků je spojeno s plicními komplikacemi různých typů, včetně intersticiálních zánětů, fibróz, bronchospazmů, plicních edémů a pleurálních výpotků. Mezi léky, které vyvolávají intersticiální onemocnění plic, se řadí například chemoterapeutika, antibiotika, antiarytmika a imunosupresiva. K poškození plic může dojít dvěma různými cestami. Poranění alveolárních a bronchiálních epitelových buněk může být způsobeno inhalací léku nebo transportem léku vaskulárním systémem (Schwaiblmair et al., 2012).

Kyslík je jedním z nejrozšířenějších používaných terapeutických látek na světě. Toxicita kyslíku vzniká důsledkem trvalé expozice plic zvýšeným hladinám kyslíku při normálním atmosférickém tlaku. Mechanismem účinku hyperoxie je tvorba kyslíkových volných radikálů. Ty mají jeden nebo více nepárových elektronů, což je činí velmi nestabilní. Narušení stability oxidační



a antioxidační rovnováhy je důležité v patogenezi akutního poškození plic a syndromu akutní respirační tísně (*Thomson, Paton, 2014*).

Amiodaron je jodovaný derivát benzofuranu a patří mezi nejvíce předepisovaná antiarytmika. Navzdory tomu je jeho užívání spojeno se systémovými vedlejšími účinky. Plicní toxicita bývá obvykle popsána v souvislosti s jeho chronickým užíváním. Příčinou cytotoxicity amiodaronu může být díky jeho lipofilní povaze akumulace v membránové fosfolipidové dvojvrstvě, čímž narušuje funkci buněk. Navíc amiodaron podporuje produkci reaktivních forem kyslíku prostřednictvím přenosu elektronů na kyslík. Předpokládá se, že riziko vývoje plicní toxicity může být zvýšené kvůli afinitě amiodaronu k vysokým koncentracím kyslíku (*Fadahunsi, Krol, 2014*).

Plicní toxicita indukovaná inhalovanými nanomateriály je významným problémem (*Vlachogianni et al., 2013*). Rychlý nárůst ve výrobě nanomateriálů vyžaduje zajistit kontrolu a ochranu proti jejich potenciálně nepříznivým účinkům na lidské zdraví, které mohou nastat během výroby nebo používání (*Shvedova et al., 2009*).

### **2.2.1 Buněčná linie A549 a studium toxicity**

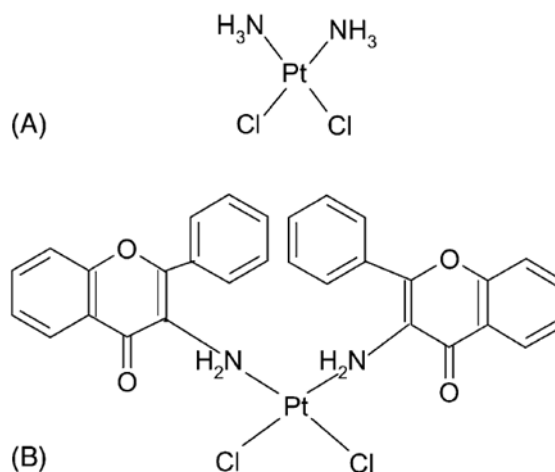
Reaktivní formy kyslíku se podílejí na různých plicních onemocněních tím, že způsobují přímé poškození plicního epitelu. Z tohoto důvodu je často zkoumán vliv oxidačního stresu za použití například *tert*-butylhydroxyperoxidu na buňkách A549. Oxidant *tert*-butylhydroxyperoxid o koncentraci 12,5  $\mu\text{M}$  po 4 hodinách způsobil dvakrát vyšší uvolnění interleukinu-8 z buněk A549 ve srovnání s kontrolními buňkami (*Brown et al., 2007*).

Z meziproductů S-adenosylmethioninu a S-adenosylhomocysteinu se syntetizují postupně transmetylací a transsulfurací methionin, homocystein a následně i glutathion. Oxidačním stresem způsobené změny poměru S-adenosylmethioninu a S-adenosylhomocysteinu mohou vést k chybám v metylaci s negativními účinky na růst, viabilitu buněk a jiné metabolické procesy. Hladiny těchto dvou meziproductů se v buňkách A549 snížily podobně po jedné hodině v závislosti na koncentraci peroxidu vodíku nebo *tert*-butylhydroxyperoxidu. Výsledky ukázaly, že buňky A549 uvolnily vysoké hladiny S-adenosylmethioninu pravděpodobně jako adaptivní reakci na zvýšený

oxidační stres, i když byl substrát methionin pro tvorbu S-adenosylmethioninu vyčerpaný (Panayiotidis et al., 2009).

Jednou z nejvíce studovaných reaktivních forem kyslíku (ROS – *Reactive oxygen species*) spojených s karcinomem plic je peroxid vodíku. Peroxid vodíku může poškozovat jadernou i mitochondriální DNA, zvyšovat expresi buněčných adhezivních molekul, zvyšovat aktivitu p53 a dalších transkripčních faktorů, které zapříčiňují apoptózu nádorových buněk. Bylo zjištěno, že koncentrace peroxidu vodíku nad 100  $\mu\text{M}$  má pro buňky A549 cytotoxický a genotoxický účinek způsobující poškození DNA a vyvolává katalytickou aktivitu komplexu DNA topoizomerasy (Vilema-Enríquez et al., 2016).

Nemalobuněčný karcinom plic zahrnuje skupinu nádorů, která špatně reaguje na chemoterapeutika. *Cis*-diaminodichloroplatina (II) (*cis*-DDP) se řadí mezi často používaná chemoterapeutika (Sarin et al., 2017). Analogem *cis*-DDP s příznivějším účinkem vůči normálním buňkám a lepší protinádorovou aktivitou je komplex *cis*-bis(3-aminoflavon)dichloroplatina (II) (*cis*-[Pt(AF)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]) (Kosmider et al., 2004).



**Obr. 3:** Chemická struktura *cis*-DDP (II) (A) a *cis*-[Pt(AF)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (B) (Převzato z Kosmider et al., 2004).

Získané výsledky prokázaly, že komplex *cis*-[Pt(AF)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] indukoval apoptózu a nekrózu a snižoval viabilitu buněk A549 více než *cis*-DDP, což naznačuje, že by mohl být potenciálním chemoterapeutikem. Hodnoty IC<sub>50</sub> po 24 hodinách byly navrženy jako 23 μM pro *cis*-[Pt(AF)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] a 5 μM pro *cis*-DDP. Hodnota IC<sub>50</sub> značí koncentraci testovaného toxinu, která inhibuje růst buněk na 50% hranici ve třech nezávislých experimentech (*Kosmider et al., 2004*).

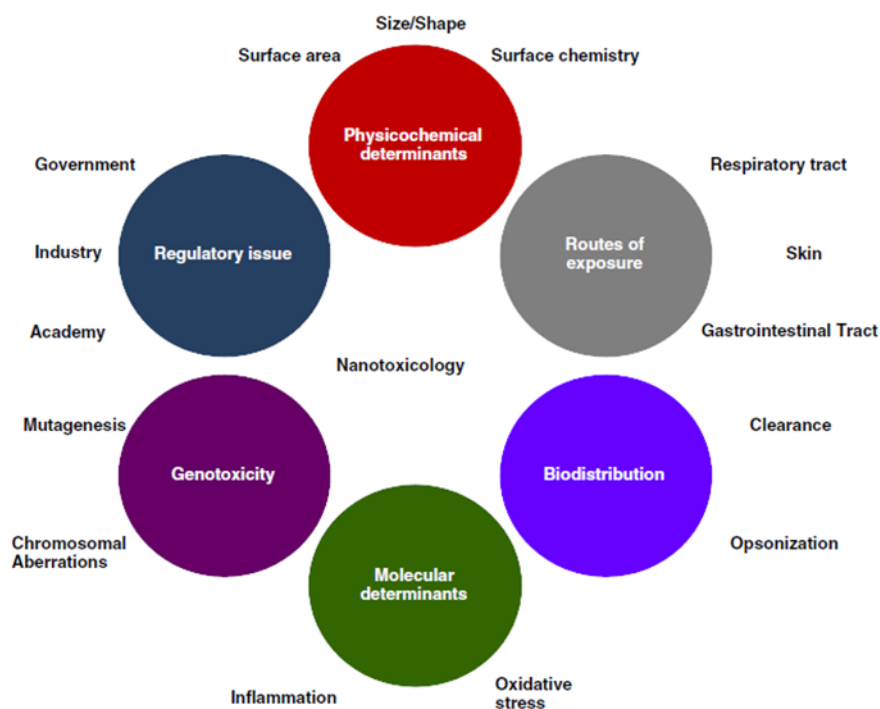
Účinnost chemoterapie karcinomů na bázi *cis*-diaminodichloroplatiny (II) je omezena výskytem vrozených a získaných rezistencí vůči těmto lékům. Za účelem lepšího pochopení základních mechanismů získané *cis*-DDP rezistence byla porovnána buněčné linie adenokarcinomu plic A549 a její podtyp A549<sup>r</sup>CDDP<sup>2000</sup>, která je odolná k účinku *cis*-DDP (*Sarin et al., 2017*).

*Cis*-DDP u rezistentních buněk A549 neindukovala zástavu buněčného cyklu, a naopak byla snížena apoptóza ve srovnání s kontrolními buňkami A549. Tyto rozdíly byly doprovázené změnami v expresi proteinů, které se podílejí na poškození DNA. V buňkách A549 vedla expozice *cis*-DDP k vyšší expresi proteinů zprostředkujících zástavu buněčného cyklu a apoptózu. Tyto nálezy naznačují, že získaná rezistence buněk nemalobuněčného karcinomu plic vůči *cis*-DDP je důsledkem změněné signalizace vedoucí ke snížení zástavy buněčného cyklu a apoptózy (*Sarin et al., 2017*).

### **2.3 Nanomateriály a toxicita**

Nanotechnologie jsou považovány za jedny z klíčových technologií 21. století. Zahrnují manipulaci a aplikaci se zkonstruovanými částicemi nebo systémy velmi malých rozměrů (*Arora et al., 2012*). Nanočástice (NPs – *Nanoparticles*) jsou podle standardní definice částice s délkou, která se pohybuje od 1 do maximálně 100 nanometrů v alespoň jednom ze 2D nebo 3D rozměrů (*Lewinski et al., 2008*).

Nanotoxikologie byla navržena jako nové odvětví toxikologie k řešení mezer ve znalostech o nanomateriálech a jejich možných nepříznivých zdravotních účinků. Nanotoxikologie zahrnuje fyzikálně chemické determinanty, způsoby expozice a biodistribuce, molekulární determinanty, genotoxicitu a regulaci účinků a použití nanomateriálů (obr. 4) (*Arora et al., 2012*).



**Obr. 4: Komplexní souhrn otázek týkajících se toxicity nanomateriálů** (Převzato z Arora et al., 2012).

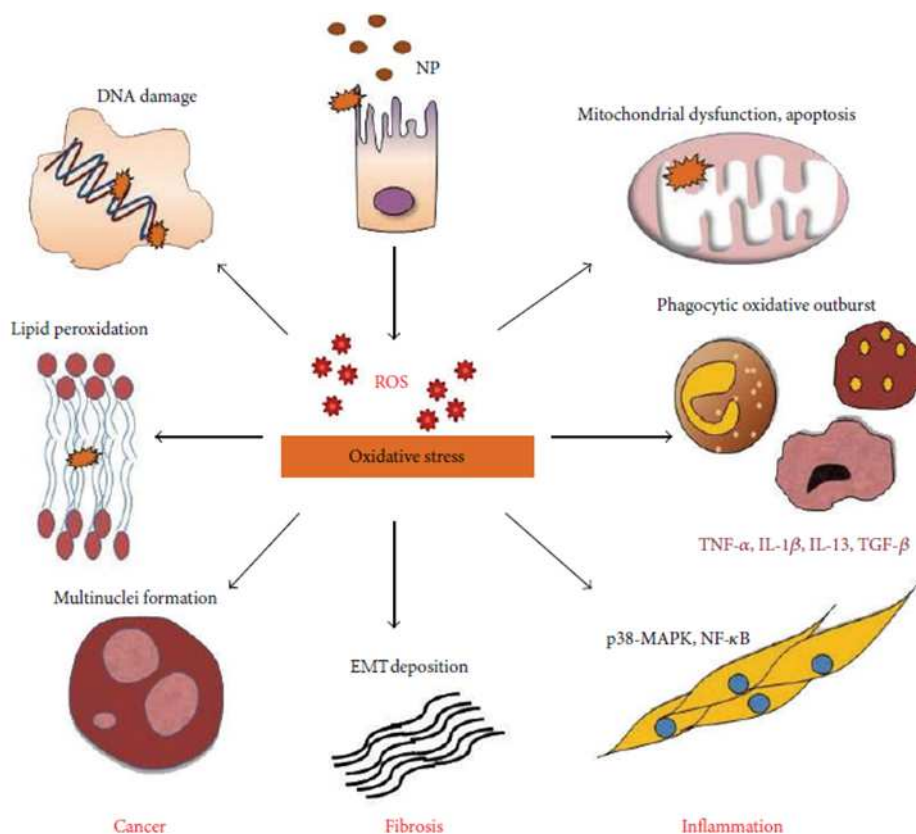
### 2.3.1 Mechanismus toxicity indukovaný nanomateriály

Biologické a toxické vlastnosti nanomateriálů (*NMs – Nanomaterials*) jsou závislé na jejich fyzikálně chemických vlastnostech, velikosti, tvaru, kontaminujících látkách, aglomeraci, rozpustnosti, hydrofobních vlastnostech, povrchovém náboji a povrchové funkcionalizaci. Vysoká reaktivita nanomateriálů může potenciálně vést k toxicitě v důsledku škodlivých interakcí s biologickými systémy a životním prostředím. Jakékoliv použití *NMs in vivo* znamená důkladně pochopit kinetiku a toxikologii částic, zajistit komplexní informace o jejich bezpečnosti a potenciálním nebezpečí (Arora et al., 2012).

Kvůli malé velikosti se NPs snadno dostávají do lidského těla, překračují biologické bariéry a mohou pronikat do citlivých orgánů. Předpokládá se, že NPs o velikosti menší než 10 nm působí podobně jako plyn a mohou snadno vstoupit do lidských tkání a narušit biochemické prostředí buňky (Bahadar et al., 2016).

NPs mohou zvyšovat produkci reaktivních forem kyslíku i dalších oxidantů a zapříčínovat tak oxidační stres (obr. 5). ROS vznikají po internalizaci NPs v mitochondriích nebo po vyčerpání antioxidantů v buňce. Po expozici NPs je nadměrná produkce ROS schopna indukovat oxidační poškození a přerušení řetězce DNA, denaturaci proteinů, peroxidaci lipidů a mutagenezi. Dále mohou

způsobit poškození mitochondriální membrány, nekrózu a apoptózu. Stimulace zprostředkovaná oxidačním stresem těchto buněčných mechanismů vede k transkripci genů odpovědných za fibrózu, epitel-mezenchymální přechod a karcinogenezi (Manke et al., 2013; Vlachogianni et al., 2013).



**Obr. 5: Oxidační stres jako mechanismus toxicity nanočástic.** TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  – tumor nekrotizující faktor- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  (*Interleukin-1 $\beta$* ), IL-13 (*Interleukin-13*), TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$*  – transformující růstový faktor- $\beta$ ), p38 MAPK (*p38 Mitogen Activated Protein Kinase* – p38 mitogenem aktivovaná proteinkinasa, NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor- $\kappa$ B* – nukleární faktor- $\kappa$ B), ETM (*Epithelial-Mesenchymal Transition* – epitel-mezenchimální tranzice) (Převzato z Manke et al., 2013).

V buňce existuje úzká souvislost mezi oxidačním stresem a vyvoláním zánětlivé odpovědi. Fagocyty včetně neutrofilů a makrofágů generují masivní množství ROS při neúplné fagocytóze NPs prostřednictvím enzymatického systému NADPH-oxidasy. NPs-indukovaná produkce ROS spouští zánětlivou kaskádu exprese chemokinů a cytokinů. Exprese je zprostředkována aktivací buněčných signalizačních cest, tzn. aktivací tyrosinkinasového receptoru mitogenem aktivované proteinkinasy (MAPK) a nukleárního faktoru- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Manke et al., 2013).

Povrchová úprava a rozpustnost NPs mohou snižovat nebo zesilovat míru jejich toxického efektu (*Arora et al., 2012*). Rozpustnost nanomateriálů ovlivňuje také jejich perzistenci a clearance v organismu. Hůře rozpustné NPs, které jsou ukládány v dolní části respiračního traktu, mohou při malých dávkách sekundárně indukovat zánětlivé poškození tkáně. Vysoce perzistentní NPs s nízkou toxicitou mohou být vyšší zátěží pro tkáň plic a způsobovat výraznější poškození než velmi toxické NPs s nízkou persisterencí (*Landsiedel et al., 2014*).

V jedné studii byly testovány nanočástice a nanotrubičky o různých velikostech na třech buněčných liniích. Toxicita NMs byla proměnlivá na základě typu buňky a závislá na složení a velikosti NMs. Kromě toho expozice NMs vedla k intracelulárním reakcím podmíněným typem buňky. Makrofágy byly například podstatně více náchylné toxickému účinku NMs než fibroblasty (*Sohaebuddin et al., 2010*).

Předpokládá se, že nanočástice mohou potencionálně způsobovat akutní respirační onemocnění nebo karcinom plic (*Vlachogianni et al., 2013*). Studie na lidech a zvířatech prokázaly, že po inhalaci a ústní expozici jsou NPs distribuovány kromě plic a gastrointestinálního traktu i do jater, srdce, sleziny, mozku a kůže. Aby došlo k vyloučení NPs z těla, musí být aktivovány složky imunitního systému. Předpokládaný poločas rozpadu NPs v lidských plicích je přibližně 700 dní, což představuje stálou hrozbu pro dýchací systém. Během metabolismu jsou některé NPs hromaděny v játrech (*Bahadar et al., 2016*).

### **2.3.2 Význam a aplikace nanomateriálů**

Narůstající výzkum nanotechnologie vedl k identifikaci mnoha jedinečných vlastností nanomateriálů, tj. zlepšené magnetické, katalytické, optické, elektrické a mechanické vlastnosti ve srovnání s obvyklými produkty ze stejného materiálu (*Arora et al., 2012*). Nanomateriály jsou aplikovány zejména v oblasti energetiky, elektrotechniky, stavebnictví, životního prostředí, medicíny, kosmetiky a dalších (*Shvedova et al., 2009*). Na rozdíl od extrémně malých rozměrů mají nanomateriály vysoký poměr povrchu k objemu, který je činí vysoce reaktivní. Lidé jsou vystaveni jejich působení přímo nebo nepřímo (*Arora et al., 2012*).

Využití nanomateriálů v biomedicínské oblasti je zejména jako transportní systémy pro léky, biosenzory, nebo jako kontrastní látky pro zobrazovací techniky

(*Bayford et al., 2017*). Vzhledem k malé velikosti mohou být nanočástice velmi užitečné v onkologii, zejména v zobrazovacích technikách. Lai (2015) používal zlaté NPs také jako multimodální zobrazovací agens pro mozkový gliom u myší. Díky NPs identifikovali primární gliom, sledovali vývoj gliomu v čase a odhalili podrobnosti o mikrocévrách nádoru (*Lai et al., 2015*).

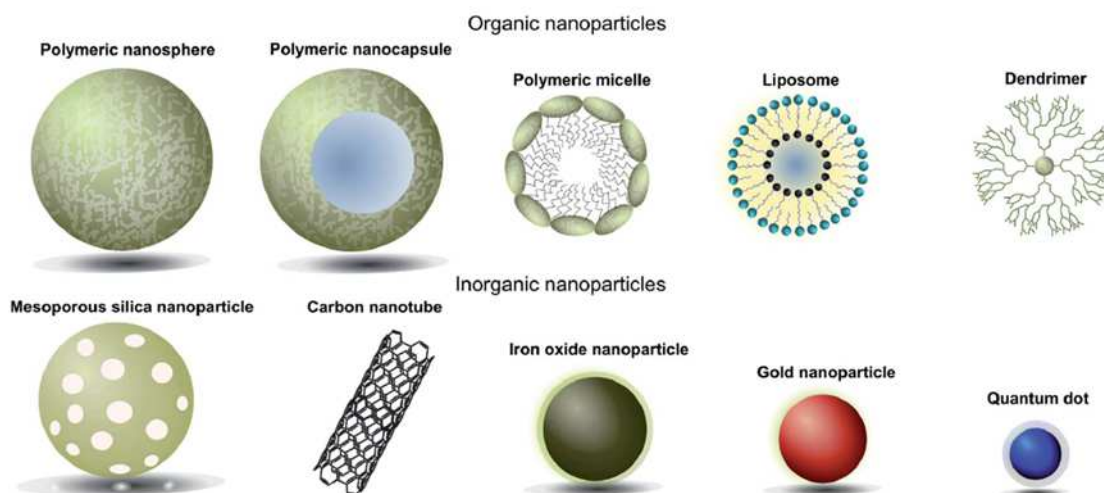
Pokrok v nanotechnologii pomáhá v léčbě Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby, tuberkulózy, v operační stomatologii, chirurgii, tkáňovém inženýrství atd. Nanoléčiva mohou být použita i k detekci nemocí v mnohem ranějších fázích v porovnání ke standardním postupům (*Nikalje, 2015*). Aplikace týkající se léčiv zahrnuje záměrné přímé požití nebo injekci nanočástic do těla. Zvláště pro biomedicínské účely *in vivo* je toxicita rozhodujícím faktorem při hodnocení jejich potenciálu. Povrch nanočástic pro zobrazovací technologie a podávání léků je často záměrně modifikován biokonjugáty, tj. DNA, proteiny a monoklonálními protilátkami specifickými pro konkrétní buňky (*Lewinski et al., 2008*).

Modifikace povrchu nanočástic polyethylenglykolem (PEG) je běžně využívaný přístup pro zlepšení účinnosti podávaných léků a genů do cílových buněk a tkání. Inertní polymer PEG chrání povrch nanočástic před agregací, opsonizací, fagocytózou a prodlužuje čas jejich systémové cirkulace. PEG může zlepšit průnik nanomateriálů biologickými bariérami, včetně redukce interakcí s extracelulární matricí, buněčnou bariérou a biologickými tekutinami, což vede k lepšímu transportu léčiva (*Suk et al., 2016*).

Jedním z nejčastějších uplatnění magnetických nanočástic, které jsou složeny z magnetického jádra opouzdřeného organickou látkou nebo polymerem, je použití jako magnetický vektor. Nanočástice oxidu železitého s lékem nebo nukleovými kyselinami mohou být distribuovány na cílené místo pomocí vnějšího magnetického pole. Dále jsou aplikovány například v diagnostice pomocí magnetické rezonance nebo potencionálně jako tepelné mediátory v léčbě nádorů metodou hypertermie (*Filippousi et al., 2014*).

### 2.3.3 Přehled nanomateriálů a jejich toxicity

Do dnešní doby bylo vyvinuto několik druhů nanostruktur. Rozlišujeme nanotrubičky, nanovláčka, nanokrystalické, sférické a dendritické agregované nanomateriály, kvantové tečky, kovové nanočástice atd. (obr. 6) (Pandey, Prajapati, 2018). Lze je rozdělit do dvou velkých skupin, tj. nanočástice na bázi kovu a NMs z nekovových materiálů (Bahadar et al., 2016).



Obr. 6: Různé typy nanočástic (Převzato z Richards et al., 2017).

#### 2.3.3.1 Nanočástice na bázi kovů

Nanočástice na bázi oxidů hliníku se využívají hlavně při výrobě polymerů, barev, ochranných vrstev, textilií, kosmetiky a v biomedicině (Bahadar et al., 2016). Radziun (2011) potvrdil schopnost NPs oxidu hlinitého proniknout přes membrány buněk. Navzdory tomu nedošlo k významnému snížení viability buněk v testovaném rozmezí koncentrací (Radziun et al., 2011). Bylo zjištěno, že akumulace a toxicita NPs hydroxidu hlinitého je silnější vzhledem k jeho nízké stabilitě a přítomnosti hydroxylové skupiny ve srovnání s NPs oxidu hlinitého (Park et al., 2016).

Na základě vysokého využití NPs oxidu zinečnatého v mnoha oblastech je vystavení člověka těmto NPs velmi časté (Bahadar et al., 2016). Rozpuštěné ionty  $Zn^{2+}$  mohou pronikat do mitochondrií, kde mohou způsobit dysfunkci mitochondrií a apoptózu (Landsiedel et al., 2014). Bylo také zjištěno, že tvar těchto nanočástic ovlivňuje jejich toxicitu. Sférické nanočástice vyvolávaly mírně silnější cytotoxicitu než nanočástice ve tvaru listu (Heng et al., 2011).



Nanočástice oxidu titaničitého mají širokou škálu použití při výrobě barev, papíru, podlahových krytin, dezinfekčních přípravků a v kosmetice (Pandey, Prajapati, 2018). U imunitních buněk byla pozorována významná toxicita NPs, zejména v koncentraci vyšší než 100 µg/ml (Xiong et al., 2013).

Stříbrné nanočástice (Ag-NPs) jsou nejvíce využívanými NPs v průmyslu z důvodu jejich antimikrobiálních, optických, katalytických a dezinfekčních vlastností (Pandey, Prajapati, 2018). Vstupují do lidského těla různými způsoby a akumulují se například v plicích, slezině, ledvinách, játrech a mozku (Bahadar et al., 2016). Byl vytvořen model hematoencefalické bariéry pomocí trojitě kokultury primárních krysích mozkových mikrovaskulárních endotelových buněk, pericytů a astrocytů. Po expozici Ag-NPs po dobu 24 hodin byla permeabilita hematoencefalické bariéry významně zvýšena a exprese proteinů těsných spojů byla snížena. Bylo pozorováno také smrštění mitochondrií, zvýšená vakuolizace, rozvoj endoplazmatického retikula v astrocytech. Tyto výsledky upozorňují na významnou neurovaskulární toxicitu indukovanou v přítomnosti Ag-NPs (Xu et al., 2015).

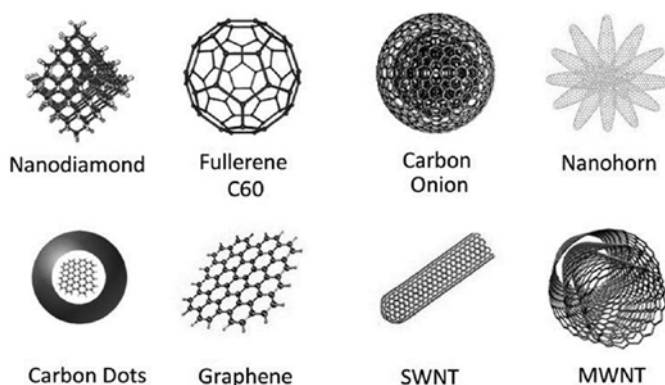
Zlaté nanočástice mají velmi unikátní fyzikálně chemické vlastnosti. Tzv. „nanoshells“ jsou nanočástice skládající se z dielektrika, které je obklopeno tenkou kovovou krycí vrstvou s optickými vlastnostmi. Typicky jsou zlaté „nanoshells“ složeny z jádra oxidu křemičitého pokrytého ultratenkou kovovou zlatou vrstvou. Disponují optickými rezonančními vlastnostmi plazmonů. Jsou vyvinuty pro aplikace v zobrazovacích technikách a fototermální terapii rakoviny. *In vitro* toxikologický screening neprokázal toxicitu (Lewinski et al., 2008; Pandey, Prajapati, 2018).

### **2.3.3.2 Nekovové nanomateriály**

Do skupiny nanomateriálů na bázi uhlíku se řadí například jedno- nebo vícevrstvé uhlíkové nanotrubic, fulleren a grafen (obr. 7) (Bahadar et al., 2016). Vzhledem k perzistenci, obtížné degradaci v organismu, a především podobnosti karbonových nanotubic (CNT – Carbon Nanotubes) s jehlicovitými vlákny azbestu se předpokládalo, že CNT vyvolávají cytotoxické účinky (Manke et al., 2013). Byly navrženy strategie ke zlepšení biokompatibility CNT prostřednictvím

povrchové modifikace a byla prokázána citlivost vůči enzymatické degradaci těchto nanomateriálů (*Bhattacharya et al., 2016*).

Nanofulleren  $C_{60}$  se skládá ze 60 sféricky uspořádaných atomů uhlíku, kdy vzniklý sféroid nabývá průměru přibližně 50 nm. Je přirozeně produkován jako vedlejší produkt spalování paliva. U myši a krys byla po expozici nanofullerenu  $C_{60}$  indukována zánětlivá odpověď plic podmíněná jeho koncentrací. Přetížení plic, které přispělo k plicní zánětlivé odezvě, bylo pozorované po expozici fullerenu  $C_{60}$  o koncentraci  $2 \text{ mg/m}^3$  (*Sayers et al., 2016*).



**Obr. 7: Druhy karbonových nanomateriálů.** SWNT (*Single-Walled Carbon Nanotubes* – jednovrstvé karbonové nanotrubic), MWNT (*Multi-Walled Carbon Nanotubes* – vícevrstvé karbonové nanotrubic) (*Převzato z Baptista et al., 2015*).

Nanovlákná oxidu křemičitého byla testována z důvodu potenciálního opakovatelného použití pro krytí ran. Byla vyráběna metodou sol-gel a elektrospiningu. Povrch nanovláken byl upraven stříbrnými nanočásticemi s antibakteriálním účinkem a následovala inkubace s kostními mezenchymálními kmenovými buňkami. Výsledky prokázaly, že nanovlákná jsou velmi měkká, pružná, přizpůsobují se tvaru rány a jsou vhodným kandidátem k opětovnému využití pro krytí ran. Dlouhodobý antibakteriální účinek stříbrných nanočástic inhiboval proliferaci modelového organismu *Escherichia coli* (*Ma et al., 2011*).

Regenerace tkání vyžaduje biomateriály schopné poskytnout podporu pro aplikaci buněk a nahrazení chybějící extracelulární matrice. Cílem studie bylo zkoumat uhlíkem dopovaná nanovlákná na bázi oxidu křemičitého jako potencionální podporu pro regeneraci pojivové tkáně posuzované pomocí myši fibroblastové buněčné linie. Lagonegro a kol. (2017) prokázali, že tato nanovlákná jsou biokompatibilní a adaptabilní. Fibroblasty byly schopné

adherovat na tento nanomateriál a proliferovat, což představuje slibnou platformu pro implantace (*Lagonegro et al., 2017*).

### **2.3.4 Buněčná linie A549 a nanomateriály**

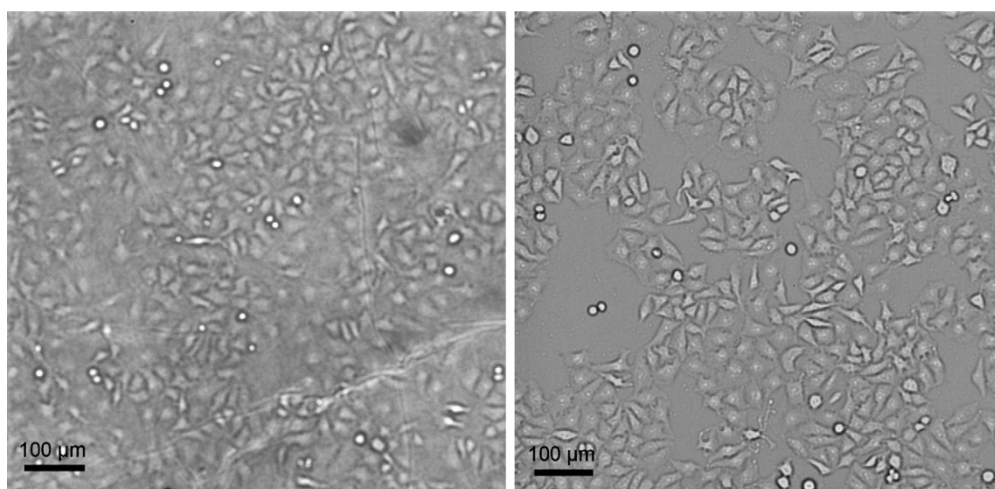
#### **2.3.4.1 Nanomateriály na bázi uhlíku**

Buněčná linie A549 je jednou z populárních buněčných linií v toxikologických studiích různých druhů nanomateriálů (*Changa et al., 2011*). Současné údaje naznačují, že karbonové nanotrubičky jsou schopny prostoupit buněčnou membránu, a proto mohou mít vliv na fyziologii a funkci buněk. Buňky A549 byly inkubovány s komerčními jedno a vícevrstevnými CNT. Bylo zjištěno, že nárůst produkce ROS a snížení potenciálu mitochondriální membrány u komerčně vyráběných CNT je závislý na jejich koncentraci a čase. Inkubace s purifikovanými CNT neměla žádný toxický vliv na buňky. Z toho vyplývá, že stopy kovů a jiných příměsí, které jsou obsaženy v komerčních nanotrubicích, jsou zodpovědné za jejich biologické účinky (*Pulskamp et al., 2007*).

Toxicita nanočástic fullerenu C<sub>60</sub> o koncentracích 12,5 až 200 µg/ml byla hodnocena po 6 hodinách za použití buněčné linie A549. Nanočástice fullerenu snadno vstoupily do buněk a neprokázaly významnou toxicitu. V buňkách po expozici narůstajícím koncentracím fullerenu byla zvýšená produkce ROS. Nárůst intracelulární hladiny glutathionu pozitivně koreloval s nárůstem hladiny ROS. Buňky A549 reagovaly na rostoucí produkci ROS zahájením autofagie. Buněčná autofagie slouží nejen k recyklaci intracelulárních složek a kompenzaci nedostatku živin, ale také eliminuje selektivně poškozené orgány nebo bílkoviny pro zlepšení životaschopnosti buněk (*Wang et al., 2014*).

Grafen je alotrop uhlíku, který se skládá z dvourozměrné krystalické mřížky hexagonálně uspořádaných atomů uhlíku (*Lammel et al., 2013*). Grafen a jeho deriváty mají velký potenciál pro aplikace v biomedicíně a technice. V nedávné studii byla zkoumána toxicita oxidů grafenu (GO – *Graphene Oxide*) pomocí hodnocení morfologie, viability, a integrity membrány buněk A549. Bylo zjištěno, že oxidy grafenu ve vysoké koncentraci mohou v buňce způsobit oxidační stres závislý na dávce a vyvolat i ztrátu viability (*Changa et al., 2011*).

Po expozici koncentraci 200  $\mu\text{g/ml}$  GO po 24 hodinách byla viabilita buněk snížena na 67 %. Účinky byly závislé na koncentraci nanočástic a měly by tedy být zohledněny při aplikaci v biomedicíně. Expozice oxidům grafenu nevyvolala únik laktátdehydrogenasy z buňky. Z toho vyplývá, že integrita buněčné membrány nebyla porušena. Celkově jsou oxidy grafenu bezpečným materiálem na úrovni buněk, což bylo potvrzeno i růstem buněk A549 na grafenové fólii. Růst buněk A549 na grafenové fólii (obr. 8) o tloušťce několik desítek  $\mu\text{m}$  byl srovnatelný s jejich růstem na běžné kultivační misce (Changa *et al.*, 2011).



**Obr. 8:** Mikroskopické snímky buněk A549 kultivovaných na grafenové fólii (vlevo) a na běžné kultivační misce (vpravo). V důsledku tmavě hnědé barvy fólie není kontrast obrázku vlevo tak dobrý jako obrázku kontroly vpravo (Převzato z Changa *et al.*, 2011).

V buňkách A549 byla také hodnocena distribuce a cytotoxicita oxidů grafenu ve spojení s oxidem titaničitým o koncentracích 100 a 300  $\mu\text{g/ml}$  po 4 hodinách. Byla zkoumána viabilita a ultrastruktura buněk. Výsledky ukázaly, že GO mohou vstoupit do buněk, kde byly lokalizovány v cytoplasmě a jádru, aniž by způsobily poškození. Kompozit nanočástic  $\text{TiO}_2$  a GO byl rozdělen po vstupu do buněk A549. Samotný  $\text{TiO}_2$  nebo  $\text{TiO}_2 + \text{GO}$  o koncentraci 300  $\mu\text{g/ml}$  snížily významně viabilitu buněk. Byly výrazně poškozeny mitochondrie a zvýšil se počet lyzozomů. Tyto výsledky by měly být brány v úvahu při vývoji biologických aplikací s tímto kompozitem (Jin *et al.*, 2014). Při nízkých koncentracích 5  $\mu\text{g/ml}$  redukované GO významně indukují pozdní apoptózu a nekrózu (Tabish *et al.*, 2017).

#### **2.3.4.2 Nanomateriály na bázi oxidu křemičitého**

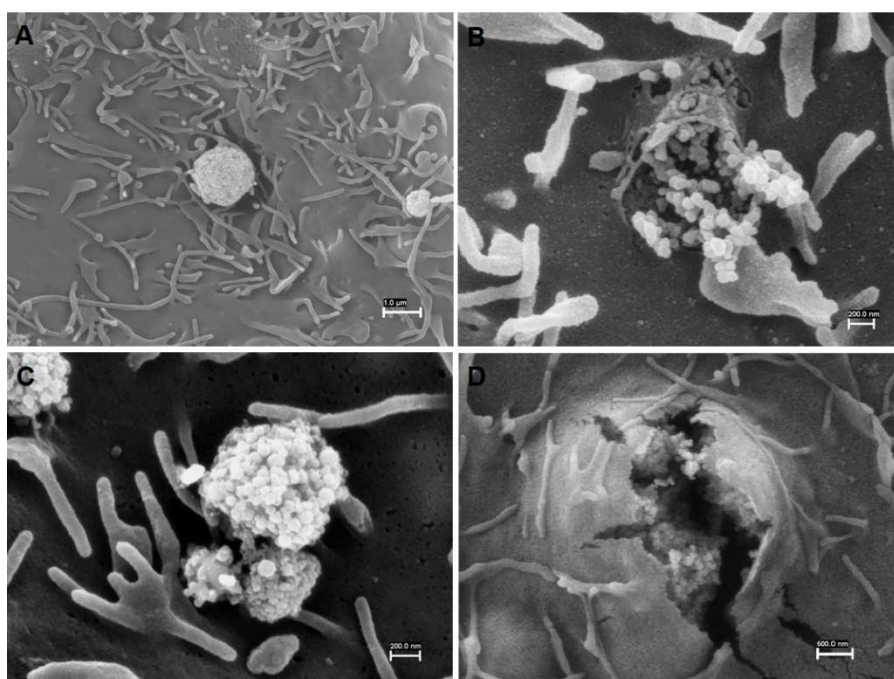
Monodisperzní kulovité nanočástice silikagelu o průměru 20 až 200 nm byly použity pro studium cytotoxicity například na buňkách A549, jaterních buňkách HepG2 a fibroblastech NIH/3T3. Bylo zjištěno, že rozsah a mechanismus cytotoxicity NPs silikagelu není jen závislý na velikosti a dávce, ale také na typu buňky. Všechny různě velké NPs o koncentraci  $\geq 50 \mu\text{g/ml}$  způsobily snížení viability buněk A549 po 24 hodinách expozice. Po 72 hodinách expozice NPs došlo ke snížení životaschopnosti v závislosti na koncentraci a velikosti nanočástic silikagelu u všech buněk kromě HepG2. Zvláštní případ nastal u NPs o průměru 60 nm, které byly přednostně endocytovány buňkami a ve vysokých dávkách nepřiměřeně snížily životaschopnost buněk (*Kim et al., 2015*).

Superparamagnetické nanočástice oxidů železa byly pokryty tenkou vrstvou amorfního oxidu křemičitého za účelem snížení rozpustnosti železa. V plicních alveolech tyto NPs přicházejí do styku se surfaktantem, alveolárními makrofágy a epitelem. Na rozdíl od nepokrytých NPs pokryté superparamagnetické nanočástice i po nejvyšší expoziční koncentraci  $100 \mu\text{g/ml}$  nezávisle na čase neovlivnily viabilitu buněk. Bylo ale prokázáno, že pokryté superparamagnetické nanočástice oxidů železa indukovaly v buňkách A549 změny metabolismu surfaktantu a biogeneze lamelárních tělísek. Buňky A549 jsou náchylné vůči NPs kvůli své vysoké endocytózní aktivitě během procesu obnovy surfaktantu (*Kononenko et al., 2017*).

#### **2.3.4.3 Nanočástice oxidu titaničitého**

Interakce nanočástic a buněčné membrány může vést ke změně její integrity a metabolismu. Po expozici nanočástic je důležité pochopit modifikace buněčné membrány zejména epitelálních buněk. Proto byly buňky A549 vystaveny působení nanočástic oxidu titaničitého ( $\text{TiO}_2$ -NPs) o koncentracích  $5\text{-}40 \mu\text{g/ml}$ . U všech testovaných koncentrací  $\text{TiO}_2$ -NPs vstupovaly do buňky jako agregáty. Odhaleným mechanismem vstupu agregátu do buňky byl vstup zapříčiněný ohnutím membrány na vnitřní straně a následným vklesnutím NPs (obr. 9A), nebo přímo přes póry v membráně (obr. 9B) (*Baiguera et al., 2014*).

Zvláště bylo pozorováno, že s narůstající koncentrací TiO<sub>2</sub>-NPs se navýšil počet buněk, které byly charakteristické snížením hustoty mikroklků. Ke snížení hustoty mikroklků docházelo v celé nebo jen v určité oblasti buněčné membrány ve spojení s jejími strukturálními modifikacemi. Snímky z elektronového transmisního mikroskopu odhalily prodloužené nebo rozšířené mikroklky, které tvořily síť obklopující TiO<sub>2</sub>-NPs (obr. 9 C), což naznačuje mechanismus endocytózy. Byla objevena přítomnost fraktur na plazmatické membráně (obr. 9D), kterými bylo možné pozorovat uvnitř buněk velké agregáty TiO<sub>2</sub>-NPs o velikosti asi 1 μm (Baiguera et al., 2014).



**Obr. 9: Buňky A549 po expozici nanočástic oxidu titaničitého.** TiO<sub>2</sub>-NPs o koncentraci 5 μg/ml (A), 40 μg/ml (B), 20 μg/ml (C) a 40 μg/ml (D) (Převzato z Baiguera et al., 2014).

Dlouhodobá expozice nanočásticím oxidu titaničitého o koncentracích 2,5-50 μg/ml po dobu 2 měsíců umožnila identifikaci nových mechanismů v buňkách A549, které vysvětlují TiO<sub>2</sub>-NPs toxicitu *in vitro*. Bylo zjištěno, že dlouhodobá expozice NPs mění funkci proteinů, které se podílejí na funkci mitochondrií, intra a extracelulárním transportu, proteasomové aktivitě, metabolismu glukosy a expresi genů. Bylo pozorováno, že nejnižší koncentrace a nejdelší doba expozice těchto nanočástic vyvolala intenzivnější buněčnou odezvu. Předpokládá se, že dlouhodobá expozice nízkým koncentracím TiO<sub>2</sub>-NPs může indukovat adaptaci buněk (Armand et al., 2016).

#### 2.3.4.4 Nanočástice stříbra

Foldbjerg a kolektiv (2011) studovali toxicitu nanočástic stříbra na buněčné linii A549. Toxická dávka nanočástic v rozmezí 5-15 ng/ml byla prokazována měřením mitochondriální aktivity. Cytotoxicita nanočástic byla snížena, pokud byly buňky vystaveny působení antioxidantu *N*-acetyl-L-cysteinu. Byla zjištěna korelace mezi hladinami reaktivních forem kyslíku a poškozením mitochondrií i časnou apoptózou. Pohlcení nanočástic buňkami vedlo k oxidačnímu stresu a smrti buněk. Bylo prokázáno, že reaktivní formy kyslíku vyvolávaly přímé a nepřímé poškození DNA. Z toho vyplývá, že stříbrné nanočástice mohou být prostředníkem pro indukovanou genotoxicitu reaktivními formami kyslíku (Foldbjerg et al., 2011).

Mechanismus plicní cytotoxicity široce využívaných stříbrných nanočástic není zcela jasný. V exponovaných buňkách byly nanočástice nalezeny v lysozomálních strukturách, kdy v této práci byla hodnocena intracelulární distribuce Ag-NPs, lysozomální pH, buněčná viabilita, agregace stříbra a hladina mRNA metalothioneinu v exponovaných buňkách A549. Metalothionein je protein, který váže ionty kovů. Buňky byly také léčeny bafilomycinem A1, což je inhibitor acidifikace lysozomů (Klionsky et al., 2008; Miyayama, Matsuoka, 2016). Nanočástice potažené citrátem přímo úměrně své koncentraci indukovaly poškození a smrt buněk po 24 hodinách. Aglomerace se zvýšila v závislosti na množství nanočástic. Expozice Ag-NPs vyvolala zvýšení lysozomálního pH i po aplikaci 200 nM bafilomycinu A1. Bafilomycin A1 potlačil také rozpouštění Ag-NPs a byla snížena hladina exprese mRNA metalothioneinu. Z poznatků vyplývá, že narušení lysozomálního pH po expozicích Ag-NPs může hrát roli v aglomeraci Ag-NPs a následném poškození buněk A549 (Miyayama, Matsuoka, 2016).

Jiná studie hodnotila *in vitro* mechanismy toxicity Ag-NPs o průměru < 100 nm ve vztahu k tvorbě ROS v buňkách A549. Po expozici vyvolaly Ag-NPs tvorbu ROS, snížily viabilitu buněk a potenciál mitochondriální membrány. Následovalo zvýšení podílu buněk v sub-G1 fázi, pozastavení buněčného cyklu v S fázi a pokles regulace proliferujícího buněčného jaderného antigenního proteinu. Antioxidant *N*-acetyl-L-cystein snížil účinky Ag-NPs kromě vlivu Ag-NPs na zástavu buněčného cyklu v S fázi a sníženou regulaci výše uvedeného proteinu. Bylo navrženo, že *in vitro* účinky nanočástic na buňky A549 jsou

zprostředkovány ROS v závislosti na cytotoxicitě a nezávisle na zástavě buněčného cyklu (*Chairuangkitti et al., 2013*).

### 2.3.5 Přehled testů pro stanovení toxicity nanomateriálů

Modelové systémy *in vitro* poskytují rychlý a účinný způsob hodnocení toxicity nanočástic (*Arora et al., 2012*). Výhody používání buněčných linií zahrnují například odhalení primárních účinků NMs na cílové buňky za nepřítomnosti sekundárních účinků způsobených zánětem a identifikaci primárních mechanismů toxicity za absence kompenzačních faktorů, které ztěžují interpretaci studií na zvířatech (*Huang et al., 2010*). Potenciálním nebezpečím použití *in vitro* testování je, že buňky v kultuře nemusí projevit úplný rozsah patogenních účinků nanočástic, které mohou být pozorovány *in vivo* (*Arora et al., 2012*).

Základní postupy, které lze aplikovat pro hodnocení toxicity nanomateriálů, tvoří *in vitro* testy životaschopnosti a proliferace buněk na bázi tetrazoliových solí, např. MTT, MTS a WST-1. Buněčná mortalita se hodnotí pomocí trypanové modři, která se hromadí v mrtvých buňkách. Hladiny interleukinu-8, interleukinu-6 a tumor nekrotizujícího faktoru detekované metodou ELISA vypovídají o buněčné zánětlivé odpovědi indukované NPs. K uvolnění laktátdehydrogenasy z buněk dochází při narušení integrity buněčné membrány (*Bahadar et al., 2016; Changa et al., 2011*).

Provádí se také měření změny potenciálu mitochondriální membrány, analýza genové exprese, detekce hemolýzy a genotoxicity. Mikroskopicky se hodnotí intracelulární lokalizace nanomateriálů a pozměněná morfologie buněk za pomoci skenovacího a transmisního elektronového mikroskopu, fluorescenční spektroskopie, magnetické rezonance a dalších (*Arora et al., 2012*).

Apoptické a nekrotické buňky jsou často kvantifikovány průtokovou cytometrií za použití dvojího barvení annexinem V a propidium jodidem. Annexinem V, který je fluorescenčně značený fluorescein-isothiokyanátem, se identifikují apoptické buňky. Annexin V se váže na fosfatidylserin během časně apoptózy, zatímco propidium jodid se váže na DNA v nekrotických buňkách. ROS se detekují citlivými fluorescenčními sondami (*Changa et al., 2011*). Zlomy

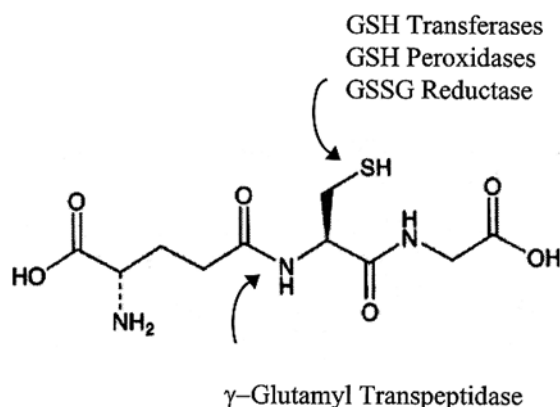


řetězce DNA nebo oxidační poškození DNA se stanovují převážně kometovým testem nebo jeho modifikovanou alkalickou verzí (Karlsson, 2010).

Kontrola experimentálních podmínek je důležitá proto, aby výsledek nebyl zkreslený nestabilními podmínkami kultivace. Kromě toho nanomateriály mohou adsorbovat barviva a mohou mít redoxní aktivitu, což lze kompenzovat vhodným výběrem testu cytotoxicity. Biologické účinky nanomateriálů zahrnují interakce s plazmatickou membránou, organelami nebo DNA, proto je nutné provádět studie toxicity pro každý typ nanomateriálu (Arora et al., 2012).

## 2.4 Glutathion a jeho funkce v buňce

Glutathion (GSH) je hlavní složkou antioxidačního obranného systému buněk. Jeho molekulová hmotnost činí 307 g/mol. Jedná se o tripeptid, který je syntetizován z L-glutamátu, L-cysteinu a glycinu ve dvou po sobě jdoucích krocích za katalýzy  $\gamma$ -glutamylcysteinsyntetasy a glutathionsyntetasy. Thiolová skupina glutathionu je zodpovědná za jeho silné redukční účinky. Degradaci tohoto peptidu na aminokyseliny katalyzují enzymy  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa a cysteinylglycindipeptidasa (obr. 10). Glutathion se nachází intracelulárně v redukované formě (GSH), což je také jeho aktivní forma, a v oxidované formě, glutathiondisulfidu (GSSG) (Lewinski et al., 2008; Sies, 1999).



Obr. 10: Glutathion (Převzato ze Sies, 1999).

Jako důležitý antioxidant má GSH významnou roli při detoxikaci různých druhů elektrofilních sloučenin a peroxidů za katalýzy glutathion-S-transferas a glutathionperoxidasa. Glutathionperoxidasa, katalasa a superoxidodismutasa chrání buňku před poškozením reaktivními formami kyslíku. Při detoxikaci ROS katalyzované glutathionperoxidasou působí GSH jako donor elektronů a je zároveň redukován na konečný produkt GSSG (Townsend et al., 2003). Glutathionreduktasa, jejíž exprese je indukovaná oxidačním stresem, katalyzuje redukci oxidované formy glutathiondisulfidu zpět na GSH (Sies, 1999).

Kromě detoxikace hraje GSH také roli v jiných buněčných reakcích, včetně glyoxalázového systému, redukce ribonukleotidů na deoxyribonukleotidy, regulace exprese proteinů a genů prostřednictvím přeměny thiolů a disulfidů, atd. (Townsend et al., 2003). Bylo prokázáno, že glutathion má stimulační nebo inhibiční účinky na imunologickou odpověď za účelem regulace zánětu (Perricone et al., 2009). Změněné koncentrace glutathionu mohou hrát důležitou roli v autoimunitních patologických stavech, které jsou zpravidla vyvolávány, potlačovány a udržovány zánětlivou imunitní odpovědí zprostředkovanou oxidačním stresem (Perricone et al., 2009).

#### **2.4.1 Role glutathionu v buňce proti toxicitě nanomateriálů**

Změny fyzikálně chemických a strukturálních vlastností konstruovaných nanomateriálů jsou zodpovědné za řadu interakcí, které vedou k toxikologickým účinkům. Změny v elektronových vlastnostech nanomateriálů mohou indukovat vytvoření specifických povrchových skupin, které mohou fungovat jako reaktivní místa. Povrchové skupiny mohou činit NMs hydrofilní, hydrofobní, lipofilní, lipofobní, katalyticky aktivní nebo katalyticky pasivní (Manke et al., 2013; Nel et al., 2006).

Aktivní místa donoru nebo akceptoru elektronů mohou interagovat s molekulárním kyslíkem. Vychytávání elektronů kyslíkem vede k tvorbě superoxidového radikálu, který prostřednictvím dismutázové nebo Fentonovy reakce může generovat další ROS. Jednokomponentové materiály, přítomnost přechodných kovů na povrchu NMs, rozpustnost a aktivace UV zářením se mohou také podílet na tvorbě aktivních míst (Nel et al., 2006).

Za normálních podmínek v mitochondriích jsou ROS generovány s nízkou frekvencí a jsou snadno neutralizovány glutathionem a antioxidantními enzymy. Při nadměrné produkci ROS během expozice nanočástic může být přirozená obranyschopnost antioxidantů vyčerpána a dochází k akumulaci oxidovaného GSSG. Buňky reagují na změnu poměru GSH a GSSG zpočátku ochrannými, nebo nakonec až sebepoškozujícími mechanismy, což může mít v plicích za následek vznik zánětu dýchacích cest a intersticiální fibrózy (Nel et al., 2006; Sies, 1999).

Vliv nanočástic  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  o koncentraci 12,5  $\mu\text{g/ml}$  na peroxidaci lipidů a antioxidantní systém byl zkoumán pomocí plicní fibroblastové buněčné linie MRC-5. Viabilita buněk se snížila po 48 hodinách o 30 %. Pokles hladiny GSH po 48 hodinách expozice NPs lze vysvětlit jeho využitím jako substrátu pro glutathionperoxidasovou reakci. Elektrofilní železité ionty ve vysokých koncentracích mohou vyčerpat intracelulární GSH interakcí s thiolovou skupinou nebo absorpcí cysteinu. Také dlouhodobá expozice nanočásticím  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  by mohla indukovat pokles hladin GSH v buňce díky glutathionylaci proteinů. Po 72 hodinách expozice NPs byla nadále snižena hladina redukovaného glutathionu a zvýšená hladina malondialdehydu, což je produkt peroxidace lipidů. Z toho vyplývá, že obranné antioxidantní mechanismy buněk MRC-5 účinně nepůsobily proti indukovanému oxidačnímu stresu (Radu et al., 2010).

Glutathion-S-transferasy se řadí do skupiny antioxidantních dimerických enzymů, které katalyzují konjugaci GSH s různými elektrofilními látkami (Strange et al., 2000). Mikrosomální glutathiontransferasa-1 je lokalizována převážně v endoplazmatickém retikulu a vnější mitochondriální membráně. Chrání buňku před peroxidací lipidů vyvolanou prooxidačními stimuly. Po expozici NPs oxidu křemičitého buňky nadměrně exprimovaly glutathiontransferasu-1. Následná zvýšená hladina GSH v buňkách byla pravděpodobně způsobena jeho menší spotřebou, kdy důvodem byla nižší produkce lipidových peroxidů. Závěrem bylo řečeno, že nadměrná exprese glutathiontransferasy-1 chrání buňky specificky proti toxicitě indukované těmito nanočásticemi (Shi et al., 2012).

## 2.4.2 Buněčná deplece glutathionu a jeho detekce

Za účelem vyhodnocení funkce glutathionu mohou být buňky vystaveny působení diethylmalonátu (DEM), který molekulu GSH vychytává, a glutathion tedy depletuje. Buňky A549 byly inkubovány po dobu 1, 6 nebo 24 hodin s koncentracemi 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  DEM. To vedlo k zastavení růstu buněk v porovnání s kontrolními buňkami. Bylo zjištěno, že DEM v závislosti na koncentraci a čase výrazně snižuje hladinu GSH. DEM o koncentraci 100  $\mu\text{M}$  po 1 hodině a 50  $\mu\text{M}$  DEM po 5 hodinách snížily celkovou koncentraci GSH v buňkách o 50 %. Po 24 hodinách inkubace s 100  $\mu\text{M}$  DEM nebyl spektrofotometricky detekován téměř žádný glutathion (*Gaubin et al., 2000*).

Jako další významný nástroj pro výzkum glutathionu je používán L-buthioninsulfoximin (BSO). Detekce je založena na principu inhibice enzymu pro syntézu GSH  $\gamma$ -glutamylcysteinsyntetasy pomocí BSO. Pokud je GSH vyčerpán a jeho resyntéza blokována, dochází k poklesu hladin GSH a lze sledovat následné změny uvnitř buněk (*Armstrong et al., 2002; Sies, 1999*).

Byly vyvinuty různé biochemické testy pro stanovení thiolů, disulfidů a podobných sloučenin. Studie v buňkách a tkáních byly umožněny za pomoci oxidace thiolů peroxidem vodíku, *tert*-butylhydroxyperoxidem a diamidem (*Sies, 1999*). Mezi metody ke stanovení hladiny GSH patří spektrometrie, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, plynová chromatografie nebo elektrochemické metody (*Čapek et al., 2017; Gaubin et al., 2000*). Metody na principu fluorometrie jsou často preferovány kvůli jejich vysoké citlivosti a specifitě. Do skupiny fluorescenčních sond pro detekci GSH se řadí například *orto*-ftalaldehydy, monochlorobimany a monobromobimany, které mohou reagovat s GSH za vzniku vysoce fluorescenčních produktů (*Čapek et al., 2017*).

### 3. CÍL PRÁCE

- 1) Optimalizovat stanovení buněčné viability a glutathionu ke studiu nanotoxicity *in vitro*.
- 2) Zavedené metody využít při studiu případného toxického vlivu nanomateriálů v podmínkách *in vitro*.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Pomůcky a přístroje

- Automatický pipetor Accujet-Pro (BrandTech Scientific, Německo)
- CASY counter + Innovatis TT (Roche, Švýcarsko)
- Centrifuga Labofuge 400 (HERAEUS Instruments, Německo)
- Cytospiny (SPL, Korea)
- Inkubátor Memmert (IndiaMART, Indie)
- Invertovaný mikroskop Primo Vert (Carl Zeiss, USA)
- Kultivační lahve, misky a ostatní plastové pomůcky pro buněčné linie (TPP, Švýcarsko)
- Laminární box Airstream (ESCO, USA)
- Lednice s mrazákem (Liebherr, Německo)
- Fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japonsko)
- Mikrotitrační destičky 96jamkové (Nunc, Dánsko)
- Mikrozkmavky (Neptune, Mexiko)
- Pipety Eppendorf (Eppendorf, Německo)
- Spektrofotometr a spektrofluorometr Infinite M200 (Tecan, Rakousko)
- Třepačka s kontrolovatelnou teplotou PST-100HL (Biosan, Lotyšsko)
- Třepačka (Reax Top Heidolph, Německo)
- Vortex s multifunkčním nástavcem (Heathrow Scientific, USA)
- Míchací rotátor SB3 (Stuart, UK)
- Vodní lázeň (Bionics Scientific Technologies, Indie)

### Software

- Tecan i-control
- Microsoft Office – Word, Excel (Microsoft, USA)

## 4.2 Seznam použitých chemikálií

- *Cell proliferation reagent* WST-1 (Roche, Německo)
- Deionizovaná voda, USP WFI (Lonza, Belgie)
- Fluorescenční sonda 5,5',6,6'-tetrachlóro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylkarbokyanin jodid, JC-1 (Mr = 652,2316; Enzo, ČR)
- Fluorescenční sonda monochlorobiman, MCB (Mr = 226,66; Sigma Aldrich, USA)
- Fosfátový pufr (pH 7,4), 10x koncentrovaný, PBS (GIBCO, USA)
- Nanovlákná SiO<sub>2</sub> 5 (CEMNAT)
- Nanovlákná SiO<sub>2</sub> 6 (CEMNAT)

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Centru materiálů a nanotechnologií za přípravu a poskytnutí unikátních nanovláken oxidu křemičitého o různé délce.

## 4.3 Kultivace buněk A549

**Pro kultivaci buněk A549 byly použity tyto chemikálie:**

- Buněčná linie adenokarcinomu lidských plic, A549 (ATCC, USA)
- *Minimum Essential Medium Alpha*,  $\alpha$ -MEM (Sigma Aldrich, USA)
- RPMI 1640 (Biowest, Francie)
- Fetální hovězí sérum, FBS (*Fetal Bovine Serum*) (GIBCO, USA)
- Pyruvát sodný, PYR (GIBCO, USA)
- 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonová kyselina, HEPES (GIBCO, USA)
- Penicilin/Streptomycin, P/S (GIBCO, USA)
- Trypsin (GIBCO, USA)
- Fosfátový pufr (pH 7,4), 10x koncentrovaný, PBS (GIBCO, USA)
- Kompletní kultivační médium:  $\alpha$ -MEM doplněné o 10 % (v/v) fetálního hovězího séra, 1 mmol/l pyruvátu, 10 mmol/l HEPES, 50  $\mu$ g/ml penicilinu a 50  $\mu$ g/ml streptomycinu.

- Kultivační médium bez fenolové červeně a fetálního hovězího séra: RPMI médium doplněné o 1 mmol/l pyruvátu, 10 mmol/l HEPES, 50 µg/ml penicilinu a 50 µg/ml streptomycinu.
- Inaktivační médium: kultivační médium  $\alpha$ -MEM doplněné o 20 % fetálního hovězího séra.

Buněčnou linii A549 jsme kultivovali v kompletním kultivačním médiu. Do kultivační nádoby jsme přidali kompletní kultivační médium o objemu 10 ml. Následně jsme přidali takové množství buněk, aby jejich výsledná koncentrace byla 300 tis. buněk. Buňky byly kultivovány při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub> do dosažení 70-80% konfluence. Po třech dnech kultivace jsme v kultivační nádobě vyměnili kultivační médium.

Po dosažení potřebné konfluence jsme buňky pasážovali trypsinizací. Získaný počet buněk v suspenzi jsme stanovili pomocí přístroje CASY counter (Roche, Švýcarsko). Stanovení počtu buněk je založeno na jejich schopnosti vést elektrický proud. V případě, že buňka vede elektrický proud, je generován elektrický pulz, který je následně zaznamenán. Počet pulzů odpovídá počtu buněk v suspenzi a jejich velikost přímo závisí na velikosti buněk.

Suspenzi buněk jsme dále ředili podle potřeby pro experimenty za použití kompletního kultivačního média na příslušné koncentrace. Kultivační médium pro experimenty jsme připravovali vždy čerstvé. Všechny experimenty byly realizovány za použití 4. až 19. pasáže buněk A549.

#### **4.4 Příprava roztoků**

##### **Fosfátový pufr (PBS)**

Ke 45 ml deionizované vody jsme přidali 5 ml fosfátového pufru. Takto připravený pufr byl uchováván v lednici při 4 °C maximálně 2 týdny.

##### **Pracovní roztok pro fluorometrické stanovení glutathionu**

K 1952 µl PBS jsme přidali 48 µl zásobního roztoku monochlorbimanů o koncentraci 10 mmol/l. Pracovní roztok jsme připravovali vždy čerstvý.

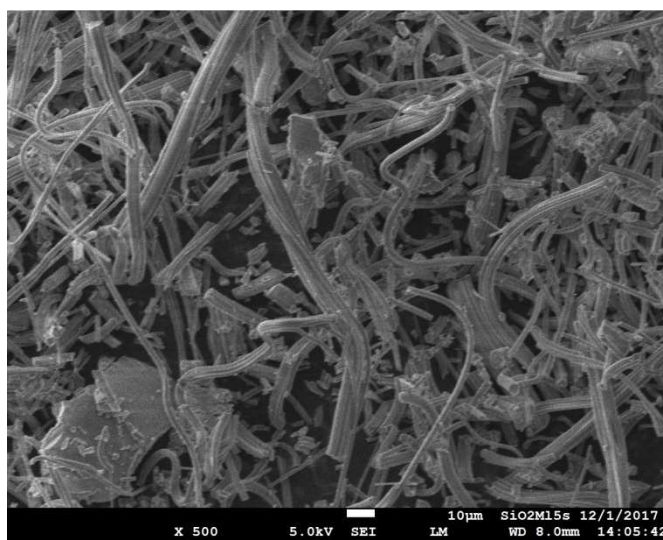


### Pracovní roztok JC-1

K 50  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku JC-1 o koncentraci 2 mg/ml jsme přidali 1617  $\mu\text{l}$  PBS. Pracovní roztok jsme připravovali vždy čerstvý.

### Zásobní roztok nanovláken SiO<sub>2</sub> 5 (SF5)

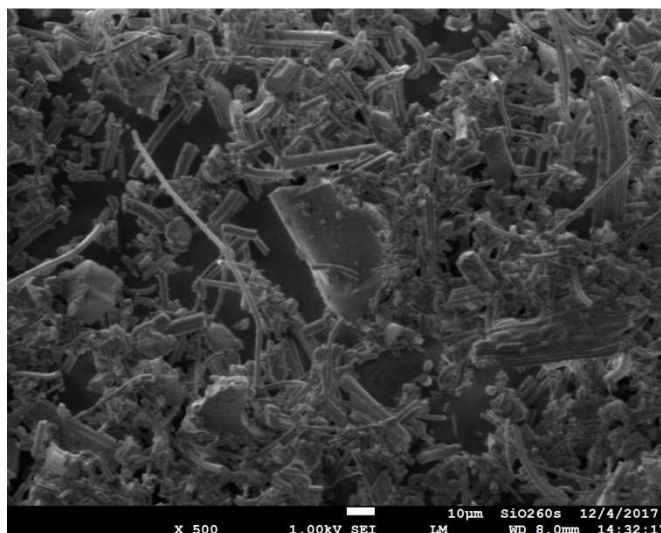
Nanovlákná SiO<sub>2</sub> byla mleta po stanovenou dobu (SF5), v porovnání s nanovlákný SiO<sub>2</sub> 6 jsou delší (obr. 11). Navážka 1 g SF5 byla resuspendována v 10 ml destilované vody. Takto připravený zásobní roztok o koncentraci 100 mg/ml byl uchováván ve tmě za laboratorní teploty.



**Obr. 11: Struktura SiO<sub>2</sub> 5 nanovláken po mletí, SEM. Měřítko = 10  $\mu\text{m}$ , zvětšení 500x (Převzato z CEMNAT).**

### Zásobní roztok nanovláken SiO<sub>2</sub> 6 (SF6)

Nanovlákná SiO<sub>2</sub> byla mleta po delší dobu (SF6) a jsou kratší než nanovlákná SiO<sub>2</sub> 5 (obr. 12). Navážka 1 g SF6 byla resuspendována v 10 ml destilované vody. Takto připravený zásobní roztok o koncentraci 100 mg/ml byl uchováván ve tmě za laboratorní teploty.



**Obr. 12: Struktura SiO<sub>2</sub> 6 nanovláken po mletí, SEM. Měřítka = 10 µm, zvětšení 500x (Převzato z CEMNAT).**

### Pracovní roztoky nanovláken SF5

Zásobní roztok SF5 jsme nadále ředili pomocí kultivačního média bez fenolové červeně a bez fetálního hovězího séra podle tabulky č. 2. Pracovní roztoky jsme připravovali vždy čerstvé.

**Tab. 2: Testované koncentrace roztoků nanovláken SiO<sub>2</sub>, postup ředění.**

Pracovní roztoky	Ředění nanovláken	Objem média
10 mg/ml	300 µl 100 mg/ml	2700 µl
1 mg/ml	300 µl 10 mg/ml	2700 µl
0,1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	2700 µl
10 µg/ml	300 µl 0,1 mg/ml	2700 µl
1 µg/ml	300 µl 10 µg/ml	2700 µl
0,1 µg/ml	300 µl 1 µg/ml	2700 µl

### Pracovní roztoky nanovláken SF6

Zásobní roztok SF6 jsme následně ředili pomocí kultivačního média bez fenolové červeně a bez fetálního hovězího séra obdobně podle tabulky č. 2. Pracovní roztoky jsme připravovali vždy čerstvé.

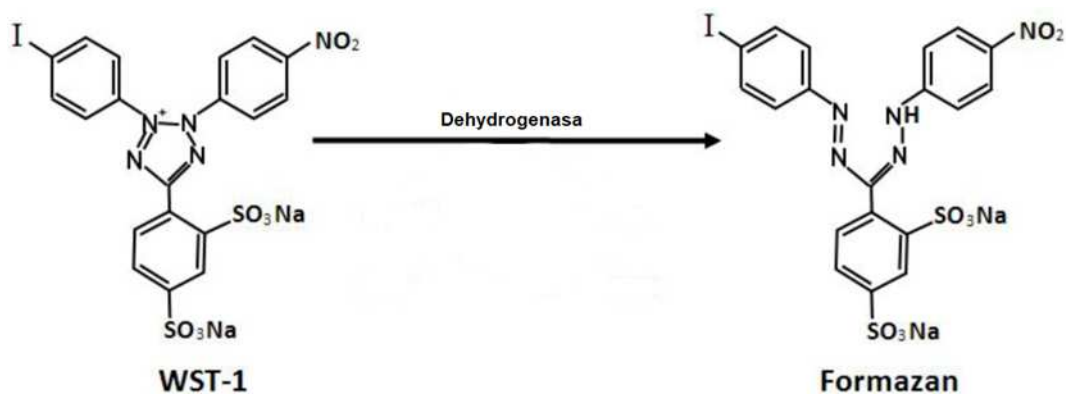
## **4.5 Testování toxicity nanovláken SiO<sub>2</sub>**

K testování toxicity nanovláken SiO<sub>2</sub> jsme použili buněčnou linii A549. Toxický vliv nanovláken jsme sledovali pomocí různých testů. Viabilitu neboli životaschopnost buněk A549 jsme hodnotili WST-1 testem. Pro podrobnější zkoumání mechanismu toxického účinku nanovláken jsme použili fluorometrickou detekci hladiny intracelulárního antioxidantu glutathionu. Pomocí fluorescenční sondy JC-1 jsme dále také sledovali možné mitochondriální poškození.

Výše uvedené testy jsme prováděli v 96jamkových destičkách nebo v cytopsinu. Do mikrotitračních destiček a cytopsinu jsme vždy nasazovali na jednu jamku 20 tis. buněk v suspenzi. Následovala 24hodinová inkubace, během které buňky přisedly na dno jamek mikrotitrační destičky nebo cytopsinu. Po inkubaci jsme odebrali kompletní kultivační médium. Poté jsme k buňkám do jamek přidali médium bez fenolové červeně a fetálního hovězího séra, které už obsahovalo příslušnou testovanou látku. Kontrolní buňky jsme kultivovali pouze v médiu bez fenolové červeně a fetálního hovězího séra. Ovlivněné buňky jsme potom inkubovali za předem definovaných podmínek podle potřeby stanovení.

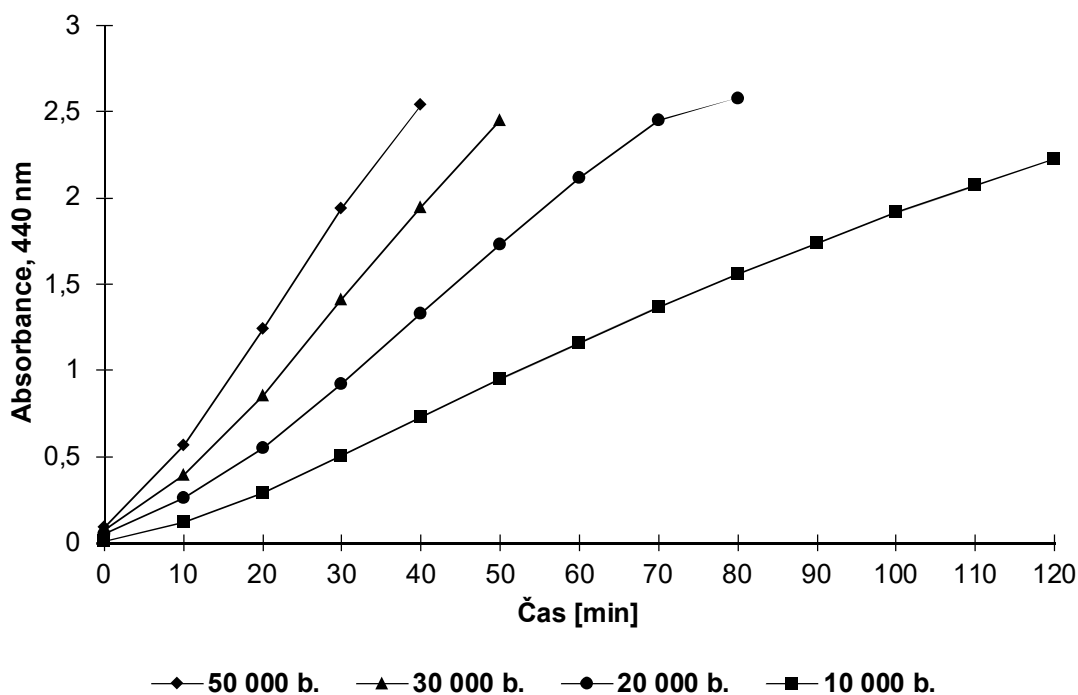
### **4.5.1 WST-1 test**

K hodnocení viability, proliferace a cytotoxicity *in vitro* slouží WST-1 test (Roche, Německo). Principem tohoto stanovení je redukce růžové tetrazoliové soli 4-[3-(4-iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen-disulfonátu na žlutý formazan za katalýzy mitochondriálními dehydrogenasami (obr. 13). Množství vznikajícího formazanového barviva tak přímo koreluje s počtem metabolicky aktivních buněk. Absorbance vzniklého barevného produktu se měří spektrofotometricky při 440 nm (*Yin et al., 2013*).



Obr. 13: Princip WST-1 testu (Převzato z Yin et al., 2013).

Nejdříve jsme definovali nejvhodnější denzitu buněk pro nasazení do mikrotitrační destičky a optimalizovali inkubační dobu pro WST-1 reagent. Proto jsme do mikrotitrační destičky nasadili různé suspenze buněk v rozmezí 10 tis. až 50 tis. buněk o objemu 100  $\mu$ l na jamku. Po 24 hodinách jsme k buňkám do jamek přidali ihned WST-1 reagent o objemu 10  $\mu$ l na jamku. Následně jsme pomocí spektrofotometru (Tecan Infinite M200, Rakousko) kineticky měřili absorbanci při vlnové délce 440 nm v 10-minutových intervalech celkem 2 hodiny.

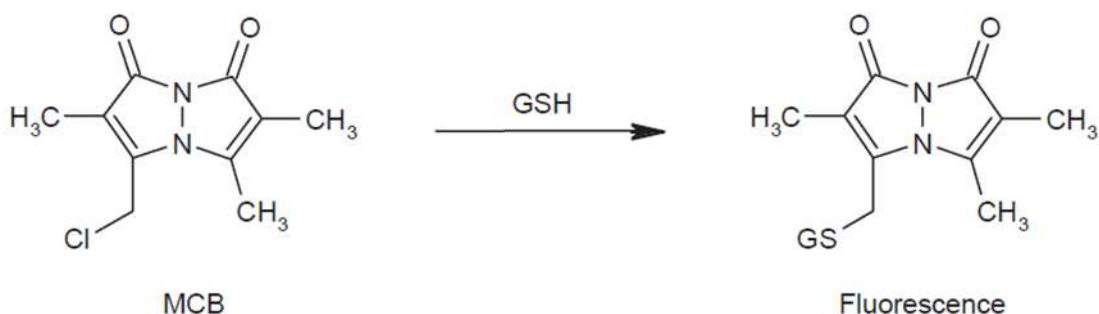


Graf 1: Optimalizace denzity buněk A549 pro WST-1 test. Buňky A549; 10 tis. až 50 tis. buněk/j.; 0-2 hod., n=5; WST-1 test (440 nm).

Graf číslo 1 znázorňuje změnu absorbance v závislosti na čase. Z tohoto grafu vyplývá, že aktivita intracelulárních dehydrogenas je přímo úměrná inkubační době a také je podmíněna denzitou buněk. Lineární závislost byla zjištěna v rozmezí 0 až 1 hodina pro denzitu 20 tis. buněk. Proto byla pro testování toxicity nanomateriálů jako nejvhodnější nasazována denzita 20 tis. buněk na jamku v 96jamkové mikrotitrační destičce. Změna absorbance po jedné hodině byla vztažena vždy ke kontrolním buňkám, které činily 100 %.

#### 4.5.2 Fluorometrické stanovení hladiny glutathionu

K široce používaným metodám stanovení glutathionu se řadí metody založené na principu fluorometrie. Jsou často upřednostňovány kvůli jejich vysoké citlivosti a specifitě. Do skupiny fluorescenčních sond pro detekci GSH patří například monochlorobimany (MCB), které mohou reagovat s GSH za vzniku fluorescenčních produktů (obr. 14). Monochlorobimany se přidávají do buněčného kultivačního média, kde následně pronikají membránou do buněk. Glutathion-S-transferasa umožňuje vznik aduktů GSH a monochlorobimanů, které jsou detekovány fluorometricky (Čapek *et al.*, 2017; Kamencic *et al.*, 2000).



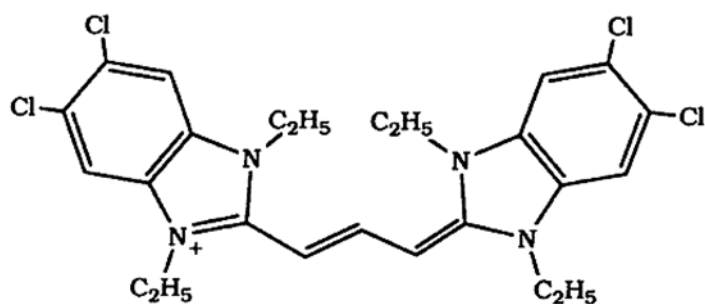
**Obr. 14: Konjugace monochlorobimanu s glutathionem.** MCB (Monochlorobimany), GSH (Glutathion) (Převzato z Jeffrey *et al.*, 2009).

Do 96jamkových destiček jsme nasazovali vždy 20 tis. buněk na jamku. Po přisednutí buněk na dno jamek jsme odsáli kompletní kultivační médium. K buňkám jsme přidali kultivační médium bez fenolové červeně a fetálního hovězího séra, které obsahovalo testovaná nanovlákná o příslušných koncentracích. Po inkubační době v rozmezí 0 až 24 hodin jsme k buňkám pipetovali takový objem pracovního roztoku MCB, aby koncentrace pracovního roztoku MCB v jamce odpovídala 40  $\mu\text{mol/l}$ . Poté byla měřena pomocí fluorometru (Tecan Infinite M200, Rakousko) kineticky intenzita fluorescence celkem 20 minut.

### 4.5.3 Detekce membránového potenciálu mitochondrií

Mitochondrie se řadí mezi nejdůležitější organely v buňkách, probíhá v nich převážná část buněčného dýchání a syntézy ATP. Mitochondrie prostřednictvím přenosu elektronů přes jednotlivé komplexy dýchacího řetězce poskytují energii pro transport protonů z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru. Nahromaděné protony jsou využity ke generaci velkého množství ATP. Síly pohánějící protony do mitochondrií jsou kombinací potenciálu mitochondriální membrány a mitochondriálního pH gradientu. Membránový potenciál si můžeme představit jako rozdíl elektrochemického potenciálu mezi vnitřním a vnějším prostředím mitochondriální membrány. Změny mitochondriálního membránového potenciálu (MMP – *Mitochondrial Membrane Potential*) jsou indikátorem poškození buněk. Pokles membránového potenciálu je charakteristickým znakem iniciace apoptózy a indukce membránového poškození (*Ly et al., 2003; Perry et al., 2011*).

V poslední době se fluorescenční sondy staly běžně používanými nástroji pro sledování změn potenciálu mitochondriální membrány za pomoci fluorescenční mikroskopie. Pro posouzení změn potenciálu mitochondriální membrány po inkubaci buněk A549 s nanovláknem jsme použili fluorescenční sondu JC-1 (obr. 15). Sonda JC-1 se řadí do skupiny lipofilních a kationických sond, což jí umožňuje pronikat přes plazmatickou membránu buňky. V nepoškozených buňkách, které mají vysokou hodnotou MMP, tvoří sonda JC-1 tzv. J-agregáty (*Smiley et al., 1991*). Emisi (červené světlo) lze pak sledovat při 595 nm. Pokud dojde k poškození mitochondrií, dochází k poklesu mitochondriálního membránového potenciálu, sonda zůstává v monomerní formě. Emisi (zelené světlo) můžeme pozorovat při 535 nm. Pro excitaci sondy JC-1 se používá světlo o vlnové délce 485 nm (*Ly et al., 2003; Smiley et al., 1991*).



Obr. 15: Chemická struktura fluorescenční sondy JC-1 (Převzato ze Smiley et al., 1991).

Změny MMP za použití fluorescenční mikroskopie jsme také detekovali v buňkách A549. Nejdříve jsme buňky A549 nasadili do cytopsinu o denzitě 20 tis. buněk o celkovém objemu 200  $\mu$ l na jamku. Následovala 24hodinová inkubace v inkubátoru, po kterou buňky přisednuly na dno jamek. Poté jsme odsáli kompletní kultivační médium a k buňkám jsme přidali kultivační médium bez fenolové červeně a fetálního hovězího séra, které už obsahovalo testovaná nanovlákná o různých koncentracích. Po uplynutí inkubační doby jsme k buňkám dodali pracovní roztok JC-1. Po dvaceti minutách inkubace jsme z jamek odpipetovali médium s přidanou sondou JC-1 a promyli pomocí PBS. Fluorescenci monomerů (zelená barva) a J-agregátů (červená barva) jsme pozorovali pomocí fluorescenčního mikroskopu.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Testování cytotoxicity nanomateriálů SF5 a SF6

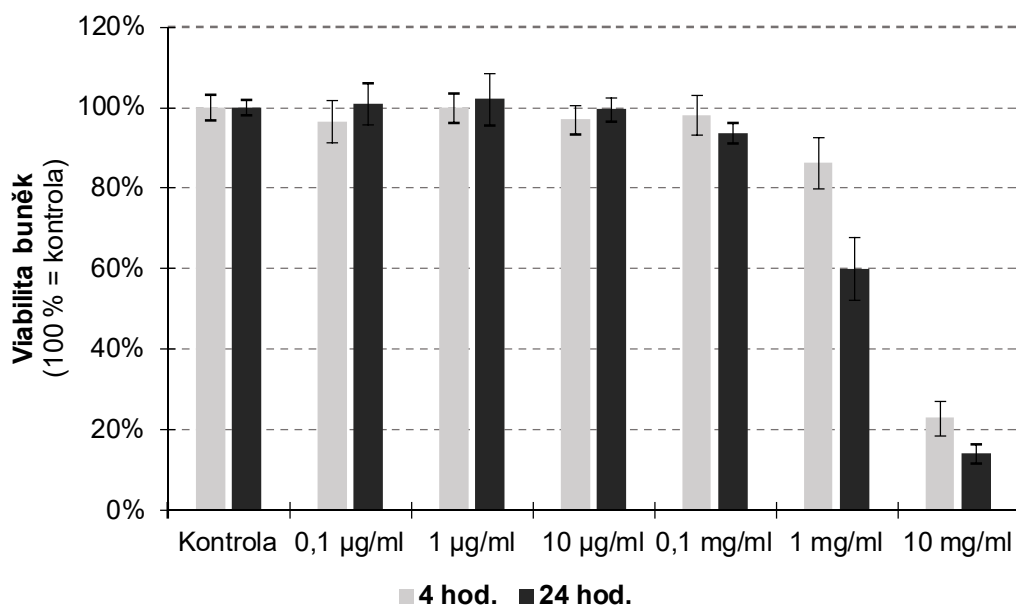
#### 5.1.1 Porovnání viability buněk A549 po inkubaci se SF5 a SF6

Toxický vliv SF5 a SF6 na plicní buňky jsme hodnotili za použití buněčné linie adenokarcinomu lidských plic A549. Vliv nanovláken na viabilitu buněk jsme posuzovali v závislosti na koncentraci nanovláken a době inkubace. Změnu životaschopnosti buněk po expozici nanovláken jsme hodnotili WST-1 testem, tj. stanovením mitochondriální aktivity dehydrogenas.

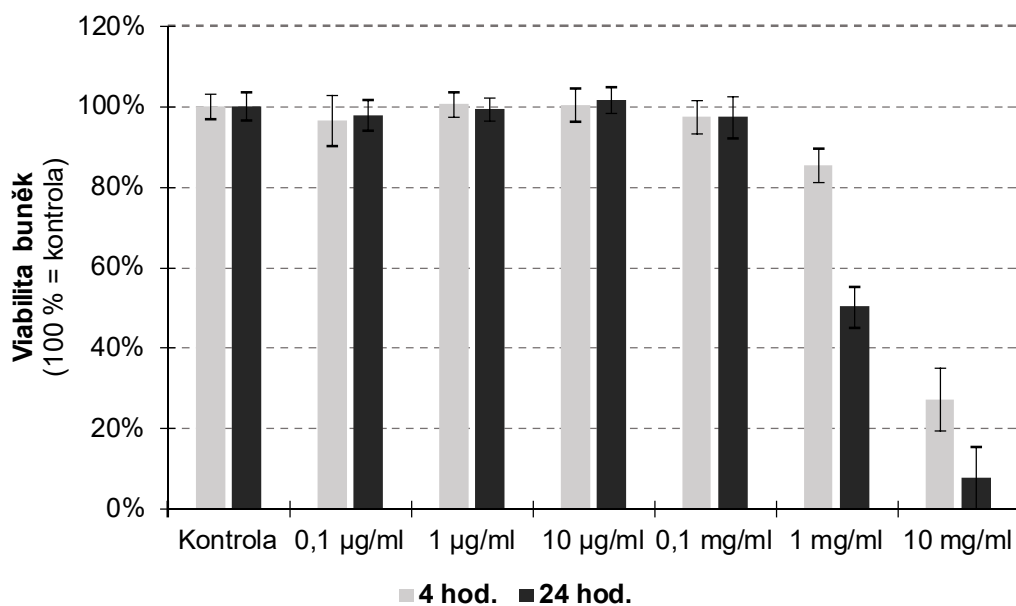
Buňky A549 jsme nejdříve inkubovali s oběma druhy nanovláken SiO<sub>2</sub> po dobu 4 a 24 hodin v širším rozmezí koncentrací 0,1 µg/ml až 10 mg/ml. Z výsledků testování širšího rozmezí koncentrací jsme vybrali čtyři koncentrace vykazující nejvyšší toxicitu. Poté jsme buňky A549 inkubovali s oběma druhy nanovláken ale s užším výběrem koncentrací mezi 10 µg/ml a 10 mg/ml. Dobu inkubace jsme rozšířili na 0, 1, 4, 24 hodin. Následně jsme porovnávali cytotoxicitu nanovláken v závislosti na různém čase a koncentraci těchto nanovláken. Pomocí WST-1 testu jsme zjistili, že toxický vliv SF5 a SF6 přímo úměrně závisí na dávce a době inkubace buněk s nanovláčky.

Z testování širokého rozmezí koncentrací po 4 a 24 hodinách jsme dospěli k závěru, že nejvyšší dvě koncentrace SF5 a SF6 vykazovaly nejvyšší toxicitu (graf 2 a 3). Mírné snížení viability buněk bylo patrné už po 4 hodinách inkubace u koncentrace obou nanovláken 1 mg/ml. Po 24 hodinách inkubace s nanovláčky o nejvyšší koncentraci buňky A549 vykazovaly velmi nízkou viabilitu v porovnání s kontrolními buňkami. Koncentrace 0,1 µg/ml až 10 µg/ml obou typů nanovláken neindukovala snížení životaschopnosti buněk.



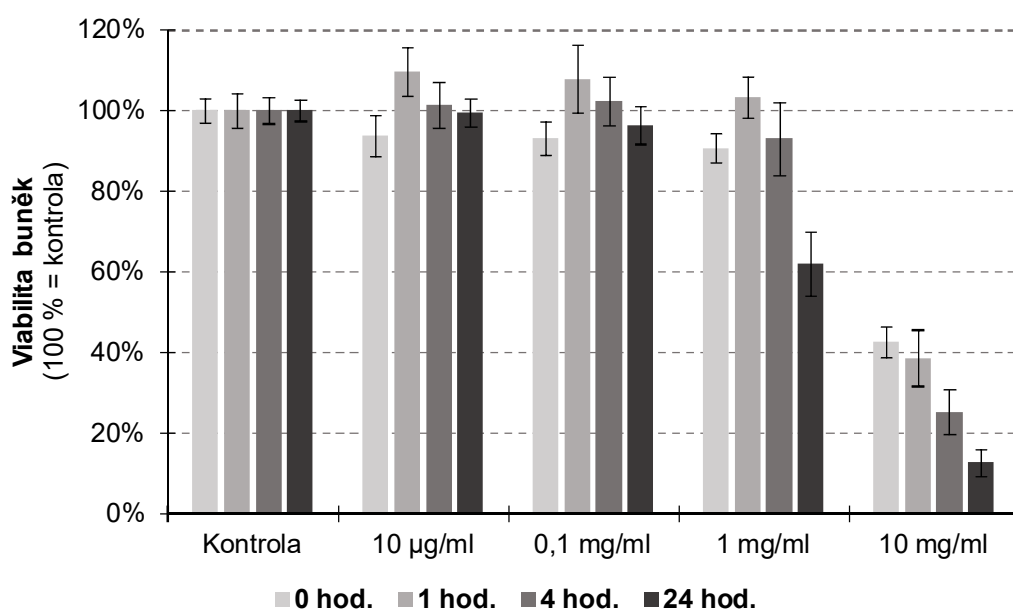


**Graf 2: Testování viability buněk v přítomnosti nanovláken SiO<sub>2</sub> SF5.** Buňky A549; koncentrace SF5: 0-10 mg/ml; doba inkubace: 4, 24 hod.; WST-1 test (440 nm). Výsledky vyjádřeny jako průměr ± SD (n = 8).



**Graf 3: Testování viability buněk v přítomnosti nanovláken SiO<sub>2</sub> SF6.** Buňky A549; koncentrace SF6: 0-10 mg/ml; doba inkubace: 4, 24 hod.; WST-1 test (440 nm). Výsledky vyjádřeny jako průměr ± SD (n = 8).

Graf číslo 4 zobrazuje rozšířené testování vlivu SF5 na buňky A549. Tato delší nanovláknina o koncentraci 10 mg/ml způsobila nejvýznamnější snížení viability buněk neboli pokles dehydrogenasové aktivity v závislosti na čase. Tento značný pokles aktivity jsme pozorovali již po nejkratší době expozice buněk těmto nanovlákninám, a to na  $43 \pm 4$  % v porovnání s kontrolními buňkami.

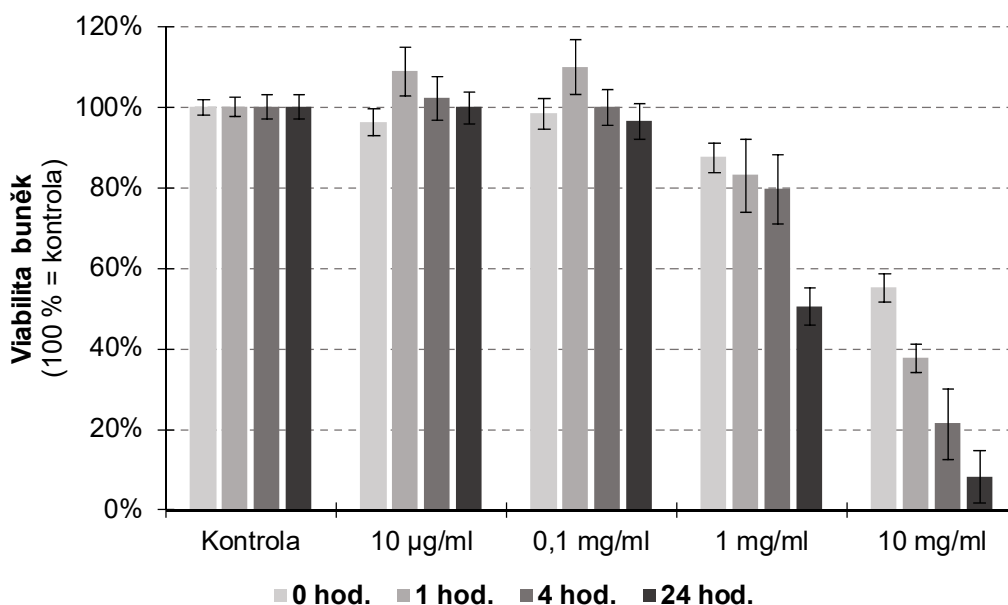


**Graf 4: Rozšířené testování viability buněk v přítomnosti nanovláken SiO<sub>2</sub> SF5.** Buňky A549; koncentrace SF5: 10 µg/ml až 10 mg/ml; doba inkubace: 0-24 hod.; WST-1 test (440 nm). Výsledky vyjádřeny jako průměr ± SD (n = 15).

Kratší vlákna SF6 o koncentraci 10 mg/ml také indukovala okamžitě značné snížení viability buněk A549 (graf 5). Životaschopnost buněk nadále přímo úměrně klesala v závislosti na rostoucím čase inkubace, po 24hodinové inkubaci prakticky k nulové hodnotě. Signifikantní pokles viability buněk na  $51 \pm 5$  % jsme pozorovali také po 24hodinové inkubaci s nanovláknou o koncentraci 1 mg/ml.

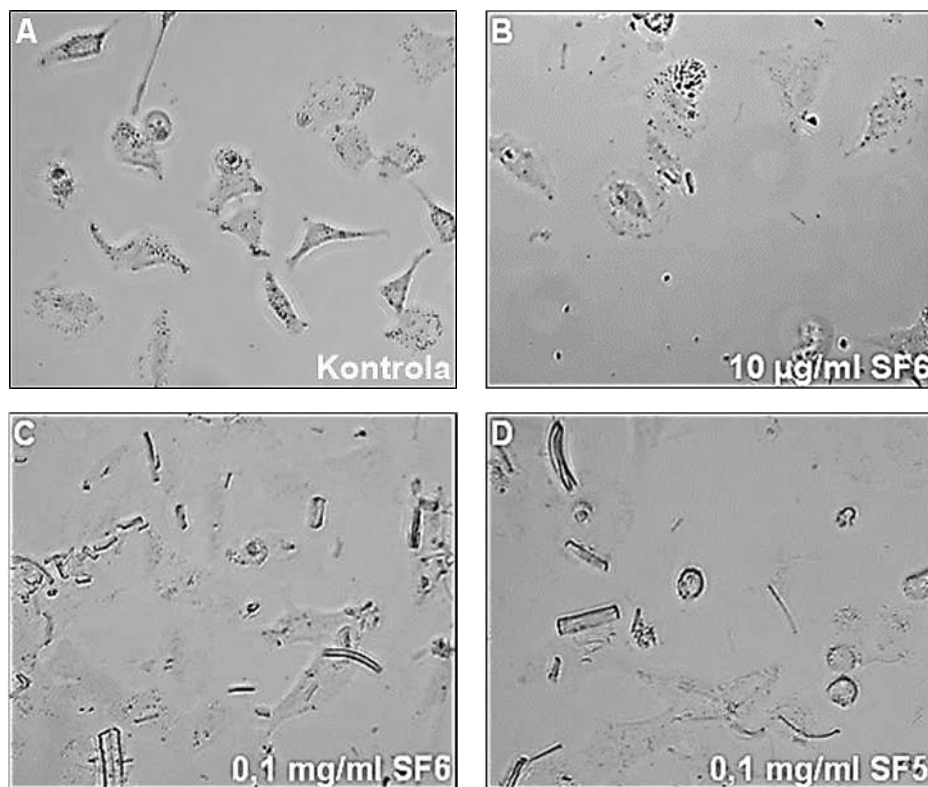
Následně jsme vzájemně porovnávali toxické vlivy obou typů nanovláken SiO<sub>2</sub>, která indukovala pokles aktivity mitochondriálních dehydrogenas u buněk A549. Např. po 4hodinové expozici SF6 a SF5 o koncentraci 1 mg/ml je patrný rozdíl v poklesu viability buněk na  $80 \pm 9$  % a  $93 \pm 9$  %. V rozmezí inkubace 0-1 hodina lze pozorovat trend klesající viability buněk u obou testovaných typů nanovláken (graf 4 a 5). To lze vysvětlit např. tím, že se buňky mohly po krátkém

čase expozice nanovláken jejich vlivu částečně přizpůsobit. Životaschopnost buněk obecně snižují oba typy nanovláken o koncentraci 1 mg/ml a vyšší.



**Graf 5: Rozšířené testování viability buněk v přítomnosti nanovláken SiO<sub>2</sub> SF6.** Buňky A549; koncentrace SF6: 10 µg/ml až 10 mg/ml; doba inkubace: 0-24 hod.; WST-1 test (440 nm). Výsledky vyjádřeny jako průměr ± SD (n = 15).

Jako ukázkou působení obou druhů nanovláken při testování jejich vlivu na buňky A549 zde předkládáme fotografie pořízené ve fázovém kontrastu. Buňky A549 byly inkubovány v cytospinu po dobu 24 hodin s vlákny SF5 a SF6 o koncentraci 10 µg/ml, 0,1 mg/ml a 1 mg/ml. Nanovlákná o nízké koncentraci 10 µg/ml se v zorném poli objektivu vyskytovala velmi málo (obr. 16 B). Na obrázku 16 C a D si lze všimnout nanovláken o koncentraci 0,1 mg/ml sedimentovaných na buňkách A549. Je zde vidět i rozdíl mezi velikostí nanovláken SF5 a SF6 (obr. 16 C a D). U koncentrace 1 mg/ml obou typů nanovláken bylo zorné pole objektivu překryté nanovláknami, přes která vůbec nebylo možné buňky pozorovat.



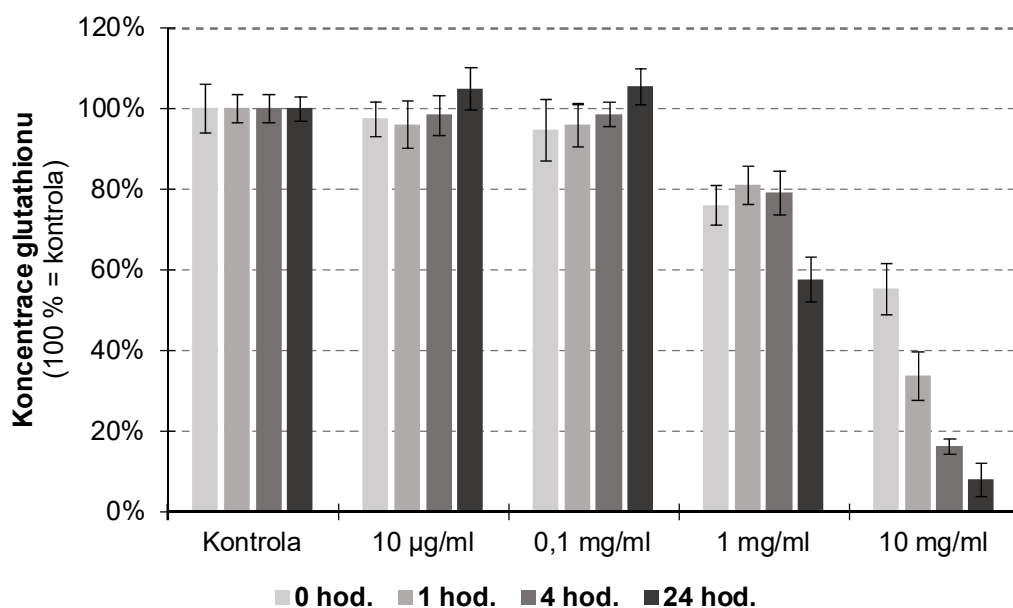
**Obr. 16: Fotografie nanovláken v kultivačním médiu při testování toxicity na buňkách A549.** Invertovaný mikroskop, fázový kontrast, zvětšení 400x; doba inkubace 24 hodin; A: kontrolní buňky, B: 10 µg/ml SF6, C: 0,1 mg/ml SF6, D: 0,1 mg/ml SF5.

### 5.1.2 Změny hladin glutathionu po inkubaci se SF5 a SF6

Kvůli další charakterizaci působení nanovláken SiO<sub>2</sub> na plicní buňky jsme také hodnotili hladinu glutathionu v buňkách. Vliv nanovláken na koncentraci glutathionu v buňkách jsme posuzovali v závislosti na koncentraci nanovláken a různém čase inkubace. Účinky po expozici nanovláken jsme sledovali pomocí fluorescenční sondy monochlorbiman, která se specificky váže na GSH za vzniku fluorescenčních produktů.

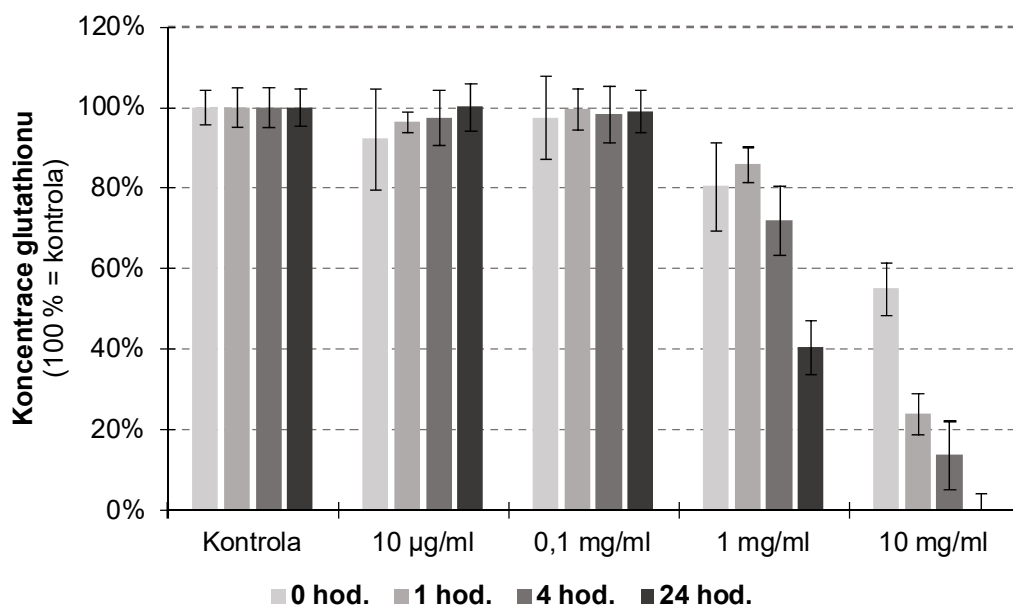
Buňky A549 jsme inkubovali s oběma druhy nanovláken SiO<sub>2</sub> po dobu 0, 1, 4, 24 hodin v rozmezí koncentrací 10 µg/ml až 10 mg/ml. Následně jsme porovnávali toxicitu nanovláken v závislosti na čase a koncentraci těchto nanovláken. Z fluorometrické detekce hladin GSH vyplynulo, že efekt SF5 a SF6 na koncentraci GSH je přímo úměrný dávce a době inkubace buněk s nanovláčky.

Nanovlákná SF5 v rozmezí koncentrací 10  $\mu\text{g/ml}$  až 0,1  $\text{mg/ml}$  neindukovala depleci glutathionu v buňkách ani po 24hodinové inkubaci (graf 6). Významný pokles glutathionu na  $55\pm 6\%$  v porovnání s kontrolními buňkami jsme pozorovali například po okamžitém kontaktu buněk se SF5 o koncentraci 10  $\text{mg/ml}$ .



**Graf 6: Testování koncentrace glutathionu v buňkách v přítomnosti nanovláken  $\text{SiO}_2$  SF5.** Buňky A549; koncentrace SF5: 10  $\mu\text{g/ml}$  až 10  $\text{mg/ml}$ ; doba inkubace: 0-24 hod.; Fluorometrické stanovení koncentrace glutathionu (394/490 nm). Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD (n = 8).

Podobné výsledky jsme získali i po expozici SF6 (graf 7). Po narůstající době inkubace s nanovláknou o koncentraci 1  $\text{mg/ml}$  SF6 došlo po 24 hodinách k depleci glutathionu v buňkách z  $80\pm 11\%$  na  $40\pm 7\%$ . K vyčerpání glutathionu docházelo přímo úměrně v závislosti na narůstajícím čase inkubace a koncentraci testovaných nanomateriálů.



**Graf 7: Testování koncentrace glutathionu v buňkách v přítomnosti nanovláken SiO<sub>2</sub> SF6.** Buňky A549; koncentrace SF6: 10 µg/ml až 10 mg/ml; doba inkubace: 0-24 hod.; Fluorometrické stanovení koncentrace glutathionu (394/490 nm). Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD (n = 8).

### 5.1.3 Detekce funkce mitochondrií po inkubaci se SF5 a SF6

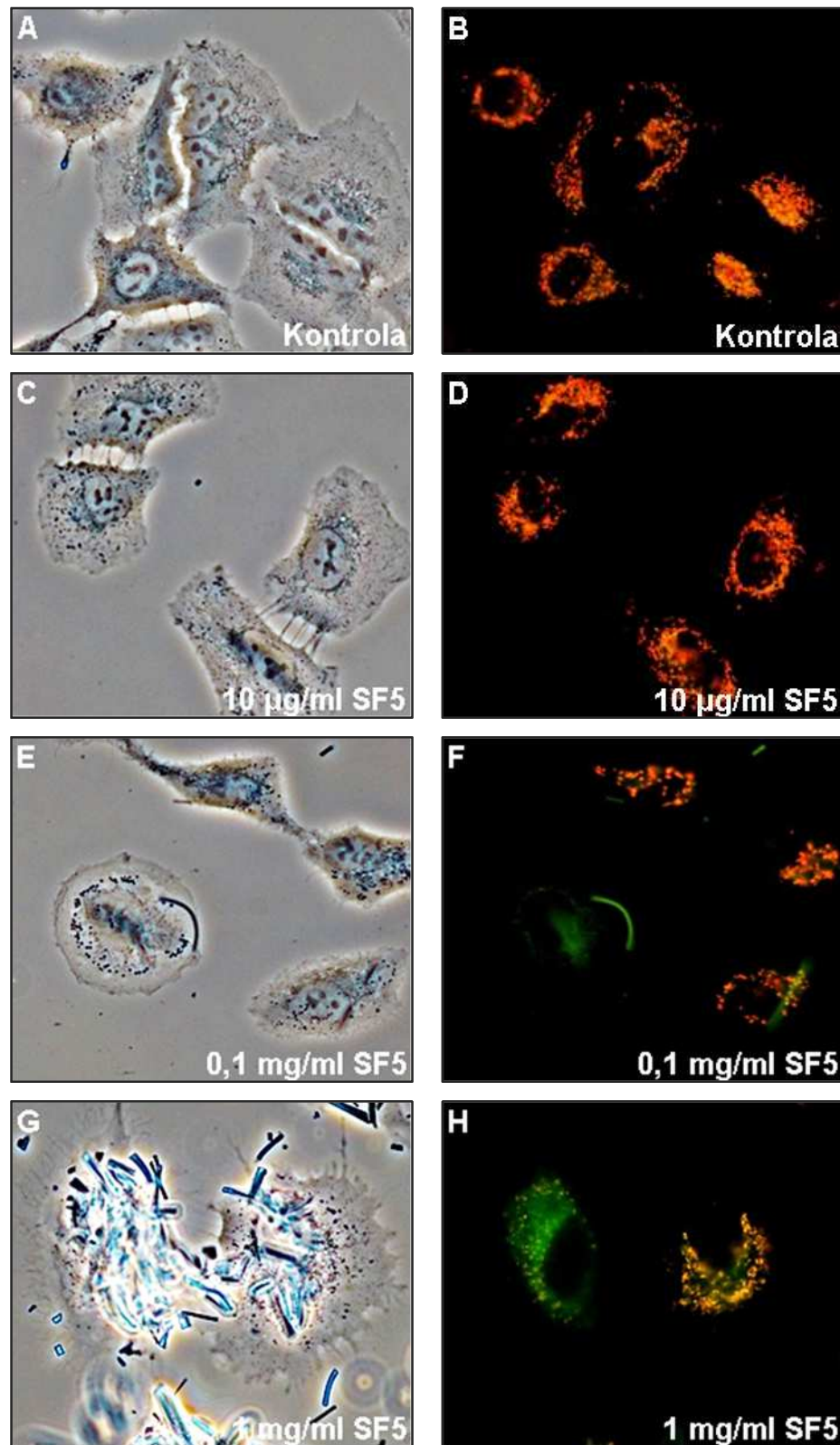
Předpokládaný vliv nanovláken na změnu potenciálu mitochondriální membrány jsme posuzovali v závislosti na koncentraci nanovláken a době inkubace. Poškození mitochondrií po expozici nanovláken jsme hodnotili fluorescenční mikroskopií za použití fluorescenční sondy JC-1.

Buňky A549 jsme pro tento experiment inkubovali s oběma druhy nanovláken SiO<sub>2</sub> po dobu 24 hodin v rozmezí koncentrací 10 µg/ml až 1 mg/ml. Následně jsme srovnávali míru poškození mitochondrií pomocí změny mitochondriálního membránového potenciálu v závislosti na koncentraci nanovláken. Následující výsledky naznačují, že nanovláčka SF5 a SF6 o vysoké koncentraci jsou odpovědné za pokles potenciálu mitochondriální membrány.

Výsledky 24hodinové inkubace buněk A549 s delšími SF5 o různé koncentraci jsou zobrazeny na obrázku číslo 17. Buňky inkubované s nanovlákný jsme porovnávali vždy s kontrolními neovlivněnými buňkami. Buňky ovlivněné koncentrací 10  $\mu\text{g/ml}$  SF5 nevykazovaly žádné snížení MMP, intenzita fluorescence byla srovnatelná s kontrolními buňkami (obr. 17 C a D). Problémem při vyhodnocování může být interference nanovláken se sondou JC-1, což je dobře patrné na obrázku č. 17 F. Vysoká koncentrace SF5 1  $\text{mg/ml}$  způsobila pokles potenciálu mitochondriální membrány (zelená barva, obr. 17 H). Na obrázku ve fázovém kontrastu si můžeme všimnout četného výskytu nanovláken, která pokrývají celý povrch buněk, a jsou zodpovědná za nízký MMP neboli poškození mitochondrií.

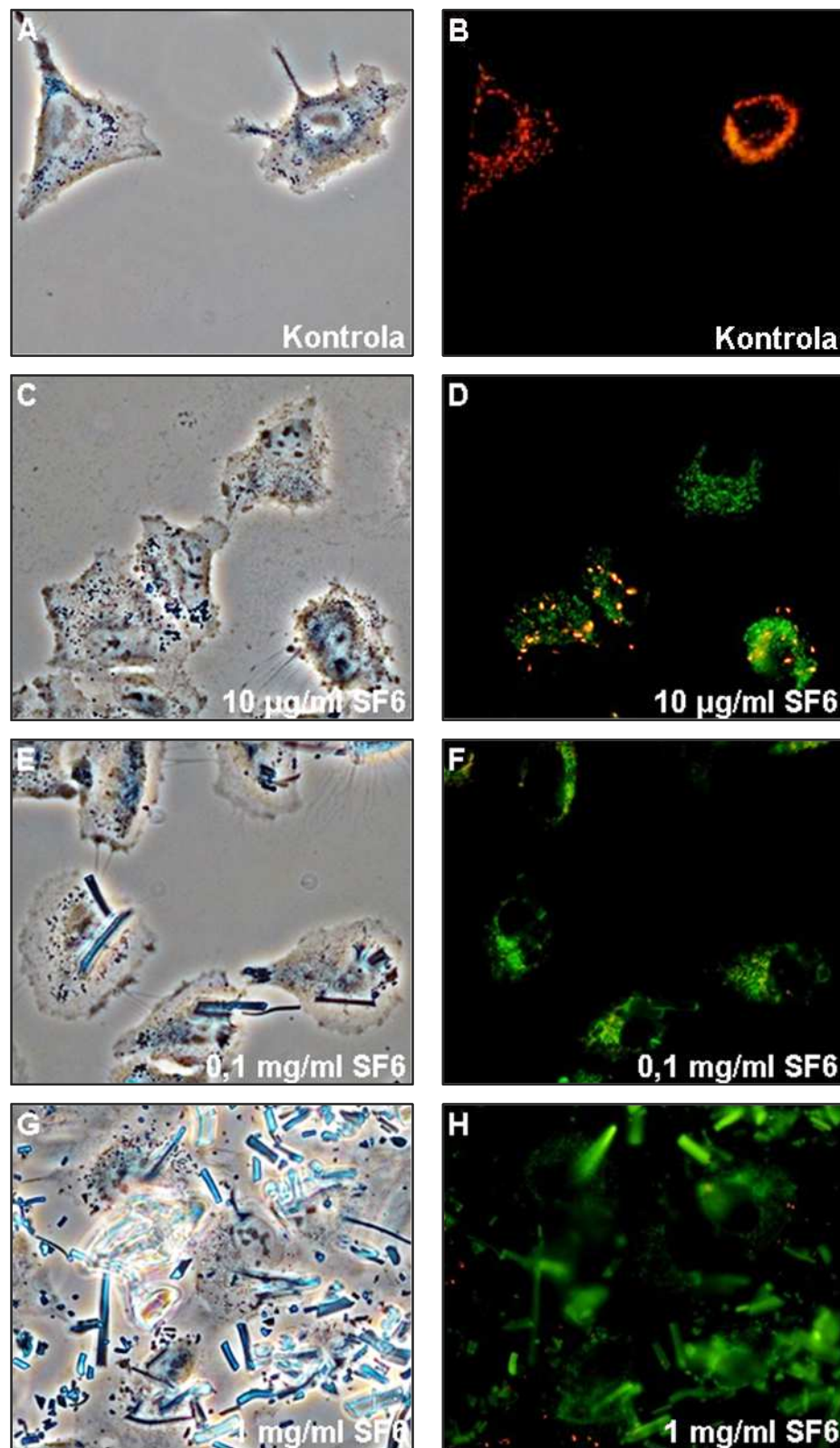
Kratší SF6 jsme inkubovali s buňkami A549 také 24 hodin (obr. 18). Vysoký mitochondriální membránový potenciál jsme zjistili pouze u kontrolních buněk (obr. 18 B). Nanovlákná SF6 již o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  způsobila snížení potenciálu mitochondriální membrány (obr. 18 D). Přisednutá nanovlákná na buňkách A549 o koncentraci 0,1  $\text{mg/ml}$  můžeme dobře pozorovat na obrázku ve fázovém kontrastu (obr. 18 E). U vysoké koncentrace SF6 1 $\text{mg/ml}$  si můžeme také všimnout interference nanovláken se sondou JC-1. Přes vysokou koncentraci nanovláken jsou buňky ve fázovém kontrastu těžko viditelné (obr. 18 G).

Po srovnání vlivu obou typů nanovláken lze usoudit, že kratší SF6 o nízké koncentraci měla více toxický vliv na buňky A549, protože indukovala snížení MMP v porovnání se SF5. Oba typy nanovláken o koncentraci 0,1  $\text{mg/ml}$  a vyšší způsobila snížení potenciálu mitochondriální membrány. Bylo možné si všimnout i časté interference obou druhů nanovláken s fluorescenční sondou JC-1, která může být komplikací při sledování změn MMP na snímcích pořízených pomocí fluorescenčního mikroskopu.



**Obr. 17: Detekce mitochondriálního membránového potenciálu u buněk A549 pomocí sondy JC-1 (červená fluorescence = vysoký membránový potenciál mitochondrií; zelená fluorescence = nízký membránový potenciál mitochondrií). Zvětšení 400x; A, C, E, G: fázový kontrast; B, D, F, H: fluorescence 485/535 (595) nm; doba inkubace 24 hod.; SF5 10 µg/ml, 0,1 g/ml, 1 mg/ml.**





Obr. 18: Detekce mitochondriálního membránového potenciálu u buněk A549 pomocí sondy JC-1 (červená fluorescence = vysoký membránový potenciál mitochondrií; zelená fluorescence = nízký membránový potenciál mitochondrií). Zvětšení 400x; A, C, E, G: fázový kontrast; B, D, F, H: fluorescence 485/535 (595) nm; doba inkubace 24 hod.; SF6 10 µg/ml, 0,1 g/ml, 1 mg/ml.

## 6. DISKUZE

Do dnešní doby bylo vyvinuto několik různých druhů nanomateriálů. Podle tvaru a velikosti rozlišujeme nanotrubice, nanovlákna, sférické a dendritické agregované nanomateriály, kovové nanočástice atd. Tyto struktury také můžeme zařadit do dvou velkých skupin, tj. nanočástice na bázi kovů a nanomateriály z nekovových materiálů (*Bahadar et al., 2016; Pandey, Prajapati, 2018*).

V nanotechnologiích mají nanomateriály na bázi oxidu křemičitého dominantní úlohu vzhledem k jejich vlastnostem, tj. jedinečným optickým vlastnostem, specifickému povrchu, nízké hustotě, adsorpční kapacitě, porézности, biokompatibilitě a potenciálně nízké toxicitě. Oxidy křemíku jsou v nanotechnologiích široce využívány také díky jejich poměrně snadné syntéze a nižším nákladům výroby. Tyto všechny vlastnosti vedou k tomu, že nanomateriály na bázi oxidu křemičitého jsou využívány jako inertní pevné podpůrné matrice v biomedicínských aplikacích. Nově rozšířené aplikace nanomateriálů na bázi oxidu křemičitého jsou v adsorpci a separaci biomolekul, detekci a purifikaci nukleových kyselin, transportu léků a genů (*Bitar et al., 2012*).

Nanomateriály díky své vysoké reaktivitě mohou potenciálně působit toxicky v důsledku škodlivých interakcí s biologickými systémy. Kvůli své malé velikosti v řádech nanometrů se nanomateriály mohou snadno dostávat do lidského těla, překračovat biologické bariéry a pronikat tak do různých orgánů (*Arora et al., 2012; Bahadar et al., 2016*). Právě plíce jsou častým cílem pro možné toxické působení nanomateriálů především kvůli jejich velké kontaktní ploše (*Schwaiblmair et al., 2012*).

Cílem diplomové práce proto bylo optimalizovat stanovení buněčné toxicity *in vitro* po inkubaci buněk s vybranými nanomateriály. Při studiu případného toxického vlivu různých typů nanomateriálů v podmínkách *in vitro* jsme využili test viability WST-1, fluorometrické stanovení koncentrace glutathionu a sledování změny potenciálu mitochondriální membrány pomocí fluorescenční sondy JC-1. Jako linii pro testování plicní toxicity *in vitro* jsme vybrali buněčnou linii adenokarcinomu lidských plic A549, která je jednou z populárních buněčných linií v toxikologických studiích různých druhů nanomateriálů (*Changa et al., 2011*).

Ke studiu plicní toxicity *in vitro* jsme měli k dispozici nanovlákná oxidu křemičitého. Jedná se o jednoduchá nanovlákná oxidu křemičitého dvou typů, delší SF5 a kratší SF6. Jelikož se jedná o unikátní nanovlákná oxidu křemičitého, ve vědeckých publikacích chybí primární data, se kterými by bylo možné naše výsledky porovnávat a diskutovat. Naše nalezené výsledky jsme tedy alespoň srovnávali se závěry obdobných experimentů, ve kterých dominovaly např. nanočástice oxidu křemičitého, nebo nanovlákná oxidu titaničitého.

Nejdříve jsme optimalizovali nejvhodnější denzitu buněk A549 na jamku v 96jamkové destičce. S ohledem na co nejnížší spotřebu buněk a dobu inkubace jsme zvolili denzitu 20 tis. buněk na jamku. Následně jsme se zaměřili na posouzení toxicity nanovláken pomocí WST-1 testu. Buňky jsme vystavili různým koncentracím nanovláken po různý čas inkubace. Podle našeho předpokladu docházelo ke snížení viability buněk v závislosti na vzrůstající koncentraci nanovláken a době inkubace. Nejvíce indukovaly snížení viability buněk oba typy nanovláken o koncentraci 0,1 mg/ml a vyšší (v porovnání s kontrolními buňkami).

V nedávné studii zahraniční autoři dospěli k závěru, že testovaná toxicita kulovitých nanočástic oxidu křemičitého (SiO<sub>2</sub>-NPs) závisí na dávce, velikosti i typu použité buněčné linie. V této studii použili ke stanovení buněčné viability MTT test na bázi tetrazoliových solí. SiO<sub>2</sub>-NPs o koncentraci 50 µg/ml a vyšší po 24 hodinách inkubace způsobily snížení životaschopnosti buněk A549 (*Kim et al., 2015*).

V jiné studii autoři potvrdili po testování krátkých a dlouhých vláknitých nanomateriálů TiO<sub>2</sub>, že delší nanovlákná byla vysoce toxická a iniciovala zánětlivou reakci u primárních myších alveolárních makrofágů. Tato studie také naznačuje, že pokud se prodlouží délka nanomateriálu, změní se i toxicita a patogenní potenciál. To vede k narušení lyzozomů, protože pro fagocytární buňky je tento nanomateriál obtížně zpracovatelný (*Hamilton et al., 2009*). Z našich výsledků je patrný mírný rozdíl v poklesu viability buněk A549. Po 4hodinové expozici v závislosti na rozdílné délce SF6 a SF5 o koncentraci 1 mg/ml poklesla viabilita buněk na 80±9 % a 93±9 %.

Příčinou toxicity námi testovaných SF5 a SF6 může být také chybějící povrchová modifikace. V nedávné práci byly testovány modifikované a nemodifikované nanomateriály oxidu křemičitého na několika buněčných liniích

včetně buněk A549. Část nanomateriálů byla modifikována karboxylovou nebo aminovou skupinou. Výsledky ukázaly, že nemodifikované nanomateriály indukovaly buněčnou smrt. Naproti tomu povrchová modifikace nanomateriálů cytotoxicitu potlačovala (*Hansjosten et al., 2018*). Tyto experimenty byly potvrzeny už i dříve (*Morishige et al., 2012*).

V minulosti byla zkoumána také cytotoxicita nanočástic oxidu křemičitého o velikosti 15 nm a 46 nm. Toxicita obou druhů SiO<sub>2</sub>-NPs se významně nelišila. Po expozici SiO<sub>2</sub>-NPs o koncentraci 10 µg/ml až 100 µg/ml v průběhu 72 hodin došlo ke snížení životaschopnosti buněk A549 v závislosti na dávce nanočástic a času inkubace. Nejvíce byl patrný pokles způsobený koncentrací 100 µg/ml za 72 hodin inkubace. Po 24 hodinách inkubace nanočástic o koncentraci 100 µg/ml s buňkami poklesla viabilita přibližně na 84 %, což je o něco méně v porovnání s naším experimentem. Buněčná hladina glutathionu vykazovala pokles závislý na množství SiO<sub>2</sub>-NPs obdobně jako v naší práci, a také byla prokázána zvýšená produkce ROS (*Lin et al., 2006*).

Pokud by podobný mechanismus toxicity fungoval i v našem případě, tak pokles hladiny GSH po vystavení buněk účinkům oběma typům SF5 a SF6 by mohl být přičítán právě zvýšené produkci ROS. Z našich získaných výsledků byla také zjištěna významná korelace mezi poklesem koncentrace GSH a viabilitou buněk, které byly exponovány různými koncentracemi těchto nanovláken. Buněčnou smrt lze pravděpodobně vysvětlit jako reakci na pokles koncentrace glutathionu a změnu poměru oxidačně-antioxidační rovnováhy v buňkách A549.

Toxické účinky nanomateriálů se mohou také lišit vzhledem k použité buněčné linii. Některé buňky mohou být vůči nanomateriálům více citlivé a naopak. V jedné práci autoři stanovovali pokles životaschopnosti u více linií buněk po expozici TiO<sub>2</sub> nanovláknům. Výsledky ukázaly, že nanovláknem TiO<sub>2</sub> indukovala snížení životaschopnosti buněk v závislosti na koncentraci nanovláken a s větším účinkem na alveolární epiteliální buňky než na makrofágy. Mimo jiné ve srovnání s nanočásticemi TiO<sub>2</sub> byla nanovláknem TiO<sub>2</sub> více cytotoxická a všechny nanomateriály iniciovaly snížení hladiny glutathionu v makrofázích (*Allegri et al., 2016*).

V dalších pracích autoři například testovali koexpozici nanočástic oxidu křemičitého o velikosti přibližně 39 nm a octanu olova na buňkách A549. Nanočástice o koncentraci 10 µg/ml v různé kombinaci inkubovali s druhou

testovanou látkou po dobu 24 hodin. Vyhodnocení MTT testu ukázalo, že samotné SiO<sub>2</sub>-NPs neměly vliv na pokles životaschopnosti buněk, což dobře koresponduje s našimi experimenty s SF. V této publikaci také detekovali změnu mitochondriálního membránového potenciálu s využitím fluorescenční sondy rhodamin 123. Po 24hodinové expozici samostatných SiO<sub>2</sub>-NPs o koncentraci 10 µg/ml nenalezli žádnou významnou změnu mitochondriálního membránového potenciálu (*Lu et al., 2017*). Po porovnání s těmito závěry jsou tedy naše výsledky získané pomocí sondy JC-1 mírně odlišné.

Vedle této práce byla studována toxicita nanočástic oxidu železitého pokrytých tenkou vrstvou oxidu křemičitého na buňkách A549, kdy autoři testovali také změnu potenciálu mitochondriální membrány. Změna potenciálu byla detekována fluorometricky v 96jamkové destičce pomocí sondy JC-1. Porušení mitochondrií bylo více patrné u buněk po inkubaci s NPs s nemodifikovaným povrchem. Obecně výsledky této studie ukázaly, že povrchová úprava těchto nanočástic oxidem křemičitým hraje klíčovou roli při zlepšení stability částic v biologickém prostředí a snižuje jejich cytotoxické účinky (*Malvindi et al., 2014*).

V jiné práci autoři zjišťovali potencionální vliv NPs na poškození mitochondrií jaterních buněk HepG2 s využitím fluorescenční mikroskopie a také sondy JC-1. Bylo zjištěno, že docházelo ke snížení MMP po expozici jaterních buněk amorfním SiO<sub>2</sub>-NPs v závislosti na vzrůstající koncentraci. Testované koncentrace SiO<sub>2</sub>-NPs se nacházely v rozmezí 0-200 µg/ml a doba inkubace činila 3 nebo 24 hodin (*Sun et al., 2011*). Na dalších plicních buňkách WI-38 jiný vědecký tým testoval nanomateriály na bázi oxidu křemičitého. Při zkoumání účinku speciálních biogenních SiO<sub>2</sub>-NPs na plicní fibroblasty WI-38 zjistili, že neovlivňují životaschopnost ani morfologii buněk a pouze mírně ovlivňují MMP ve vysokých dávkách (*Athinarayanan et al., 2017*).

V nedávném experimentu si autoři další práce vybrali SiO<sub>2</sub>-NPs o velikosti 40, 60 a 200 nm k testování na nenádorové buněčné linii plicního epitelu BEAS-2B. Životaschopnost buněk zde byla snížena přímo úměrně velikosti a dávce SiO<sub>2</sub>-NPs, zatímco aktivita laktátdehydrogenasy, oxidační stres a poškození mitochondrií výrazně vzrostly. Tento efekt se nejdříve projevil po expozici NPs o koncentraci 25 µg/ml, což se neshoduje s výsledky naší diplomové práce, kde jsme detekovali toxickou koncentraci mnohem vyšší (*Li et al., 2016*).

Na fotografiích, které jsme pořídili ve fázovém kontrastu pomocí invertovaného mikroskopu, jsou dobře viditelná nanovlákná o koncentraci 0,1 mg/ml. Oba typy nanovláken o vysoké koncentraci byly sedimentované na dně jamek. Nanovlákná o nejvyšší testované koncentraci 1 mg/ml a 10 mg/ml pokrývala většinu nebo celý povrch jamky cytopsinu, a proto nebylo možné buňky A549 pozorovat. Takto přisednutá SF5 a SF6 pravděpodobně mohla zamezit přístupu živin a kyslíku k buňkám, což mělo za následek rapidní snížení viability buněk, s čímž souvisí i snížení potenciálu mitochondriální membrány. Rychlé sedimentace nanovláken na dno jamek si bylo možné všimnout i při ovlivňování buněk připravenými suspenzemi nanovláken po odsátí kompletního kultivačního média v 96jamkové destičce.

Proto se domníváme, že SF5 a SF6 působí na buňky A549 spíše mechanicky než cíleně toxicky. S tím souvisí i skutečnost, že většina *in vitro* studií biologických účinků nanočástic na plicní buňky jsou obvykle prováděny za podmínek, kdy jsou NPs v suspenzi v kultivačním médiu. Případnou aglomeraci nebo sedimentaci v takových suspenzích je obtížné kontrolovat, a tudíž i množství sedimentovaných nanočástic na buňkách může být nejasné. Kromě toho mohou být buněčné reakce na NPs v kultivačním médiu odlišné od těch pozorovaných při fyziologickém nastavení na rozhraní vzduchu a kapaliny (Lu et al., 2017; Panas et al., 2014).

Aby se více napodobily realistické situace relevantní pro inhalaci, buňky A549 byly vystaveny aerosolům v mezifázi vzduchu a kapaliny pomocí speciálního zařízení. Překvapivě byly takto exponované buňky méně citlivé na SiO<sub>2</sub>-NPs. Je tedy zřejmé, že je zapotřebí více studií, aby bylo možné potvrdit, jestli jsou takto vystavené buňky obecně méně náchylné k NPs, nebo zda konkrétní NPs vykazují různou toxicitu v závislosti na použité metodě expozice (Panas et al., 2014).

## 7. ZÁVĚR

V naší diplomové práci jsme optimalizovali stanovení buněčné viability WST-1 testem a stanovení koncentrace glutathionu v buňkách založeném na fluorometrické detekci. Tyto metody jsme následně využili při charakterizaci plicní toxicity *in vitro* na buněčné linii adenokarcinomu lidských plic A549. Dále jsme studovali vliv nanomateriálů na bázi oxidu křemičitého na plicní buňky v podmínkách *in vitro*.

Závěrem lze shrnout, že toxicita nanovláken oxidu křemičitého, která jsme měli k dispozici, závisí na jejich koncentraci a času inkubace s buňkami A549. Zásadní negativní vliv podle ukazatele životaschopnosti buněk a dalších parametrů měla podle našich výsledků koncentrace obou nanovláken nejméně 1 mg/ml. K depleci hladiny glutathionu docházelo nejvíce po expozici buněk nanovláknům o nejvyšší koncentraci. Změnu potenciálu mitochondriální membrány jsme detekovali fluorescenční mikroskopií s využitím fluorescenční buněčné sondy JC-1.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Allegri M., Bianchi M. G., Chiu M., Varet J. et al.: Shape-related toxicity of titanium dioxide nanofibres. *PLoS ONE*, 2016, 11, s. 1-21.
2. Armand L., Biola-Clier M., Bobyk L., Collin-Faure V. et al.: Molecular responses of alveolar epithelial A549 cells to chronic exposure to titanium dioxide nanoparticles: A proteomic view. *Journal of Proteomics*, 2016, 134, s. 163-173.
3. Armstrong J. S., Steinauer K. K., Hornung B., Irish J. M. et al.: Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death and Differentiation*, 2002, 9, s. 252-263.
4. Arora S., Rajwade J. M., Paknikar K. M.: Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2012, 258, s. 151-165.
5. Athinarayanan J., Periasamy V. S., Alhazmi M., Alshatwi A. A.: Synthesis and biocompatibility assessment of sugarcane bagassederived biogenic silica nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*, 2017, 105, s. 340-349.
6. Bahadar H., Maqbool F., Niaz K., Abdollahi M.: Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models. *Iranian Biomedical Journal*, 2016, 20, s. 1-11.
7. Baiguera S., Casciardi S., Incoronato F., Cavallo D. et al.: Cell surface modifications induced by titanium dioxide nanoparticles in A549 cells. *Formatex Research Center*, 2014, s. 24-31.
8. Baptista F. R., Belhout S. A., Giordanib S., Quinn S. J.: Recent developments in carbon nanomaterial sensors. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44, s. 4433-4453.
9. Bayford R., Rademacher T., Roitt I., Wang S. X.: Emerging applications of nanotechnology for diagnosis and therapy of disease: a review. *Physiological Measurement*, 2017, 38, s. 183-203.



10. Bhattacharya K., Mukherjee S. P., Gallud A., Burkert S. C. et al.: Biological interactions of carbon-based nanomaterials: From coronation to degradation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2016, 12, s. 333-351.
11. Bitar A., Ahmad N. M., Fessi H., Elaissari A.: Silica-based nanoparticles for biomedical applications. *Drug Discovery Today*, 2012, 17, s. 1147-1154.
12. Bookman R. S., Bellin A., Repo M. A., Hickok N. J. et al.: In vivo and in vitro biological activities of two human cell lines derived from anaplastic lung cancers. *Cancer Research*, 1983, 43, s. 4571-4576.
13. Brown D. M., Hutchison L., Donaldson K., MacKenzie S. J. et al.: The effect of oxidative stress on macrophages and lung epithelial cells: The role of phosphodiesterases 1 and 4. *Toxicology Letters*, 2007, 168, s. 1-6.
14. Cooper J. R., Abdullatif M. A., Burnett E. C., Kempell K. E. et al.: Long term culture of the A549 cancer cell line promotes multilamellar body formation and differentiation towards an alveolar type II pneumocyte phenotype. *PLoS ONE*, 2016, 11, s. 1-20.
15. Čapek J., Hauschke M., Brůčková L., Roušar T.: Comparison of glutathione levels measured using optimized monochlorobimane assay with those from ortho-phthalaldehyde assay in intact cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2017, 88, s. 40-45.
16. Emmendoerffer A., Hecht M., Boeker T., Mueller M. et al.: Role of inflammation in chemical-induced lung cancer. *Toxicology Letters*, 2000, 112-113, s. 185-191.
17. Fadahunsi O., Krol R.: Acute amiodarone pulmonary toxicity following lung resection. *International Journal of Biomedical Science*, 2014, 10, s. 217-220.
18. Fehrenbach H.: Alveolar epithelial type II cell: Defender of the alveolus revisited. *Respiratory Research*, 2001, 2, s. 33-46.
19. Filippousi M., Angelakeris M., Katsikini M., Paloura E. et al.: Surfactant effects on the structural and magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry*, 2014, 118, s. 16209-16217.
20. Foldbjerg R., Dang D. A., Autrup H.: Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Archives of Toxicology*, 2011, 85, s. 743-750.

21. Foster K. A., Oster C. G., Mayer M. M., Avery M. L. et al.: Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Experimental Cell Research*, 1998, 243, s. 359-366.
22. Fujita E., Khoroku Y., Urase K., Tsukahara T. et al.: Involvement of sonic hedgehog in the cell growth of LK-2 cells, human lung squamous carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 238, s. 658-664.
23. Gaubin Y., Vaissade F., Croute F., Beau B. et al.: Implication of free radicals and glutathione in the mechanism of cadmium-induced expression of stress proteins in the A549 human lung cell-line. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1495, s. 4-13.
24. Gazdar A. F., Gao B., Minna J. D.: Lung cancer cell lines: Useless artifacts or invaluable tools for medical science? *Lung Cancer*, 2010, 68, s. 309-318.
25. Geraghty R. J., Capes-Davis A., Davis J. M., Downward J. et al.: Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *British Journal of Cancer*. 2014, 111, s. 1021-1046.
26. Hansjosten I., Rapp J., Reiner L., Vatter R. et al.: Microscopy-based high-throughput assays enable multi-parametric analysis to assess adverse effects of nanomaterials in various cell lines. *Archives of Toxicology*, 2018, 92, s. 633-639.
27. Heng B. C., Zhao X., Tan E. C., Khamis N. et al.: Evaluation of the cytotoxic and inflammatory potential of differentially shaped zinc oxide nanoparticles. *Archives of Toxicology*, 2011, 85, s. 1517-1528.
28. Huang Y.-W., Wu C.-H., Aronstam R. S.: Toxicity of transition metal oxide nanoparticles: Recent insights from in vitro studies. *Materials*, 2010, 3, s. 4842-4859.
29. Chairuangkitti P., Lawanprasert S., Roytrakul S., Aueviriyavit S. et al.: Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. *Toxicology in Vitro*, 2013, 27, s. 330-338.
30. Changa Y., Yanga S.-T., Liua J.-H., Donga E. et al.: In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicology Letters*, 2011, 200, s. 201-210.
31. Jeffrey P., Lock R., Witherington J.: Highlights of the society for medicines research symposium: approaches to lead generation. *Drugs of the Future*, 2009, 34, s. 501-508.

32. Jin C., Wang F., Tang Y., Zhang X. et al.: Distribution of graphene oxide and TiO<sub>2</sub>-graphene oxide composite in A549 cells. *Biological Trace Element Research*, 2014, 159, s. 393-398.
33. Kamencic H., Lyon A., Paterson P. G., Juurlink B. H. J.: Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. *Analytical Biochemistry*, 2000, 286, s. 35-37.
34. Karlsson H. L.: The comet assay in nanotoxicology research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 398, s. 651-666.
35. Kaur G., Dufour J. M.: Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis*, 2012, 2, s. 1-5.
36. Kim I. Y., Joachim E., Choi H., Kim K.: Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2015, 11, s. 1407-1416.
37. Klionsky D. J., Elazar Z., Seglen P. O., Rubinsztein D. C.: Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy*, 2008, 4, s. 849-850.
38. Kononenko V., Erman A., Petan T., Križaj I. et al.: Harmful at non-cytotoxic concentrations: SiO<sub>2</sub>-SPIONs affect surfactant metabolism and lamellar body biogenesis in A549 human alveolar epithelial cells. *Nanotoxicology*, 2017, 11, s. 419-429.
39. Kosmider B., Zyner E., Osiecka R., Ochocki J.: Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. *Mutation Research*, 2004, 563, s. 61-70.
40. Lagonegro P., Rossi F., Galli C., Smerieri A. et al.: A cytotoxicity study of silicon oxycarbide nanowires as cell scaffold for biomedical applications. *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*, 2017, 73, s. 465-471.
41. Lai S.-F., Ko B.-H., Chien C.-C., Chang C.-J. et al.: Gold nanoparticles as multimodality imaging agents for brain gliomas. *Journal of Nanobiotechnology*, 2015, 13, s. 1-8.
42. Lammel T., Boisseaux P., Fernández-Cruz M.-L., Navas J. M.: Internalization and cytotoxicity of graphene oxide and carboxyl graphene nanoplatelets in the human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2. *Particle and Fibre Toxicology*, 2013, 10, s. 1-21.

43. Landsiedel R., Sauer U. G., Ma-Hock L., Schnekenburger J. et al.: Pulmonary toxicity of nanomaterials: a critical comparison of published in vitro assays and in vivo inhalation or instillation studies. *Nanomedicine*, 2014, 9, s. 2557-2585.
44. Lewinski N., Colvin V., Drezek R.: Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, 2008, 4, s. 26-49.
45. Li Q., Hu H., Jiang L., Zou Y. et al.: Cytotoxicity and autophagy dysfunction induced by different sizes of silica particles in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *Toxicology Research*, 2016, 5, s. 1216-1228.
46. Lin W., Huang Y.-W., Zhou X.-D., Ma Y.: In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2006, 217, s. 252-259.
47. Lu C.-F., Li L.-Z., Zhou W., Zhao J, et al.: Silica nanoparticles and lead acetate co-exposure triggered synergistic cytotoxicity in A549 cells through potentiation of mitochondria-dependent apoptosis induction. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2017, 52, s. 114-120.
48. Ly J. D., Grubb D. R., Lawen A.: The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) in apoptosis; an update. *Apoptosis*, 2003; 8, s. 115-128.
49. Ma Z., Ji H., Tan D., Teng Y. et al.: Silver nanoparticles decorated, flexible SiO<sub>2</sub> nanofibers with long-term antibacterial effect as reusable wound cover. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 2011, 387, s. 57-64.
50. Malvindi M. A., Matteis V., Galeone A., Brunetti V. et al.: Toxicity assessment of silica coated iron oxide nanoparticles and biocompatibility improvement by surface engineering. *PLoS ONE*, 2014, 9, s. 1-11.
51. Manke A., Wang L., Rojanasakul Y.: Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed Research International*, 2013, 2013, s. 1-15.
52. Miyayama T., Matsuoka M.: Involvement of lysosomal dysfunction in silver nanoparticle-induced cellular damage in A549 human lung alveolar epithelial cells. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 2016, 11, s. 1-6.
53. Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A. et al.: Suppression of nanosilica particle-induced inflammation by surface modification of the particles. *Archives of Toxicology*, 2012, 47, s. 1297-1307.

54. Nel A., Xia T., Mädler L., Li N.: Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 2006, 311, s. 622-627.
55. Nikalje A. P.: Nanotechnology and its applications in medicine. *Medicinal chemistry*, 2015, 5, s. 81-89.
56. Panayiotidis M. I., Stabler S. P., Allen R. H., Pappa A. et al.: Oxidative stress-induced regulation of the methionine metabolic pathway in human lung epithelial-like (A549) cells. *Mutation Research*, 2009, 674, s. 23-30.
57. Pandey R. K., Prajapati V. K.: Molecular and immunological toxic effects of nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 107, s. 1278-1293.
58. Parka E.-J., Lee G.-H., Yoon C., Jeong U. et al.: Biodistribution and toxicity of spherical aluminum oxide nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology*, 2016, 36, s. 424-433.
59. Panas A., Comouth A., Saathoff H., Leisner T. et al.: Silica nanoparticles are less toxic to human lung cells when deposited at the air-liquid interface compared to conventional submerged exposure. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2014, 5, s. 1590-1602.
60. Perricone C., De Carolis C., Perricone R.: Glutathione: A key player in autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 2009, 8, s. 697-701.
61. Perry S. W., Norman J. P., Barbieri J., Brown E. B. et al.: Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques*, 2011, 50, s. 98-115.
62. Pulskamp K., Diabaté S., Krug H. F.: Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicology Letters*, 2007, 168, s. 58-74.
63. Radu M., Munteanu M. C., Petrache S., Serban A. I. et al.: Depletion of intracellular glutathione and increased lipid peroxidation mediate cytotoxicity of hematite nanoparticles in MRC-5 cells, *Acta Biochimica Polonica*, 2010, 57, s. 355-360.
64. Radziun E., Wilczyńska J. D., Książek I., Nowak K. et al.: Assessment of the cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles on selected mammalian cells. *Toxicology in Vitro*, 2011, 25, s. 1694-1700.

65. Richards D. A., Maruani A., Chudasama V.: Antibody fragments as nanoparticle targeting ligands: A step in the right direction. *Chemical Science*, 2017, 8, s. 63-77.
66. Roman M.: Toxicity of cellulose nanocrystals: A review. *Industrial Biotechnology*, 2015, 11, s. 25-33.
67. Sarin N., Engel F., Kalayda G. V., Mannewitz M. et al.: Cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells is associated with an abrogation of cisplatin-induced G2/M cell cycle arrest. *PLoS ONE*, 2017, 12, s. 1-26.
68. Sayers B. C., Germolec D. R., Walker N. J., Shipkowski K. A. et al.: Respiratory toxicity and immunotoxicity evaluations of microparticle and nanoparticle C60 fullerene aggregates in mice and rats following nose-only inhalation for 13 weeks. *Nanotoxicology*, 2016, 10, s. 1458-1468.
69. Shi J., Karlsson H. L., Johansson K., Gogvadze V. et al.: Microsomal glutathione transferase 1 protects against toxicity induced by silica nanoparticles but not by zinc oxide nanoparticles. *American Chemical Society Nano*, 2012, 27, s. 1925-1938.
70. Shvedova A. A., Kisin E. R., Porter D., Schulte P. et al.: Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus? *Pharmacology & Therapeutics*, 2009, 121, s. 192-204.
71. Schwaiblmair M., Behr W., Haeckel T., Märkl B. et al.: Drug induced interstitial lung disease. *The Open Respiratory Medicine Journal*, 2012, 6, s. 63-74.
72. Sies H.: Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, 27, s. 916-921.
73. Smiley S. T., Reers M., Mottola-Hartshorn C., Lin M. et al.: Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88, s. 3671-3675.
74. Sohaebuddin S. K., Thevenot P. T., Baker D., Eaton J. W.: Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Particle and Fibre Toxicology*, 2010, 7, s. 1-17.

75. Soto-Pantoja D. R., Menon J., Gallagher P. E., Tallant E. A.: Angiotensin-(1-7) inhibits tumor angiogenesis in human lung cancer xenografts with a reduction in vascular endothelial growth factor. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2009, 8, s. 1676-1683.
76. Strange R. C., Jones P. W., Fryer A. A.: Glutathione S-transferase: Genetics and role in toxicology. *Toxicology Letters*, 2000, 112-113, s. 357-363.
77. Suk J. S., Xu Q., Kima N., Hanes J. et al.: PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 99, s. 28-51.
78. Sun L., Li Y., Liu X., Jin M. et al.: Cytotoxicity and mitochondrial damage caused by silica nanoparticles. *Toxicology in Vitro*, 2011, 25, s. 1619-1629.
79. Tabish T. A., Pranjol M. Z. I., Hayat H., Rahat A. A. M.: In vitro toxic effects of reduced graphene oxide nanosheets on lung cancer cells. *Nanotechnology*, 2017, 28, s. 1-8.
80. Thomson L., Paton J.: Oxygen toxicity. *Paediatric Respiratory Reviews*, 2014, 15, s. 120-123.
81. Townsend D. M., Tew K. D., Tapiero H.: The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2003, 57, s. 145-155.
82. Vilema-Enríguez G., Arroyo A., Grijalva M., Amador-Zafra R. I. et al.: Molecular and cellular effects of hydrogen peroxide on human lung cancer cells: potential therapeutic implications. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2016, 2016, s. 1-12.
83. Vlachogianni T., Fiotakis K., Loidas S., Perdicaris S. et al.: Potential toxicity and safety evaluation of nanomaterials for the respiratory system and lung cancer. *Lung Cancer: Targets and Therapy*, 2013, 4, s. 71-82.
84. Wadman M.: Medical research: Cell division. *Nature*, 2013, 498, s. 422-426.
85. Wang F., Jin C., Liang H., Tang Y. et al.: Effects of fullerene C<sub>60</sub> nanoparticles on A549 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2014, 37, s. 656-661.
86. Watanabe T., Miura T., Degawa Y., Fujita Y. et al.: Comparison of lung cancer cell lines representing four histopathological subtypes with gene expression profiling using quantitative real-time PCR. *Cancer Cell International*, 2010, 10, s. 1-12.

87. Wu F., Reddy K., Nadeau I., Gilly J. et al.: Optimization of a MRC-5 cell culture process for the production of a smallpox vaccine. *Cytotechnology*, 2005, 49, s. 95-107.
88. Xiong S., George S., Yu H, Damoiseaux R. et al.: Size influences the cytotoxicity of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles. *Archives of Toxicology*, 2013, 87, s. 1075-1086.
89. Xu L., Dan M., Shao A., Cheng X. et al.: Silver nanoparticles induce tight junction disruption and astrocyte neurotoxicity in a rat blood–brain barrier primary triple coculture model. *International Journal of Nanomedicine*, 2015, 10, s. 6105-6119.
90. Yin L.-M., Wei Y., Wang Y., Xu Y.-D. et al.: Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells. *International Journal of Medical Sciences*, 2013; 10, s. 68-72.