

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

ZMĚNY EXPRESE PROTEINŮ PŘI BUNĚČNÉM POŠKOZENÍ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE:

Bc. Kateřina Antošová

VEDOUCÍ PRÁCE:

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

KONZULTANT:

Mgr. Jan Čapek, Ph.D.

Mgr. Pavlína Majtnerová

2021

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCE

CHANGES OF PROTEIN EXPRESSION IN CELL TOXICITY

THESIS

AUTHOR: Bc. Kateřina Antošová
SUPERVISOR: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.
CONSULTANT: Mgr. Jan Čapek, Ph.D.
Mgr. Pavlína Majtnerová

2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Změny exprese proteinů při buněčném poškození jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 7. 5. 2021

.....
Bc. Kateřina Antošová

Ráda bych poděkovala za celé vedení diplomové práce doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. Dále bych ráda poděkovala svým konzultantům Mgr. Janu Čapkovi, Ph.D. a Mgr. Pavlíně Majtnerové za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování diplomové práce. Za praktické rady vděčím Mgr. Filipovi Petirovi. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a svému příteli za podporu a trpělivost během celého studia.

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Antošová**
Osobní číslo: **C19530**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Změny exprese proteinů při buněčném poškození**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na obecný popis buněčné smrti, blíže se soustředte na popis mechanismů procesu apoptózy a jejích markerů. Dále popište induktory buněčné smrti (fyzikální, chemické, biologické a další) se zaměřením na *tert*-butylhydroperoxid, cisplatinu a chlorid kademnatý. Dále se věnujte popisu vybraných nanomateriálů (tj. nanočástice a nanovlákná TiO₂, SiO₂).
2. V rámci teoretické části dále popište významné proteiny účastníci se procesu apoptózy, jako jsou např. p16, p21, p38, p53, PARP-1 a proteiny rodiny Bcl-2. Dále se věnujte popisu role kaspáz. Závěrem teoretické části popište metody pro detekci buněčné smrti se zaměřením na využití techniky *Simple western* (princip, specifita, atd.).

Experimentální část:

1. Diplomová práce bude zaměřena na charakterizaci a sledování toxicity vybraných látek a nanomateriálů na kultivovaných buňkách pomocí pokročilých technik využívajících chemiluminiscenci. Hlavní používanou metodou bude *Simple western*. Cílem práce bude charakterizovat buněčné poškození po inkubaci s vybranými potenciálně cytotoxickými látkami pomocí změn proteinové exprese.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Ke zpracování literárního přehledu využijte elektronické databáze (*ScienceDirect, NCBI, PubMed, Web of Science*)

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultanti diplomové práce: **Mgr. Jan Čapek, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Mgr. Pavlína Majtnerová
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

ANOTACE

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na charakterizaci toxinů cisplatiny, CdCl_2 , t-BHP a nanočástic SiO_2 a TiO_2 P25. Dále jsme charakterizovali důležité proteiny účastnící se apoptózy a princip metody *Simple Western*. V rámci praktické části jsme detekovali buněčné poškození u SH-SY5Y buněk po působení vybraných toxinů a nanočástic. V závěrečné části diplomové práce jsme výsledky shrnuli a diskutovali.

KLÍČOVÁ SLOVA

Simple Western, PARP-1, cisplatina, apoptóza, toxiny.

ANNOTATION

The theoretical part of the thesis focuses on the characterisation of cisplatin, CdCl₂ and t-BHP toxins, and SiO₂ and TiO₂ P25 nanoparticles. Furthermore, the author characterizes important proteins involved in apoptosis and also the *Simple Western* method principle. In results part, the author provides the description of the cell damage in SH-SY5Y cells after exposure to selected toxins and nanoparticles. In the final part of the thesis, the summary of the results is provided and discussed in more detail.

KEY WORDS

Simple Western, PARP-1, cisplatin, apoptosis, toxins.

OBSAH

ÚVOD	14
1. TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1 Buněčná smrt	15
1.1.1 Apoptóza.....	16
1.1.2 Nekróza	17
1.1.3 Autofagie.....	18
1.1.4 Entóza.....	19
1.2 Induktory buněčné smrti	20
1.2.1 Toxiny	20
1.2.1.1 Cisplatina	20
1.2.1.2 Chlorid kademnatý.....	22
1.2.1.3 <i>Tert</i> -butylhydroperoxid.....	24
1.2.2 Nanomateriály.....	25
1.2.2.1 TiO ₂	26
1.2.2.2 SiO ₂	28
1.3 Markery apoptózy	29
1.4 Významné proteiny účastníci se buněčné smrti	29
1.4.1 Protein Fas-L	29
1.4.2 Protein PARP-1	31
1.4.3 Protein p53	32
1.4.4 Cyklin-dependentní kinázové inhibitory.....	33
1.4.4.1 Protein p21	33
1.4.4.2 Protein p16	34
1.4.5 Protein Bcl-XL.....	35
1.4.6 Protein Bax	36
1.4.7 ASK-1 kináza	37
1.4.8 JNK kinázy.....	38
1.4.9 ERK kinázy	39
1.4.10 Protein p38.....	40
1.4.11 Kaspázy	41
1.4.11.1 Kaspáza-3	41
1.4.11.2 Kaspáza-7	42

1.4.11.3 Kaspáza-9	42
1.5 Metody detekce apoptózy	43
1.6 Metoda <i>Simple Western</i>.....	44
2. CÍLE PRÁCE	47
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	48
3.1 Seznam použitých chemikálií	48
3.2 Příprava roztoků.....	49
3.3 Přístroje a laboratorní vybavení	49
3.4 Kultivace buněk SH-SY5Y	50
3.5 Fluorimetrické stanovení koncentrace glutathionu	51
3.5.1 Princip metody	51
3.5.2 Pracovní postup.....	51
3.6 Stanovení viability buněk – WST-1 test.....	51
3.6.1 Princip metody	51
3.6.2 Pracovní postup.....	52
3.7 Lýza buněk pomocí RIPA pufru	52
3.7.1 Princip metody	52
3.7.2 Pracovní postup.....	52
3.8 Stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové	53
3.8.1 Princip metody	53
3.8.2 Pracovní postup.....	53
3.9 Stanovení vybraných proteinů metodou <i>Simple Western</i>.....	54
3.9.1 Princip metody	54
3.9.2 Pracovní postup.....	54
3.10 Statistická analýza naměřených dat	55
4. VÝSLEDKY.....	56
4.1 Fluorimetrické stanovení koncentrace glutathionu	56
4.2 Stanovení dehydrogenázové aktivity buněk – WST-1 test	57
4.3 Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové	58
4.4 Stanovení změn exprese proteinů pomocí <i>Simple Western</i>	60
5. DISKUZE	64
6. ZÁVĚR.....	69
7. ZDROJE	70
8. PŘÍLOHY	81

SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK A GRAFŮ

Obr. 1: Typy buněčné smrti	15
Obr. 2: Porovnání apoptózy, nekrózy a autofagie	19
Obr. 3: Uspořádání cisplatiny	20
Obr. 4: Hlavní mechanismy účinku cisplatiny v tubulárních buňkách	21
Obr. 5: Uspořádání CdCl ₂	23
Obr. 6: Schéma CdCl ₂ - závislých drah indukujících apoptózu	24
Obr. 7: Strukturální vzorec <i>tert</i> -butylhydroperoxidu	25
Obr. 8: Krystalické uspořádání TiO ₂	27
Obr. 9: Krystalické uspořádání SiO ₂	28
Obr. 10: Významné proteiny účastnící se apoptózy	30
Obr. 11: Princip metody <i>Simple Western</i>	46
Obr. 12: Schéma destičky do přístroje <i>Wes</i>	55
Obr. 13: Expres proteinů PARP-1, f-PARP-1 a β-aktinu	61
Obr. 14: Záznam analýzy proteinů pomocí metody <i>Simple Western</i>	62
Tab. 1: Isoformy proteinu p53	33
Tab. 2: Isoformy proteinu p16	34
Tab. 3: Isoformy proteinu Bcl-XL	35
Tab. 4: Isoformy proteinu Bax	37
Tab. 5: Isoformy JNK1 kinázy, JNK2 kinázy a JNK3 kinázy	38
Tab. 6: Isoformy ERK1 a ERK2 kinázy	40
Tab. 7: Isoformy kaspázy-7	42
Tab. 8: Isoformy kaspázy-9	43
Tab. 9: Použité primární protilátky u <i>Simple Western</i>	55
Tab. 10: Stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové	60
Tab. 11: Expres proteinů PARP-1, f-PARP-1 metodou <i>Simple Western</i>	63
Graf 1: Stanovení koncentrace glutathionu	56
Graf 2: Stanovení dehydrogenázové aktivity WST-1 testem	58
Graf 3: Kalibrační řada BSA pro 6 hod inkubaci	59

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Apaf-1	Aktivační faktor 1 pro apoptotickou proteázu
ASK-1	Apoptotická signální kináza 1
ATP11C	ATP Fosfolipid transportní 11C
Bak	Bcl-2 homologní antagonist
Bax	Bcl-2-asociovaný X protein
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
Bcl-XL	<i>B-cell lymphoma extra large</i>
Bid	Agonista smrti interagující s BH3 doménou
BRR	Roztok dle Bradfordové
BSA	Hovězí sérový albumin
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
CDK	Cyklin-dependentní kinázy
CDKI	Cyklin-dependentní kinázové inhibitory
CisPt	Cisplatina
CTRL	Kontrolní vzorek
DTT	1,4-dithiothreitol
DV	Deionizovaná voda
ER	Endoplazmatické retikulum
ERK-1/2	Extracelulární signální regulovaná kináza-1/2
Fas-L	Fas ligand
f-PARP-1	Fragment proteinu PARP-1
GADD153	<i>The Growth arrest and DNA damage</i>
GSH	Glutathion
JNK kináza	c-Jun N-terminální kináza
MAPK	Mitogenem aktivované proteinkinázy
MCB	Monochlorobiman
MEK1/2	MAPK/ERK 1/2
MKK	Mitogenem aktivovaná proteinkináza kináza
MLKL	Pseudokináz doména jako protein
PARP-1	Poly (ADP-ribóza) polymeráza 1
PtdEtn	Fosfatidylethanolamin
PtdSer	Fosfatidylserin
Raf	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>

Ras	<i>Rat sarcoma</i> protein
RIPK3	Receptor interagující se serin/threonin- proteinkináza3
ROS	Reaktivní formy kyslíku
t-BHP	Terciární butylhydroperoxid
TNF	Tumor nekrotizující faktor
TRAIL	Ligand indukující apoptózu
Xkr8	Fosfolipid skramblázový komplex

Úvod

Apoptóza je typem programované buněčné smrti, která je charakterizovaná smrštěním buňky, kondenzací chromatinu a rozpadem celé buňky na jednotlivá apoptotická tělíška, která jsou následně fagocytovaná okolními buňkami. Jedním z významných markerů apoptózy je vystavení fosfatidylserinu na buněčném povrchu.

Mezi možné induktory apoptózy řadíme řadu toxinů, mezi které patří cisplatina, CdCl_2 a t-BHP. Koordinační sloučenina cisplatiny tvoří s glutathionem reaktivní thiol, který má silné cytotoxické účinky a indukuje apoptózu. Cytotoxické účinky CdCl_2 závisí na redoxním stavu Cd^{2+} , neboť může indukovat apoptózu i nekrózu. Sloučenina t-BHP indukuje apoptózu tvorbou *tert*-butoxy radikálů. Dalšími potenciálními induktory apoptózy jsou nanomateriály, jejichž vlastnosti jsou závislé na velikosti nanočástic. Čím jsou částice nanomateriálů menší, tím snáz se tvoří volné radikály, a tím se zvyšuje pravděpodobnost indukce apoptózy. Mezi zkoumané nanomateriály patří TiO_2 P25, TiO_2 a SiO_2 . Titan existuje ve 3 modifikacích, které mají rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti, a tím i rozdílnou cytotoxicitu. Krystalický SiO_2 je považovaný za bezpečnou látku, ale amorfni nanočástice SiO_2 vykazují toxické účinky.

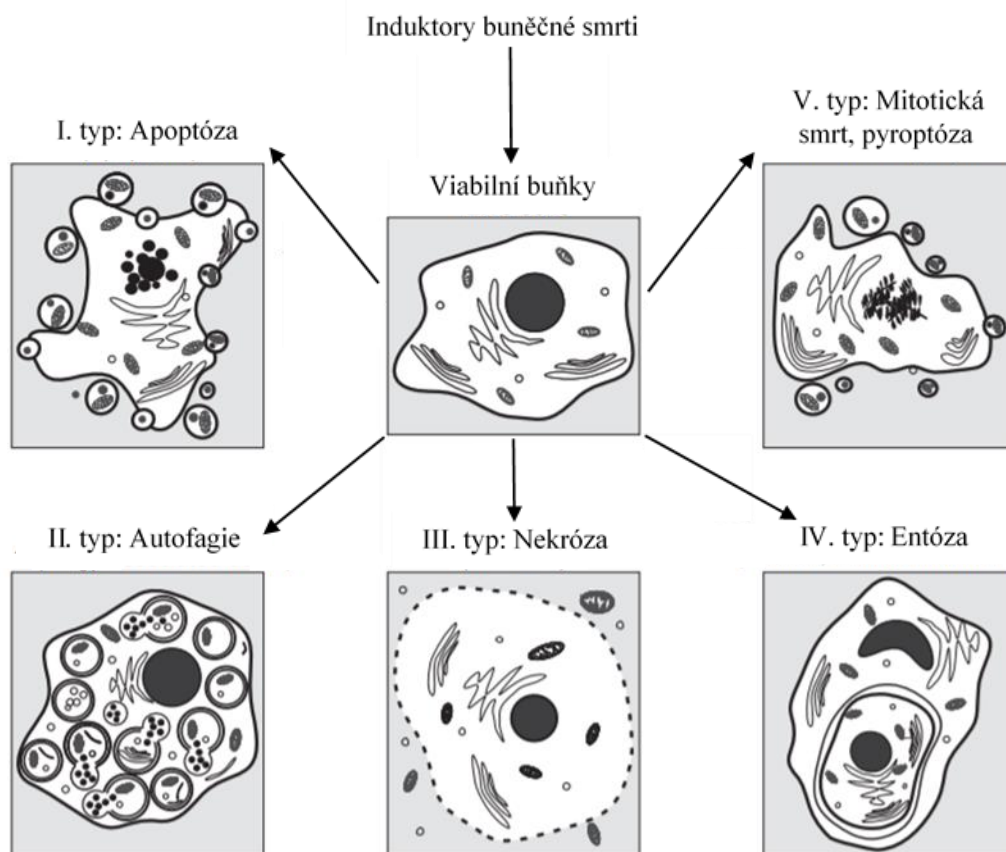
Celý mechanismus apoptózy zahrnuje řadu významných proteinů, které jsou propojené a navzájem ovlivňované. Protein Fas-L je membránově vázaný nebo se vyskytuje volně v cytoplazmě. Naopak jaderným proteinem je protein PARP-1, který je aktivovaný v závislosti na jaderném poškození buňky. K aktivaci proteinu PARP-1 je nutný protein p21. Do rodiny CDKI spolu s proteinem p21 patří také protein p16. Kináza ERK-1/2 aktivuje protein p53, který následně způsobuje oligomerizaci proteinu Bax. Protein Bcl-XL se podílí na tvorbě mitochondriálních pórů. Kináza ASK-1 je aktivovaná oxidačním stresem a interaguje s JNK-kinázou nebo proteinem p38. V neposlední řadě se celého mechanismu účastní efektorové kaspázy-3, kaspáza-7 a iniciační kaspáza-9.

Mezi používané metody pro sledování průběhu apoptózy patří mikroskopie či biochemické testy. Mikroskopické a biochemické metody jsou často používány pro popis a detekci procesu apoptózy. Fluorescenční mikroskopie je velice citlivá metoda, kde se pro sledování procesu apoptózy využívá řada fluorescenčních sond, mezi které řadíme např.: Annexin V značený fluoresceinem isothiokyanátem. Tato sonda se velice specificky váže na fosfatidylserin, který buňky podstupující proces apoptózy vystavují na svém povrchu. Z biochemických metod je jednou z možností hodnocení změny exprese proteinů metoda *Simple Western*, která je rychlá, přesná a reprodukovatelná.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Buněčná smrt

Buněčná smrt je soubor dějů, ve kterých jsou buňky eliminovány z tkáně buď kontrolovaným způsobem, který zahrnuje řadu biochemických procesů nebo nekontrolovatelným způsobem, který vede k uvolnění buněčného obsahu do okolních tkání s následným patologickým efektem, kterým je zánět okolní tkáně. Buněčnou smrt lze rozdělit na pět základních typů (obr. 1). Mezi programované typy buněčné smrti patří např.: apoptóza, autofagie a entóza. Mezi patologické, neprogramované typy buněčné smrti patří např.: nekróza (Chen Q. *et al*, 2018).



Obr. 1: Typy buněčné smrti (převzato a upraveno z Martins I. *et al.*, 2017).

1.1.1 Apoptóza

Apoptóza patří do programovaných buněčných smrtí a fyziologicky se uplatňuje při spermatogenezi, embryogenezi nebo eliminaci nádorových buněk. Celý průběh apoptózy doprovází charakteristické morfologické změny. Raným znakem je zmenšování buňky, zhuštění cytoplazmy, pyknóza jádra způsobená kondenzací chromatinu (obr. 2A). Druhým stádiem je fragmentace jádra způsobená uvolňováním chromatinu skrz cytoplazmatickou membránu a fragmentace DNA na úseky o velikosti 180 bp. Finálně dochází k tvorbě apoptotických tělísek, které jsou eliminovány buňkami okolními nebo buňkami imunitního systému (Chen Q. *et al*, 2018).

Apoptóza může být aktivovaná několika způsoby, mezi hlavní způsoby aktivace patří vnější dráha a vnitřní dráha. Vnitřní dráha se aktivuje signálem z vnitřního prostředí buňky a nastává při metabolickém rozvratu, nedostatku živin, vlivem cytostatik a volných radikálů, zvýšenou koncentrací vápenatých iontů nebo stresovou situací, jako je infekce, zvýšené teplo a vliv radiace. Vnější dráha se aktivuje interakcí ligandu a receptoru. Obě dráhy pracují synergicky, aby eliminace poškozených buněk proběhla v pořádku a celý proces apoptózy je řízený a zpětně kontrolovaný. Přímým regulátorem jsou kaspázy, cysteinové proteázy hydrolyzující peptidové vazby v místě aspartátu. Další klíčovou rodinou proteinů v kontrole průběhu apoptózy je *B-cell lymphoma-2* (Bcl-2) rodina zahrnující 25 proteinů, které mají ve své struktuře BH-domény. Domény BH-3 se podílí na tvorbě dimerů, u kterých vzájemný poměr a interakce rozhodují o tom, zda bude apoptotická dráha aktivovaná nebo inhibovaná. Mezi anti-apoptotické aktivátory lze zařadit Bcl-2, *B-cell lymphoma extra large* (Bcl-XL), *Myeloid cell leukemia-1*, Bcl-2-like-2. Mezi pro-apoptotické faktory patří agonista smrti interagující s BH3 doménou (*BH3 interacting domain death agonist*, Bid) a *Bcl-2-like protein 11* (Mcllwain D. R. *et al*, 2013).

Vnitřní dráha apoptózy je iniciována poškozením prostřednictvím intercelulárních senzorů, které vyvolají rozvrat mitochondriální membrány, skrz kterou pronikají do buňky pro-apoptotické faktory, které spolu s Aktivačním faktorem 1 pro apoptickou proteázu-1 (*Apoptosis proteas activating factor-1*; Apaf-1) a kaspázou-9 vytváří apoptozóm. Kaspáza-9, v apoptozómu, aktivuje prokaspázu-3, která v aktivní formě způsobí sebedestrukci (Xu X. *et al*, 2019; Su Z. *et al*, 2015). Další vnitřní dráhou je aktivace faktory, které leží na vnitřní membráně mitochondrií po přemístění pomocí jaderného lokalizačního signálu do jádra, kde způsobují kondenzaci chromatinu (Xu X.

et al, 2019). Pokud apoptóza aktivovaná vnitřní drahou nenastává v mitochondrii, aktivace je možná endoplazmatickým retikulem. Spouštěčem bývá homeostatický rozvrat vápenatých iontů, nedostatek živin nebo hypoxie. Klíčový je přesun kaspázy-9 z endoplazmatického retikula (ER) do cytosolu, což aktivuje kaspázu-3, která způsobí destrukci buňky (Chen Q. *et al*, 2018).

Vnější dráha je iniciována interakcí imunitního systému s poškozenou buňkou. Navázání probíhá spojením ligandů smrti s receptory, které jsou umístěné na povrchu cytoplazmatické membrány. Mezi důležité ligandy patří Tumor nekrotizující faktor (*Tumor Necrosis Factor*, TNF), Fas-ligand (Fas-L) a Ligand indukující apoptózu (*Death effector domains*; TRAIL=APO-2). Každý ligand má konkrétní receptor. Tumor nekrotizující faktor se pojí s TNF-receptorem 1 nebo s TNF-receptorem 2, Fas-L se pojí s Fas-receptorem (CD95) a s TRAIL se může pojit pět různých receptorů (DR4, DR5, DcR1, DcR2, osteoprotegerin) (Xu X. *et al*, 2019).

Interakce TNF ligandu s TNF receptorem způsobuje vznik trimeru, který zesiluje přenášejší signál a umožňuje lepší vazbu na prokaspázu-8. Prokaspáza-8 se aktivuje autohydrolyticky na kaspázu-8 za současné aktivace efektorové prokaspázy-3 na kaspázu-3. Obdobná kaskáda se spouští, pokud nastane interakce Fas-L a Fas-receptoru. Dráha začínající spojením TRAIL s příslušným receptorem má větší aktivační rozsah, protože zahrnuje i aktivaci T-buněk imunitního systému nebo destrukci nádorových buněk, proto ho lze považovat za protirakovinotvorného činitele. Na jeho účinky má vliv protein p53, který se vyskytuje ve zvýšené míře v rakovinových buňkách. V dnešní době je však stále velké množství rakovinových buněk na léčbu pomocí Ligandu indukujícího apoptózu rezistentní, hledají se ale stále účinnější formy. První objevenou účinnější formou je přísada s arginin-glycin-aspartát proteinem, a další je kombinace s Annexinem V známá jako TP8 (Xu X. *et al*, 2019).

1.1.2 Nekróza

Nekróza je vyvolávaná fyzikálně-chemickým stresem, jako je teplo, osmotický šok, zvýšená koncentrace peroxidu vodíku nebo interakcí proteinu 1 (Berghe V. T. *et al*, 2013; Koubek K., 2010). Průběh nekrózy je neregulovaný a doprovází ho otok cytoplazmy, otok mitochondrií s následnou kalcifikací, rozpad organel a v posledním stádiu dochází k prasknutí buněčné membrány a k vylití buněčného obsahu do okolí (obr. 2B). Zánět vzniká důsledkem uvolnění intracelulárních faktorů amphoterinu

nebo růstového faktoru odvozeného od hepatomu z usmrčené buňky. Na tyto faktory reaguje Neuronový sítnicový leucinový zipový protein, který uvolní prozánětlivý cytokin Interleukin 1 β . Na rozdíl od apoptózy se nekróza nepojí s kaspázami. Celý mechanismus doprovází inhibice syntézy adenosintrifosfátu, zastavení proteosyntézy a naopak aktivace pasivního transportu a převládající katabolismus (Green D. R. *et al*, 2015; D'Arcy M. S., 2019).

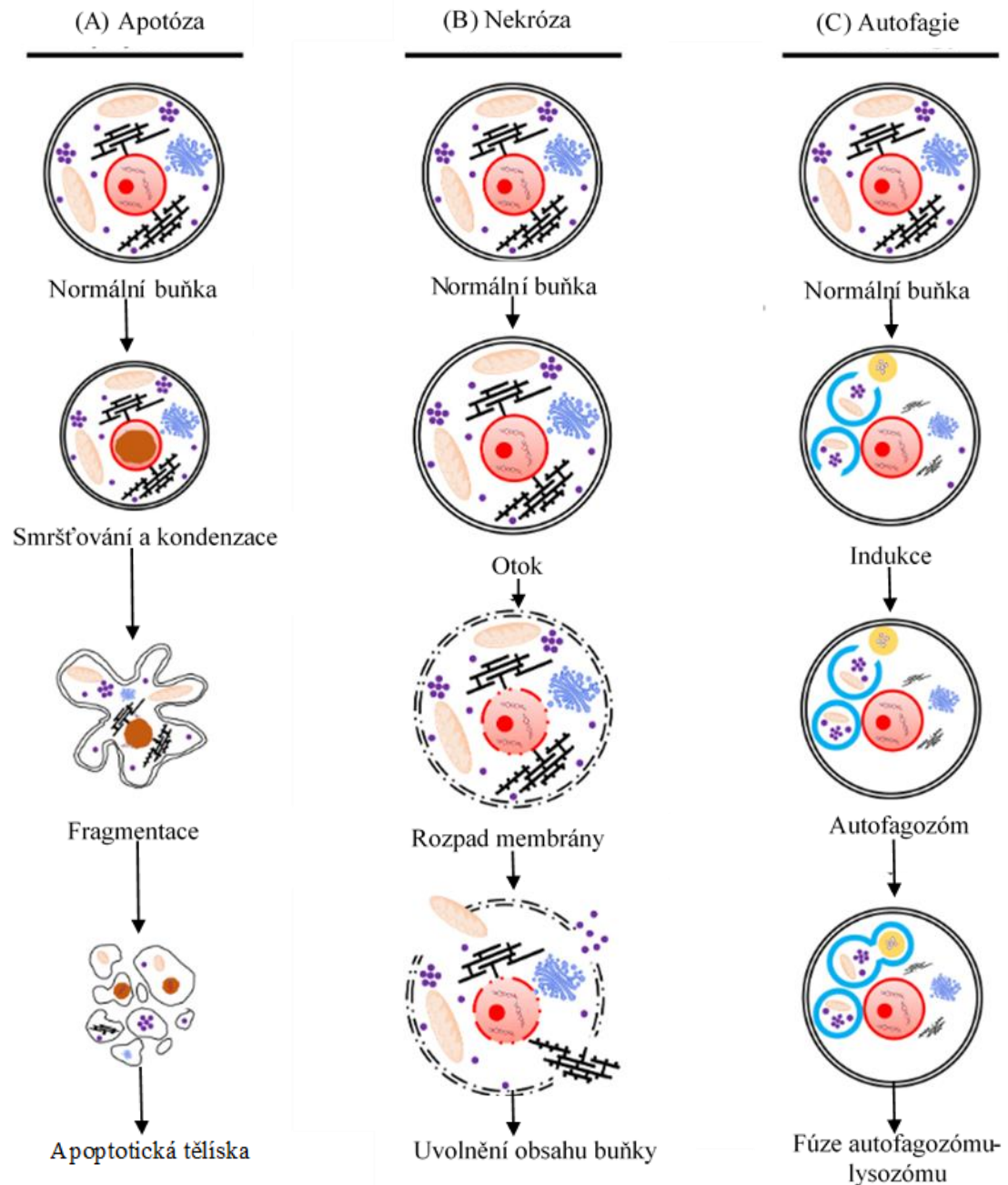
Samostatným podtypem nekrózy je programovaná nekróza, neboli nekroptóza. Termín označuje neapoptotickou programovanou buněčnou smrt, která probíhá dle podobných signálních drah jako apoptóza, ale procesu se neúčastní kaspázy. Nekroptóza je vyvolána vazbou receptorů smrti s ligandy (Fas, TNF-receptor 1), navázáním receptorů na T buňky, intracelulárními senzory RNA a DNA, interferony nebo stresovými faktory (reaktivní formy kyslíku, nadbytek vápníku, fotodynamická terapie, ionizující záření). Klíčovými molekulami je receptor interagující se serin/threonin-proteinkinázou 3 (*Receptor-interacting serine/threonine protein kinase3*; RIPK3) a pseudokináz doména jako protein (*Pseudokinase mixed-lineage kinase domain-like protein*; MLKL). K uskutečnění nekroptózy je nutné, aby RIPK3 kináza fosforylovala MLKL kinázu, která následně poškodí plazmatickou membránu a je efektoem buněčné smrti (Chico F. J. *et al*, 2017; Schwarzer R. *et al*, 2020).

1.1.3 Autofagie

Autofagie je proces, při kterém se buněčné složky odštěpují do lysozomů, kde probíhá jejich degradace (obr. 2C). Složky substrátů mohou být recyklovány za vzniku nových buněčných struktur nebo organel, nebo mohou být použity jako zdroj energie. Je charakteristická přítomností velkých intracelulárních váčků a zapojení autofagocytického aparátu. Iniciací autofagie je závislá na buněčné krizi v podobě nedostatku živin, nízké hladiny ATP nebo odstranění poškozených organel. Bylo prokázáno, že autofagie je součástí adaptivního i vrozeného imunitního systému (Levine B. *et al*, 2007). Hlavní funkcí je degradace intracelulárních patogenů a dodání antigenů do MHC II. třídy. Ačkoliv se většinou autofagie podílí na recyklaci buněčných složek, je schopná také způsobit destrukci buněk a odstranit je z těla. Tímto způsobem se odstraňují senescentní buňky (Mizushima N. *et al.*, 2011).

1.1.4 Entóza

Entóza je mechanismus představující výjimečný případ xenofágie, která je charakteristická autofagií cizích mikroorganismů. Poprvé byla entóza objevena u lidských nádorových buněk. Charakteristickým rysem entózy je pohlcení buňky buňkou (Kirsha S. *et al*, 2016).



Obr. 2: Porovnání apoptózy, nekrózy a autofágie (převzato a upraveno z Patil A. A. *et al.*, 2020).

Mechanismus pohlcení spočívá v interakci epiteliálních adherentů E-kadherinu a adhezním spojením s proteinem a-cateninem. Na rozdíl od fagocytózy se vycytávané buňky aktivně účastní celého procesu prostřednictvím Rho-asociovaných protein kináz I a II nebo Rho-GTPáz. Další odlišností entózy je nevystavení „eat-me“ signálu v podobě fosfatidylserinu na buněčné membráně, který slouží pro následný proces fagocytózy (Krisha S. *et al*, 2016).

Po internalizaci jsou pohlcené buňky ve většině případů eliminovány lysozomálním systémem hostitelských buněk, ale v některých případech je možné uvolnění pohlcených buněk do okolí a znovuoobnovení jejich buněčné proliferace. Dle dosavadních studií lze říci, že celý proces je obdobný jako u programované buněčné smrti *anoikis*, ke které dochází u buněk oddělených od okolní extracelulární matrice (Krisha S. *et al*, 2016).

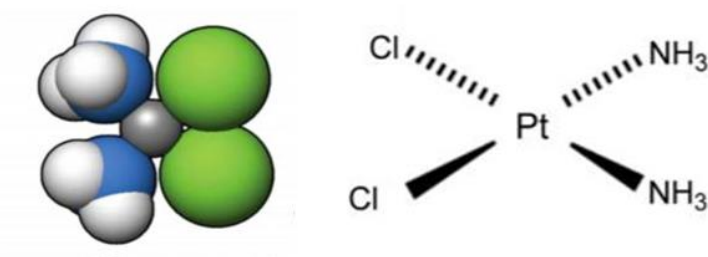
1.2 Induktory buněčné smrti

Induktory buněčné smrti lze rozdělit podle původu na fyzikální, chemické a biologické. Mezi fyzikální induktory řadíme různé druhy záření, do chemických endogenní a exogenní chemikálie spolu s toxiny a do biologických virové infekce.

1.2.1 Toxiny

1.2.1.1 Cisplatina

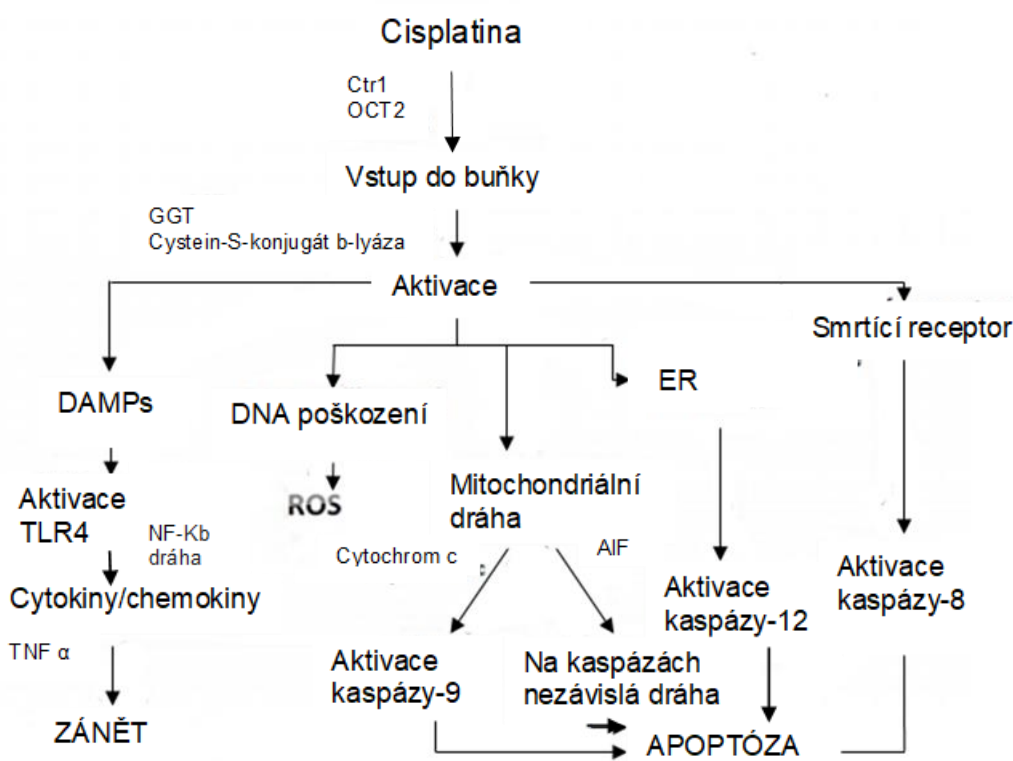
Jednou z často používaných toxinů je cisplatina (CisPt). Z chemického hlediska se jedná o cis-diamindichloroplatinu (obr. 3), koordinační sloučeninu, která má při pokojové teplotě bílou, tmavě žlutou až žlutooranžovou barvu. Je mírně rozpustná ve vodě a rozpustná v dimethylprimanidu a N, N-dimethylformamidu (Dasari S. *et al*, 2014).



Obr. 3: Uspořádání cisplatiny (převzato a upraveno z Dasari S. *et al*, 2014).

Za normálních teplot a tlaků je CisPt stabilní, může se však transformovat na trans-izomer. První syntéza proběhla v roce 1844 M. Peyronem a struktura byla objasněna Alfredem Wernerem v roce 1893. Díky dalším výzkumům se CisPt prokázala jako látka se silným cytotoxickým účinkem a v roce 1978 byla schválena jako sloučenina pro léčbu maligních onemocnění (Kelland, 2007).

V dnešní době její použití zahrnuje chemoterapeutickou léčbu maligního onemocnění hlavy, krku, jícnu, močového měchýře, varlat, vaječnicků, dělohy, žaludku, prsu a nemalé a malobuněčné rakoviny plic. CisPt zesíťuje purinové báze v DNA a interferuje s DNA syntézou. Má schopnost poškodit buněčné dělení, proto CisPt vykazuje nejvyšší aktivitu v rychle se dělících buňkách (obr. 4) (Dasari S. *et al*, 2014).



Obr. 4: Hlavní mechanismy účinku cisplatiny v tubulárních buňkách. Transportér mědi 1 (Ctr1), organický transporter kationtů 2 (OCT2), g-glutamyl transpeptidáza (GGT), *Damage associated molecular patterns* (DAMPs), *toll-like* receptor (TLR), tumor nekrotizující faktor α (TNF α), reaktivní formy kyslíku (ROS), apoptózu indukující faktor (AIF) (převzato a upraveno z Manohar S. *et al*, 2018).

Mezi vedlejší účinky léčby pomocí CisPt patří nefrotoxicita, dále ototoxicita, neurotoxicita, vysoké emetické riziko, poškození gastrointestinálního traktu nebo myelosuprese. Nefrotoxicita postihuje až 30-40 % pacientů užívající tento lék. Nastává z důvodu kumulace CisPt v ledvinách, kde je její koncentrace v tubulárních

epiteliálních buňkách až pětikrát vyšší než v krvi. To omezuje zvyšování dávek při léčbě a snižuje tedy její účinnost. Toxické účinky postihují primárně proximální tubulární buňky, konkrétně segment S3 tubulárních epitheliálních buněk, následně je postižen glomerulus a distální tubulus (Volarevic V. *et al*, 2019).

Patofyziologický mechanismus CisPt zahrnuje po akumulaci díky membránovému transportu konverzi na nefrotoxiny, poškození DNA s mitochondriální dysfunkcí, oxidačním stresem, zánětlivou reakci, aktivaci převodníků signálu a intracelulárních posílů a aktivaci apoptotických drah (Dasari S. *et al*, 2014; Peres B. L. A. *et al*, 2013). Projevem je akutní poškození ledvin, deplece solí, hořčičku a ztráta schopnosti koncentrovat moč. Ke zmírnění nežádoucích účinků se podává krátkodobě a v malém množství hořčík nebo se uměle vyvolá diuréza manitolem, zejména u pacientů, kteří se léčí vysokými dávkami CisPt nebo trpí hypertenzí. Nežádoucí účinky nejsou však dostatečně zmírněny, ve většině případů dochází ke snížení protinádorové aktivity (Crona D. J. *et al.*, 2017).

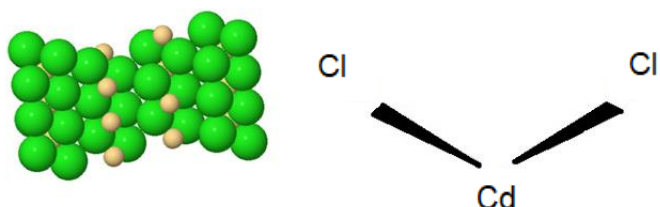
Vstup CisPt do buňky je usnadněn buněčnými transportéry. Mezi důležité transportéry patří Lidský transporter mědi 1, Organický transporter kationtů, který vychytává CisPt ledvinami, Transportér vylučování toxinu, který je zodpovědný za transport CisPt z proximálního tubulu do moči. Dle další studie enzymy spolu s konjugátem glutathion-CisPt (GSH-CisPt) vytvořili reaktivní thiol, který má větší cytotoxické účinky. Úspěšnější studie byla provedena s látkou cimetidin, který má schopnost inhibovat Transportér organických kationtů. Katsuda *et al.* dokázal, že kontinuální infuze cimetidinu (20 µg/mL po dobu 4 hod) dokázala zabránit nefrotoxicitě bez ovlivnění protinádorové aktivity (Katsuda H. *et al*, 2010).

1.2.1.2 Chlorid kademnatý

Chlorid kademnatý je silně toxická látka, která je po absorpci uložena v játrech a ledvinách (obr. 5). První studie pochází z r. 1919 a zařazení do toxikologického výzkumu kovů nastalo v 60. letech 20. století. Bylo zjištěno, že kadmium (Cd^{2+}) je příčinou onemocnění itai-itai postihující japonské ženy, které konzumovali vodu a rýži kontaminovanou kadmiem (Nordberg G. F., 2009).

Toxické účinky Cd^{2+} postihují ledviny, játra, plíce, mozek, varlata, srdce a centrální nervový systém. Dalším důsledkem působení Cd^{2+} je vznik osteoporózy, anémie, nehypertrofického emfyzému, eosinofilie nebo anosmie. Neurotoxicita také souvisí

se vznikem neurodegenerativních chorob, mezi které patří Parkinsonova a Alzheimerova choroba, myalgická encefalomyelitida a roztroušená skleróza. Mimo jiné je Cd^{2+} klasifikován Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny jako karcinogen I. typu (Rani A. *et al*, 2013).

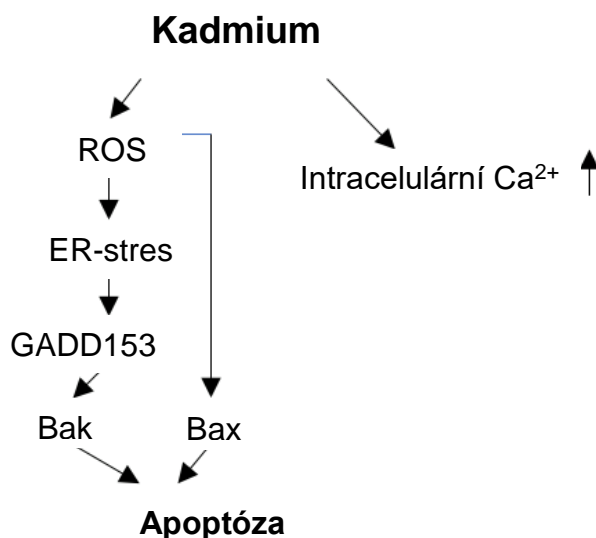


Obr. 5: Uspořádání CdCl_2 .

Na buněčné úrovni má Cd^{2+} silné cytotoxické účinky vedoucí k apoptóze nebo nekróze v závislosti na buněčném redoxním stavu. Bylo dokázáno, že Cd^{2+} vyvolává nepřímé oxidační poškození DNA, což má za následek indukci buněčné proliferace, inhibici apoptotických mechanismů a blokaci opravy DNA. Je dokázáno, že jen část buněk po expozici Cd^{2+} vede k apoptóze a část buněk se může stát rezistentní na apoptózu (obr. 6). Dále se ukázalo, že buňky transformované nebo adaptované po působení Cd^{2+} vykazují zvýšenou odolnost proti apoptóze, což má za následek tvorbu nádoru a maligní progresi (Rani A. *et al*, 2013).

Je prokázáno, že Cd^{2+} má vysokou afinitu k thiolovým skupinám, proto mezi hlavní nosiče Cd^{2+} patří GSH a methionin. Vstup do buňky je Cd^{2+} umožněn napěťově řízenými Ca^{2+} kanály a bylo dokázáno, že Cd^{2+} se účastní tvorby reaktivních forem kyslíku (*Reactive Oxygen Species, ROS*), které vyvolávají stres ER. Následně se tvoří *The Growth arrest and DNA damage* (GADD153), který je členem rodiny transkripčních faktorů *CCAAT/enhancer binding protein* (C/EBP). Molekula GADD153 tvoří heterodimer s jiným faktorem z C/EBP prostřednictvím interakcí domén základního leucinového typu, který potlačuje navázání v DNA. Z toho důvodu GADD153 inhibuje expresi genů reagujících na transkripční faktory rodiny C/EBP a zvyšuje expresi dalších genů obsahujících motiv 5'-(A/G)(A/G)(A/G)TGCAAT(A/C)CCC-3'. Relevantním cílem je protein Bcl-2, jehož exprese je v některých případech potlačena. Aktivace GADD153 vede k translokaci Bcl-2 asociovaného X proteinu (*Bcl-2-associated X protein; Bax*) proteinu z cytosolu do mitochondrie, kde se signál smrti zesiluje. Dále se do dráhy zapojuje protein Bcl-2 homologní antagonist (Bcl-2

homologous antagonist killer, Bak) který ovlivňuje uvolňování cytochromu c z mitochondrií a následně indukuje apoptotickou eliminaci buněk (Kim S. *et al*, 2013).



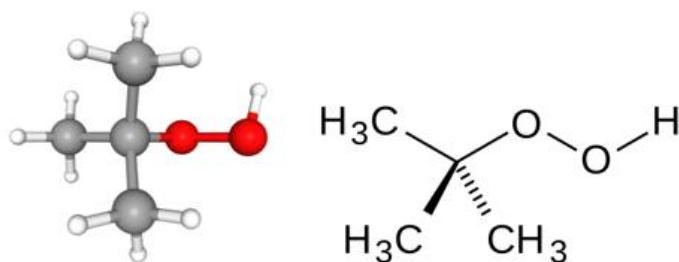
Obr. 6: Schéma CdCl₂ - závislých drah indukujících apoptózu. Reaktivní formy kyslíku (ROS), endoplazmatické retikulum (ER), *The Growth arrest and DNA damage* (GADD153), Bcl-2 homologní antagonist (Bak), Bcl-2-asociovaný X protein (Bax) (převzato a upraveno z Kim S. *et al*, 2013).

Na modelu potkanů bylo zjištěno, že diacerein (5 mg/kg/den) chrání testikulární toxicitu způsobenou kadmíem. Diacerein má antioxidační, protizánětlivý, antiapoptotický účinek. Projevem je zachování spermatogeneze, snížení exprese NOD-like receptoru rodiny proteinu 3 (Fouad A. A. *et al*, 2019). Mechanismus účinku diacerinu byl potvrzen i u lidí. Hlavním principem je inhibice kaspázy-1, která je jinak nezbytná pro aktivaci interleukinu 1 β a reguluje směrem dolů příslušné specifické receptory (Almezgagi M. *et al*, 2020). Dále bylo prokázáno, že zinek zmírňuje oxidační stres způsobený Cd²⁺ a Se s kofaktorem GSH peroxidázou chrání před neurotoxicitou způsobenou kadmíem. Protektivní účinky Se závisí na neuronovém podtypu, protože je účinný pouze u katecholaminergních neuronů (Branca J. J. V. *et al*, 2018).

1.2.1.3 *Tert*-butylhydroperoxid

Tert-butylhydroperoxid (t-BHP) je organický peroxid (obr. 7). Do těla se dostává inhalací, skrz kůži nebo požitím a je metabolizován na 2-methylpropan-2-ol a distribuován po celém těle. Mezi další účinky patří urychlení oxidace GSH a je znám

jako silné oxidační činidlo. Je dokázáno, že t-BHP indukuje apoptózu v pigmentovém epitelu sítnice zvýšením permeability mitochondriální membrány. Bylo také prokázáno, že t-BHP má mutagenní účinky a způsobuje chromozomální aberace a aneuploidie *in vitro* (Gad S. E., 2014). Dále t-BHP indukuje apoptózu závislou na mitochondriích a indukovanou oxidačním stresem, který vzniká generováním *tert*-butoxy radikálů. Radikály způsobují zvýšenou permeabilitu membrány, zvýšení hladiny Bax/Bcl-2 a cytochromu c, peroxidaci lipidů, spotřebu ATP, modifikaci thiolové skupiny proteinů a deregulaci v koncentraci cytosolických Ca^{2+} iontů. Rovnováha Ca^{2+} iontů zvyšuje přepravu kyseliny arachidonové z buněčné membrány do cytosolu a zvyšuje tvorbu malondialdehydu, který vede k buněčné smrti aktivací prokaspázy-3 na kaspázu-3 (Rashid K. *et al*, 2013; Manu M. T. *et al*, 2018).



Obr. 7: Strukturní vzorec *tert*-butylhydroperoxidu.

Jako protektivní látky před toxickými účinky t-BHP se osvědčil Luteonil, který obnovuje hladiny prokaspázy-3 a chrání ji před aktivací na kaspázu-3. Jako další se osvědčil lykopen-NSC, který obsahuje faktory zeslabující buněčnou apoptózu snížením Bax/Bcl-2 a hladiny cytochromu c se snížením exprese kaspázy-3 (Rashid K. *et al*, 2013; Manu M. T. *et al*, 2018).

1.2.2 Nanomateriály

Nanomateriál je přírodní nebo vyrobený materiál, který obsahuje minimálně 50 % částic alespoň s jedním rozměrem velikosti 1-100 nm. Nanomateriály vytváří prostorové struktury, jako jsou vlákna, trubice nebo tenké vrstvy. Obecně je u všech nanomateriálů popsána velká reaktivita, která způsobuje toxické reakce, včetně mutagenity tvorbou DNA aduktů nebo senzibilizace hapténovou vazbou (Nogueira D. R. *et al*, 2014).

Chování nanomateriálů v biologických systémech je ovlivněno fyzikálně-chemickými vlastnostmi, mezi které patří velikost, stabilita, zeta potenciál nebo geometrické uspořádání. Velikost a povrchový náboj nanomateriálů ovlivňují interakce mezi nanomateriálem a buněčným prostředím (Nogueira D. R. *et al*, 2014).

Nanočástice jsou částice, který mají alespoň jeden rozměr menší než 100 nm. Lze rozlišit nanočástice přírodního původu, mohou být součástí dýmu, prachu nebo kouře, a vyráběné. Mezi využití nanočástic patří regenerativní medicína, tkáňové inženýrství, jako podpůrné struktury pro kmenové buňky nebo cílený transport léčiv. Díky své velikosti mohou interagovat s biologickými systémy a mohou být snadno absorbovány buňkami (Nogueira D. R. *et al*, 2014).

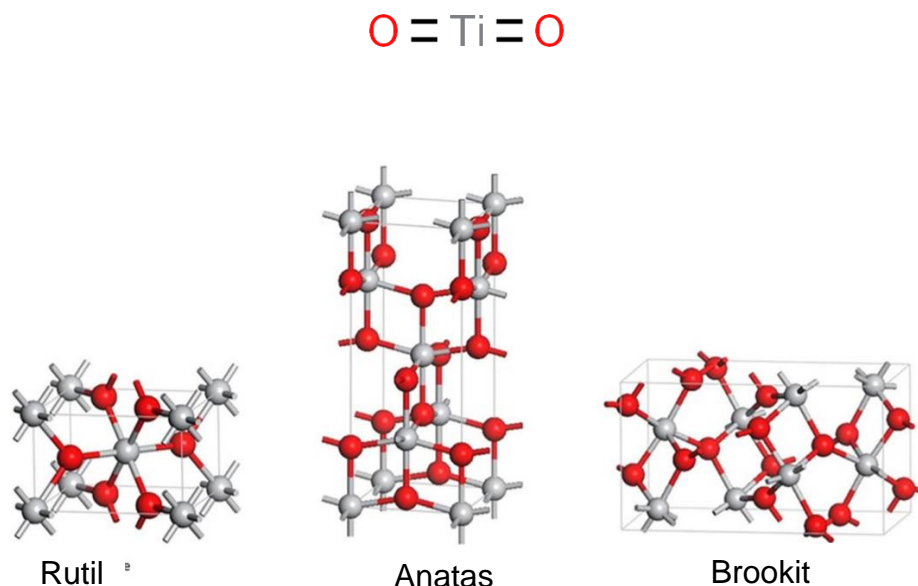
Menší nanočástice s velikostí kolem 50 nm jsou lépe absorbovány procesem endocytózy, která je umožněna díky efektivní vazbě nanočástice na membránové receptory. Větší nanočástice se váží na membránové receptory obtížněji. U snadno absorbovaných nanočástic je riziko bioakumulace. Pozitivně nabitě nanočástice mají vyšší buněčnou internalizaci oproti negativně nabitým nanočásticím. Bylo dokázáno, že toxicita buněk vyvolaná nanočásticemi se zvyšuje v závislosti na koncentraci, nikoliv v závislosti na schopnosti absorpce (Rasmussen K. *et al*, 2018; Sohaebuddin S. K. *et al*, 2010).

1.2.2.1 TiO₂

Titan patří mezi kovy, které se vyskytují v zemské kůře. Stabilní sloučeninou je oxid titaničitý, který je používán jako polovodič typu n a jako častý nanomateriál. V přírodě se vyskytuje ve třech modifikacích: anatas, rutil a brookit (obr. 8). Každá modifikace má rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti, což úzce souvisí s různou toxicitou. Anatasové nanočástice mají vyšší toxicitu než rutilové nanočástice (Clemente Z. *et al*, 2015). Aplikace TiO₂ zahrnuje antibakteriální použití, protože jeho mechanismy fotokatalytické oxidace jsou dobře zdokumentovány (Lee S.-Y. *et al*, 2013). Je dokázáno, že TiO₂ zvyšuje tvorbu ROS (Khraisheh M. *et al*, 2015).

Pro syntézu TiO₂ je nejvhodnější kapalný titan tetrafluorid (TiF₄), chlorid titaničitý (TiCl₄), síran titaničitý (TiSO₄), alkoxidy titanu (isopropoxid titaničitý nebo tetrabutoxytitanium). Při výrobě je riziko nežádoucí hydrolyzy, proto se kapalné prekurzory používají s anorganickou kyselinou nebo chelatačními činidly (alkohol,

kyselina karboxylová nebo ethylendiamin). Z pevných prekurzorů se používá Ti fólie anatasu (Wei Y. *et al*, 2018).



Obr. 8: Krystalické uspořádání TiO₂ (převzato a upraveno z: Ewa Baranowska-Wójcik. *et al*, 2020).

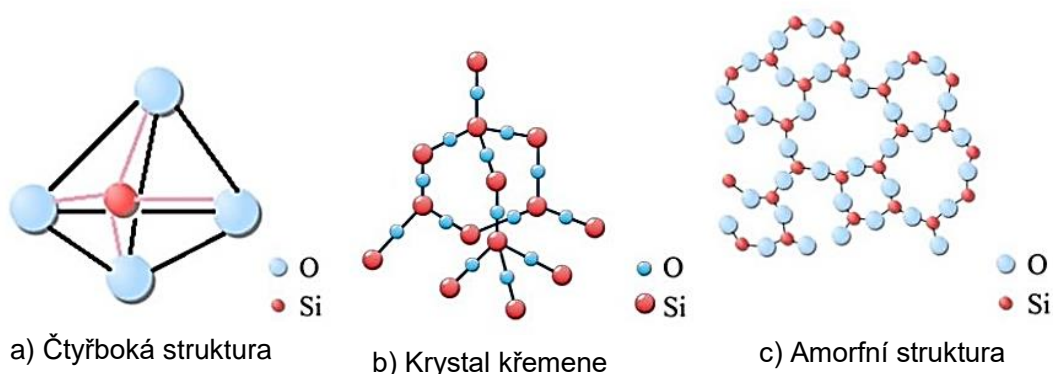
Typem TiO₂ jsou nanočástice TiO₂ P25, které jsou komerčně snadno dostupné. Do těla se TiO₂ P25 dostává zejména inhalací, injekcí, kontaktem s kůží a absorpcí v zažívacím traktu a hromadí se v různých vnitřních orgánech (slezina, ledviny, plíce). Průnik TiO₂ P25 do buňky je umožněn endocytózou, aktivací receptoru epidermálního růstového faktoru. Primární lokace po absorpci TiO₂ P25 je v endosomech, lysozomech, v některých případech v cytoplazmě nebo v perjaderné oblasti. TiO₂ P25 mění buněčný cyklus, způsobuje zúžení jaderné membrány a způsobuje apoptózu generací ROS spolu se snížením redukovaného GSH. ROS aktivují prokaspázu-3 a prokaspázu-9, sníží expresi genů a proteinů rodiny Bcl-2, zvýší expresi genů a proteinů Bax a cytochromu c. Po expozici TiO₂ velikosti 20-100 nm, nebyl pozorován průnik hluboko skrz *stratum corneum* do spodních vrstev epidermis a dermis, proto se používá TiO₂ do opalovacích krémů a k ochraně proti slunečním paprskům (Song B., Zhou T. *et al*, 2016). Bylo dokázáno, že nanočástice TiO₂ P25 mohou zvyšovat uvolňování histaminu ze žírných buněk, což může způsobit vznik zánětu. V myším modelu bylo prokázáno, že oxidační stres vyvolaný TiO₂ P25 zvyšuje expresi genů proteinů p38, c-Jun N-terminální kinázy (*C-Jun N-terminale kinases*; JNK

kináza), nukleárního faktoru β a hemoxygenázy-1 (Song B. *et al*, 2016; Hussain Z. *et al*, 2020; Zhang R. *et al*, 2012; Wójcik-Baranowska E. *et al*, 2020).

1.2.2.2 SiO₂

Oxid křemičitý je ve formě kyseliny křemičité polymer se vzájemně propojenými jednotkami, které tvoří čtyřbokou strukturu (obr. 9a). Přírodní SiO₂ se nachází ve formě krystalů (křemen, cristobalit, tridymit; obr. 9b) nebo v amorfní podobě (obr. 9c). Krystalický SiO₂ je považován za biologicky bezpečný materiál, který se používá v potravinářském nebo farmaceutickém průmyslu bez zjevných zdravotních problémů. SiO₂ má nízký index lomu a vysoký stupeň tepelné a mechanické stability (Mallakpour S. *et al*, 2018).

Nanočástice amorfního SiO₂ vstupují do krevního řečiště a bylo dokázáno, že buněčná smrt se indukuje zvýšenou koncentrací částic a sníženou velikostí částic (Wang W. *et al*, 2018). Apoptotická smrt je zprostředkována cestou aktivace proteinu p53, působením ROS s následnou aktivací Bcl-2 nebo serin/threonin proteinkinázy. Další možností je prostřednictvím koagulačního faktoru XII a JNK-jaderného faktoru kappa dráhy. Nanočástice SiO₂ o velikosti 12 nm jsou nejsilnějšími nanočásticemi s významnou pozitivní korelací mezi kyselostí povrchu částic a biologickou silou, včetně cytotoxických a zánětlivých odpovědí napříč buněčnými liniemi (Sharma N. *et al*, 2020).



Obr. 9: Krystalické uspořádání SiO₂ (převzato a upraveno z: Coelho R. *et al*, 1993).

1.3 Markery apoptózy

Mezi nejčastější marker apoptózy patří vystavení fosfatidylserinu (PtdSer) na buněčný povrch během procesu apoptózy. Syntéza PtdSer probíhá v ER dvěma odlišnými PtdSer syntázami od fosfatidylcholinu nebo fosfatidylethanolaminu (PtdEtn). Následně je PtdSer katalyzován na PtdEtn dekarboxylázou PtdSer na mitochondriální vnitřní membráně. Ve zdravých buňkách jsou fosfolipidy udržovány v plazmatické membráně. Během apoptózy, kaspázy štěpí ATP fosfolipid transportní 11C (*ATP phospholipid transporting 11C*; ATP11C) a fosfolipid skramblázový komplex (*Phospholipid scrambling complex*; Xkr8). Z důvodu deaktivace flipázy a aktivace skramblázy dojde k nevratné expozici PtdSer na buněčný povrch. Na rozpoznávání kaspáz mají Xkr8 i ATP11C místa ve svých doménách. Komplex ATP11C má ve své doméně tři rozpoznávací místa kaspázy-3. Štěpením těchto kaspáz nastává inaktivace ATP11C, což je nezbytné pro vystavení PtdSer na buněčný povrch. Komplex Xkr8 je štěpen kaspázami na C-terminálním štěpném místě a nastává dimerizace komplexu Xkr8 s basiginem na heterotetramer, který zabrání návratu vystaveného PtdSer zpět dovnitř buňky a slouží jako signál „eat me“ (Segawa K. *et al*, 2015; Nagata S. *et al*, 2020).

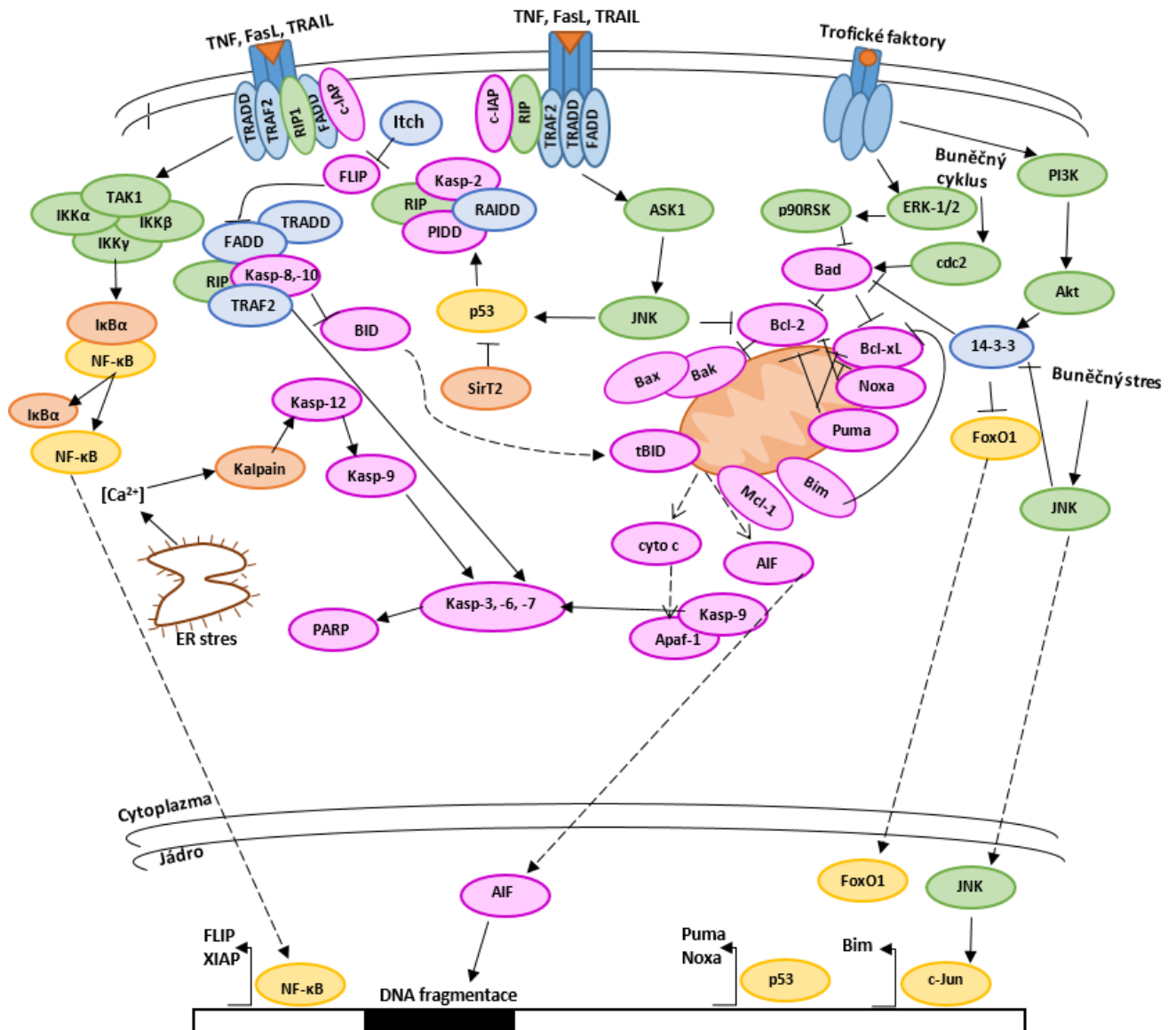
1.4 Významné proteiny účastníci se buněčné smrti

Průběh buněčné smrti je závislý na vlastnostech a aktivaci jednotlivých proteinů, které se procesu účastní aktivně nebo celý proces apoptózy inhibují (obr. 9). Monitorováním exprese jednotlivých proteinů je možné kontrolovat celý proces apoptózy, což by znamenalo možnost využít jednotlivé proteiny jako terapeutické cíle pro léčbu onemocnění, u kterých byla zaznamenána změna hladin konkrétních proteinů. Mezi nejdůležitější stanovované proteiny metodou *Western Blotting* patří Fas-L, PARP-1, p53, p21, p16, Bcl-XL, n Bax, ASK-1 kináza, JNK kinázy, ERK kinázy, p38 a kaspázy.

1.4.1 Protein Fas-L

Fas-L (CD95, Apo-1) je transmembránový protein patřící do nadrodiny receptorů TNF o celkové hmotnosti 48 kDa. Gen *Fas-L* je lokalizovaný na chromozomu 1q24.3, obsahuje 4 exony a celková délka *Fas-L* je 7774 bp. Protein Fas-L existuje

ve 2 isoformách o molekulové hmotnosti 31,5 kDa a 14 kDa. V lidském těle se Fas-L vyskytuje ve volné formě nebo jako vázaný na membránu, kde je účinnějším induktorem apoptózy (Redza-Dutordois M. *et al*, 2016).



Obr. 10: Významné proteiny účastníci se apoptózy. Tumor nekrotizující faktor (TNF), Fasligand (FasL), Ligand indukující apoptózu (TRAIL), Extracelulární signální regulovaná kináza-1/2, Apoptotická signální kináza-1 (ASK-1), c-Jun N-terminální kináza (JNK), kasp (kaspáza), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), apoptózu indukující faktor (AIF), *Bcl-2 interacting mediator of cell death* (Bim), nukleární faktor $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), Poly (ADP-ribóza) polymeráza-1 (PARP), agonista smrti interagující s BH3 doménou (Bid), kináza 1 aktivovaná transformujícím růstovým faktorem β (TAK1), kináza inhibitoru κ (IKK), inhibitor $\kappa\beta$ (I $\kappa\beta$), Fas-sdružené smrtící domény (FADD), Bcl-2 homologní antagonist (Bak), Bcl-2-asociovaný X protein (Bax), Bcl-2 extra large (Bcl-xL), p53 regulační modulátor apoptózy (Puma), Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (NOXA), cyklin dependentní kinázy (Cdc), *myeloid cell leukemia-1* (Mcl-1) (převzato a upraveno z: Yuan J., 2008).

Funkce Fas-L je jako receptor smrti a jeho zapojení iniciuje vnější dráhu apoptózy. Aktivace nastává vazbou Fas-L na příslušný transmembránový receptor Fas díky agregaci receptorů smrti a jejich domén smrti za tvorby Fas-sdružené smrtící domény. Fas-sdružená smrtící doména obsahuje doménu vázající kaspázu, kam se iniciační kaspázy (kaspáza-8, kaspáza-10) váží a tvoří komplex zvaný signální komplex vyvolávající smrt. Kaspázy jsou syntetizované v neaktivní podobě prokaspáz a aktivují se odštěpením prodomény. Aktivované kaspázy mohou aktivovat efektorové prokaspázy, popřípadě alternativně štěpit protein Bid, který podporuje permeabilizaci vnější membrány mitochondrií s následným uvolněním cytochromu c, který se podílí na tvorbě apoptozómu (Cullen S. P. *et al*, 2015; Calmon-Hamaty F. *et al*, 2015).

Bylo prokázáno, že mutace receptoru Fas nebo Fas-L způsobuje autoimunitní lymfoproliferativní syndrom, který se projevuje v raném dětství lymfadenopatií a splenomegalií. Z důvodu defektní apoptózy nastává akumulace autoreaktivních lymfocytů a dochází k opakujícím se bakteriálním a virovým infekcím. Kromě toho se uvádí, že u pacientů s autoimunitním lymfoproliferativním syndromem je nedostatek kaspázy-8 a kaspázy-10 (Meynier. S. *et al*, 2018).

1.4.2 Protein PARP-1

Poly (ADP-ribóza) polymeráza-1 (*Poly [ADP-ribose] polymerase-1*; PARP-1) je jaderný enzym kódovaný genem *PARP-1*. Gen *PARP-1* je lokalizovaný na chromozomu 1q42.12, obsahuje 23 exonů a celková délka *PARP-1* je 47403 bp. Enzym PARP-1 existuje pouze v 1 isoformě o molekulové hmotnosti 113,1 kDa. Enzym PARP-1 je členem rodiny ADP-ribosyltransferáz podobný difterickému toxinu, která obsahuje 17 členů včetně enzymu PARP-1. Prvních 6 enzymů (PARP-1 až PARP-6) obsahuje triádu His-Tyr-Glu v katalytických doménách, která je alespoň u některých členů této rodiny (PARP-1,-2,-5,-6) indikativní pro PAR-generující (ADP-ribosyl) transferázy tím, že začleňují jednotky ADP-ribózy v souladu se syntézou PARP. Polymery ADP-ribózy připojené k PARP-1 během automodifikačních reakcí mohou dosáhnout velikosti větší, než je 200 zbytků o délce až 100 nm. Mohou mít rozvětvenou nebo lineární formu. Není jasné, jak tyto struktury vznikají v unimolekulární modifikaci, ale PARP-1 funguje jako monomer a zbytky jsou připojeny na PARP distální konec stávajících řetězců PAR (Alemasova E. E. *et al*, 2019).

Mezi hlavní funkce PARP-1 patří účast na buněčných procesech, jako je replikace, regulace délky telomer, transkripce, oprava DNA nebo regulace buněčné smrti. Aktivace PARP-1 je závislá na neopravitelném jaderném poškození DNA, zejména se jedná o jednořetězcové a dvouřetězcové zlomy. Detekce DNA zlomů je pomocí určitých zinkových motivů N-koncové domény PARP-1 vázající DNA. Vazba na DNA indukuje alosterické konformační změny ve struktuře proteinu, které umožňují vazbu NAD⁺ na C-koncovou katalytickou doménu, což aktivuje enzymatickou aktivitu PARP-1 (Enbrecht M. *et al*, 2020). Zlomy DNA jsou způsobeny vysokou produkcí ROS. Během aktivace proteinu PARP-1 nastává masivní spotřeba NAD⁺ na syntézu poly (ADP-ribózy). Aktivovaný PARP-1 je štěpený kaspázami na doménu vázající DNA a katalytickou doménu, čímž se zachovává koncentrace ATP potřebná pro případný proces apoptózy, který může buňka podstupovat. Enzym PARP-1 je deaktivován štěpením kaspáz a naopak indukuje proces apoptózy (Breton C. S. *et al*, 2015; Kumar Ch. *et al*, 2019; Jain P. G. *et al*, 2019).

1.4.3 Protein p53

Jaderný protein p53 je protein o celkové molekulové hmotnosti 43,7 kDa. Gen *p53* je lokalizovaný na chromozomu 17p13.1, obsahuje 12 exonů a je složený z 19070 bp. Protein p53 existuje v 9 isoformách (tab. 1). Protein p53 hraje klíčovou roli při reakci na oxidační stres zastavením buněčného cyklu za účelem opravy DNA, nebo indukci apoptózy. Defosforylovaný stav proteinu p53 je důležitý pro jeho interakci s ubikvitinovanými ligázami, jako je E3 ubikvitin-proteinová ligáza, která značí defosforylované molekuly proteinu p53 ubikvitinem s následnou degradací zprostředkovanou proteazomem. Fosforylovaný stav proteinu p53 určuje vazbu a výběr transkripčních kofaktorů, který indukuje expresi genu dle konkrétního typu buňky a typu stresu (Martinho M. S. *et al*, 2020).

Za fyziologických podmínek má protein p53 krátkou životnost a je udržován v nízkých koncentracích prostřednictvím ubikvitinace proteinu *Mouse double minute 2 homolog*, který je přítomen v jádře a degraduje protein p53 v proteazomu. V reakci na stresové podmínky nebo poškození DNA se protein p53 uvolňuje z komplexu, stabilizuje se postranslačními modifikacemi. Následně protein p53 aktivuje transkripci proapoptotických genů a je translokován do mitochondrií, jádra nebo ER. V mitochondriích se podílí na permeabilizaci vnější membrány inhibicí proteinu

myeloidní buněčné linie-1a aktivací oligomerizace proteinů Bax/Bak. V jádře nastává regulace transkripčních faktorů souvisejících s apoptózou, jako jsou proteiny Bax, Bak a další. V ER protein p53 interaguje s ER Ca²⁺ ATPázou 2, která umožňuje vstup Ca²⁺ z ER do mitochondrií, kde spouští apoptotickou smrt přes aktivaci hlavního vnějšího membránového porinu, skrz který uniká cytochrom c (Yamada K. *et al*, 2019).

Tab. 1: Isoformy proteinu p53.

Isoforma	Molekulová hmotnost [kDa]
p53 α	43,6
p53 β	37,8
p53 γ	38,5
del40-p53	39,3
del40-p53 β	33,4
del40-p53 γ	29,5
del133-p53 β	23,7
del133-p53 γ	24,4

1.4.4 Cyklin-dependentní kinázové inhibitory

Cyklín-dependentní kinázové inhibitory (*Cyclin-dependent kinases inhibitors*; CDKI) je skupina proteinů, které inhibují cyklin-dependentní kinázy (*Cyclin-dependent kinases*; CDK). Mají schopnost koordinovat buněčnou proliferaci a vývoj. Členové CDKI rodiny obsahují ve svých doménách konzervovanou N-terminální doménu, která inhibuje aktivitu CDK (De Bondt H. L. *et al*, 1993).

1.4.4.1 Protein p21

Protein p21 má celkovou molekulovou hmotnost 18,1 kDa. Gen *p21* je lokalizovaný na chromozomu 6p21.2 o celkové velikosti 10870 bp, obsahuje 6 exonů a má pouze 1 isoformu. Lokus *p21* má dvě strukturně odlišné, ale funkčně související varianty genu *p21*. Mezi účinky proteinu p21 patří regulace buněčného cyklu, reparace DNA, modulace apoptózy a indukce stárnutí. Protein p21 úzce souvisí s PARP-1, protože pokud není protein p21 aktivován, zůstává PARP-1 vázán na DNA v automaticky modifikované formě, což zpomaluje reparaci DNA (Moussa R. S. *et al*, 2019).

Toxiny působící na lidské buňky vyvolávají buněčný stres, který vede k poškození DNA s následnou aktivací proteinu p53. Úloha proteinu p21 je závislá na tom, jaký typ proteinu p53 je aktivován. Pokud se aktivuje divoký typ proteinu p53, protein p21 zastavuje buněčný cyklus v G1 fázi a reparuje poškozenou DNA, nebo indukuje senescenci či apoptózu. Pokud se aktivuje deficitní forma proteinu p53, protein p21 vede k deregulaci aparátu replikace, replikačnímu stresu a genomové nestabilitě. Buňky se zvýšenou expresí proteinu p21 mají vysokou proliferační schopnost a zvýšenou reaktivitu. Protein p21 má schopnost aktivovat apoptózu také aktivací prokaspázy-3, stresem aktivované proteinkinázy a apoptózou signál-regulující kinázou 1. Protein p21 může mít ale také antiapoptotický účinek, protože buňky exprimující protein p21 mohou generovat antiapoptotické proteiny, které parakrinním účinkem ovlivní přežití okolních buněk (Georgakilas G. A. *et al*, 2017; Moussa R. S. *et al*, 2019).

1.4.4.2 Protein p16

Protein p16 (CDKN2A) má celkovou molekulovou hmotnost 16 kDa. Gen kódující protein p16 je lokalizovaný na chromozomu 9q21.3. Protein p16 je celkové velikosti 27573 bp, má 8 exonů a existuje v 6 isoformách (tab. 2). Hlavní funkcí proteinu p16 je zpomalení buněčného cyklu z G1 fáze do S fáze vazbou proteinu p16 na CDK4 a CDK6, což způsobí hypofosforylaci retinoblastomového proteinu. Tento mechanismus indukuje např.: progresi nádoru (Serra S. *et al*, 2018).

Tab. 2: Isoformy proteinu p16.

Isoforma	Molekulová hmotnost [kDa]
1	16,5
2	11,2
3	12,1
4	13,9
5	17,9
6	8,7

Bylo zjištěno, že H₂O₂ indukuje apoptózu prostřednictvím fosforylace proteinu p16, který následně interaguje s CDK4. Komplex usnadňuje stabilizaci retinoblastomového proteinu s transkripčním faktorem E2F, které způsobují zástavu buněčného cyklu

ve fázi G1 za následné degradace fosforylovaného proteinu p16 ubikvitinací zprostředkovanou proteosomálního systému. Po zástavě buněčného cyklu nastává apoptóza či senescence v závislosti na množství výchozích volných radikálů (Lu Y. *et al*, 2017).

1.4.5 Protein Bcl-XL

Protein Bcl-XL (BCL2L1) má celkovou molekulovou hmotnost 26,1 kDa. Gen *BCL2L1* je lokalizovaný na chromozomu 20q11.21 o celkové velikosti 59512 bp obsahuje 6 exonů a může existovat ve 3 isoformách (tab. 3). Protein Bcl-XL patří do rodiny Bcl-2 proteinů a konkrétně k antiapoptotickým členům. Protein Bcl-XL je lokalizovaný na vnější mitochondriální membráně a v cytosolu. Cytoprotektivní aktivita proteinu Bcl-XL je spojena se schopností vázat cytotoxický protein Bcl-2, což zabrání mitochondriální permeabilizaci a destabilizaci membrány (Ryzhov P. *et al*, 2020).

Protein Bcl-XL obsahuje 4 BH domény (BH1-4) a je tvořen ze svazku osmi α -helixů, které jsou propojené přes oblasti smyčky. Hydrofobní centrální jádrová šroubovice (α_5 a α_6) obsahuje drážku, kam se váže motiv BH3 proapoptotických proteinů a další šroubovice definuje okraj vazebného místa. Kritickými rozpoznávacími místy pro motiv BH3 proapoptotických proteinů jsou hydrofobní místa zvýšené aktivity (P2 a P4) spolu s navázaným argininem v drážce. BH4 doména je zodpovědná za apoptotickou aktivitu.

Tab. 3: Isoformy proteinu Bcl-XL.

Isoforma	Molekulová hmotnost [kDa]
Bcl-XL	26,0
Bcl-Xs	18,9
Bcl-X β	25,3

Apoptóza je indukovaná po přesunu Bcl-XL na mitochondriální membránu, kde nastává tvorba mitochondriálního póru, skrz který proudí cytochrom c z mitochondrií ven. Následuje navázání cytochromu c na apoptotický adaptorový protein a aktivace prokaspázy-9, která vyvolá apoptózu. Bylo prokázáno, že Bcl-XL omezuje

proapoptotickou aktivitu Bak retranslokací Bak z mitochondrií do cytosolu (Hennessy E. J., 2016; Li M. *et al*, 2020).

Hypotéza o nové apoptotické smyčce indukované glukokortikoidy indukovaným leucinovým zipem- Bcl-XL- prokaspázou-8 je založena na průniku glukokortikoidů přes membránu thymocytů, kde se váží na glukokortikoidový receptor. Navázaný komplex se přemísťuje do jádra a stimuluje transkripci glukokortikoidy indukovaného leucinového zipu, který snižuje expresi Bcl-XL proteinu, což způsobuje aktivaci prokaspázy-8. Aktivovaná prokaspáza-8 podporuje apoptózu závislou na kaspáze-3 a zároveň zabraňuje polyubikvitinaci zipu, která by způsobila proteasomální degradaci. Mechanismus aktivace prokaspázy-8 je však neznámý (Muscari I. *et al*, 2020).

1.4.6 Protein Bax

Protein Bax (BCL2L4) má celkovou molekulovou hmotnost 21,2 kDa. Gen *Bax* je lokalizovaný na chromozomu 19q13.33 o celkové velikosti 6974 bp, obsahuje 7 exonů a existuje v 8 isoformách (tab. 4). Struktura proteinu Bax obsahuje společný záhyb označovaný jako jádro Bcl-2. Jádro je složené z osmi α -helixů, které tvoří hydrofobní drážku mezi helixy zakončenou krátkou C-koncovou šroubovicí. Drážka obsahuje zbytky BH1-BH3 domén a je nazývána jako BC drážka, protože váže oblast BH3 vazebných partnerů a oblast C-terminálního transmembránového cíle. Protein Bax je primárně lokalizovaný v cytosolu a před aktivací musí nastat zapojení nekanonického místa na povrchu jádra Bcl-2 proteinu Bax naproti BC drážce (místo, spojení BH3 domény proteinu s C koncovou doménou proteinu). Toto zapojení umožňuje aktivaci proteinu Bax, který je schopen se zacílit na vnější mitochondriální membránu. Na mitochondriální membráně nastává oligomerizace Bax proteinu doprovázená tvořením mitochondriálních pórů (Moldoveanu T. *et al*, 2014).

Antiapoptotické funkce virových proteinů závisí na blokování aktivace Bax přímou interakcí s virovým proteinem. Komplex mezi Bax a virovým proteinem je složený z krátké amfipatické, pozitivně nabitě šroubovice, která se váže na záporně nabitý lalok Bax. Lalok Bax obsahuje smyčky spojující šroubovice α -3 a α -4 se šroubovicí α -5 a α -6. Bylo prokázáno, že HA14-1 je první makromolekulární inhibitor Bcl-2Z, který může narušit interakci mezi Bax a Bcl-2 a vyvolat uvolnění cytochromu c z mitochondrií, což

vede k apoptóze různých nádorových buněk (Moldoveanu T. *et al*, 2014; Liu T. *et al*, 2020).

Protein Bax spolu s proteinem Bak hrají důležitou roli při vývoji savců a homeostáze tkání. Dále je dokázáno, že při absenci proteinu Bax a proteinu Bak nastává v hematopoetickém systému akumulace zralých krevních buněk, zejména lymfocytů a krevních destiček, z čehož se následně může vyvinout fatální systémové autoimunitní onemocnění podobné onemocnění lupus erythematoses (McArthur K. *et al*, 2018).

Tab. 4: Isoformy proteinu Bax.

Isoforma	Molekulová hmotnost [kDa]
α	21,2
β	24,2
γ	4,7
δ	15,8
ε	18,1
ζ	12,9
ψ	19,3
ς	19,7

1.4.7 ASK-1 kináza

Apoptotická signální kináza-1 (*Apoptosis signalling kinase 1*; ASK-1) má molekulovou hmotnost 154,5 kDa. Gen *ASK-1* je lokalizovaný na chromozomu 6q23.3 o celkové velikosti 5157 bp, obsahuje celkem 32 exonů a existuje ve 2 isoformách o hmotnosti 154,5 kDa a 69,8 kDa.

Aktivita ASK-1 (MAP3K5) kinázy je regulovaná intracelulární signalizací, fosforylací a dimerizací. Mezi inhibitory aktivace ASK-1 kinázy můžeme zařadit buněčný represor genů stimulovaných E1A, který brání fosforylaci ASK-1 kinázy. Negativním regulátorem ASK-1 kinázy je Dickkopf-příbuzný protein 3. Pozitivním regulátorem jsou naopak adaptorové proteiny rodiny TNF receptor asociované faktory. Inaktivace kinázy ASK-1 je možná fosfatázou-5.

Kináza ASK-1 je aktivovaná působením oxidačního stresu, stresem ER, zvýšenou koncentrací Ca^{2+} , zánětlivými cytokiny a infekcí. Oxidační stres vzniká v důsledku zvýšených koncentrací ROS. Úplná aktivace kinázy ASK-1 má několik fází. Nejprve

ROS oxidují thioredoxin, čímž se indukuje jeho disociace od ASK-1 kinázy. Další fází je defosforylace specifické domény S967, která uvolní 14-3-3 inhibitor ASK-1 kinázy. Díky přítomnosti ROS je usnadněna vazba TRAF adaptorových proteinů, které podporují homodimerizaci ASK-1 kinázy. Poslední fází je autofosforylace Thr845, který se nachází v aktivační smyčce kinázové domény. V celém procesu ROS zabraňují ubikvitinaci aktivované ASK-1 vyvolanou ubikvitin specifickou peptidázou 9. Aktivovaná ASK-1 kináza může interagovat s JNK kinázou nebo proteinem p38. JNK kináza je aktivována fosforylací mitogenem aktivované protein kinázy kinázy (*Mitogen-activated protein kinase kinase*; MKK), v tomto případě MKK4/MKK7. Aktivace proteinu p38 nastává fosforylací MKK3/MKK6 a protein p38 dále aktivuje molekulární signalizaci apoptózy (Kovalic A. J. *et al*, 2018; Mao G. *et al*, 2014; Redza-Dutordois M. *et al*, 2016).

1.4.8 JNK kinázy

Kinázy JNK jsou členem rodiny MAPK s celkovým počtem 16 exonů. V lidském těle se vyskytují 3 druhy JNK kináz kódované 3 geny ležící na chromozomech 10q11.22, 5q35.3 a 4q21.3. Velikost jednotlivých genů je 132688 bp, 58941 bp a 584221 bp. Kináza JNK1 (MAPK8) se vyskytuje v 5 isoformách, JNK2 (MAPK9) kináza v 5 isoformách a JNK3 (MAPK10) kináza ve 3 isoformách (tab. 5). Kinázy JNK1 a JNK2 jsou exprimovány téměř ve všech tkáních lidského těla, zatímco JNK3 se vyskytuje pouze ve varlatech, mozku a srdci. Všechny druhy JNK kináz se podílí na embryogenezi a fungování imunitního systému. V imunitním systému reagují na antibakteriální, antivirové i antiparazitární signály, kontrolují vrozenou imunitu a podílí se na vývoji T lymfocytů (Grynberg K. *et al*, 2017; Arthur J. S. *et al*, 2013).

Tab. 5: Isoformy JNK1 kinázy, JNK2 kinázy a JNK3 kinázy.

Isoforma JNK1	Molekulová hmotnost [kDa]	Isoforma JNK2	Molekulová hmotnost [kDa]	Isoforma JNK3	Molekulová hmotnost [kDa]
JNK1- α -2(2)	48,3	α 2	48,1	α 2	52,6
JNK1- α -1	44,2	α 1	44,1	α 1	48,6
JNK1- β -1	44,0	β 1	44,2	3	48,1
JNK1- β -2	48,1	β 2	48,3	-	-
5	35,3	5	27,3	-	-

JNK kinázy jsou duální kinázy, které jsou schopny apoptózu indukovat i inhibovat v závislosti na výchozích signálech. Jak již bylo zmíněno, JNK kinázy jsou aktivovány MKK4/MKK7 kinázou. Mechanismus aktivace je negativně regulován signalizací přes extracelulární signální regulovanou kinázu-1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase*; ERK-1/2), protein kinázu C a protein kinázu D. Další regulace je umožněna fosfatázami, kdy je k aktivaci JNK kináz nutná jejich defosforylace. Následně aktivované JNK kinázy aktivují c-Jun fosforylací Ser63 a Ser73, který vyvolává uvolňování cytochromu c z mitochondrie a následně dochází k aktivaci prokaspázy-3, jejíž aktivovaná forma vyvolává apoptotickou destrukci buňky (Kovalic A. J. *et al*, 2018; Ge H.-x. *et al*, 2017).

Kinázy JNK mají schopnost deaktivovat Bcl-2. Deaktivovaný Bcl-2 ztrácí schopnost inhibovat proapoptotické členy rodiny Bcl-2 a není schopen regulovat odtok Ca^{2+} z ER. Následně nastává příliv Ca^{2+} do mitochondrií, které deaktivují komplex 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin a vyvolávají mitochondriální otok s narušením vnější mitochondriální membrány, což vede k uvolnění proapoptotických faktorů v cytosolu a apoptóze. Aktivované JNK kinázy mají schopnost také fosforylovat a aktivovat ER proapoptotický protein Bcl2L11, který je za fyziologických podmínek inhibován vazbou na dyneinové motorické komplexy (Redza-Dutordois M. *et al*, 2016).

1.4.9 ERK kinázy

Kináza ERK se dělí na ERK-1 kinázu a ERK-2 kinázu. Kináza ERK-1 (MAPK3) je kódovaná genem *ERK-1*, který je lokalizovaný na chromozomu 16q11.2, velikost odpovídá 9205 bp a celkový počet exonů je 10. Kináza ERK-1 se vyskytuje ve 3 isoformách. Kináza ERK-2 (MAPK1) je kódovaná genem *ERK-2*, který leží na chromozomu 22q.11.22, velikost odpovídá 108024 bp, celkový počet exonů je 9 a vyskytuje se ve 2 isoformách (tab. 6). Obě kinázy sdílí mnoho fyziologických i biologických funkcí, mají vysokou podobnost, a proto jsou označovány jako ERK-1/2. Obě kinázy jsou exprimované v aktivované podobě (fosforylované pERK-1/2) nebo inaktivované formě.

ERK-1/2 funguje jako hlavní efektor onkoproteinu *Rat sarcoma* (Ras). Signál aktivující ERK signální dráhu do buňky proniká skrz tyrosinkinázové receptory, receptory spřažené s G proteinem nebo iontové kanály. Nastává kaskádová aktivace Ras a proteinkinázy *Rapidly accelerated fibrosarcoma* (Raf). Proteinkináza Raf má

jako hlavní úlohu aktivaci kinázy MAPK/ERK-1/2 (*MAPK/ERK kinase-1/2*; MEK1/2) fosforylací Ser218 a Ser222 v katalytické doméně. Kináza MEK1/2 aktivuje ERK-1/2 fosforylací Thr185³ a Tyr187 v aktivační smyčce Thr-Glu-Tyr. Aktivovaný ERK-1/2 se může translokovat do jádra za účelem aktivace transkripčních faktorů, nebo zůstat v cytoplazmě, kde se váže na protein p53, čímž ho fosforyluje a vede k akumulaci proteinu p53. Zvýšené hladiny proteinu p53 vyvolávají mitochondriální apoptózu aktivací proapoptotických faktorů (Bax, Bid) a inhibicí antiapoptotických členů (Bcl-2, Bcl-x) (Yan S. *et al*, 2021; Borges G. *et al*, 2015).

Tab. 6: Isoformy ERK-1 a ERK-2 kinázy.

ERK-1	Molekulová hmotnost [kDa]	ERK-2	Molekulová hmotnost [kDa]
1	43,1	1	41,3
2	38,2	2	36,4
3	40,0	-	-

1.4.10 Protein p38

Protein p38 (MAPK11) má celkovou molekulovou hmotnost 38 kDa. Gen *MAPK11* je lokalizovaný na chromozomu 6p21.31 o celkové velikosti 95254 bp, má 22 exonů a existuje ve 2 isoformách α , β o molekulové hmotnosti 41,9 kDa a 40,8 kDa. Protein p38 patří do rodiny mitogenem-aktivovaných proteinkináz (*Mitogen-activated protein kinases*; MAPK).

Aktivace dráhy proteinu p38 je závislá na stresových reakcích, jako je osmotický šok, teplo nebo oxidační stres. Kanonická aktivační dráha zahrnuje kaskády MAPKKK a MAPKK. Fosforylace proteinu p38 na Thr/Tyr zbytcích v aktivační smyčce kinázy vede ke konformační změně, která indukuje katalytickou aktivitu kinázy a vazbu na substráty. Nekanonická aktivační dráha autofosforylací proteinu p38 je regulovaná proteinem 1 vzájemným kinázu 1 aktivovanou transformujícím růstovým faktorem β . Protein p38 snižuje anti-apoptotický protein Bcl-XL, což indukuje apoptózu prostřednictvím signálního převodníku a aktivátoru transkripce 1, cytochromem c a proteinem p53. Protein p38 má však také antiapoptotický účinek indukci proto-onkogenu se Ser/Thr kinázovou aktivitou. Isoforma proteinu p38 α a isoforma proteinu p38 β mají v procesu apoptózy opačné vlastnosti, protože isoforma α má

proapoptotickou funkci prostřednictvím aktivace proteinu p53 a isoforma β má antiapoptotickou funkci prostřednictvím inhibice tvorby ROS (Yokota T. *et al*, 2016; Li Z. *et al*, 2020).

1.4.11 Kaspázy

Kaspázy jsou cysteinové proteázy, které hydrolyzují peptidové vazby v místě aspartátu. Jejich hlavní úlohou je přímá regulace apoptózy. Kaspázy se skládají z aminoterminální domény s proměnnou velikostí následované velkými a malými katalytickými podjednotkami o 20 kDa a 10 kDa, které společně tvoří doménu proteáz. Kaspázy dělíme na iniciační a efektorové. Iniciační kaspázy jsou na začátku aktivační dráhy a efektorové kaspázy se vyskytují na konci aktivační dráhy, kde způsobují štěpení buněčných proteinů (Opdenbosch N. V. *et al*, 2019).

V lidském organismu se kaspázy podílí na vývoji mnoha buněk. Jako první bylo dokázáno, že se kaspázy účastní diferenciaci buněk čočky pomocí inhibitoru kaspázy fluoromethyketonu Z-VAD-FMK, který potlačil tvorbu enukleovaných čočkových tělísek během kultivace explantátových čoček. Dále bylo zjištěno, že se kaspázy účastní diferenciaci, zrání a aktivace kmenových buněk, erytrocytů, lymfocytů, makrofágů, megakaryocytů a krevních destiček. Dále se kaspázy podílejí na aktivaci mikroglíí, hojení ran a diferenciaci embryonálních kmenů. Z nefyziologických úloh se kaspázy podílí na patogenezi salmonely. Většina důkazů byla prokázána na kaspáze-3 (McArthur K. *et al*, 2018).

1.4.11.1 Kaspáza-3

Kaspáza-3 (CASP3) je kódovaná genem *CASP3*, který je lokalizovaný na chromozomu 4q35.1. Velikost *CASP3* je 21752 bp, s celkovým počtem 9 exonů a existuje pouze v jedné isoformě o molekulové hmotnosti 31,6 kDa. Kaspáza-3 je efektorová kaspáza, která se vyskytuje v neaktivní formě proenzymu prokaspázy-3, který prochází proteolytickým zpracováním v konzervovaných aspartátových zbytcích za vzniku velké a malé podjednotky, které následně dimerizují za vzniku aktivního enzymu. Vnější i vnitřní dráhy se sbíhají u kaspázi-3, která společně s dalšími efektorovými kaspázami organizuje eliminaci buněčné struktury štěpením specifických endogenních substrátů. Mimo jiné kaspáza-3 štěpí protein PARP-1. Konečným účinkem aktivace kaspázy-3 je *blebbing* plazmatické membrány, kondenzace

chromatinu, štěpení DNA a expozice PtdSer na extracelulární straně plazmatické membrány (D'Amelio M. *et al*, 2012).

1.4.11.2 Kaspáza-7

Kaspáza-7 (CASP7) je kódovaná genem *CASP7*, který je lokalizovaný na chromozomu 10q25.3. Velikost *CASP7* je 51716 bp s celkovým počtem 13 exonů. Gen *CASP7* se vyskytuje ve 4 isoformách (tab. 7). Kaspáza-7 je řazena spolu s kaspázou-3 do efektorových kaspáz a vyskytuje se v neaktivní formě prokaspázy-7. Aktivace prokaspázy-7 probíhá štěpením kaspázou-9. Aktivovaná prokaspáza-7 štěpí substráty jako je např.: enzym PARP-1. Kaspáza-7 má funkční podobu s kaspázou-3, protože obě sdílí řadu stejných substrátů, které mohou štěpit, ale byly dokázány odlišné funkce během procesu apoptózy. Kaspáza-3 je nezbytná pro destrukci buněk a může blokovat produkci ROS, kdežto kaspáza-7 je zodpovědná za produkci ROS a během apoptózy odděluje buňky. Mutace kaspázy-7 jsou pozorované u různých druhů malignit. Sledování štěpení prokaspázy-7 westernovým přenosem pomocí protilátek proti kaspáze-7 se používá pro sledování progresu apoptózy. Díky protilátkám proti kaspáze-7 bylo možné sledovat indukci apoptózy a identifikovat roli tumor supresorových genů u rakoviny děložního čípku (Brentnall M. *et al*, 2013; Jin H. *et al*, 2015).

Tab. 7: Isoformy kaspázy-7.

Isoforma	Molekulová hmotnost [kDa]
α	34,2
β	28,0
α'	37,8
4	31,6

1.4.11.3 Kaspáza-9

Kaspáza-9 (CASP9) je kódovaná genem *CASP9*, který je lokalizovaný na chromozomu 1p36.21. Velikost *CASP9* je 33512 bp s celkovým počtem 11 exonů. Gen *CASP9* se vyskytuje ve 4 isoformách (tab. 8). Kaspáza-9 je iniciační kaspáza, která je potřebná pro signalizaci apoptózy mitochondriální cestou.

Kaspáza-9 se vyskytuje v neaktivní formě prokaspázy-9 a je aktivovaná v komplexu apoptozómu dimerizací za přítomnosti autokatalytického štěpení v Asp315. Apoptozóm vzniká z proteinu Apaf-1, který je aktivován po vazbě na cytochrom c, který je uvolněn z mitochondrií do cytosolu. Po aktivaci nastává výměna nukleotidů v přítomnosti dATP a nastává oligomerizace Apaf-1 na heptamerní komplex apoptozómu. Aktivovaná kaspáza-9 proteolyticky aktivuje prokaspázu-3 na kaspázu-3 (Würstle M. L. *et al*, 2012).

Tab. 8: Isoformy kaspázy-9.

Isoforma	Molekulová hmotnost [kDa]
α	46,2
β	30,1
γ	17,3
4	36,5

1.5 Metody detekce apoptózy

Detekce buněčné smrti zahrnuje zobrazovací metody a biochemické testy. K všeobecnému rozlišení mezi viabilní a mrtvou buňkou se používá test přežití. Principem tohoto testu je nanesení přesně známého počtu buněk na pevné médium a následný růst za optimálních podmínek. Předpokladem tohoto stanovení je, že každá nanesená buňka vytvoří kolonii. Pokud tedy známe počet naočkovaných buněk a počet vzniklých kolonií, vypočteme počet životaschopných buněk a počet mrtvých buněk. Metoda je jednoduchá, ale blíže neurčí typ buněčné smrti. Mezi další jednodušší metody řadíme světelnou mikroskopii, která je rychlá a levná, ale umožňuje zobrazení pouze omezené, a to hlavně pro morfologické pozorování změn. Pro vizualizace se používá Nomarského diferenciální interferenční kontrast, který umožní zobrazení struktur s malým indexem lomu jako prohlubně a struktury s vyšším indexem lomu jako vyvýšeniny bez rušivého halo efektu (Wloch-Salamon D. M. *et al*, 2012).

Fluorescenční mikroskopie využívá barviva vitální a vylučovací. Do vylučovacích barviv patří trypanová modř, která neobarví neporušené buňky. Test vyloučení trypanové modři je běžně používaná, standardní rychlá metoda, která vyžaduje malou

část buněčné populace k rozlišení mezi životaschopnými a mrtvými buňkami pomocí světelné mikroskopie. Vitální barviva barví selektivně živé nebo mrtvé buňky a vylučovací mohou procházet permeabilizovanými plazmatickými membránami. Při detekci apoptózy se používá Annexin V, který je navázaný na fluoresceinu isothiokyanátu, díky kterému je možná detekce struktur po navázání na PtdSer. Jako další barvivo se používá propidium jodid, který prostupuje membránou mrtvých buněk. Pokud použijeme obě barviva najednou, jsme schopni rozlišit buňky živé, nekrotické, časné apoptotické a pozdní apoptotické. Další fluorescenční barvivo je 4',6-diamidino-2-fenylindol, který má vysokou afinitu k A-T oblastem DNA a váže se do malého žlábků dvoušroubovice v poměru jedna molekula barviva na tři molekuly A-T párů. Toto barvení se používá hlavně pro vizualizaci jádra. Další fluorescenční sondou používanou pro vizualizaci jádra je sonda Hoechst. Elektronová mikroskopie umožňuje detekci ultrastrukturálních modifikací (Banfalvi G. 2017; Wloch-Salamon D. M. *et al*, 2012).

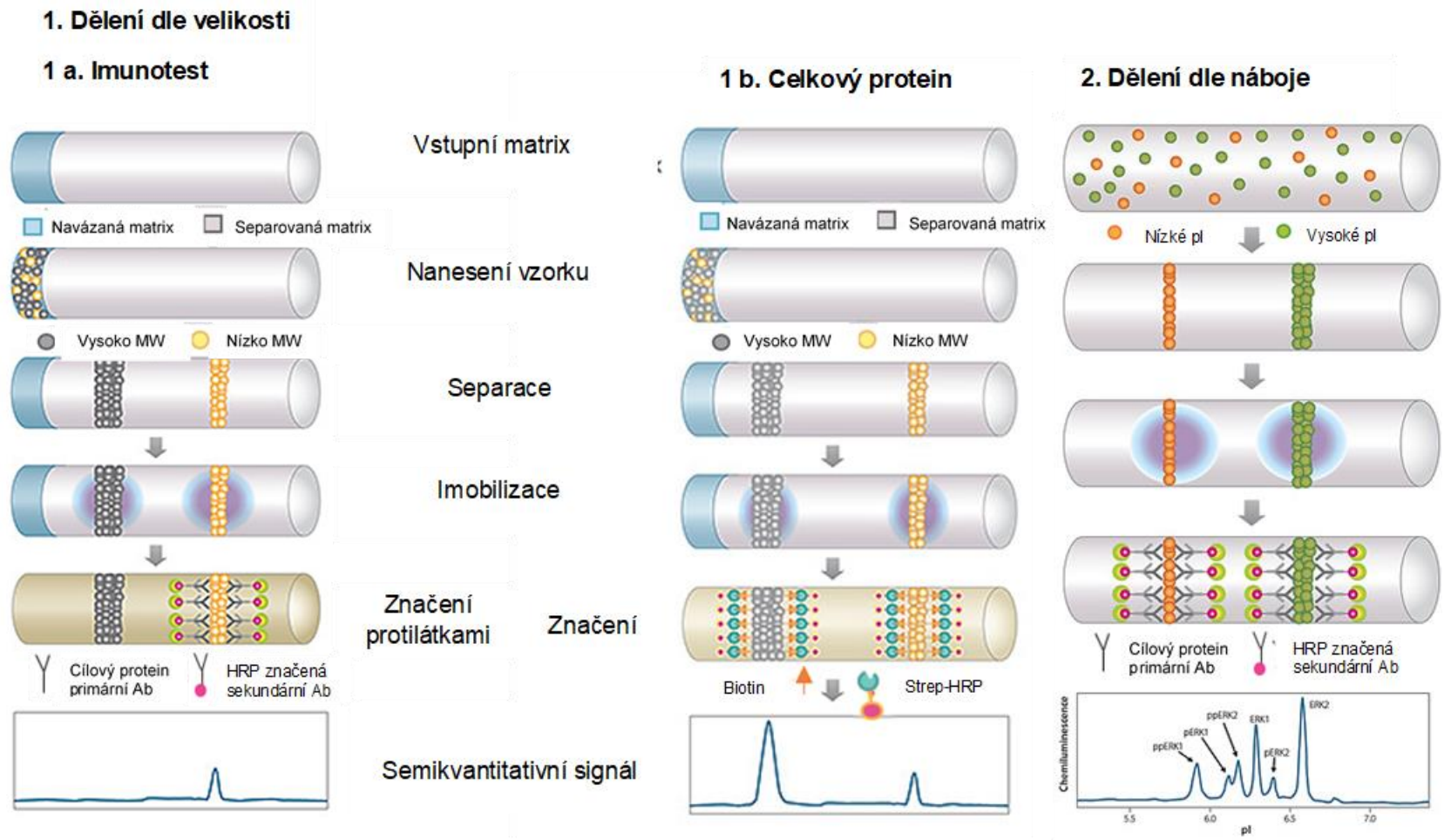
Imunoblotting umožňuje detekovat buněčné populace jako celek. Metoda je přesná a specifická. Pro detekci vybrané frakce se využívá *Western blotting*. Celý proces je však časově náročný, je potřeba velké množství vzorku (10-20 µg / test) a obvykle umožňuje detekci pouze jednoho proteinu. Z těchto důvodů byla vyvinuta kapilární a mikročipová elektroforéza. Metoda má vyšší citlivost, lepší rozlišení, je možná detekce více cílových proteinů ze vzorku jednoho lyzátu buněk. Celkový čas analýzy je kratší ve srovnání s klasickou metodou *Western blotting* (Wloch-Salamon D. M. *et al*, 2012; Mishra M. *et al*, 2019).

1.6 Metoda *Simple Western*

Simple Western (obr. 10) je moderní metoda založená na separaci a analýze proteinů buď imunotestem nebo analýzou celkového proteinu. Nejprve byla použita metoda založená na kapilárním zobrazení isoelektrické fokusace pro westernové bloty a později byla použita mikročipová kapilární elektroforéza (CE)-SDS kombinovaná s imunoprecipitací. Přístroj *Wes* od společnosti *ProteinSimple* z Kalifornie má hlavní výhodu v automatizaci celého procesu. Mezi jeho další výhody patří rychlý postup, malé množství vzorku, analýza je možná s použitím 24-90 různých protilátek současně, schopnost reprodukovatelnosti a lepší kvantifikace. Lze provádět standardní kvantifikaci křivky podobné těm, které se provádí pomocí vysokotlaké

kapalinové chromatografie. Mezi nevýhody patří potřeba specializovaných činidel a malý počet nezávislých srovnání při porovnání tohoto systému s klasickou metodou westernového přenosu (ProteinSimple, 2020).

Dělení proteinů probíhá podle velikosti nebo podle náboje. Nejprve jsou vloženy vzorky proteinů s požadovanými protilátkami a markerem molekulové hmotnosti do testovací destičky předem naplněné separační matricí a pufrů. Obě varianty analýzy probíhají v kapiláře, kam se automaticky zavede až 40 nL vzorku. Každá kapilára obsahuje separační gelovou matici. Následně se vzorky rozdělí buď podle velikosti, nebo podle náboje. Separované proteiny jsou imobilizovány na kapilární stěnu pomocí proprietární fotoaktivovanou záchytnou chemickou látkou. Cílové proteiny reagují s primární protilátkou a jsou značeny pomocí HRP-konjugované sekundární protilátky zviditelněné chemiluminiscenčním substrátem. Výsledný chemiluminiscenční signál je detekován a kvantifikován. Pokud chceme analýzu celkové bílkoviny, nepřidáme primární protilátky, ale pouze rozdělené bílkoviny označíme biotinovým činidlem. Výsledky jsou automaticky zpracovány v programu *Compass* ihned po analýze. Je možný náhled výsledků ve virtuálním gelu nebo ve formě elektroforogramu s příslušnou tabulkou s výsledky (molekulová hmotnost, plocha intenzity signálu, % plocha intenzity signálu) (ProteinSimple, 2020; Mishra M. *et al*, 2019).



Obr. 11: Princip metody *Simple Western*. Molekulová hmotnost (MW), protilátka (Ab), křenuvá peroxidáza (HRP), Streptavidin (STREP), náboj (pI) (převzato a upraveno z ProteinSimple, 2020).

2. CÍLE PRÁCE

1. Detekovat buněčné poškození buněčné linie SH-SY5Y pomocí biochemických testů po působení toxinů (*tert*-butylhydroperoxid, cisplatina, CdCl₂) a nanočástic (TiO₂ P25, SiO₂) po inkubaci 6 hod, 24 hod a 48 hod.
2. Stanovit změny exprese proteinů PARP-1, f-PARP-1 a JNK kináz po inkubaci s vybranými toxiny.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Seznam použitých chemikálií

Cisplatina, CisPt ($\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$; Mr = 300,01; Sigma-Aldrich, USA)
Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, USA)
Deionizovaná voda, DV ($G < 0,1\mu\text{S}$)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM (Sigma-Aldrich, USA)
Ethanol, EtOH ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$; Mr = 46,07; Merck KGaA, SRN)
Fosfátem pufrovaný fyziologický roztok, PBS (pH 7,4; GIBCO, USA)
Hovězí sérový albumin, BSA (Sigma-Aldrich, USA)
Chlorid kademnatý (CdCl_2 ; Mr = 183,32; Sigma-Aldrich, USA)
Inhibitor proteáz a fosfatáz MSSAFE (Sigma-Aldrich, USA)
Kyselina trihydrogenfosforečná (H_3PO_4 ; Mr = 97,99; Sigma-Aldrich, USA)
Monochlorobiman, MCB ($\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_2$; Mr = 226,7; Sigma-Aldrich, USA)
Nanočástice oxidu křemičitého, SiO_2 (Sigma-Aldrich, USA)
Nanočástice oxidu titaničitého P25, TiO_2 P25 (Sigma-Aldrich, USA)
RIPA pufr (Sigma-Aldrich, USA)
Tert-butylhydroperoxid, *t*-BHP ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2$; Mr = 90,12; Sigma-Aldrich, USA)
WST-1 (Roche, Německo)

Chemikálie použité při metodě *Simple Western*

1,4-dithiothreitol, DTT (Protein Simple, USA)
10x vzorkový pufr (Protein Simple, USA)
Biotinylovaný marker (Protein Simple, USA)
Fluorescenční Master Mix (Protein Simple, USA)
Luminol-S (Protein Simple, USA)
Peroxid (Protein Simple, USA)
Primární protilátka králičí ACTIVE[®] JNK (Promega, USA)
Primární protilátka králičí PARP-1 (Cell Signaling, USA)
Primární protilátka králičí β -aktin (Sigma-Aldrich, USA)
Promývací pufr (Protein Simple, USA)
Ředící pufr protilátky (Protein Simple, USA)
Sekundární protilátka značená křenovou peroxidázou králičí (Protein Simple, USA)
Streptavidin-křenová peroxidáza, streptavidin-HRP (Protein Simple, USA)

3.2 Příprava roztoků

Kultivační médium pro buňky SH-SY5Y

Dulbecco's Modified Eagle's Medium F12 1:1 (DMEM-F12) – kultivační médium jsme obohatili 15% (v/v) fetálním bovinním sérem, 2 mM glutaminem, 50 µg/mL penicilinu, 50 µg/mL streptomycinu a 1% neesenciálními aminokyselinami. Pro spektrofotometrická stanovení jsme použili médium bez fenolové červeně.

Roztoky používané během stanovení

Roztok dle Bradfordové (BRR) - 50 mg *Coomassie Brilliant Blue G-250* jsme smíchali s 25 mL 95% ethanolu a s 50 mL 85% H_3PO_4 a doplnili destilovanou vodou na celkový objem 500 mL. Důkladně jsme suspenzi homogenizovali a následně 2x přefiltrovali přes filtr. Roztok byl následně uchován v lednici při 4 °C.

Zásobní roztok BSA (c = 10 mg/mL) – 10 mg BSA jsme smíchali s 1 mL deionizovanou vodou.

Pracovní roztok PBS (1x) – smíchali jsme 1 mL PBS 10x s 9 mL deionizované vody.

Zásobní roztok $CdCl_2$ (c = 20 mM) – 0,37 µg $CdCl_2$ jsme smíchali s 1 mL média.

Zásobní roztok CisPt (c = 1 mM) – 0,30 µg CisPt jsme smíchali s 1 mL média.

Zásobní roztok SiO_2 (c = 100 µg/mL) – 100 µg SiO_2 jsme smíchali s 1 mL média.

Zásobní roztok t-BHP (c = 5,5 M) – 0,49 g t-BHP jsme smíchali s 1 mL média.

Zásobní roztok TiO_2 P25 (c = 100 µg/mL) – 100 µg TiO_2 P25 jsme smíchali s 1 mL média.

Pracovní roztok MCB (c = 240 µM) – alikvot 30 µL zásobního roztoku MCB jsme pipetovali do 1,220 mL pufru PBS.

3.3 Přístroje a laboratorní vybavení

Přístroje:

Analytické váhy ARJ 120-4M (Kern, SRN)

Automatické pipety Finnpipette (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

Biohazard box SafeFAST Elite (Faster, Itálie)

CO₂ inkubátor (PHCbi, Japonsko)

Destičkový spektrofotometr a spektrofluorimetr Spark (Tecan, Rakousko)
Lednice s mrazákem -20 °C (Liebherr, ČR)
Odstředivka Mikro 20 R (Hettich, SRN)
Počítačka buněk (Beckman, USA)
Třepačky, vortexy (Reax top Heidolph, SRN, IKA Švédsko)
Vodní lázeň s termostatem a ultrazvukem (Bandelin Sonorex, SRN)
Výrobník ledu (Evermed, Italy)
Wes (Protein Simple, USA)

Pomůcky:

Filtr (póry 2,7 µm; Whatman, UK)
Kultivační lahve NUNC T75 s filtrem (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
Mikrotitrační destičky 96jamkové, 6jamkové (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
Mikrozkumavky, objem 0,5; 1,5; 2,5 a 5 mL (Eppendorf, SRN)
Skleněné nádobí

Software:

Compass for Wes (Simple Western, USA)
i-control 1.6 (Tecan, Rakousko)
Microsoft Office (Word, Excel; Microsoft, USA)
OriginPro 9.0.0.(Origin Lab, USA)

Buněčná linie:

Neuroblastomová buněčná linie SH-SY5Y

3.4 Kultivace buněk SH-SY5Y

Buněčnou linii SH-SY5Y jsme kultivovali v kultivačním médiu DMEM/F-12 (1:1). Do kultivačních lahví jsme nasazovali 350 tisíc buněk do 10 mL kultivačního média. Buňky jsme umístili do inkubátoru, kde byly kultivovány při 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO₂. Každých 72 hod jsme měnili kultivační médium za čerstvé. Buňky jsme kultivovali do doby, než konfluence dosáhla 70 % a poté jsme buňky pasážovali. Denzitu buněk jsme počítali pomocí počítačky buněk Beckman (USA). Buňky jsme na experiment nasadili do 6jamkových a 96jamkových destiček. Do 6jamkových

destiček jsme nasadili buňky v počtu 500 tisíc na jamku, ve 2 mL média. Buňky jsme inkubovali 6, 24 a 48 hod s vybranými toxiny - CisPt 5 a 50 $\mu\text{mol/L}$, t-BHP 25 $\mu\text{mol/L}$, CdCl_2 25 a 50 $\mu\text{mol/L}$ a nanočásticemi SiO_2 a TiO_2 P25 v koncentraci 100 $\mu\text{g/mL}$. Do 96jamkové destičky jsme nasadili buňky v celkovém počtu 25 tisíc na jamku ve 100 μL média bez fenolové červeně. Buňky jsme inkubovali 6, 24 a 48 hod s vybranými toxiny - CisPt 5 a 50 $\mu\text{mol/L}$, t-BHP 25 $\mu\text{mol/L}$, CdCl_2 25 a 50 $\mu\text{mol/L}$ a nanočásticemi SiO_2 a TiO_2 P25 v koncentraci 100 $\mu\text{g/mL}$.

3.5 Fluorimetrické stanovení koncentrace glutathionu

3.5.1 Princip metody

Principem fluorimetrického stanovení koncentrace GSH je intracelulární vazba fluorescenční sondy monochlorobimanu (MCB) s GSH za vzniku fluorescenčních produktů. Intenzita fluorescence je měřena spektrofluorimetricky ($\lambda_{\text{EX/EM}} = 394/490 \text{ nm}$) a je úměrná koncentraci GSH v buňkách.

3.5.2 Pracovní postup

Buňky v 96jamkové destičce jsme kultivovali dle podkapitoly 3.4. Po uplynutí inkubačního intervalu buněk s látkami jsme si vždy připravili pracovní roztok MCB o koncentraci 240 μM . Následně jsme do každé jamky napipetovali 20 μL pracovního roztoku MCB a měřili změnu fluorescence za 10 min v přístroji Tecan při 37 °C. Intracelulární koncentrace GSH byla následně vyjádřena v procentech vztažených ke kontrolním buňkám (kontrolní buňky = 100 %).

3.6 Stanovení viability buněk – WST-1 test

3.6.1 Princip metody

Principem stanovení viability buněk pomocí WST-1 testu je redukce tetrazoliové soli 4-[3-(4-iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen-disulfonátu na formazan za katalýzy mitochondriálními dehydrogenázami. Celou reakci doprovází barevná změna z růžové na žlutou a množství vzniklého formazanu je přímo úměrné počtu metabolicky aktivních buněk. Množství formazanu je detekováno spektrofotometricky při vlnové délce 440 nm.

3.6.2 Pracovní postup

Buňky v 96jamkové destičce jsme kultivovali dle podkapitoly 3.4. Detekce dehydrogenázové aktivity pomocí WST-1 testu následovalo ihned po fluorimetrické detekci koncentrace GSH. Do příslušných jamek jsme napipetovali 12 μ L činidla WST-1. Po přidání WST-1 jsme změřili absorbanci vzorků v čase 0 a 60 min ve spektrofotometru Tecan při 37 °C a vlnové délce 440 nm. Pro vyhodnocení testu WST-1 jsme naměřené absorbance v čase 0 odečetli od naměřených absorbancí v 60. minutě. Buněčnou viabilitu jsme vyjádřili v procentech vztažených ke kontrolním buňkám (kontrolní buňky = 100 %).

3.7 Lýza buněk pomocí RIPA pufru

3.7.1 Princip metody

Metoda umožňuje izolovat proteiny pomocí RIPA pufru, který narušuje integritu buněčných membrán a je vhodný zejména pro izolaci membránových, jaderných nebo mitochondriálních proteinů. Proteiny během lýzy buněk přechází do lyzačního pufru, jehož nezbytnou součástí jsou inhibitory proteáz a fosfatáz, které zamezí degradaci izolovaných proteinů. Proteiny jsou oddělené centrifugací, kdy rozbité buňky jsou na dně mikrozkuřavky ve formě pelety a proteiny se nacházejí v supernatantu. Aby nedocházelo k degradaci izolovaných proteinů prostřednictvím proteáz, lýza buněk a další práce s izolovanými proteiny je prováděna na ledu.

3.7.2 Pracovní postup

Buňky SH-SY5Y jsme kultivovali v 6jamkové destičce dle podkapitoly 3.4. Z jednotlivých jamek odsáli supernatant do 2mL mikrozkuřavek a centrifugovali (4 °C, 5000g, 5 min). Celá práce probíhala na ledu. Po stočení roztoku v mikrozkuřavkách jsme odpipetovali supernatant. Buňky přisedlé v jamkách destičky jsme omyli 500 μ L sterilním PBS (4 °C) a opět přepipetovali do příslušné mikrozkuřavky na již stočené buňky a centrifugovali (4 °C, 5000g, 5 min). Poté jsme odpipetovali supernatant do odpadu. V následujícím kroku jsme si připravili inhibitory proteáz a fosfatáz MSSAFE naředěné v 500 μ L vody na 40x zředěný roztok. Inhibitor proteáz a fosfatáz jsme smíchali s RIPA pufrem (1 jamka = 10 μ L inhibitoru + 390 μ L RIPA pufru) dle celkového počtu jamek. Z připraveného RIPA pufru s inhibitory jsme odpipetovali

do každé jamky 400 μL a buňky roztokem omyli. Dále jsme roztok přepipetovali do příslušné mikrozkušavky se stočenými buňkami a homogenizovali na vortexu. Takto připravené vzorky jsme umístili na rotátor v lednici a rotovali (4 $^{\circ}\text{C}$, 30 min). Poté jsme vzorky centrifugovali (4 $^{\circ}\text{C}$, 16 000g, 20 min). Z těchto vzorků jsme odsáli supernatant, který obsahoval námi izolované proteiny z buněčné linie SH-SY5Y.

3.8 Stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové

3.8.1 Princip metody

Metoda stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové je založená na kolorimetrickém stanovení celkového obsahu proteinů ve vzorku. Metoda umožňuje detekci i kvantifikaci proteinů. Principem je interakce bazických aminokyselin (Lys, Arg, His) v polypeptidovém řetězci pomocí iontových a hydrofobních vazeb s barvivem *Coomassie Brilliant Blue G-250* v kyselém prostředí. Reakci doprovází změna barvy roztoku z červenohnědé na modrofialovou, která je způsobená posunem absorpčního maxima z 465 nm na 610 nm. Nejvyšší rozdíl absorpčních maxim je ale při vlnové délce 595 nm, proto se tato vlnová délka používá pro měření spektrofotometrem.

3.8.2 Pracovní postup

Připravené činidlo dle Bradfordové (BRR) jsme vytemperovali na laboratorní teplotu ve tmě. Jako kalibrační protein byl použit hovězí sérový albumin (*bovine serum albumine*, BSA). Připravili jsme si zásobní roztok BSA, který jsme naředili na koncentraci 1 mg/mL odebráním 200 μL zásobního roztoku BSA a doplněním 1800 μL deionizované vody (DV). Z takto připraveného roztoku jsme připravili kalibrační řadu o koncentracích 100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$. Z roztoku o koncentraci 100 $\mu\text{g/mL}$ jsme si připravili zbytek kalibrační řady o koncentracích 10, 50, 70 $\mu\text{g/mL}$.

Proteinové lyzáty z SH-SY5Y buněk jsme si naředili 50x na celkový objem 100 μL . Do 96jamkové mikrotitrační destičky jsme vždy pipetovali v tripletu 10 μL kalibračního standardu nebo vzorku a na závěr jsme přidali 300 μL BRR. Následně jsme připravenou destičku vložili do přístroje Tecan Spark bez víčka. Po 10 min inkubace s činidlem BRR jsme změřili absorbanci při vlnové délce 595 nm a ze změřených dat jsme vyhodnocovali koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích.

3.9 Stanovení vybraných proteinů metodou *Simple Western*

3.9.1 Princip metody

Princip stanovení proteinů metodou *Simple Western* kombinuje *Western Blotting* a elektroforézu. Příklad umožňuje semikvantitativní detekci proteinů od 2-440 kDa. Analýza probíhá v kapilárách, kde se jednotlivé proteiny rozdělí podle molekulové hmotnosti a následně imobilizují UV zářením. Po imobilizaci se naváží primární protilátky, na které se naváží sekundární protilátky značené křenovou peroxidázou. Chemiluminiscenční substrát je za katalýzy křenovou peroxidázou přeměněn na detekovatelný produkt. Chemiluminiscenční signál je zaznamenán CCD kamerou. Výsledky jsou prezentovány ve formě grafu i ve formě blotovacího schématu.

3.9.2 Pracovní postup

Na stanovení exprese proteinů metodou *Simple Western* jsme použili proteinové lyzáty buněk SH-SY5Y z j6jamkových destiček připravených dle podkapitoly 3.4. Jako první jsme si připravili roztoky dle postupu od výrobce. Roztok 1,4-dithiothreitolu (DTT) jsme si připravili přidáním 40 μL DV, proto výsledná koncentrace byla 400 mM. Druhým roztokem od výrobce byl fluorescenční master mix, který jsme připravili přidáním 20 μL vzorkovacího pufru a 20 μL připraveného roztoku DTT o výsledné koncentraci 400 mM. Posledním roztokem od výrobce je biotinylovaný marker, který jsme připravili naředěním s 40 μL DV.

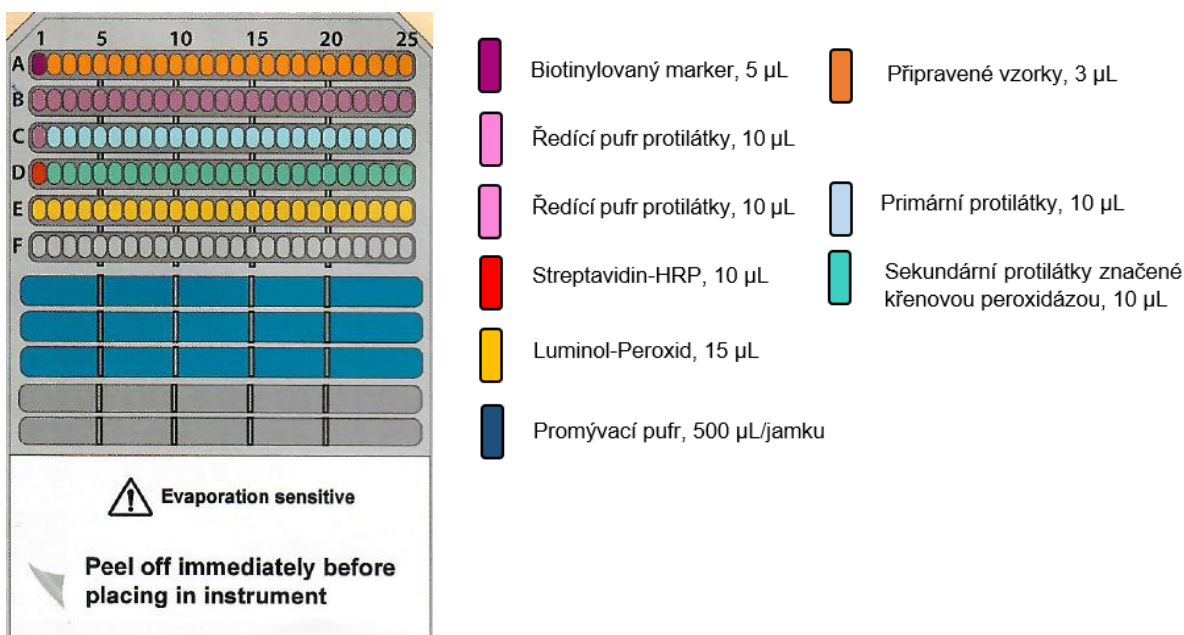
Ve druhém kroku jsme si připravili vzorky a z důvodu zábrany degradace proteinů, probíhala práce na ledu. Do jedné jamky jsme potřebovali 3 μL každého vzorku, proto jsme si dle počtu použitých protilátek naředili vzorky na výslednou koncentraci 0,4 g/mL a jako ředicí roztok jsme použili 1x vzorkovací pufr. Ke každému vzorku jsme přidali 10 μL fluorescenčního mixu a promíchali na vortexu. V dalším kroku jsme potřebovali vzorky denaturovat, proto jsme je umístili na 5 min do termobloku vyhřátého na 95 °C a následně promíchali na vortexu.

Ve třetím kroku jsme si naředili primární protilátky (tab. 9). Použily jsme primární protilátky β -aktin, JNK kinázu a PARP-1. Každé protilátky jsme potřebovali do jedné jamky 10 μL . Jako referenční gen jsme použili β -aktin. Následně jsme začali pipetovat dle schématu do destičky (obr. 11). Před vlastní analýzou jsme celou destičku se vzorky centrifugovali (2500g, 5 min), abychom odstranili případné bubliny. Následně jsme destičku bez víka vložili na držák destičky v přístroji *Wes*, vložili

kapiláry a nastavili parametry v *Compass software* na samotnou analýzu a spustili jsme ji.

Tab. 9: Použité primární protilátky u metody *Simple Western*.

Primární protilátka	Původ	Molekulová hmotnost detekovaného proteinu	Ředění
β-aktin	Králík	43,7 kDa	1 : 500
ACTIVE® JNK	Králík	46-54 kDa	1 : 50
PARP-1	Králík	113,4 kDa	1 : 100



Obr. 12: Schéma destičky do přístroje Wes.

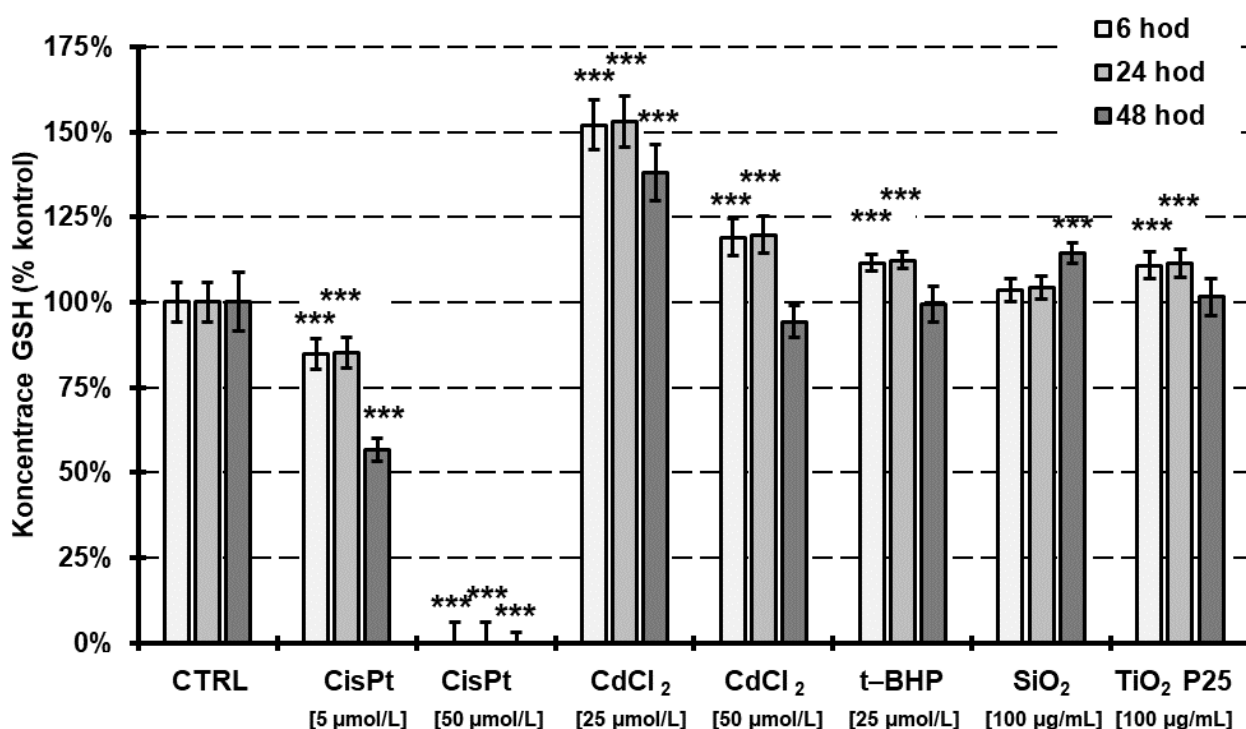
3.10 Statistická analýza naměřených dat

Výsledky analýz jsou vyjadřovány jako průměr \pm SD. Výsledky byly podrobeny statistické analýze, při zvolené hladině významnosti: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. Výsledky testů WST-1 a MCB pro posouzení toxického působení látek na buňky byly analyzovány jednorozměrnou analýzou rozptylu (jednorozměrná ANOVA) s následným Tukey post-testem (OriginPro 9.0.0., USA).

4. VÝSLEDKY

4.1 Fluorimetrické stanovení koncentrace glutathionu

Ke fluorimetrickému stanovení koncentrace GSH jsme použili SH-SY5Y buněčnou linii, kterou jsme kultivovali dle podkapitoly 3.4. Intracelulární koncentraci GSH jsme stanovovali u buněk po 6, 24 a 48 hod inkubace toxinů s CisPt, CdCl₂, t-BHP a nanočástic SiO₂ a TiO₂ P25 (graf 1).



Graf 1: Stanovení koncentrace glutathionu. Buňky SH-SY5Y; inkubace 6, 24, 48 hod; cisplatina (CisPt); *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP); kontrolní buňky (CTRL); absorbance ($\lambda_{\text{Ex/EM}} = 394/490$ nm; 37 °C); %průměr ± %SD; n = 6-12; ***, $p < 0,001$; originální data - příloha 1.

Snížení koncentrace GSH v porovnání s kontrolními buňkami (CTRL) pozorujeme po působení 5 µmol/L CisPt. Pokud zhodnotíme pokles GSH v závislosti na čase po působení 5 µmol/L CisPt, koncentrace GSH se po 6 hod (84,7±4,4 %) a 24 hod inkubace (85,2±4,5 %) téměř nezměnila. Naopak po 48 hod inkubace s 5 µmol/L CisPt jsme zaznamenali snížení koncentrace GSH téměř na polovinu (56,8±3,4 %) oproti CTRL. Nejvýraznější snížení GSH po působení všech toxinů jsme detekovali u 50 µmol/L CisPt, kdy došlo k úplné depleci GSH.

Výrazné zvýšení koncentrace GSH v porovnání s CTRL jsme detekovali po 6 hod inkubace buněk s 25 µmol/L CdCl₂ po 6 hod (152,1±7,4 %) a 24 hod inkubace

(153,0±7,4 %). Po 48 hod inkubace buněk s 25 µmol/L CdCl₂ se koncentrace GSH ve srovnání s kratšími inkubačními intervaly snížila. Buňky ovlivněné vyšší koncentrací CdCl₂ (50 µmol/L) měly vyšší intracelulární koncentraci GSH ve srovnání s CTRL v inkubačních intervalech 6 hod (119,1±5,5 %) a 24 hod (119,8±5,5 %). Pokud porovnáme buňky ovlivněné 25 µmol/L a 50 µmol/L CdCl₂ ve všech časových intervalech, koncentrace GSH je u méně koncentrovaného toxinu vyšší. Koncentrace GSH se po působení 25 µmol/L t-BHP nepatrně zvýšila po inkubačním intervalu 6 hod (111,5±2,4 %) a 24 hod (112,2±2,4 %), ale po 48 hod inkubace byla koncentrace GSH srovnatelná s koncentrací GSH u CTRL (99,5±5,2 %). Působení nanočástic nezpůsobilo přílišné rozdíly v koncentraci GSH oproti CTRL. Lehké zvýšení pozorujeme po působení nanočástic SiO₂ 100 µg/mL po 48 hod inkubace (114,4±2,9 %), které je srovnatelné se zvýšením koncentrace GSH po inkubaci se 100 µg/mL TiO₂ P25 6 hod (110,7±3,9 %) a 24 hod (111,4±3,9 %).

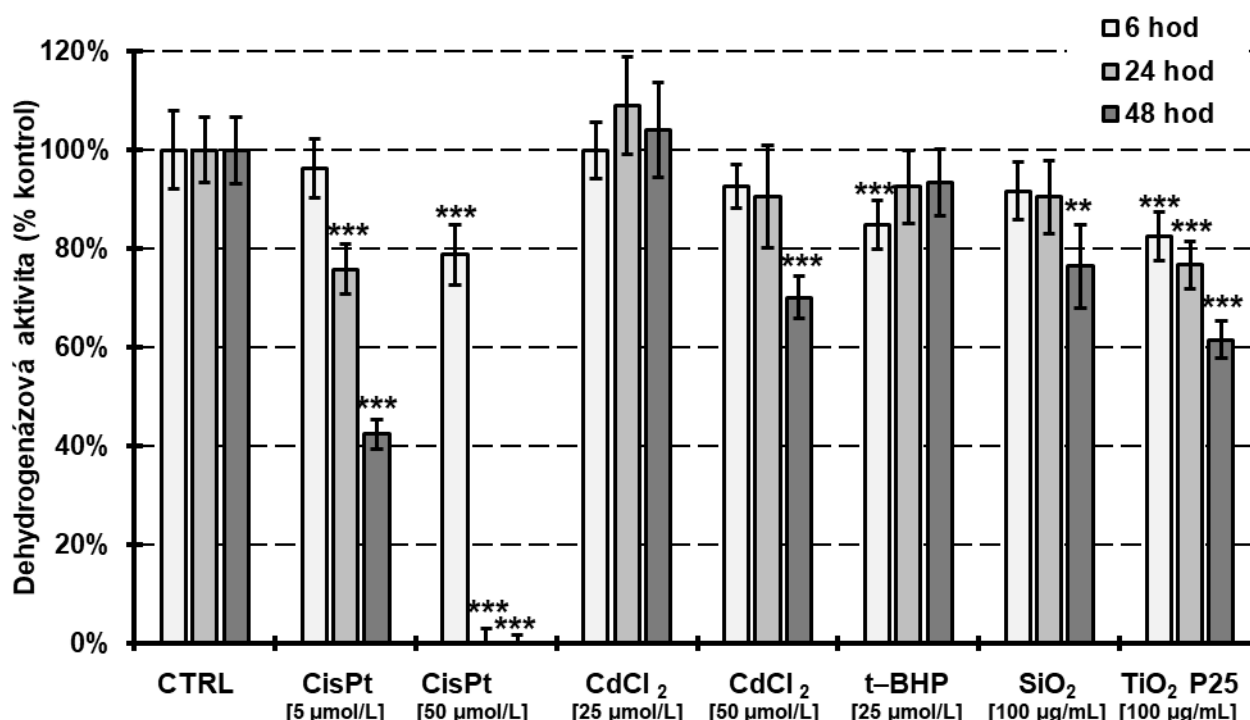
4.2 Stanovení dehydrogenázové aktivity buněk – WST-1 test

Stanovení dehydrogenázové aktivity buněk jsme provedli pomocí WST-1 testu. Buněčnou linii SH-SY5Y jsme kultivovali dle podkapitoly 3.4. Dehydrogenázovou aktivitu buněk jsme detekovali po inkubaci 6, 24 a 48 hod s vybranými toxiny a nanočásticemi (graf 2).

Snížení dehydrogenázové aktivity ve srovnání s CTRL pozorujeme u většiny toxinů mimo působení 25 µmol/L CdCl₂ po 24 a 48 hod, u kterého jsme zaznamenali lehké zvýšení dehydrogenázové aktivity. U buněk inkubovaných s 5 µmol/L CisPt jsme zaznamenali ve všech inkubačních intervalech snížení dehydrogenázové aktivity. Toto snížení dehydrogenázové aktivity je závislé na daném časovém intervalu, kde jsme zaznamenali signifikantní pokles dehydrogenázové aktivity po 48 hod inkubace buněk s toxinem (42,4±3,0 %). Dehydrogenázovou aktivitu buněk po působení 50 µmol/L CisPt jsme detekovali pouze po inkubačním intervalu 6 hod, kde jsme zaznamenali snížení oproti CTRL (78,7±6,0 %). Po inkubačním intervalu 24 hod a 48 hod s 50 mol/L CisPt jsme detekovali depleci dehydrogenázové aktivity.

Výraznější snížení dehydrogenázové aktivity buněk jsme zaznamenali u inkubačního intervalu 48 hod po působení 50 µmol/L CdCl₂ (70,1±4,3 %), ale kratší působení tohoto toxinu nezpůsobilo výrazné změny. Po působení t-BHP o koncentraci 25 µmol/L nastalo snížení dehydrogenázové aktivity po 6 hod inkubace (84,9±4,9 %).

Po delších inkubačních intervalech 25 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP je dehydrogenázová aktivita ve srovnání s CTRL mírně snižena. Působení nanočástic TiO_2 P25 ($82,4 \pm 4,9$ %) způsobuje výraznější snížení dehydrogenázové aktivity ve srovnání s působením nanočástic SiO_2 ($91,6 \pm 5,9$ %) už po 6 hod inkubace. Snížení dehydrogenázové aktivity po působení TiO_2 P25 je závislé na daném časovém intervalu, kde jsme signifikantní pokles dehydrogenázové aktivity zaznamenali po 48 hod inkubace buněk s těmito nanočásticemi ($61,5 \pm 3,8$ %).

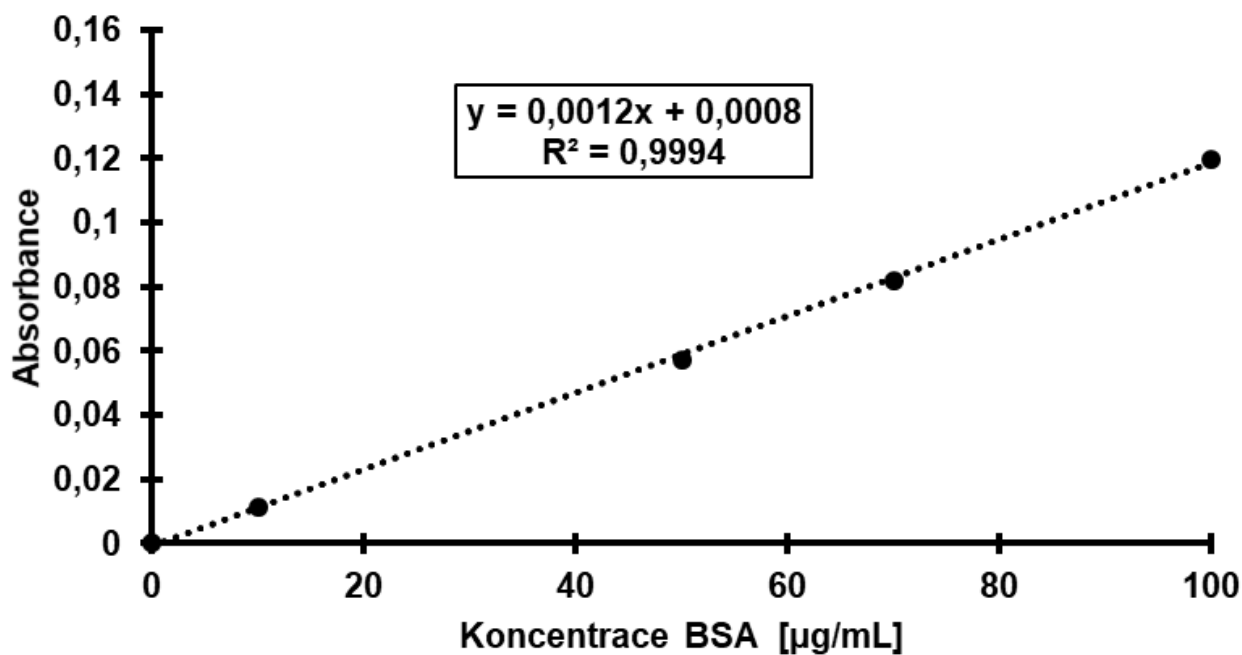


Graf 2: Stanovení dehydrogenázové aktivity buněk WST-1 testem. Buňky SH-SY5Y; inkubace 6, 24, 48 hod; cisplatina (CisPt); *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP); kontrolní buňky (CTRL); absorbance (440 nm, 37 °C); %průměr \pm %SD; n = 6-12; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; originální data - příloha 2.

4.3 Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové

Ke stanovení koncentrace proteinů jsme použili buněčnou linii SH-SY5Y kultivovanou dle podmínek uvedených v podkapitole 3.4. U všech vzorků jsme po uplynulé inkubaci provedli lýzu buněk pomocí RIPA pufru a následně jsme stanovili koncentraci všech proteinů pomocí metody dle Bradfordové. Ke stanovení je nutné vycházet z kalibrační křivky BSA, ze které získáme rovnici regrese. Rovnice regrese slouží k výpočtům koncentrací proteinů. Uvádím vzorovou kalibrační křivku, kterou jsme použili pro vyhodnocení působení toxinů a nanočástic po 6 hod (graf 3). Hodnoty

absorbance jsou uvedené jako průměr hodnot po odečtení pozadí. Rovnice regrese pro 24hod interval byla $y = 0,0015x + 0,0031$ a pro 48hod interval $y = 0,00108x + 0,00009$ (originální data - příloha 3).



Graf 3: Kalibrační řada BSA pro 6 hod inkubaci. Absorbance (595 nm, 30 °C, t = 10 min); n = 3; hovězí sérový albumin (BSA); originální data - příloha 3.

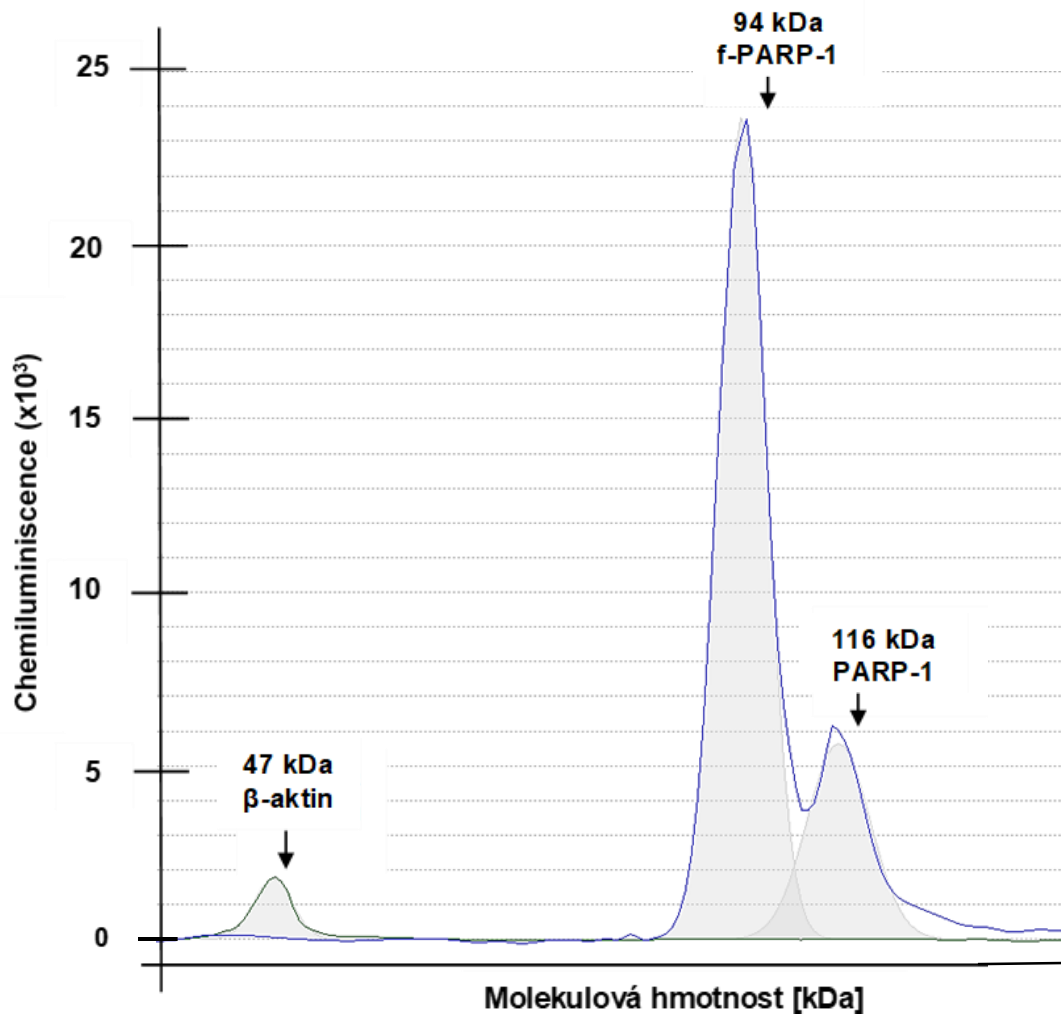
Vypočítané koncentrace proteinů v jednotlivých buněčných lyzátech po inkubaci 6, 24 a 48 hod jsou uvedené jako průměr hodnot po odečtení pozadí \pm směrodatná odchylka (tab. 10).

Tab. 10: Stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové. Buňky SH-SY5Y, inkubace 6, 24, 48 hod; cisplatina (CisPt), *tert*-butylhydroperoxid (*t*-BHP); kontrolní buňky (CTRL); lýza buněk pomocí RIPA pufru; absorbance (595 nm, 30 °C, t = 10 min); Průměr ± SD; n = 3-4.

Toxiny [koncentrace]	Koncentrace proteinů [μg/mL]		
	6 hod	24 hod	48 hod
CTRL [0 μmol/L]	836 ± 91	1829 ± 64	1346 ± 30
CisPt [5 μmol/L]	457 ± 192	1478 ± 59	985 ± 31
CisPt [50 μmol/L]	749 ± 127	1573 ± 42	371 ± 68
CdCl ₂ [25 μmol/L]	661 ± 103	1882 ± 21	900 ± 70
CdCl ₂ [50 μmol/L]	586 ± 15	2070 ± 23	1016 ± 33
<i>t</i> -BHP [25 μmol/L]	1144 ± 21	1790 ± 75	1034 ± 61
SiO ₂ [100 μg/mL]	1105 ± 47	1783 ± 66	525 ± 149
TiO ₂ P25 [100 μg/mL]	1038 ± 112	1443 ± 71	960 ± 109

4.4 Stanovení změn exprese proteinů pomocí *Simple Western*

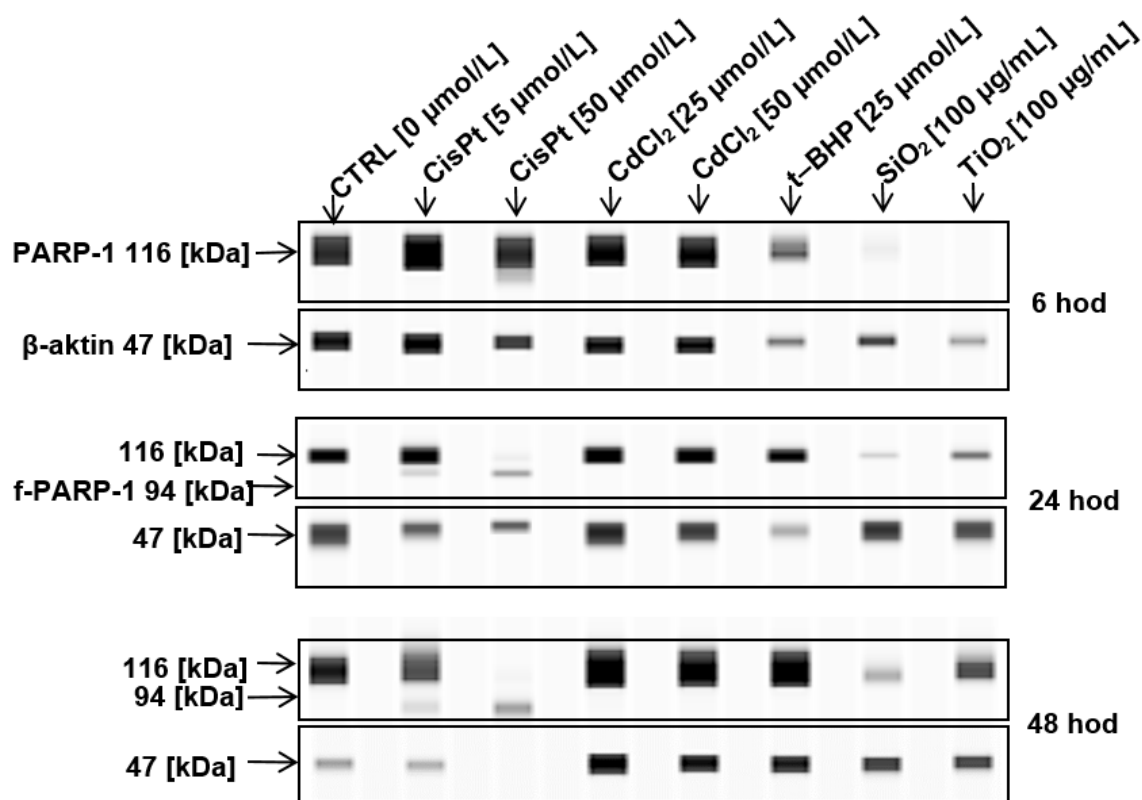
Změny exprese proteinů PARP-1 a JNK kinázy jsme detekovali pomocí přístroje *Wes*. K detekci jsme ještě zahrnuli fragment PARP-1 (f-PARP-1), který se objevuje v důsledku apoptotické aktivace kaspázy-3. Vycházeli jsme ze stanovených koncentrací proteinů metodou dle Bradfordové (tab. 10). Stanovili jsme i změny exprese fosforylované JNK kinázy, která se účastní různých buněčných mechanismů, ale během daných podmínek fosforylovaná JNK kináza nebyla detekovaná. Hodnotili jsme expresi proteinu PARP-1 a f-PARP-1 u SH-SY5Y buněk po inkubaci s vybranými toxiny a nanočásticemi po 6, 24 a 48 hod. Výsledky stanovení pomocí *Simple Western* jsou semikvantitativní. Kvantitativní vyhodnocení vychází ze záznamu, který je podobný záznamu z elektroforézy, a na kterém jsou zaznamenány jednotlivé píky odpovídající stanovovaným proteinům dle jejich molekulové hmotnosti a použitých primárních protilátek (obr. 12). Kvalitativní vyhodnocení je formě blot záznamu, který je obdobný jako u metody *Western Blotting* (obr. 13). My jsme výsledky semikvantitativního hodnocení uvedli ve formě poměru plochy píku proteinu PARP-1 k ploše píku referenčního genu β -aktinu (tab. 11). Výška píku musí být alespoň 1000 jednotek, abychom daný signál mohli vyhodnotit.



Obr. 13: Expres proteinů PARP-1, f-PARP-1 a β -aktinu. Buňky SH-SY5Y, inkubace 48 hod; 50 $\mu\text{mol/L}$ cisplatina; lýza buněk pomocí RIPA pufru.

Výsledné plochy píku proteinu PARP-1 jsme vyjádřili ve formě poměru k ploše píku referenčního genu β -aktinu a po působení 6 hod s toxiny v porovnání s CTRL jsou mírně zvýšené. Největší plochu píku proteinu PARP-1 jsme detekovali po 6 hod inkubace s 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt (2,91). Naopak po působení nanočástic SiO_2 se plocha píku PARP-1 po 6 hod inkubace snížila téměř trojnásobně (0,50) v porovnání s CTRL (1,43). Po 6 hod inkubace s vybranými látkami nebyl f-PARP-1 detekovaný. Po působení nanočástic TiO_2 P25 jsme protein PARP-1, ani f-PARP-1 nedetekovali.

Po inkubačním intervalu 24 hod jsme protein PARP-1 detekovali po působení všech vybraných toxinů i nanočástic. V porovnání s CTRL se exprese proteinu PARP-1 výrazně zvýšila po 24 hod inkubace s 5 $\mu\text{mol/L}$ CisPt (5,43) a 25 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP (5,47). Mírné zvýšení exprese proteinu PARP-1 v porovnání s CTRL nastalo po 24 hod inkubace s 25 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 (3,43) a 50 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 (3,46).



Obr. 14: Záznam proteinů pomocí metody *Simple Western*. Buňky SH-SY5Y; inkubace 6, 24, 48 hod; cisplatina (CisPt), *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP), kontrolní buňky (CTRL); lýza buněk pomocí RIPA pufru.

Naopak snížení exprese proteinu PARP-1 v porovnání s CTRL jsme zaznamenali po 24 hod inkubace s nanočásticemi SiO₂ (0,31) a nanočásticemi TiO₂ P25 (0,85). Dále jsme v inkubačním intervalu 24 hod detekovali f-PARP-1 po působení CisPt o koncentraci 5 μmol/L (0,54) a 50 μmol/L (0,45). Exprese f-PARP-1 je po působení obou koncentrací totožného toxinu srovnatelná.

Po 48 hod inkubace jsme opět detekovali protein PARP-1 po působení všech vybraných toxinů a nanočástic. V porovnání s CTRL je zvýšená exprese proteinu PARP-1 po 48 hod inkubace pouze po působení 50 μmol/L CisPt (16,74), a to více než trojnásobně. Po působení ostatních vybraných toxinů a nanočástic jsme detekovali v porovnání s CTRL sníženou expresi proteinu PARP-1 po 48 hod inkubace, přičemž nejnižší expresi proteinu PARP-1 jsme zaznamenali po působení nanočástic SiO₂ (0,67).

Tab. 11: Expres proteinů PARP-1, f-PARP-1 metodou *Simple Western*. Buňky SH-SY5Y; inkubace 6, 24, 48 hod; cisplatina (CisPt), *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP), kontrolní buňky (CTRL); lýza buněk pomocí RIPA pufru; pod limitem detekce (< LOD, výška píku nižší než 1000 chemiluminescenčních jednotek).

Toxiny [koncentrace]	Plocha píku stanoveného proteinu / plocha píku β -actinu					
	6 hod		24 hod		48 hod	
	PARP-1	f-PARP-1	PARP-1	f-PARP-1	PARP-1	f-PARP-1
CTRL [0 μ mol/L]	1,43	< LOD	2,47	< LOD	4,93	< LOD
CisPt [5 μ mol/L]	2,64	< LOD	5,43	0,54	4,28	0,64
CisPt [50 μ mol/L]	2,91	< LOD	0,76	0,45	16,74	5,30
CdCl ₂ [25 μ mol/L]	2,05	< LOD	3,43	< LOD	2,61	< LOD
CdCl ₂ [50 μ mol/L]	2,03	< LOD	3,46	< LOD	2,67	< LOD
t-BHP [25 μ mol/L]	2,19	< LOD	5,74	< LOD	3,26	< LOD
SiO ₂ [100 μ g/mL]	0,50	< LOD	0,31	< LOD	0,67	< LOD
TiO ₂ P25 [100 μ g/mL]	< LOD	< LOD	0,85	< LOD	1,67	< LOD

Expres proteinu PARP-1 je po působení 48 hod 25 μ mol/L CdCl₂ (2,61) i 50 μ mol/L CdCl₂ (2,67) srovnatelná. Dále jsme po inkubačním intervalu 48 hod detekovali f-PARP-1, a to opět po působení 5 a 50 μ mol/L CisPt. Po působení 5 μ mol/L CisPt 48 hod je expres f-PARP-1 mírně zvýšená (0,64) ve srovnání s inkubací 24 hod (0,54), ale po 48 hod inkubace s 50 μ mol/L CisPt je expres f-PARP-1 pětinasobně zvýšená (5,30) ve srovnání s inkubací 24 hod (0,45).

5. Diskuze

Buněčné poškození vzniká důsledkem fyzikálních, chemických a biologických vlivů. Míra buněčného poškození může následně vést k buněčné smrti. Rozlišujeme několik základních druhů buněčné smrti a mezi nejvíce dosud prostudované můžeme zařadit apoptózu, autofagii a nekrózu. Každý druh buněčné smrti je specifický a je doprovázený charakteristickými morfologickými změnami (Chen Q. *et al*, 2018).

Apoptóza patří mezi programované buněčné smrti. Fyziologicky se objevuje při embryonálním vývoji, spermatogenezi nebo při destrukci nádorových buněk (Snaha C. *et al*, 2010). Apoptóza je aktivovaná vnější a vnitřní signální dráhou, které se vzájemně doplňují. Iniciátorem apoptózy může být metabolický rozvrat buňky, nedostatek živin nebo zvýšená produkce volných radikálů (Koubek K., 2010).

V naší práci jsme se zaměřili na detekci buněčného poškození a změn v expresi některých proteinů po působení vybraných toxinů a nanočástic. Jako testované látky jsme zvolili zástupce různých druhů toxinů a nanočástic. Zástupcem kovů je CisPt, která je typickým induktorem apoptózy a zároveň je účinným chemoterapeutickým lékem. Toxicita kovů je spojena s poruchou regulace hospodaření v organismu s kovy, protože jsou důležitou součástí fungování buněčných mechanismů. Mezi jejich specifické vlastnosti patří redoxní aktivita či reaktivita vůči substrátům. Jejich intracelulární dostupnost je však přísně regulovaná a nerovnováha koncentrací kovů vede k patologickým poruchám, mezi které řadíme např.: karcinogenní onemocnění. Expozicí CisPt dochází k řadě vedlejších účinků, mezi které patří nefrotoxicita, ototoxicita a neurotoxicita (Staff N. P. *et al*, 2019; Florea A.-M. *et al*, 2011). Druhým zástupcem kovů testovaným v naší práci je CdCl₂, které patří mezi těžké kovy, se kterými se setkáváme expozicí z životního prostředí, a může mít karcinogenní vlastnosti. Toxicita CdCl₂ spočívá v možné indukci ROS, které mohou způsobit apoptotickou smrt buněk. Škodlivé účinky CdCl₂ mají vliv na řadu orgánů včetně plic, ledvin, jater a nervové soustavy (Pak E. J. *et al*, 2014). Třetím zvoleným toxinem je peroxid t-BHP, který má mutagenní účinky. Toxicita spočívá v indukci produkce ROS (Rashid K. *et al*, 2013). Z nanočástic jsme zvolili TiO₂ P25 a SiO₂. Nanočástice TiO₂ P25 jsou běžně používány v kosmetice nebo léčivech, mají však potenciálně toxický účinek (Song B., Zhou T. *et al*, 2016). Nanočástice SiO₂ pak mohou indukovat apoptózu prostřednictvím proteinu p53 (Sharma N. *et al*, 2020).

Většina toxinů a nanočástic indukuje tvorbu ROS, která může vést k poškození mnoha orgánových soustav. (Ruffels J. *et al*, 2004). My jsme si vybrali testování toxinů na nervových buňkách, konkrétně na neuroblastomových buňkách SH-SY5Y.

Prvním cílem diplomové práce bylo charakterizovat buněčné poškození SH-SY5Y buněčné linie po působení vybraných toxinů a nanočástic. Pro studium buněčného poškození *in vitro* jsme zvolili fluorimetrické stanovení koncentrace GSH a stanovení dehydrogenázové aktivity WST-1 testem.

Koncentrace toxinů jsme zvolili: 5 a 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt, 25 a 50 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ a 25 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP. Zvolené koncentrace jsou běžně používané, protože dle literatury toxiny o koncentraci do 50 $\mu\text{mol/L}$ ověřeně indukují apoptózu v rakovinných buňkách (Frankfurt O. S. *et al*, 2003). Koncentrace nanočástic 100 $\mu\text{g/mL}$, kterou jsme zvolili v naší práci, koresponduje s pracemi ostatních autorů (Tokgun O. *et al*, 2015). Buněčné poškození jsme také charakterizovali v závislosti na časových intervalech, které jsme zvolili 6 hod, 24 hod a 48 hod.

Ve studii Altun *et al.* (2010) autoři naměřili snížení koncentrace GSH po 24 hod inkubace buněk SH-SY5Y s 7,5 $\mu\text{mol/L}$ CisPt a koncentraci GSH vypočetli odečtením koncentrace změřeného GSH od koncentrace celkového GSH s následným přepočtením na obsah bílkovin v buňkách. Tyto výsledky se shodují s výsledky z našeho experimentu, kde jsme detekovali snížení koncentrace GSH po 24 hod inkubace s 5 $\mu\text{mol/L}$ CisPt. Dle studie Mahmoudinasab *et al.* (2018) autoři porovnávali relativní expresi genů glutathion-S-transferázy P1 po 24 hod inkubace s 4 $\mu\text{g/mL}$ CisPt metodou PCR. Výsledkem studie Mahmoudinasab *et al.* (2018) je snížení exprese genů glutathion-S-transferázy P1 v porovnání s kontrolními buňkami, což asociuje s našimi výsledky snížení koncentrace GSH po 24 hod inkubace s 5 $\mu\text{mol/L}$ CisPt. Autoři Lawal *et al.* (2010) ve své studii stanovovali GSH peroxidázovou aktivitu pomocí GSH peroxidázového kitu po 24 hod inkubaci s 10 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ na buňkách jaterního karcinomu, embryonálních ledvinných buňkách a na astrocytomálních buňkách lidského mozku. Ve všech buněčných liniích změřili pokles GSH peroxidázové aktivity po 24hod působení 10 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ ve srovnání s kontrolními buňkami, což neodpovídá výsledkům v našem experimentu.

Další metodou, kterou jsme stanovovali buněčné poškození v buňkách SH-SY5Y, je stanovení dehydrogenázové aktivity pomocí WST-1 testu. Dehydrogenázová aktivita po 24 hod inkubace s 5 $\mu\text{mol/L}$ CisPt je dle našich výsledků 75,8 \pm 5,1 %. Ostatní autoři stanovovali pokles dehydrogenázové aktivity použitím MTT testu, který

využívá přeměnu 3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-difenylnitrotetrazolium bromidu na MTT-formazan za katalýzy sukcinát dehydrogenázy (Chacon E. *et al*, 1997). Autoři Altun *et al.* (2010) stanovovali dehydrogenázovou aktivitu po 24 hod inkubace s 5 µg/mL CisPt u buněk SH-SY5Y pomocí MTT testu a detekovali snížení na 63 % ve srovnání s kontrolními buňkami (= 100 %). Výsledky v našem experimentu jsou obdobné, změřili jsme dehydrogenázovou aktivitu 75,8±5,1 % po 24 hod inkubace s 5 µmol/L CisPt. Dalším použitým obdobným testem je MTS test, který stanovuje pokles dehydrogenázové aktivity za přeměny 3-[4,5, dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-karboxymethoxyfenyl]-2-[4-sulfofenyl]-2H-tetrazolia na MTS-formazan (Luca De A. *et al*, 2019). Dle autorů Luca *et al.* (2019), kteří stanovovali dehydrogenázovou aktivitu MTS testem, je dehydrogenázová aktivita buněk po 24 hod inkubace s 5 µmol/L CisPt přibližně 35 % ve srovnání s kontrolními buňkami (= 100 %). Pokud porovnáme výsledek autorů Luca *et al.* (2019) s našimi výsledky po 24 hod inkubace s 5 µmol/L CisPt, naměřili dehydrogenázovou aktivitu o více než polovinu nižší, než jsme naměřili v našem experimentu.

Delší působení 5 µmol/L CisPt na buňky SH-SY5Y jsme porovnávali se studií autorů Li *et al.* (2018), kde viabilitu buněk stanovili pomocí WST-8 testu. Princip testu je založený na přeměně [2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolia] na oranžový formazan. Dobu inkubace zvolili 24-72 hod. Výslednou dehydrogenázovou aktivitu buněk vyjádřili jako průměr z naměřených hodnot vztažených ke kontrolním buňkám (= 100 %) a odpovídá 65 %. Pokud výsledek experimentu autorů Li *et al.* (2018) porovnáme s inkubací 48 hod 5 µmol/L CisPt v našem experimentu, zjistíme, že jsme naměřili nižší dehydrogenázovou aktivitu.

Působení 50 µmol/L CisPt jsme srovnávali se studií autorů Donzeli *et al.* (2004), kde testovali viabilitu pomocí MTT testu po inkubaci 24 hod s 50 µmol/L CisPt. Dle výsledků byla viabilita po 24 hod inkubace 0 %, což je shodné s naším experimentem. Ve studii autorů Gao *et al.* (2019) stanovovali dehydrogenázovou aktivitu MTT testem po 24 hod inkubace s 40 µmol/L CisPt a dehydrogenázová aktivita odpovídala přibližně 30 % (Gao J. *et al*, 2019). Výsledek autorů Gao *et al.* (2019) je odlišný od našeho stanovení dehydrogenázové aktivity po 24 hod inkubace s 50 µmol/L CisPt.

Dle studie autorů Kim *et al.* (2005), ve které prováděli MTT test, je po 12 hod inkubace s 25 µmol/L CdCl₂ dehydrogenázová aktivita 55 %. Výsledek studie autorů Kim *et al.* (2005) je výrazně odlišný v porovnání s naším experimentem, kde jsme naměřili dehydrogenázovou aktivitu po 6 hod inkubace s 20 µmol/L CdCl₂

téměř 100 %. Autoři Oh *et al.* (2009) stanovovali dehydrogenázovou aktivitu také MTT testem, kde po 13 hod inkubace s 10 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 je dle jejich výsledků dehydrogenázová aktivita téměř 60 %. V našem experimentu jsme změřili dehydrogenázovou aktivitu po 6 hod inkubace s 25 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 téměř 100 %, což je výrazně odlišný výsledek. Ve studii autorů Kim *et al.* (2005) je dehydrogenázová aktivita stanovena MTT testem. Po 12 hod inkubace s 50 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 je dehydrogenázová aktivita 25 %. V našem experimentu jsme naměřili odlišné výsledky dehydrogenázové aktivity po inkubaci 6 hod s 50 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 ($92,6 \pm 4,5$ %).

Působení t-BHP studovali autoři Huang *et al.* (2019) na buňkách myších cerebrokortikálních neuronů pomocí MTT testu. Použili 20 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP a inkubační interval 24 hod. Dle jejich studie je dehydrogenázová aktivita přibližně 25 %. V našem experimentu je odlišná dehydrogenázová aktivita po inkubaci 24 hod s 25 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP, $92,5 \pm 7,4$ %.

Dle těchto výsledků je patrné, že námi zvolené toxiny způsobují buněčné poškození. Monitorování změn exprese proteinů nám umožňuje zhodnocení buněčného poškození, bez použití mikroskopických metod. My jsme se rozhodli v naší diplomové práci sledovat změnu proteinu PARP-1, který je nezbytný pro průběh apoptotické smrti buněk. Během apoptózy je PARP-1 štěpen kaspázami na dva fragmenty, což způsobí jeho inaktivaci a umožní správnou funkci apoptotického aparátu. Z tohoto důvodu jsme sledovali i změnu f-PARP-1 (Green A. R. *et al.*, 2015).

Druhým cílem diplomové práce je stanovení změny exprese proteinu PARP-1 po inkubaci s vybranými látkami pomocí přístroje *Wes*.

Ve studii autorů Donzeli *et al.* (2004) je protein PARP-1 stanovovaný metodou *immunoblotting* v časových intervalech 6, 16 a 24 hod. Autoři protein PARP-1 detekovali od inkubačního intervalu 6 hod s 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt a od časového intervalu 16 hod detekovali f-PARP-1, který přetrvával až do 24 hod inkubace. Lze říci, že výsledky autorů Donzeli *et al.* (2004) jsou shodné s našimi výsledky, kdy jsme detekovali protein PARP-1 po 6 hod i 24 hod inkubace s 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt a f-PARP-1 jsme detekovali pouze po 24 hod inkubace s 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt. Dle studie autorů Santin *et al.* (2013) je f-PARP-1 detekovaný jen při inkubaci 48 hod s 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt, ale při kratších inkubačních intervalech je patrný pouze nefragmentovaný protein PARP-1. Výsledky autorů Santin *et al.* (2013) nejsou shodné s našimi výsledky, kdy my jsme f-PARP-1 detekovali už po 24 hod inkubace s 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt.

Pokud porovnáme působení podobné koncentrace CisPt (30 $\mu\text{mol/L}$) na působení He-La buněk, fragmentovaný protein PARP-1 detekovali autoři Wang *et al.* (2000) od inkubace 14 hod. Autoři Wu *et al.* (2021) detekovali protein PARP-1 spolu s f-PARP-1 v ledvinných buňkách po 16 hod inkubace s 20 $\mu\text{mol/L}$ CisPt. Dle studie Xu *et al.* (2014) autoři detekovali protein PARP-1 i f-PARP-1 u buněčné linie adenokarcinomu žaludku po 24 hod inkubace s 5 $\mu\text{g/mL}$ CisPt. V jiném experimentu autoři Singh *et al.* (2018) detekovali protein PARP-1 v buňkách HEK-293 spolu s f-PARP-1 po 24 hod inkubace s 20 $\mu\text{mol/L}$ CisPt. Z výsledků experimentu Singh *et al.* (2018) je exprese proteinu PARP-1 v porovnání s CTRL téměř trojnásobná. Pokud porovnáme v našem experimentu 6hod působení 5 $\mu\text{mol/L}$ CisPt a 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt, výsledné exprese proteinu PARP-1 jsou téměř identické. Autoři Park *et al.* (2015) porovnávali expresi proteinu PARP-1 v ledvinných buňkách po působení 10 $\mu\text{mol/L}$ a 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt. Inkubační interval zvolili 8 hod. Dle jejich výsledků je zvýšená exprese proteinu PARP-1 po působení 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt. Ty samé toxiny testovali ještě na epitelových buněčných liniích a na mnohjaderných nádorových sféroidech. Exprese proteinu PARP-1 v epitelových buněčných liniích po 8 hod inkubace s 10 $\mu\text{mol/L}$ CisPt a 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt je srovnatelná, ale exprese proteinu PARP-1 v mnohjaderných nádorových sféroidech je vyšší po působení 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt.

Fosforylovanou JNK kinázu jsme dle našeho experimentu nedetekovali, ale autoři Donzeli *et al.* (2004) ve studii zaznamenávali JNK kinázu pomocí metody *immunoblotting*. Donzeli *et al.* (2004) detekovali JNK kinázu, bez ohledu na její fosforylovaný stav, po 6 hod inkubace s 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt. Po působení 14 hod 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt JNK kinázu stále detekovali, její aktivita však od této koncentrace klesala, zůstala však mírně patrná až do 24 hod inkubace s CisPt. (Donzeli E. *et al*, 2004).

6. Závěr

V rámci diplomové práce jsme charakterizovali buněčné poškození po působení toxinů CisPt, CdCl₂, t-BHP a nanočástic SiO₂, TiO₂ P25 na neuroblastomovou buněčnou linii SH-SY5Y. Dále jsme stanovovali metodou *Simple Western* změnu exprese proteinů PARP-1, f-PARP-1 a JNK kinázy.

Pro charakterizaci buněčného poškození jsme zvolili metodu fluorimetrického stanovení intracelulární koncentrace GSH a stanovení dehydrogenázové aktivity WST-1 testem. Koncentrace jednotlivých toxinů a nanočástic byla zvolena následovně: 5 a 50 μmol/L CisPt, 25 a 50 μmol/L CdCl₂, 25 μmol/L t-BHP, 100 μg/mL SiO₂, 100 μg/mL TiO₂ P25 v časových intervalech 6, 24 a 48 hod.

Zjistili jsme, že koncentrace GSH se po 24 hod inkubace s vybranými látkami téměř shoduje s naměřenou koncentrací GSH po 6 hod inkubace s totožnými látkami. Ze stanovení dehydrogenázové aktivity jsme zjistili, že s prodlužujícím se inkubačním intervalem CisPt se dehydrogenázová aktivita snižuje.

Expese proteinů PARP-1, f-PARP-1 a JNK kinázy byla stanovena metodou *Simple Western* v proteinových lyzátech SH-SY5Y za použití primárních protilátek β-aktin, JNK kinázy a PARP-1. Pozorovali jsme změnu exprese vybraných proteinů v rámci 6, 24 a 48 hod inkubace. Protein PARP-1 jsme detekovali po působení všech vybraných látek v inkubačních intervalech 6 hod, 24 hod i 48 hod, mimo inkubační interval 6 hod s TiO₂ P25. Fragment proteinu PARP-1 jsme detekovali pouze po působení toxinu CisPt o koncentraci 5 μmol/L a 50 μmol/L v inkubačních intervalech 24 hod a 48 hod. Expese proteinu JNK kinázy nebyla detekovaná.

7. Zdroje

1. Alemasova E. E., Lavrik O. I.: *Poly(ADP-ribosylation) by PARP-1: reaction mechanism and regulator proteins*. Nucleic Acids Research, 2019, 47, 8, 10.1093/nar/gkz120.
2. Almezgagi M., Zhang Y., Hezam K. et al.: *Diacerein: Recent insight into pharmacological activities and molecular pathways*. Biomedicine and pharmacotherapy, 2020, 131, 110594, 10.1016/j.biopha.2020.110594.
3. Altun Z. S., Günes D., Aktas S. et al.: *Protective Effects of Acetyl-L-Carnitine on Cisplatin Cytotoxicity and Oxidative Stress in Neuroblastoma*. Neurochemical Research, 2010, 35, 437-443. 10.1007/s11064-009-0076-8.
4. Arthur J. S., Ley S. C.: *Mitogen-activated protein kinases in innate immunity*. Nat Rev Immunol 13, 2013, 679–692, 10.1038 /nri3495.
5. Banfalvi G.: *Methods to detect apoptotic cell death*. Apoptosis, 2017, 22, 306-323, 10.1007/s10495-016-1333-3.
6. Berghe V. T., Grootjans P., Goossens V.; et al.: *Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo*. Methods 61, 2013, 117-129, 10.1016/j.ymeth.2013.02.011.
7. Borges G., Berrocoso E., Mico J. A. et al.: *ERK1/2: Function, signaling and implication in pain and pain-related anxio-depressive disorders*. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2015, 60, 77-92, 10.1016/j.pnpbp.2015.02.010.
8. Branca J. J. V., Morucci G., Pacini A.: *Cadmium-induced neurotoxicity: still much ado*. Neural regeneration research, 2018, 13, 11, 1879-1882, 10.4103/1673-5374.239434.
9. Brentnall M., Rodriguez-Menocal L., Landron De Guevara R. et al.: *Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis*. BioMed Central Cell Biology, 2013, 14, 32, 10.1186/1471-2121-14-32.
10. Breton C. S., Aubry D., Ginet V. et al.: *Combinative effects of β -Lapachone and APO866 on pancreatic cancer cell death through reactive oxygen species production and PARP-1 activation*. Biochimie, 2015, 116, 141-153, 10.1016/j.biochi.2015.07.012.

11. Cai L., Wang L.-F., Pan J.-P. *et al.*: *Neuroprotective Effets of Methyl 3,4-Dihydroxybenzoate against TBHP-Induced Oxidative Damage in SH-SY5Y Cells*. *Molecules*, 2016, 21, 1071, 10.3390/molecules21081071.
12. Calmon-Hamaty F., Audo R., Combe B. *et al.*: *Targeting the Fas/FasL system in Rheumatoid Arthritis therapy: Promising or risky?* *Cytokine*, 2015, 75, 228-233, 10.1016/j.cyto.2014.10.004.
13. Clemente Z., Castro V. L., Feitosa L. O. *et al.*: *Biomarker evaluation in fish after prolonged exporuse to nano-TiO₂: influence of illumination conditions and crytal phase*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2015, 15, 7, 10.1166/jnn.2015.10021.
14. Coelho R., Aladenize B.: *Les diélectriques : Propriétés diélectriques des matériaux isolants*. HERMES, 1993.
15. Crona D. J., Faso A., Nishijima T. F. *et al.*: *A Systematic Review of Strategies to Prevent Cisplatin-Induced Nephrotoxicity*. *The Oncologist*, 2017, 22, 5, 609-619, 10.1634/theoncologist.2016-0319.
16. Cullen S. P., Martin S. J.: *Fas and TRAIL ,death receptors' as initiators of inflammation: Implications for cancer*. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2015, 39, 26-34, 10.1016/j.semcdb.2015.01.012.
17. D'Amelio M., Sheng M., Cecconi F.: *Caspase-3 in the central nervous systém: beyond apoptosis*. *Trends in Neurosciences*, 2012, 35, 11, 10.1016/j.tins.2012.06.004.
18. D'Arcy M. S.: *Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy*. *Cell Biology International*, 2019, 43, 582-592, 1065-6995, 10.1002/cbin.11137.
19. Dasari S., Tchounwou P. B.: *Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action*. *European Journal of Pharmacology*, 2014, 10.1016/j.ejphar.2014.07.025i.
20. De Bondt H. L., Rosenblatt J., Jancarik J. *et al.*: *Crystale structure of cyclin-dependent kinase 2*. *Nature*, 1993, 363, 6430, 595-602, 10.1038/363595a0.
21. Donzelli E., Carfi M., Miloso M. *et al.*: *Neurotoxicity of platinum compounds: comparison of the effects of cisplatin and oxaliplatin on the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y*. *Journal of Neuro-Oncology*, 2004, 67, 65-73, 10.1023/B:NEON.0000021787.70029.ce.

22. Enbrecht M., Mangerich A.: *The Nucleolus and PARP-1 in Cancer Biology*. *Cancers*, 2020, 12, 1813, 10.3390/cancers1207/1813.
23. Florea A.-M., Büsselberg D.: *Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects*. *Cancers*, 2011, 3, 1351-1371, 10.3390/cancers3011351.
24. Fouad A. A., Abdel-Aziz A. M., Hamouda A. A.: *Diacerein downregulates NLRP3/Caspase-1/IL-1 β and IL-6/STAT3 pathways of inflammation and apoptosis in a rat model of cadmium testicular toxicity*. *Biological Trace Element Research*, 2019, 195, 2, 499-505, 10.1007/s12011-019-01865-6.
25. Frankfurt O. S., Krishan A.: *Apoptosis-based drug screening and detection of selective toxicity to cancer cells*. *Anti-cancer Drugs*, 2003, 14, 555, 10.1097/01.cad.0000086305.28884.da.
26. Gad S. E.: *Hydroperoxide, tert-Butyl*. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* [ONLINE], 2014, 977-978, 10.1016/B978-0-12-386454-3.00854-X.
27. Gao J., Wang W.: *Knockdown of galectin-1 facilitated cisplatin sensitivity by inhibiting autophagy in neuroblastoma cells*. *Chemico-Biological Interactions*, 2019, 297, 50-56, 10.1016/j.cbi.2018.10.014.
28. Ge H.-x., Zou F.-m., Li Y. *et al.*: *JNK pathway in osteoarthritis: pathological and therapeutic aspects*. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 2017, 37, 5, 431-436, 10.1080/10799893.2017.1360353.
29. Georgakilas G. A., Martin A. O., Bonner M. W. : *p21: A Two-Faced Genome Guardian*. *Trends in Molecular Medicine*, 2017, 23, 4, 310-319, 10.1016/j.molmed.2017.02.001.
30. Green A. R., Caracappa D., Benhasouna A. A. *et al.*: *Biological and clinical significance of PARP-1 protein expression in breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 149, 353-362, 10.1007/s10549-014-3230-1.
31. Green D. R., Llambi F.: *Cell Death Signaling*. *Cold Spring Harb Perspec Biol*, 2015, 7, 1-24, 10.1101/cshperspect.a006080.
32. Grynberg K., Ma Frank Y., Nikolic-Paterson D.: *The JNK Signaling Pathway in Renal Fibrosis*. *Renal and Epithelial Physiology, a section of the journal Frontiers in Physiology* 9, 829, 2017, 1-12, 10.3389/phys.2017.00829.
33. Hennessy E. J.: *Selective inhibitors of Bcl-2 and Bcl-XL: Balancing antitumor activity with on-target toxicity*. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters*, 2016, 26, 2105-2114, 10.1016/j.bmcl.2016.03.032.

34. Huang C., Wen C., Yang M. *et al.*: *Lycopene protects against t-BHP-induced neuronal oxidative damage and apoptosis via activation of the PI3K/Akt pathway.* *Molecular Biology Reports*, 2019, 46, 3387-3397, 10.1007/s11033-019-04801-y.
35. Chacon E., Acosta D., Lemasters J. J.: *Primary Cultures of Cardiac Myocytes as In Vitro Models for Pharmacological and Toxicological Assessments.* *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*, 1997, 218, 0-12-163390-X.
36. Chen Q., Kang J., Fu C.: *The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis.* *Signal Transduction and Targeted Therapy* 3, 18, 2018, 1-7, 10.1038/s41392-018-0018-5.
37. Chico F. J., Saggau C., Adam D.: *Proteolytic control of regulated necrosis.* *BBA Molecular Cell Research* 1864, 2017, 2147-2161, 10.1016/k.bbamcr.2017.05.025.
38. Jain P. G., Patel B. D.: *Medicinal chemistry approaches of poly ADP-Ribose polymerase 1 (PARP-1) inhibitors as anticancer agents – A recent update.* *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 165, 198-215, 10.1016/j.ejmech.2019.01.024.
39. Jin H., Suh D.-S., Kim T.-H. *et al.*: *IER3 is a crucial mediator of TAp73 β -induced apoptosis in cervical cancer and confers etoposide sensitivity.* *Scientific reports*, 2015, 5, 8367, 10.1038/srep08367.
40. Katsuda H., Yamashita M., Katsura H. *et al.*: *Protecting cisplatin-induced nephrotoxicity with cimetidine does not affect antitumor activity.* *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2010, 33, 11, 1867-1871, 10.1248/bpb.33.1867.
41. Kelland L.: *The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy.* *Nature Publishing Group*, 2007, 7, 573-584, 10.1038/nrc2167.
42. Khraisheh M., Wu L., Al-Muhtaseb A. *et al.*: *Photocatalytic disinfection of Escherichia coli using TiO₂ P25 and Cdoped TiO₂.* *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2015, 28, 369-176, 10.1016/j.jiec.2015.02.023.
43. Kim S. D., Moon Ch. K., Eun S.-Y. *et al.*: *Identification of AKS1, MKK4, JNK, c-Jun, and caspase-3 signaling cascade involved in cadmium –induced neuronal cell apoptosis.* *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 328, 326-334, 10.1016/j.bbrc.2004.11.173.
44. Kim S., Cheon H.-S., Kim S.-Y. *et al.*: *Cadmium induces neuronal cell death through reactive oxygen species activated by GADD153.* *BMC Cell Biology*, 2013, 14, 4, 10.1186/1471-2121-14-4.

45. Kovalic A. J., Satapathy S. K., Chalasani N.: *Targeting incretin hormones and the ASK-1 pathway as therapeutic options in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis*. Hepatology International, 2018, 10.1007/s12072-018-9854-1.
46. Krisha S., Overholtzer M.: *Mechanisms and consequences of entosis*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016, 73, 2379-2386, 10.1007/s00018-016-2207-0.
47. Kumar Ch., P. T. V. Lakshmi, Arunachalam A.: *Structure based pharmacophore study to identify possible natural selective PARP-1 trapper as anti-cancer agent*. Computational Biology and Chemistry, 2019, 80, 314-323, 10.1016/j.compbiolchem.2019.04.018.
48. Lawa A. O., Ellis E.: *Differential sensitivity and responsiveness of three human cell lines HepG2, 1321N1 and HEK 293 to cadmium*. The Journal of Toxicological Sciences, 2010, 35, 4, 465-478, 10.2131/jts.35.465.
49. Lee S.-Y., Park S.-J.: *TiO₂ photocatalyst for water treatment applications*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2013, 19, 1761-1769, 10.1016/j.jiec.2013.07.012.
50. Levine B., Deretic V.: *Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity*. Nature publishing group, 2007, 7, 10.1038/nri2161.
51. Li Ch., Yang Ch., Wei G.: *Vandetanib inhibits cisplatin-resistant neuroblastoma tumor growth and invasion*. Oncology reports, 2018, 39, 1757-1764, 10.3892/or.2018.6255.
52. Li M., Wang D., He J. *et al.*: *Bcl-XI: A multifunctional anti-apoptotic protein*. Pharmacological Research, 2020, 151, 10.1016/j.phrs.2019.104547.
53. Li Z., Liu F.-y., Kirkwood K. L.: *The p38/MKP-1 signaling axis in oral cancer: Impact of tumor-associated macrophages*. Oral Oncology, 2020, 103, 10.1016/j.oraloncology.2020.104591.
54. Liu T., Wu Z., He Y. *et al.*: *Single and dual target inhibitors based on Bcl-2: Promising anti-tumor agents for cancer therapy*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2020, 201, 10.1016/j.ejmech.2020.112446.
55. Lu Y., Ma W., Li Z. *et al.*: *The interplay between p16 serine phosphorylation and arginine methylation determines its function in modulating cellular apoptosis and senescence*. Scientific Reports, 2017, 7, 10.1038/srep41390.
56. Luca De A., Parker L. J., Ang W. H.: *A structure-based mechanism of cisplatin resistance mediated by glutathione transferase P1-1*. Proceedings of the National

- Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116, 28, 10.1073/pnas.1903297116.
57. Mahmoudinasab H., Saadat M.: *Electromagnetic Field Could Protect SH-SY5Y Cells Againsts Cisplatin Cytotoxicity, But not MCF-7 Cells*. DNA and Cell Biology, 2018, 37, 4, 10.1089/dna.2017.4108.
 58. Mallakpour S., Naghdi M.: *Polymer/SiO₂ nanocomposites: Production and applications*. Progress in Materials Science, 2018, 97, 409-447, 10.1016/j.pmatsci.2018.04.002.
 59. Manohar S., Leung N.: *Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature*. Italian Society of Nephrology, 2018, 10.1007/s40620-017-0392-z.
 60. Manu M. T., Anand T., Khanum F.: *Attenuation of cytotoxicity induced by tBHP in H9C2 cells by Bacopa Monniera and Bacoside A*. Pathophysiology, 2018, 10.1016/j.pathophys.2018.03.002.
 61. Mao G., Zhang P.-H., Wang Q. et al.: *Ginsenoside F2 induces apoptosis in human gastric carcinoma cells through reactive oxygen species-mitochondria pathway and modulation of ASK-1/JNK signaling cascade in vitro and in vivo*. Phytomedicine, 2014, 515-522, 10.1016/j.phymed.2013.10.013.
 62. Martinho M. S., Nancarrow D. J., Lawrence T. S. et al.: *Chaperones and Ubiquitin Ligases Balance Mutant p53 Protein Stability in Esophageal and Other Digestive Cancers*. Cellular and molecular gastroenterology and hepatology, 2020, 10.1016/j.jcmgh.2020.10.012.
 63. Martins I., Raza S. Q., Voisin L. et al.: *The emerging face of non-cell-autonomous type IV programmed death*. Biomedical Journal, 2017, 40, 133-140, 10.1016/j.bj.2017.05.001.
 64. McArthur K., Kile B. T.: *Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities?* Trends in Cell Biology, 2018, 28, 6, 10.1016/j.tcb.2018.02.003.
 65. McIlwain D. R., Berger T., Mak T. W.: *Caspase Functions in Cell Death and Disease*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 5, 2013, 10.1101/cshperspect.a008656.
 66. Meynier S., Rieux-Laucat. F.: *FAS and RAS related Apoptosis defects: From autoimmunity do leukemia*. Immunological Reviews, 2018, 287, 1, 50-61, 10.1111/imr.12720.

67. Mishra M., Tiwari S., Gomes A. V.: *Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques*. Expert Rev Proteomics, 2019, 14, 11, 1037-1053, 10.1080/14789450.2017.1388167.
68. Mizushima N., Komatsu M.: *Autophagy: Renovation of Cells and Tissues*. Cell Press, 2011, 147, 4, 728-741, 10.1016/j.cell.2011.10.026.
69. Moldoveanu T., Follis A. V., Kriwacki R. W. et al.: *Many players in BCL-2 family affairs*. Trends in Biochemical Sciences, 2014, 39, 3, 10.1016/j.tibs.2013.12.006.
70. Moussa R. S., Park K. Ch., Kovacevic Z. et al.: *Ironing out the role of the cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 in cancer: Novel iron chelating agents to target p21 expression and activity*. Free Radical Biology and Medicine, 2019, 133, 276-294, 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.027.
71. Muscari I., Adorisio S., Liberati A. M. et al.: *Bcl-XL overexpression decreases GILZ levels and inhibits glucocorticoid-induced activation of caspase-8 and caspase-3 in mouse thymocytes*. Journal of Translational Autoimmunity, 2020, 3, 100035, 10.1016/j.jtauto.2020.100035.
72. Nagata S., Sakuragi T., Segawa K.: *Flippase and scramblase for phosphatidylserine exposure*. Current Opinion in Immunology, 2020, 62, 31-38, 10.1016/j.coi.2019.11.009.
73. Nogueira D. R., Mitjans M., Rolim C. M. B. et al.: *Mechanisms Underlying Cytotoxicity Induced by Engineered Nanomaterials: A Review of In Vitro Studies*. Nanomaterials, 2014, 4, 454-484, 2079-4991, 10.3390/nano4020454.
74. Nordberg G. F.: *Historical perspectives on cadmium toxicology*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2009, 238, 3, 192-200, 10.1016/j.taap.2009.03.015.
75. Oh M. J., Chae G. Y., Ahn K. H. et al.: *Involvement of Oxidized Peroxiredoxin-3 in Cadmium- and Ceramide-induced Apoptosis of Human Neuroblastoma Cells*. Journal of Health Science, 2009, 55, 5, 739-749, 10.1248/jhs.55.739.
76. Opdenbosch N. V., Lamkanfi M.: *Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease*. Immunity, 2019, 50, 10.1016/j.immuni.2019.05.020.
77. Pak E. J., Son G. D., Yoo B. S.: *Cadmium Inhibits Neurite Outgrowth in Differentiating Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells*. International Journal of Toxicology, 2014, 33, 5, 412-418, 10.1177/1091581814550338.
78. Park S., Yoon S. P., Kim J.: *Cisplatin induces primary necrosis through poly(ADP-ribose) polymerase 1 activation in kidney proximal tubular cells*. Anatomy and Cell Biology, 2015, 48, 66-74, 10.5115/acb.2015.48.1.66.

79. Patil A. A., Bhor A. S., Rhee J. W.: *Cell death in culture: Molecular mechanisms, detections, and inhibition strategies*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 91, 2020, 37-53, 10.1016/j.jiec.2020.08.009.
80. Peres B. L. A., Dantas da C. J. A.: *Acute Nephrotoxicity of Cisplatin: Molecular mechanisms*. J. Bras. Nefrotol, 2013, 35, 4, 332-340, 10.5935/0101-2800.20130052.
81. ProteinSimple, 2020 [online], získáno červen 2020, dostupné z: <https://www.proteinsimple.com/contact.html>.
82. Rani A., Kumar A., Lal A. et al.: *Cellular mechanisms of cadmium induced toxicity: a review*. International Journal of Environmental Health Research, 2014, 24, 4, 378-399, 10.1080/09603123.2013.835032.
83. Rashid K., Sinha K., Sil P. C.: *An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology*. Food and Chemical Toxicology, 2013, 1016/j.fct.2013.09.026.
84. Rasmussen K., Rauscher H., Mech A. et al.: *Physico-chemical properties of manufactured nanomaterials-Characterisation and relevant methods*. An outlook base on the OECD Testing Programme. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2018, 92,8-28, 10.1016/j.yrtph.2017.10.019.
85. Redza-Dutordois M, Averill-Bates D. A.: *Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species*. Biochimica et Biophysica Acta, 2016, 1863, 2977-2992, 10.1016/j.bbamcr.2016.09.012.
86. RNDr. Koubek K., DRSC.: *Programovaná buněčná smrt aneb fenomén apoptózy*. Informační magazín: in vitro diagnostika 14, 2010, 10-22.
87. Ruffels J., Griffin M., Dickenson J. M.: *Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H₂O₂-induced cell death*. European Journal of Pharmacology, 2004, 483, 163-173, 10.1016/j.ejphar.2003.10.032.
88. Ryzhov P., Tian Y., Yao Y. et al.: *Conformational States of the Cytoprotective Protein Bcl-XL*. Biophysical Journal, 2020, 119, 1324-1334, 10.1016/j.bpj.2020.08.014.
89. Santin G., Piccolini V. M., Barni S. et al.: *Mitochondrial fusion: A mechanism of cisplatin-induced resistance in neuroblastoma cells?* NeuroToxicology, 2013, 34, 51-60, 10.1016/j.neuro.2012.10.011.

90. Segawa K., Nagata S.: *An apoptotic „Eat me“ Signal: Phosphatidylserine Exposure*. Trends in Cell Biology, 2015, 25, 11, 639-650, 10.1016/j.tcb.2015.08.003.
91. Serra S., Chetty R.: *p16*. J Clin Pathol, 2018, 71, 853-858, 10.1136/jclinpath-2018-205216.
92. Shaha C., Tripathi R., Mishra D. P.: *Male germ cell apoptosis: regulation and biology*. Philosophical Transactions: Biological Sciences 365, 1546, 2010, 10.1098/rstb.2009.0124.
93. Sharma N., Jha S.: *Amorphous nanosilica induced toxicity, inflammation and innate immune responses: A critical review*. Toxicology, 2020, 441, 10.1016/j.tox.2020.152519.
94. Schwarzer R., Laurien L., Pasparakis M.: *New insights into the regulation of apoptosis, necroptosis and pyroptosis by receptor interacting protein kinase 1 and caspase-8*. Current Opinion in Cell Biology, 2020, 63, 186-193, 10.1016/j.ceb.2020.02.004.
95. Singh M. P., Chauhan A. K., Kang S. Ch.: *Morin hydrate ameliorates cisplatin-induced ER stress, inflammation and autophagy in HEK-293 cells and mice kidney via PARP-1 regulation*. International Immunopharmacology, 2018, 56, 156-167, 10.1016/j.intimp.2018.01.031.
96. Sohaebuddin S. K., Thevenot P. T., Baker D. et al.: *Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent*. Part Fibre Toxicology, 2010, 7, 22.
97. Song B., Zhou T., Yang W. et al.: *Contribution of oxidative stress to TiO₂ nanoparticle-induced toxicity*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2016, 48, 130-140, 10.1016/j.etap.2016.10.013.
98. Staff N. P., Cavaletti G., Islam B. et al.: *Platinum-induced peripheral neurotoxicity: From pathogenesis to treatment*. J Peripher Nerv Syst, 2019, 24, 2, 26-39, 10.1111/jns.12335.
99. Tokgun O., Demiray A., Kaya B. et al.: *Silica nanoparticles can induce apoptosis via dead receptor and caspase 8 pathway on A549 cells*. Advances in Food Sciences, 2015, 37, 2, 65-70.
100. Volarevic V., Djokovic B., Jankovic M. G. et al.: *Molecular mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity: a balance on the knife edge between renoprotection and tumor toxicity*. Journal of Biomedical Science, 2019, 26:25, 1-14, 10.1186/s12929-019-0518-9.

101. Wang W., Zeng C., Feng Y. *et al.*: *The size-dependent effects of silica nanoparticles on endothelial cell apoptosis through activating the p53-caspase pathway.* Environmental Pollution, 2018, 233, 218-225, 10.1016/j.envpol.2017.10.053.
102. Wang X., Martindale J. L., Holbrook N. J.: *Requirement for ERK Activation in Cisplatin-induced Apoptosis.* The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275, 50, 39435-39443, 10.1074/jbc.M004583200.
103. Wei Y., Zhu J., Gan Y. *et al.*: *Titanium glycolate-derived TiO₂ nanomaterials: Synthesis and applications.* Advanced Powder Technology, 2018, 29, 2289-2311, 10.1016/j.apt.2018.05.016.
104. Wloch-Salamon D. M., Bem A. E.: *Types of cell death and methods of their detection in yeast Saccharomyces cerevisiae.* Journal of Applied Microbiology, 2012, 114, 287-298, 10.1111/jam.12024.
105. Wójcik-Baranowska E., Szwajgier D., Oleszczuk P. *et al.*: *Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles Exposure on Human Health – a Review.* Biological Trace Element Research, 2020, 193, 118-129, 10.1007/s12011-019-01706-6.
106. Wu W., Fu Y., Liu Z. *et al.*: *NAM protects against cisplatin-induced acute kidney injury by suppressing the PARP-1/p53 pathway.* Toxicology and Applied Pharmacology, 2021, 418, 10.1016/j.taap.2021.115492.
107. Würstle M. L., Laussmann M. A., Rehm M.: *The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome.* Experimental cell research, 2012, 318, 1213-1220, 10.1016/j.yexcr.2012.02.013.
108. Xu W., Wang S., Chen Q. *et al.*: *TXNL1-XRCC1 pathway regulates cisplatin-induced cell death and contributes to resistance in human gastric cancer.* Cell Death and Disease, 2014, 5, 10.1038/cddis.2014.27.
109. Xu X., Lai Y., Hua Z.: *Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials.* Bioscience Reports 39, 2019, 1-8, 10.1042/BSR20180992.
110. Yamada K., Yoshida K.: *Mechanical insights into the regulation of programmed cell death by p53 via mitochondria.* BBA- Molecular Cell Research, 2019, 1866, 839-848. 10.1016/j.bbamcr.2019.02.009.
111. Yan S., Chen R., Wang M. *et al.*: *Carbamazepine at environmentally relevant concentrations caused DNA damage and apoptosis in the liver of Chinese rare*

- minnows (Gobiocypris rarus) by the Ras/Raf/ERK/p53 signaling pathway.* Environmental Pollution, 2021, 270, 10.1016/j.envpol.2020.116245.
- 112.** Yokota T., Wang Y.: *p38 MAP kinases in the heart.* Gene, 2016, 575, 369-376, 10.1016/j.gene.2015.09.030.
- 113.** Yuan J.: *Regulation of Apoptosis.* Cell Signaling Technology [online]. 2008, dostupné z: en.cellsignal.jg/pathways/regulation-of-apoptosis-pathway.
- 114.** Zhang R., Bai Y., Zhang B. *et al.*: *The potential health risk of titania nanoparticles.* Journal of Hazardous Materials, 2012, 211-212, 404-413, 10.1016/j.jhazmat.2011.11.022.

8. PŘÍLOHY

Příloha 1: Stanovení koncentrace glutathionu. Buňky SH-SY5Y; inkubace 6, 24, 48 hod; cisplatina (CisPt), *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP); kontrolní buňky (CTRL); absorbance ($\lambda_{\text{EX/EM}} = 394/490 \text{ nm}$; $37 \text{ }^\circ\text{C}$); %Průměr \pm %SD; $n = 6-12$; ***, $p < 0,001$ (graf 1).

Toxiny [koncentrace]	% CTRL \pm % SD		
	6 hod	24 hod	48 hod
CTRL [0 $\mu\text{mol/L}$]	100,0 \pm 5,8	100,0 \pm 5,9	100,0 \pm 8,6
CisPt [5 $\mu\text{mol/L}$]	84,7 \pm 4,4	85,2 \pm 4,5	56,8 \pm 3,4
CisPt [50 $\mu\text{mol/L}$]	0,0 \pm 6,0	0,0 \pm 6,0	0,0 \pm 3,2
CdCl ₂ [25 $\mu\text{mol/L}$]	152,1 \pm 7,4	153,0 \pm 7,4	138,0 \pm 8,4
CdCl ₂ [50 $\mu\text{mol/L}$]	119,1 \pm 5,5	119,8 \pm 5,5	94,3 \pm 4,7
t-BHP [25 $\mu\text{mol/L}$]	111,5 \pm 2,4	112,2 \pm 2,4	99,5 \pm 5,2
SiO ₂ [100 $\mu\text{g/mL}$]	103,7 \pm 3,4	104,3 \pm 3,4	114,4 \pm 2,9
TiO ₂ P25 [100 $\mu\text{g/mL}$]	110,7 \pm 3,9	111,4 \pm 3,9	101,5 \pm 5,6

Příloha 2: Stanovení dehydrogenázové aktivity buněk WST-1 testem. Buňky SH-SY5Y; inkubace 6, 24, 48 hod; cisplatina (CisPt), *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP), kontrolní buňky (CTRL); absorbance (440 nm, $37 \text{ }^\circ\text{C}$); hodnoty pro 60-0 min; %Průměr \pm %SD; $n = 6-12$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ (graf 2).

Toxiny [koncentrace]	% CTRL \pm % SD		
	6 hod	24 hod	48 hod
CTRL [0 $\mu\text{mol/L}$]	100,0 \pm 7,9	100,0 \pm 6,6	100,0 \pm 6,8
CisPt [5 $\mu\text{mol/L}$]	96,2 \pm 6,2	75,8 \pm 5,1	42,4 \pm 3,0
CisPt [50 $\mu\text{mol/L}$]	78,7 \pm 6,0	0,0 \pm 3,0	0,0 \pm 1,7
CdCl ₂ [25 $\mu\text{mol/L}$]	99,9 \pm 5,8	108,9 \pm 9,9	104,0 \pm 9,7
CdCl ₂ [50 $\mu\text{mol/L}$]	92,6 \pm 4,5	90,6 \pm 10,3	70,1 \pm 4,3
t-BHP [25 $\mu\text{mol/L}$]	84,9 \pm 4,9	92,5 \pm 7,4	93,4 \pm 6,7
SiO ₂ [100 $\mu\text{g/mL}$]	91,6 \pm 5,9	90,5 \pm 7,4	76,4 \pm 8,5
TiO ₂ P25 [100 $\mu\text{g/mL}$]	82,4 \pm 4,9	76,7 \pm 4,8	61,5 \pm 3,8

Příloha 3: Průměr absorbancí kalibračních řad BSA. Absorbance (595 nm, 30 °C, t = 10 min); n = 3; (graf 3).

Koncentrace BSA [$\mu\text{g/mL}$]	Absorbance		
	6 hod	24 hod	48 hod
100	0,12	0,15	0,11
70	0,08	0,11	0,08
50	0,06	0,08	0,05
10	0,01	-	0,01
0	0,00	0,00	0,00

Práce vznikla za podpory projektu Posilování mezioborové spolupráce ve výzkumu nanomateriálů a při studiu jejich účinků na živé organismy (CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007421).