

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

**CHARAKTERIZACE BUNĚČNÉ TOXICITY POMOCÍ POKROČILÝCH
MIKROSKOPICKÝCH TECHNIK**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Michaela Jílková

VEDOUCÍ PRÁCE: Mgr. Jiří Handl, Ph.D.

KONZULTANT: Mgr. Jana Báčová

2021

UNIVERSITY OF PARDUBICE

FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**CHARACTERIZATION OF CELL TOXICITY USING ADVANCED
MICROSCOPIC TECHNIQUES**

THESIS

AUTHOR: Bc. Michaela Jílková

SUPERVISIOR: Mgr. Jiří Handl, Ph.D.

CONSULTANT: Mgr. Jana Báčová

2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela Jílková**
Osobní číslo: **C19535**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Charakterizace cytotoxicity pomocí pokročilých mikroskopických technik**
Zadávatel katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na možnosti zobrazení buněk s využitím fluorescenční mikroskopie a moderních bioanalytických metod pracujících na principu „*Live view cell imaging*“. Popište podrobně fluorescenční mikroskopii včetně principu fluorescence a dále jednotlivé zobrazovací techniky včetně holografické mikroskopie. Dále se zaměřte na popis fluorescenčních sond s důrazem na vizualizaci buněčného jádra, detekci mitochondriálního membránového potenciálu, vizualizaci mitochondrií, cytoskeletu a další.
2. V rámci teoretické části dále popište využití metod „*Live view cell imaging*“ při studiu cytotoxického působení látek *in vitro* u vybraných buněčných linií (nefro-, hepato-, neurálního původu). Zaměřte se na možnosti využití zobrazovacího zařízení BioStation (Nikon) při studiu cytotoxicity.

Experimentální část:

1. V rámci praktické části se zaměřte na přípravu a kultivaci buněčných linií pro fluorescenční mikroskopickou analýzu a „*Live view cell imaging*“ metody.
2. U vybrané buněčné linie popište změny, ke kterým u buněk dochází při působení několika modelových toxických látek, včetně cisplatinu, t-BHP, CdCl₂ či dalších. K detekci funkčních a morfologických změn u buněk inkubovaných s toxiny využijte moderní mikroskopické techniky využívající fluorescenční sondy, ale také bioanalytické metody, např. pro stanovení buněčné viability či koncentrace glutathionu.
3. Získaná experimentální data zpracujte a diskutujte. Výsledky práce následně porovnejte s výstupy jiných autorů.

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: **Mgr. Jiří Handl, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Jana Báčová**
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 Kand'ár,
Ph.D.**

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Charakterizace buněčné toxicity pomocí pokročilých mikroskopických technik jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., 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. Michaela Jílková

Poděkování:

Ráda bych především poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Jiřímu Handlovi, Ph.D., mé konzultantce Mgr. Janě Báčové a dále doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D., Mgr. Janu Čapkovi, Ph.D. a Mgr. Pavlíně Majtnerové za odborný dohled, vstřícný přístup a cenné rady, které mi při zpracování této diplomové práce věnovali. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala své rodině za obrovskou podporu během studia.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá charakterizací buněčné toxicity. V teoretické části jsou stručně popsány moderní mikroskopické metody včetně časosběrné mikroskopie, cytotoxického působení vybraných látek *in vitro* a typů buněčné smrti. Experimentální část je zaměřena na testování cytotoxicity pomocí bioanalytických a mikroskopických metod na vybrané buněčné linii SH-SY5Y. Pro studium byly vybrány modelové toxiny, jako CisPt, CdCl₂, t-BHP, TiO₂ P25 a MWCNTs. Všechny testy byly hodnoceny po 24, 48 a 72 hod inkubací buněk s toxiny. Změnu životaschopnosti buněk po expozici toxinů jsme hodnotili pomocí testu WST-1, vliv toxinů na intracelulární koncentraci glutathionu jsme detekovali pomocí monochlorobimánů a vliv na nukleární kondenzaci jsme detekovali pomocí sondy Hoechst 33258. Morfologické změny buněk jsme pozorovali ve fázovém kontrastu, pro vizualizaci cytoskeletu jsme zvolili sondu Faloidin-FITC a pro pozorování jader sondu Hoechst 33258. Působení vybraných toxinů jsme dále pozorovali pomocí časosběrné mikroskopie. V závěrečné části práce jsou výsledky diskutovány.

Klíčová slova:

Fluorescenční mikroskopie, časosběrná mikroskopie, cytotoxicita, buněčná linie SH-SY5Y.

ANNOTATION

The diploma thesis deals with the characterization of cellular toxicity. The theoretical part briefly describes modern microscopic methods, including time-lapse microscopy, cytotoxic effects of selected substances in vitro and types of cell death. The experimental part is focused on testing cytotoxicity using bioanalytical and microscopic methods on a selected cell line SH-SY5Y. Model toxins such as CisPt, CdCl₂, t-BHP, TiO₂ P25 and MWCNTs were selected for the study. All assays were evaluated after 24, 48 and 72 hours incubation of cells with toxins. We evaluated the change in cell viability after toxin exposure using the WST-1 test, the effect of toxins on the intracellular concentration of glutathione was detected using monochlorobimans and the effect on nuclear condensation was detected using the Hoechst 33258 probe. We observed morphological changes in cells in phase contrast, the Faloidin-FITC probe for cytoskeletal visualization and the Hoechst 33258 probe for the observation of nuclei. The effect of selected toxins was further observed using time-lapse microscopy. In the final part of the work the results are discussed.

Keywords:

Fluorescence microscopy, time-lapse microscopy, cytotoxicity, SH-SY5Y cell line.

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK A GRAFŮ	12
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	13
1. ÚVOD	15
2. TEORETICKÁ ČÁST	16
2.1 MIKROSKOPIE ŽIVÝCH BUNĚK.....	16
2.1.1 Mikroskopie s fázovým kontrastem.....	16
2.1.2 Holografická mikroskopie	16
2.1.3 Fluorescenční mikroskopie	17
2.1.3.1 Fluorescence	17
2.1.3.2 Fluorescenční mikroskop.....	19
2.1.3.3 Konfokální laserová skenovací mikroskopie	21
2.1.3.4 Fluorescenční mikroskopie s úplným vnitřním odrazem.....	22
2.1.3.5 Technika zobrazení fluorescence v živých buňkách v čase.....	22
2.1.3.6 Ostatní pokročilé techniky fluorescenční mikroskopie	23
2.1.4 Fluorescenční sondy	24
2.1.4.1 Vizualizace buněčného jádra	24
2.1.4.2 Detekce mitochondriálního membránového potenciálu	25
2.1.4.3 Detekce ROS.....	26
2.1.4.4 Vizualizace aktinových vláken	26
2.2. PŘÍSTROJ BIOSTATION.....	27
2.3 CYTOTOXICKÉ PŮSOBENÍ LÁTEK <i>IN VITRO</i>	28
2.3.1 Nefrotoxicita	28
2.3.2 Neurotoxicita	29
2.3.3 Hepatotoxicita.....	30
2.3.4 Plicní toxicita	31
2.4 MORFOLOGICKÉ ZMĚNY BUNĚK PŘI PŮSOBENÍ TOXINŮ	32

2.4.1 Změna morfologie při působení terc-butyhydroperoxidu.....	32
2.4.2 Změna morfologie při působení cisplatiny	32
2.4.3 Změna morfologie při působení chloridu kademnatého	33
2.4.4 Změna morfologie při působení nanočástic a nanomateriálů	34
2.4.4.1 Působení nanočástic oxidu titaničitého.....	35
2.4.4.2 Působení nanočástic oxidu zinečnatého.....	36
2.4.4.3 Působení uhlíkových nanomateriálů.....	37
2.5 TYPY BUNĚČNÉ SMRTI	38
2.5.1 Apoptóza.....	39
2.5.2 Nekróza.....	40
3. CÍL PRÁCE	42
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
4.1 Pomůcky a přístroje.....	43
4.2 Seznam použitých chemikálií	44
4.3 Příprava roztoků.....	44
4.4 Testování cytotoxicity pomocí bioanalytických metod	46
4.4.1 Detekce intracelulární dehydrogenázové aktivity.....	46
4.4.2 Fluorimetrické stanovení hladiny glutathionu	46
4.4.3 Fluorometrická detekce vlivu toxinů na nukleární kondenzaci.....	47
4.5 Mikroskopické testování cytotoxicity	47
4.5.1 Sonda Hoechst 33258	47
4.5.2 Fluorescenčně značený Faloidin.....	47
4.6 Testování cytotoxicity pomocí přístroje BioStatin IM-Q.....	48
4.7 Statistická analýza naměřených dat	48
5. VÝSLEDKY	49
5.1 Optimalizace buněčné denzity	49
5.2 Studium cytotoxicity pomocí bioanalytických metod.....	50

5.2.1 Stanovení dehydrogenázové aktivity	50
5.2.2 Stanovení intracelulární hladiny glutathionu	51
5.2.3 Vliv toxinů na nukleární kondenzaci	52
5.3 Změny morfologie buněk	53
5.3.1 Mikroskopická fluorescenční analýza buněčné morfologie	53
5.3.2 Změny buněčné morfologie v průběhu časoběrné obrazové analýzy	58
6. DISKUZE	63
7. ZÁVĚR	67
ZDROJE.....	68

SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK A GRAFŮ

Obrázek 1. Schéma digitální holografické mikroskopie.....	17
Obrázek 2. Jablonského diagram	18
Obrázek 3. Stokesův posun.....	19
Obrázek 4. Schéma epifluorescenčního mikroskopu.....	20
Obrázek 5. Princip konfokálního mikroskopu	21
Obrázek 6. BioStatin IM-Q.....	28
Obrázek 7. Schéma poškození buněk pomocí nanočástic TiO ₂	36
Obrázek 8. Formace uhlíkových nanomateriálů	38
Obrázek 9. Rozdíly mezi apoptózou a nekrotózou	41
Obrázek 10. Mikroskopická analýza vlivu toxinů na buňky SH-SY5Y (24 hod)	55
Obrázek 11. Mikroskopická analýza vlivu toxinů na buňky SH-SY5Y (48 hod).....	56
Obrázek 12. Mikroskopická analýza vlivu toxinů na buňky SH-SY5Y (72 hod)	57
Obrázek 13. Kontrolní SH-SY5Y buňky (0, 24, 48, 72 hod).....	59
Obrázek 14. SH-SY5Y buňky ovlivněné 50 μmol/L CisPt (0, 24, 48 a 72 hod).....	60
Obrázek 15. SH-SY5Y buňky ovlivněné 5 μmol/L CisPt (0, 24, 48 a 72 hod)	61
Obrázek 16. SH-SY5Y buňky ovlivněné 100 μmol/L CdCl ₂ (0, 24, 48 a 72 hod).....	62
Tabulka 1. Přehled ROS s jejich zkratkami	26
Tabulka 2. Využití běžně používaných nanočástic a nanomateriálů.....	35
Graf 1. Optimalizace denzity buněk SH-SY5Y	50
Graf 2. Vliv toxinů na intracelulární dehydrogenázovou aktivitu (24, 48 a 72 hod).....	51
Graf 3. Koncentrace glutathionu po expozici vybraným toxinům (24, 48 a 72 hod).....	52
Graf 4. Vliv toxinů na nukleární kondenzaci (24, 48 a 72 hod)	53

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A549	Buněčná linie lidského plicního adenokarcinomu
Apaf-1	Aktivační apoptický faktor 1
APAP	Acetaminofen (Paracetamol)
ATP	Adenosintrifosfát
CCD	Kamera s vázanými náboji
CisPt	Cisplatina
CLSM	Konfokální laserová skenovací mikroskopie
DISC	Signální komplex navozující smrt
FLAP	Lokalizace fluorescence po fotovybělení
FLIM	Technika zobrazení fluorescence v živých buňkách
FLIP	Ztráta fluorescence při fotovybělení
FRAP	Obnovení fluorescence po vyhasnutí
FRET	Försterův rezonanční přenos energie
GFP	Zelený fluorescenční protein
GSH	Glutathion
HE	Hydroethidin
HepaRG	Buněčná linie lidského hepatomu
HepG2	Buněčná linie lidského hepatocelulárního karcinomu
HK-2	Buněčná linie lidské ledviny 2
MB	Molekulární „majáky“
MCB	Monochlorobimán
MMP	Mitochondriální membránový potenciál
MWCNT	Vícevrstvá uhlíková nanotrubička

P53	Protein 53
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SH-SY5Y	Buněčná linie lidského neuroblastomu
SWCNT	Jednovrstvá uhlíková nanotrubiice
t-BHP	Terc-butyhydroperoxid
TCSPC	Časově korelované počítání jednotlivých fotonů
TIRFM	Fluorescenční mikroskopie s úplným vnitřním odrazem

1. ÚVOD

K popisu buněčné toxicity lze s výhodou využít moderní mikroskopické techniky, z nichž nejvyužívanější jsou techniky fluorescenční. Fluorescenční techniky jsou využívány pro svoji vysokou specifitu a selektivitu. Pro pozorování fluorescence se ke sledovaným buňkám přidávají fluorescenční sondy, které slouží ke sledování základních buněčných parametrů a k vizualizaci buněčného jádra, mitochondrií, cytoskeletu a pro sledování tvorby reaktivních forem kyslíku a dusíku. Ke sledování živých buněk lze dále využít mikroskopy s fázovým kontrastem či holografickou mikroskopií, která umožňuje pozorování buněk ve 3D. Moderním způsobem pro studium a sledování toxického působení látek v reálním čase a za stabilních podmínek je přístroj BioStation IM-Q.

Buněčné linie se používají k cytotoxickému studiu *in vitro*. Zvířecí buněčné linie mají omezené funkce pro hodnocení toxicity u lidí, proto se přednostně testuje na liniích lidských. Buněčné modely *in vitro* jsou využívány například pro sledování nefrotoxicity, neurotoxicity, hepatotoxicity a plicní toxicity. K pozorování nefrotoxicity se používá buněčná linie lidského proximálního tubulu HK-2. Nejčastěji používané linie ke studiu hepatotoxicity jsou buněčné linie lidského hepatocelulárního karcinomu HepG2 a lidská hepatomální buněčná linie HepaRG. Plicní toxicita je sledována na buněčné linii lidského plicního adenokarcinomu A549. Studium neurotoxicity látek je v současné době předmětem zájmu celé řady studií. Velký nárůst zájmu je o studium neurodegenerativních poruch, jakou je Alzheimerova a Parkinsonova choroba. Buněčná linie lidského neuroblastomu SH-SY5Y je velmi využívána, lze na ní studovat působení případných toxických účinků vybraných látek a potenciálních léčiv. Ve své diplomové práci se proto zaměřuji na charakterizaci cytotoxického působení u této buněčné linie pomocí moderních bioanalytických a mikroskopických metod.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 MIKROSKOPIE ŽIVÝCH BUNĚK

Mikroskopy rozdělujeme podle zdroje záření na dva základní typy, optické (světelné) a elektronové. Optické mikroskopy používají jako zdroj záření světlo ve viditelném rozsahu elektromagnetického spektra, zatímco elektronové mikroskopy používají jako zdroj záření elektronový paprsek. Dalším typem jsou mikroskopy, které používají jako zdroj záření ultrafialové a infračervené světlo. V dnešní době se hojně využívají techniky s vysokým rozlišením (skenovací tunelovací mikroskopie, mikroskopie atomárních sil aj.) [1].

K pozorování živých buněk a k dynamickým procesům uvnitř buňky se nejčastěji volí světelná mikroskopie. Mezi využívané světelné mikroskopické techniky patří mikroskopie s fázovým kontrastem a fluorescenční mikroskopie. Pro trojrozměrnou strukturu buněk a molekul se často využívá holografická mikroskopie [2].

2.1.1 Mikroskopie s fázovým kontrastem

Mikroskopii s fázovým kontrastem vynalezl Frits Zernike ve 30. letech 20. století. Pozorované objekty mění fázi, ale ne amplitudu dopadajícího světelného paprsku. Fázi procházejícího světelného vlnění mění preparáty kvůli různému indexu lomu. Obraz objektu vzniká interferencí přímého vlnění a difrakčního vlnění [3;4].

Do obrazového ohniska objektivu se umístí tzv. fázová deska ve tvaru prstence, která posunuje fázi přímého světla a výsledkem interference obou druhů vlnění vzniká fázový kontrast. Nejvýraznější fázový kontrast vzniká, pokud je fázový rozdíl obou vlnění roven $\frac{1}{4}$ vlnové délky [3;4].

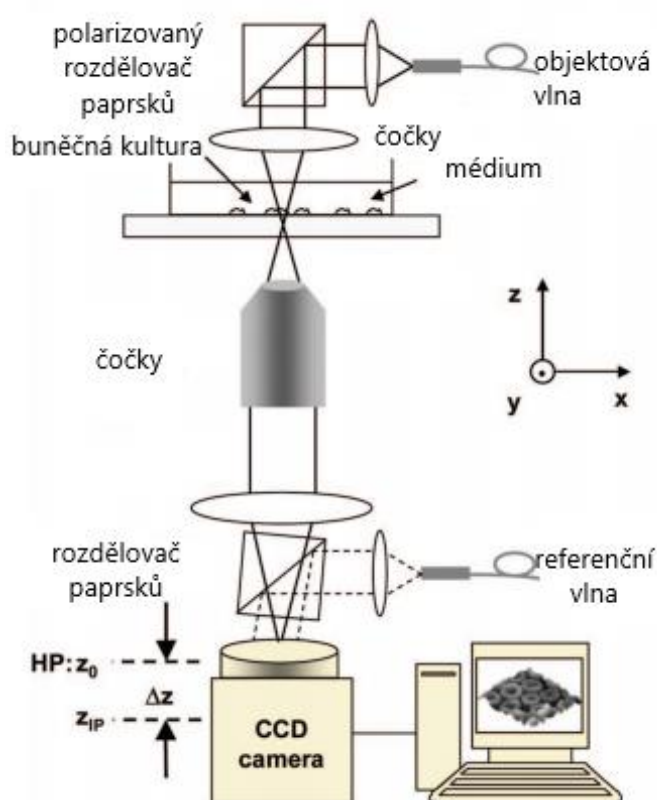
Mikroskopie s fázovým kontrastem slouží hlavně k pozorování velkých struktur (jader, organel). Většina vzorků má nerovnoměrnou tloušťku, a to má za následek řadu různých lomů světla. Lomené světlo poté prochází vnější nebo vnitřní částí prstence. Při průchodu světla vnější částí prstence je světlo fázově posunuto a jeví se jako tmavé. Naopak, když lámané světlo prochází vnitřní částí prstence, jeví se jako jasné. Modernější technologie vedly k rozvoji kvantitativního fázového kontrastu. Snímky lze pořizovat v různých ohniskových rovinách a vytvářet 3D obrazy živých buněk ve vysokém rozlišení v průběhu času [3].

2.1.2 Holografická mikroskopie

V holografické mikroskopii slouží jako výkonný koherentní zdroj záření laser, bez kterého by holografie nebyla možná. Denis Gabor navrhl řádkové uspořádání, kdy se

objektové a referenční (srovnávací) vlny šíří stejným směrem a dopadají na fotografickou desku. Na fotografické desce vzniká interferenční obrazec, který je tvořen interferenčními maximy a minimy. Interferenční obrazec se nazývá hologram a dává nám informaci nejen o intenzitě, ale i o fázi světla odraženého od předmětu. Fáze vypovídá o trojrozměrné struktuře. Obraz vzorku ale získáme až po rekonstrukci, když osvětlíme hologram laserem pod stejným úhlem, pod kterým dopadaly referenční vlny na fotografickou desku [5;6].

Digitální holografická mikroskopie je založena na klasickém holografickém principu, kdy je záznam hologramu prováděn digitálním senzorem nebo pomocí polovodičové kamery. Rekonstrukce holografického obrazu je provedena numerickým počítačem. Pro zlepšení rozlišení je vlna objektu zvětšena objektivem mikroskopu. V této kombinaci nám slouží holografie pro kvantitativní fázový kontrast živých buněk bez použití specifických markerů [5].



Obrázek 1. Schéma digitální holografické mikroskopie. Převzato a upraveno z [5].

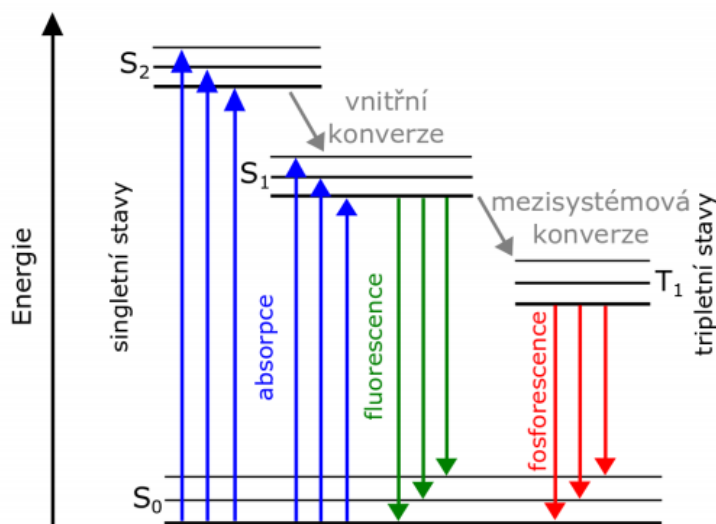
2.1.3 Fluorescenční mikroskopie

2.1.3.1 Fluorescence

Fluorescence je řazena mezi luminiscenční záření. Luminiscence je emisní záření látky (záření emitované látkou), u které předtím došlo k excitaci záření. Luminiscence se rozděluje v závislosti na povaze excitovaného stavu. Luminiscenci dělíme na fluorescenci, fosforescenci,

chemiluminiscenci, bioluminiscenci a elektroluminiscenci. Fluorescenci poprvé popsal Sir G. G. Stokes v polovině 19. století, který pozoroval vlastnosti minerálu fluoritu. K pochopení podstaty fluorescence došlo až s objevem elektronu a s vývojem kvantové mechaniky [7].

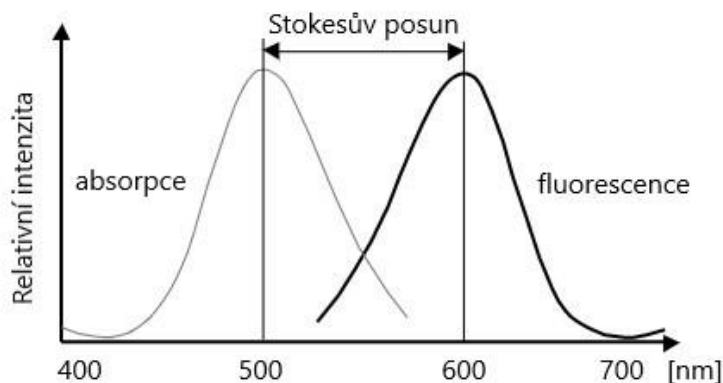
Grafické znázornění dějů probíhajících po absorpci světla molekulou je zřetelné z diagramu Jablonského na obrázku 2. Z obrázku 2 je viditelné, v jakých energetických stavech se molekula nachází a dále znázorňuje možné přechody elektronů mezi jednotlivými energetickými stavy. Přechody mezi stavy jsou znázorněny jako svislé čáry. Základní elektronový stav (S_0) reprezentuje molekulu v základním stavu před absorpcí záření. Po absorpci záření přijme molekula energii, dochází k excitaci a elektrony přechází do excitovaného prvního elektronového singletového stavu (S_1), druhého singletového elektronového stavu (S_2) nebo případně do tripletových stavů (T_1) [7;8].



Obrázek 2. Jablonského diagram.

K relaxaci molekuly může docházet zářivými přechody nebo nezářivými přechody. Zářivé přechody se projeví jako fluorescence a fosforescence. Zářivé přechody pozorujeme, pokud nastane emise záření z excitovaného elektronového stavu jedním či více spontánními energetickými přechody. Kashovo pravidlo říká, že před emisí fluorescenčního kvanta dochází k relaxaci vibrační energie a k vnitřní konverzi. To znamená, že přechod nastane vždy z nejnižší vibrační hladiny stavu S_1 . Doba dohasínání fluorescence je zhruba 10^{-8} s. Fosforescence je záření doprovázející přechod molekuly ze stavu T_1 na S_0 . Doba dohasínání je mnohem delší než u fluorescence a může trvat i několik hodin či dní [8].

Sir G. G. Stokes pozoroval průchod slunečního světla roztokem chininu a jeho změnu z ultrafialového světla na viditelné světlo. Stokesův posun poukazuje na změnu energie absorbovaného fotonu oproti fotonu, který vyzáří fluorofor při přechodu z excitovaného stavu do stavu základního. Rozdíl mezi energií fotonů je charakteristický pro každou molekulu. Stokesův posun tedy značí, že vlnová délka fluorescenčního záření je větší než vlnová délka absorpčního záření [8].



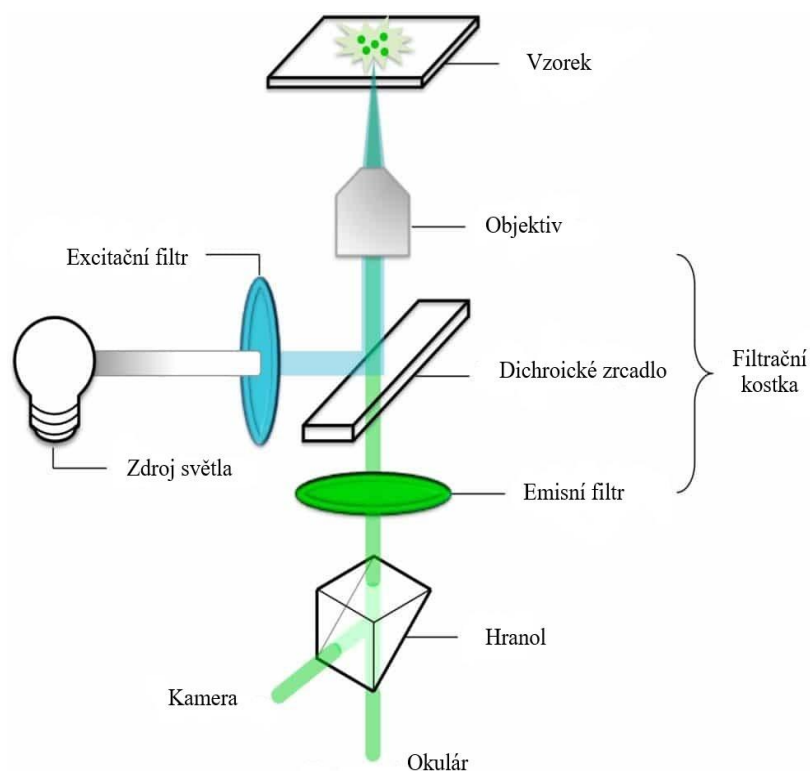
Obrázek 3. Stokesův posun.

2.1.3.2 Fluorescenční mikroskop

Fluorescenční mikroskopie se nejvíce využívá pro vizualizaci buněčných kompartmentů, např. jádra, mitochondrií, mitochondriálního potenciálu. Molekuly, které se používají na základě svých fluorescenčních vlastností se nazývají fluorofory. Součástí fluorescenčního mikroskopu jsou filtry, které vymezí rozsah excitačního spektra a filtry pro emisní spektrum. V dnešní době se nejvíce využívá epifluorescenční mikroskop [9].

Světlo ze zdroje záření prochází přes excitační filtr. Excitační filtr propouští pouze vybrané vlnové délky potřebné pro excitaci elektronů. Záření se dále odráží od dichroického zrcadla. Pokud vzorek fluoreskuje, emisní světlo jde zpět přes dichroické zrcadlo a je dále selektováno pomocí emisního filtru, který propouští pouze emisní část spektra a zabraňuje průchodu světla excitačního. Jako detektor se nejčastěji používá kamera s vázanými náboji (*Charged-coupled device camera*; CCD) [10]. V mnoha epifluorescenčních mikroskopech je tzv. filtrační kostka, která slouží pro zarovnání filtrů v dráze excitace a emise světla. Kostka je složena z excitačního filtru, dichroického zrcadla a emisního filtru. Kostka směřuje světlo ze zdroje záření do vzorku a ze vzorku do detektoru [7].

Jako zdroj světla se využívají vysokotlaké výbojky rtuťové a xenonové. Obloukový výboj mezi elektrodami představuje intenzivní bodový zdroj světla vhodný pro osvětlení zadní ohniskové roviny objektivu. Rtuťové a xenonové výbojky jsou velmi drahé, potenciálně nebezpečné a vyžadují speciální napájecí zdroje. Xenonová výbojka má spojité spektrum od ultrafialových až infračervených vlnových délek. Oproti tomu rtuťová výbojka má v rámci spektra jen 5 jasně definovaných maxim. Dále se může použít halogenidová rtuťová žárovka, kde emisní spektra jsou podobná tradičním rtuťovým výbojkám, ale mají další rozšíření spektra. Rozšíření se využívá hlavně v oblasti excitace fluoresceinu [11]. Nejnovější technologie jsou založené na LED diodě. Žárovka se skládá z řady samostatných světelných zdrojů LED, z nichž každá má jinou barvu s relativně úzkými pásmy vlnových zdrojů. LED diody lze elektronicky vypínat a zapínat během milisekund. Životnost LED lampy je řádově 10 000 hodin a zapíná se pouze během pořizování obrazu [12].



Obrázek 4. Schéma epifluorescenčního mikroskopu.

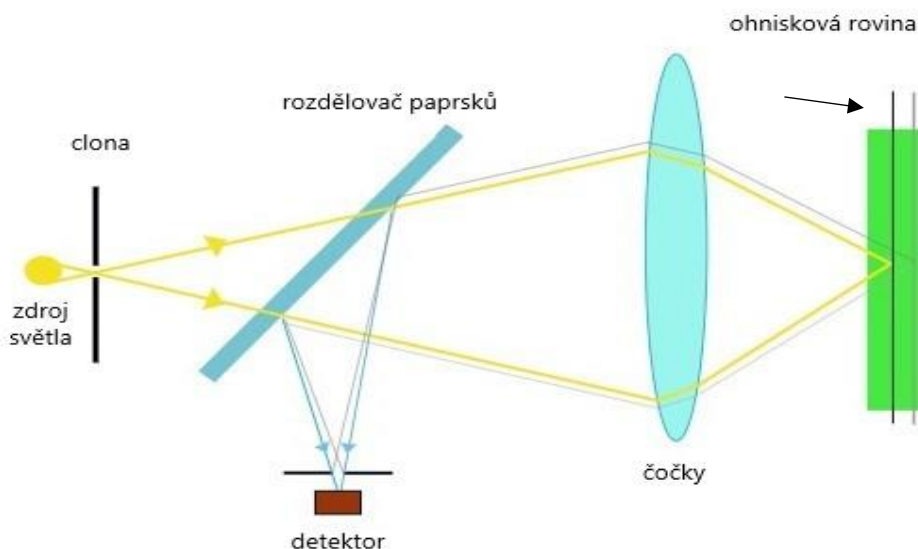
U fluorescenční mikroskopie je hlavní nevýhodou fluorescenční vybělení. Vybělení je obecný termín pro všechny procesy, které způsobují trvalé vyblednutí fluorescenčního signálu. Předpokládá se, že většina procesů je spojena s tripletovými stavy, které mají dlouhou životnost a poskytují molekule s excitovaným elektronem více příležitostí k interakci s jinými molekulami, než jsou singletové stavy. Jednou z důležitých složek při vybělení je interakce

mezi fluoroforem ve stavu tripletu a molekulárním kyslíkem za vzniku singletového kyslíku. Singletový kyslík je reaktivní molekula účastnící se mnoha druhů chemických reakcí s organickými molekulami. Chemické reakce mohou zhaset fluorofory (dochází k jejich vybělení). Kromě toho singletový kyslík může interagovat s jinými organickými molekulami a způsobit fototoxicitu pro živé buňky. Jedním ze způsobů, jak omezit vybělení je použít co nejméně světla při osvětlení vzorku [12].

2.1.3.3 Konfokální laserová skenovací mikroskopie

Konfokální laserová skenovací mikroskopie (*Confocal laser scanning microscopy*; CLSM) je technika, která kombinuje optické zobrazení s vysokým rozlišením a vysokou selektivitou. Pomocí CLSM jsme schopni získávat dobře zaostřené snímky v různých hloubkách vzorku. U konfokálního mikroskopu je zdrojem záření laserový paprsek, který excituje vzorek a výsledný obraz je vytvářen z emitovaných fotonů. Před detektorem je umístěna clona, která zabraňuje emitovanému záření procházet nad a pod ohniskovou rovinu. Detektor převádí fotony na měřitelný elektrický signál a díky cloně je obraz ve vysokém rozlišení. Vzorek je možné rekonstruovat do 3D struktury [13;14].

Technika CLSM je v biomedicínských vědách využívána na zobrazení molekul, zobrazování více značených vzorků a měření fyziologických událostí v živých buňkách. Zobrazování několika vzorků zároveň je možné díky excitaci a detekci rozdílných fluoroforů současně pomocí více laserů a detektorů. Obrázky jsou následně ukládány jako digitální obrazové soubory a mohou být analyzovány pomocí dalšího softwaru. Neobarvené vzorky lze zobrazit pomocí odrazu zpětného světla [13;15].



Obrázek 5. Princip konfokálního mikroskopu.

2.1.3.4 Fluorescenční mikroskopie s úplným vnitřním odrazem

Fluorescenční mikroskopie s úplným vnitřním odrazem (*Total internal reflection fluorescence*; TIRFM) je technika mikroskopování v širokém poli, která vizualizuje pouze molekuly poblíž skleněného krycího sklíčka [16].

Když světlo, které prochází prostředím s vysokým indexem lomu (např. sklem) narazí na prostředí s nižším indexem lomu (např. vodu), vytvoří se na rozhraní mezi dvěma médii tenká vrstva světla nazývaná evanescentní pole. TIRFM používá toto evanescentní pole k osvětlení fluorescenčních molekul v blízkosti rozhraní. Když je buňka pevně adharována ke sklu a světlo putuje vzhůru skrz skleněnou stranu, vytváří se rozhraní evanescentního pole a TIRFM může excitovat fluorescenční molekuly ve velmi tenké vrstvě [17].

Protože osvětlení TIRFM je omezeno na rozhraní sklo-voda, je také velmi vhodné pro studium interakcí molekul uvnitř nebo v blízkosti buněčné membrány v živých buňkách. Tato funkce poskytuje TIRFM pětikrát až desetkrát lepší rozlišení než konfokální mikroskopie. TIRFM se používá ke studiu proteinů *in vitro* při pozorování signálních kaskád [16]. Vysoké rychlosti snímání lze dosáhnout buď výběrem malé oblasti vzorku nebo zvýšením rychlosti skenování kamery [17].

2.1.3.5 Technika zobrazení fluorescence v živých buňkách v čase

Technika zobrazení fluorescence v živých buňkách v čase (*Fluorescence life-time imaging*; FLIM) je mikroskopická technika, která kombinuje konfokální laserovou mikroskopii s časově korelovaným počítáním jednotlivých fotonů (*Time-correlated Single Photon Counting*; TCSPC). TCSPC umožňuje určit čas po excitaci, při které byl foton emitován. Všechny detekované fotony přispívají k histogramu doby emise fotonů. FLIM se v dnešní době využívá i k detekci pohlcených fluorescenčních nanočástic buňkami nebo tkání [18;19].

Metoda FLIM se spoléhá na správný výběr fluoroforů, vnitřním prostředí buňky, vlastnostech zkoumané tkáně (viskozita, index lomu) a také závisí na chemickém stavu buňky. Endogenní fluorofory jako je NADH (nikotinamidadenindinukleotid), FAD (flavinadenindinukleotid) a melanin lze identifikovat pomocí charakteristické doby fluorescence, čehož se využívá pro zobrazování tkání [18].

Metoda se také může využívat k detekci širokého pole. Širokoúhlé techniky FLIM jsou založeny na časově ovládaných nebo modulovaných zesilovačích obrazu, které jsou kombinované s kamerami pro prostorové rozlišení a pracují buď v časové nebo frekvenční oblasti [20].

Metoda FLIM v kombinaci s Försterovým rezonančním přenosem energie (*Förster resonance energy transfer*; FRET) je široce využívanou metodou pro detekci interakcí protein-protein v nanometrovém měřítku v živých buňkách [18;20]. Při této metodě se do vzorku aplikují barviva donoru (dárce) a akceptoru (příjemce), přičemž vlnová délka vyzářovaná donorem odpovídá excitační vlnové délce akceptoru. Akceptor nemusí být fluorescenční. Excitovaný donor emituje záření, které excituje molekuly akceptoru. Podmínkou je, aby donorový a akceptorový fluorochrom byly velmi blízko u sebe (přibližně 1-10 nm) [19].

2.1.3.6 Ostatní pokročilé techniky fluorescenční mikroskopie

Mezi ostatní využívané techniky fluorescenční mikroskopie patří Obnovení fluorescence po vyhasnutí (*Fluorescence recovery after photobleaching*; FRAP), Ztráta fluorescence při fotovybělení (*Fluorescence loss in photobleaching*; FLIP) a Lokalizace fluorescence po fotovybělení (*Fluorescence localization after photobleaching*; FLAP) [19].

Technika FRAP je zobrazovací metoda pro živé buňky, která umožní zkoumání dynamiky proteinů v jednotlivých buňkách. Dokáže objasnit funkci proteinů, interakci mezi jednotlivými proteiny a jejich pohyblivost v buňkách. Princip techniky FRAP je založen na zvýšené intenzitě laseru, jehož vlivem poklesne fluorescence fotovybělených proteinů ve vybrané oblasti, zatímco obnova fluorescence v oblasti je sledována časově sledovacím mikroskopem [21]. Technice se věnovala zvýšená pozornost od doby, kdy byla poprvé zavedena do biologického výzkumu buněk v 70. letech 20. století. FRAP se nestala dosud tak populární, pravděpodobně kvůli specializované a časově náročné metodologii [22].

Technika FLIP je moderní mikroskopická metoda sloužící pro vizualizaci transportních procesů v živých buňkách. Je velmi užitečnou metodou pro studium výměny molekul mezi dvěma kompartmenty, které jsou odděleny lipidovou dvojvrstvou. Ve FLIP je vybraná oblast buněk opakovaně vybělena pomocí intenzivního laserového paprsku konfokálního mikroskopu [19;23]. Opakované vybělení stejné oblasti ve vzorku zabraňuje obnovení fluorescence. Zábava obnovení fluorescence v dané oblasti je hlavním rozdílem metody FLIP od metody FRAP [19]. Mezi vybělováním se provádí monitorování fotovybělené oblasti, ale i monitorování mimo vybělenou část buňky pro sledování transportních procesů [23]. Pomocí FLIP se může studovat Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum a přenos proteinů mezi jádrem a cytoplazmou [19].

Technika FLAP umožňuje individuální detekci fluorochromů a značených proteinů s vysokým časoprostorovým rozlišením. Hlavní výhodou FLAP je, že umožňuje detekci a sledování subpopulací, které se rychle pohybují. K molekule se přidají dvě fluorescenční

značky. Jedna značka je vybělená, druhá zůstává neporušená a používá se jako referenční. Oba fluorochromy mohou být detekovány nezávisle nebo současně fluorescenční mikroskopií. Absolutní signál FLAP je získán odečtením vyběleného signálu od referenčního [19].

2.1.4 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy jsou látky, které se váží nekovalentní vazbou na nefluoreskující molekuly pro jejich vizualizaci a často při tom samy mění své fyzikální vlastnosti. V závislosti na sledované molekule (mitochondrie, jádro, Golgiho aparát aj.) nebo na sledovaném jevu (stanovení kyslíku, membránového potenciálu, viskozity aj.) se musí vybrat vhodná sonda, která nám umožní získat potřebné informace o studovaném vzorku. Fluorescenční sondy se využívají díky své vysoké citlivosti, specifitě, rychlé odezvě a technické jednoduchosti [24].

2.1.4.1 Vizualizace buněčného jádra

Jádro je řídicím centrem buňky a jeho hlavními funkcemi je zajistit integritu genů a řídit aktivitu celé buňky pomocí regulace genové exprese. Geny jsou tvořené deoxyribonukleovou kyselinou (DNA) a transkripcí DNA vzniká ribonukleová kyselina (RNA) [21]. U genomové DNA jsou místa pro vazbu fluorescenčních sond místa opakujících se sekvencí bazí. V případě RNA jde o počet prepisovaných kopií. Ve většině studií se používají repetice, které jsou lokalizovány ve specifických lokusech chromozomů (centromery, telomery) [25].

Vizualizovat buněčného jádro lze s využitím lineárních sond a fluoroforů, které mění své fluorescenční spektrum s cílovou DNA. Detekovaný signál fluorescenční sondy bude viděn jako jasný bod na fluorescenčním pozadí. Vhodné fluorofory, které splňují tyto požadavky jsou kyaninová barviva. Nejčastěji se z nich používá thiazolová oranž. Páry kyaninových barviv jsou schopné přenášet excitační energii a lze je použít pro experimenty s FRET [25].

Barviva Hoechst patří mezi nejvyužívanější sondy používané k vizualizaci DNA v živých i fixovaných buňkách. Sondy Hoechst mají vysokou afinitu a specifitu k DNA, jsou málo toxické a práce s nimi je snadná. K barvení se může použít Hoechst 33258, Hoechst 33342 nebo Hoechst 34580. Pro barvení živých buněk je častěji využíván Hoechst 33258, který je více propustný pro buňky díky své lipofilní ethylové skupině. Hoechst je široce využíván při společném barvení buněk, kdy chceme vizualizovat kromě jádra i jiné buněčné struktury. Jeho emisní a excitační spektra se nepřekrývají s jinými běžně používanými fluorofory [26].

Oligonukleotidové sondy jsou jednovláknové fragmenty nukleových kyselin, které lze přizpůsobit tak, aby měly vysokou specifitu a afinitu k nukleovým kyselinám, ale i k jiným cílům (proteiny, malé molekuly a ionty). Oligonukleotidové sondy se dělí na hybridizační

a aptamerové sondy. Hybridizační sondy jsou založené na tvorbě komplementárních páru bazí, aptamerové sondy využívají selektivní rozpoznávání analytů jiných než nukleových kyselin. Nejběžnějšími hybridizačními sondami pro DNA a RNA jsou molekulární majáky (*Molecular beacons*, MB). Klasický MB je fluorescenčně značený vlásenkový oligonukleotid skládající se ze smyčky 15-30 nukleotidů schopných rozpoznat cílovou molekulu, kmenu 5-8 bazí, který během hybridizace disociuje MB s cílovou molekulou a dále z fluorescenční skupiny připojené k 5' konci a zhasací skupiny připojené k 3' konci MB [27]. V konformaci kmenové smyčky je fluorofor a zhasáč blízko u sebe a veškerá fluorescence je zhasána. Po hybridizaci se vlásenková struktura otevře, vzdálenost mezi fluoroforem a zhasáčem se zvětší a dochází k viditelné fluorescenci [25].

2.1.4.2 Detekce mitochondriálního membránového potenciálu

Mitochondriální membránový potenciál (*Mitochondrial membrane potential*; MMP) je výsledkem redoxních reakcí spojených s aktivitou Krebsova cyklu a slouží jako přechodná forma ukládání energie, kterou ATP-syntáza využívá k syntéze ATP. Za normálních okolností si mitochondrie udržují stabilní hladinu ATP i MMP. Stabilní hodnoty ATP a MMP jsou nezbytnou podmínkou pro fyziologické fungování buněk. Hodnoty MMP se mohou v důsledku fyziologické aktivity měnit, ale změny musí být vratné. Při jejich prodloužení by mohlo dojít k ohrožení životaschopnosti buňky a ke vzniku patologických stavů (Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, rakovina, cukrovka) [28;29]. K hodnocení hladin MMP se dříve používala mikroelektroda. Před měřením musely být mitochondrie izolovány z buněk, jinak by byly poškozeny. Při izolaci ale docházelo často ke zničení integrity buněk [30].

Pro detekci MMP se dnes využívají kationtová lipofilní barviva TMRM (*Tetramethylrhodaminmethylester*), TMRE (*Tetramethylrhodaminethylester*) a Rhodamin 123. Kladně nabité sondy prochází negativně nabitou mitochondriální membránou díky své lipofilitě. Sondy se akumulují uvnitř mitochondriální matrix. Poškozené mitochondrie mají snížený MMP a nebudou vizualizovány. Rhodamin 123 se využívá především k měření aktuálního MMP. Akumulace fluorescenčního barviva v mitochondriích je poté opticky detekována s využitím fluorescenční mikroskopie (např. CLSM) s CCD kamerou [31;32].

Další sonda pro detekci MMP se nazývá JC-1 (*5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodid*). Sonda JC-1 reaguje velice citlivě na změny hodnot MMP a je považována za nejspecifičtější sondu pro detekci změn MMP. V závislosti na MMP je sonda schopná vytvářet J-agregáty. Agregáty jsou přímo úměrné polarizaci membrány, tedy čím vyšší polarizace, tím více agregátů vznikne. V matrix

mitochondrií s vysokou hodnotou MMP detekujeme červenou barvu agregátů. U mitochondrií s nízkou hodnotou MMP detekuje zelenou fluorescenci monomerů sondy JC-1 [31;32].

2.1.4.3 Detekce ROS

Mitochondrie jsou hlavním zdrojem buněčných reaktivních forem kyslíku (*Reactive oxygen species*; ROS). ROS se účastní stárnutí buněk a vzniku patologických stavů (rakovina, neurodegenerace, cukrovka aj.). Pro udržení fyziologického stavu je zásadní rovnováha mezi produkcí a destrukcí ROS [33].

Tabulka 1. Přehled ROS s jejich zkratkami. Převzato a upraveno z [33].

ROS	Zkratka
Hydroxylový radikál	$\cdot\text{OH}$
Superoxid	$\text{O}_2^{\cdot-}$
Oxid dusnatý	$\cdot\text{NO}$
Alkylperoxylový radikál	$\text{ROO}\cdot$
Alkoxylový radikál	$\text{RO}\cdot$
Peroxid vodíku	H_2O_2
Singletový kyslík	$^1\text{O}_2$
Kyselina chlorná	HClO

Fluorescenční sonda HE (*Hydroethidin*) slouží pro detekci $\text{O}_2^{\cdot-}$. HE má schopnost procházet buněčnými membránami. Uvnitř buňky je HE oxidován na ethidium, které je zadržováno v jádru a mísí se s DNA. Jsme schopni detekovat fluorescenci ethidia. HE může být také oxidován i jinými reaktivními formami a ve skutečnosti poskytuje informace o produkci ROS i reaktivních formách dusíku (*Reactive oxygen species*; RNS) [34].

Pro detekci H_2O_2 se využívá sonda DCFH-DA (*2,7-dichlordihydrofluorescein diacetát*). DCFH-DA je pro buňky propustný ester. Uvnitř buňky se oxiduje na dihydroxy-DCFH, který je v buňce zadržen a jsme schopni zachytit jeho fluorescenci. Sondu nelze brát jako spolehlivou, protože katalyzovat oxidaci mohou i přechodné kovy a cytochrom c. Extracelulární H_2O_2 jsme schopni detekovat pomocí sondy Amplex Red (*N-acetyl-3,7-dihydroxyfenoxazin*), která je vysoce specifická a citlivá. Amplex Red je nefluorescenční molekula, která se oxiduje za katalýzy křenové peroxidázy na resorufin. Resorufin je vysoce fluorescentní produkt, který jsme schopni pozorovat [34;35].

2.1.4.4 Vizualizace aktinových vláken

Aktinový cytoskelet je nezbytný pro životaschopnost buněk a hraje klíčovou roli v buněčné motilitě, endocytóze a růstu. Aktinový cytoskelet se skládá z aktinových

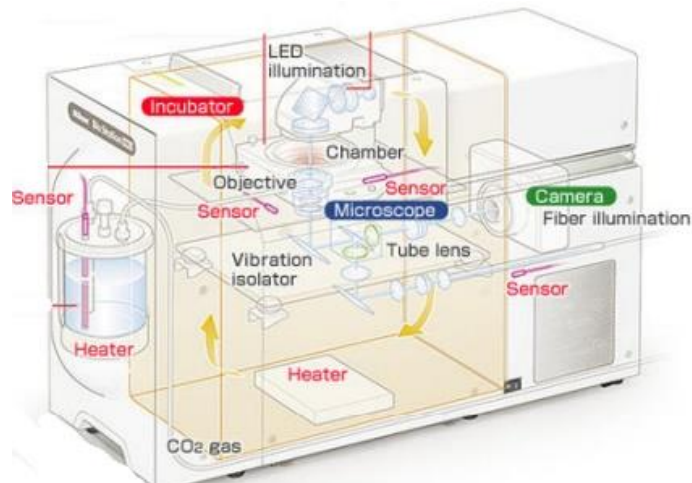
monomerních vláken (G-aktin), které se shromažďují do aktinových polymerních vláken (F-aktin) [36]. V cytoplazmě je polymerace aktinu vysoce dynamická. Kromě polymerace aktinů je dynamika aktinů silně ovlivněna místním prostředím cytosolu. Pro vizualizaci se využívá zelený fluorescenční protein (*Green fluorescent protein*, GFP). Signál GFP-aktin poskytuje cenné informace o dynamice a cytoskeletálních vlastnostech. Signál pochází hlavně z difúze monomerní části aktinu. Pro detekci GFP-aktinu se využívá především technika FRAP [37].

Zlatým standardem pro značení aktinových vláken je Faloidin. Faloidin je izolovaný toxin z hub *Amanita phalloides*. Faloidin se váže na vláknitý aktin s vysokou afinitou a konjugovaný s fluoroforem je užitečným nástrojem pro zobrazení aktinu [38]. Pozastavuje strukturální změny aktinu, a to pravděpodobně ovlivňuje interakci s proteiny, které vážou aktin. Použití je do značné míry omezeno na značení fixovaných buněk, protože toxin má nízkou permeabilitu pro buněčné membrány. Další nevýhodou toxinu je to, že nemusí vázat všechny přítomné aktinové struktury [39].

2.2. PŘÍSTROJ BIOSTATION

Přístroj BioStation IM-Q obsahuje mikroskop, inkubátor a vysoce citlivou CCD kameru. Poskytuje stabilní prostředí pro živé buňky a je pokročilým řešením pro jednoduchý dlouhodobý sběr dat v čase. Struktura je odolná proti vibracím a je tepelně izolovaná. Výhoda BioStationu je schopnost zobrazovat a inkubovat buňky současně a tím eliminovat experimentální chyby. Umožňuje časosběrné zobrazování i po dobu několika dní [40].

BioStation IM-Q obsahuje dva zdroje záření, externí rtuťovou výbojku a LED diodu. Je schopen pořizovat fluorescenční snímky a snímky ve fázovém kontrastu. Uzávěr fluorescenčního zdroje se otevírá pouze při pořizování snímku, aby se snížila jeho fototoxicita. Komoru lze z inkubační komory vytáhnout a můžeme ji sterilizovat v autoklávu. BioStation IM-Q obsahuje čtyři senzory pro přesnou kontrolu prostředí. Zvlhčovač udržuje vlhkost nad 95 %. BioStation IM-Q také poskytuje stabilní přísun oxidu uhličitého. Pomocí koncentrace oxidu uhličitého lze regulovat fyziologické pH (~ 7,4) [40].



Obrázek 6. BioStatin IM-Q [40].

Nevýhodou Biostationu IM-Q jsou omezené možnosti použití kultivačních komor. Prostor uvnitř BioStationu IM-Q je velmi malý a většinou se do prostoru pro vzorek vleze jen malá Petriho miska. Další nevýhodou při dlouhodobějších experimentech je uzavřená kultivační komora. Nelze např. vyměnit kultivační médium během záznamu [41].

2.3 CYTOTOXICKÉ PŮSOBENÍ LÁTEK *IN VITRO*

2.3.1 Nefrotoxicita

Ledviny jsou cílovým orgánem toxicity několika xenobiotik a protinádorových léků. Ledviny jsou hlavním orgánem pro udržení homeostázy v těle, a proto dysfunkce ledvin závažně ovlivňuje kvalitu života a zdraví. Protinádorová léčba, zejména chemoterapeutická činidla způsobují vysokou toxicitu vedoucí k dysfunkci ledvin [42]. Proximální tubulus je nejčastějším místem poškození ledvin vyvolaného toxiny. Koncentrace léčiva je v proximálním tubulu nejvyšší díky filtraci látek. Buňky proximálních tubulů ledvin aktivně transportují mnoho léčiv, organických sloučenin a xenobiotik z krevního řečiště do glomerulárního filtrátu a také metabolizují mnoho z těchto sloučenin [43].

K hodnocení nefrotoxicity *in vitro* se dříve využívala linie NRK-52E odvozená z epitelu proximálního tubulu potkana. Linie vykazovala dobré hodnocení toxicity *in vitro*, avšak buňky ze zvířecích tkání mají omezenou funkci pro hodnocení toxicity u lidí. Kultivované buňky odvozené z lidské tkáně poskytují komplexnější a spolehlivější informace k vyhodnocení toxikologického rizika [44]. Buněčná linie lidské ledviny-2 (*Human kidney 2*, HK-2) je buněčná linie lidského proximálního tubulu. Buňky HK-2 neexprimují kritické transportéry absorpce, jako jsou např. transportéry organických aniontů a kationtů [43]. Buňky HK-2 byly

imortalizovány transdukcí rekombinantního lidského papilomaviru obsahující geny E6/E7. Buňky si zanechávají fenotyp dobře diferencovaných proximálních tubulárních buněk, jsou pozitivní na alkalickou fosfatázu, gama-glutamyltranspeptidázu a kyselou fosfatázu. Kromě toho si buňky HK-2 zachovávají funkční vlastnosti proximálního tubulárního epitelu (transport cukru, reakce na parathormon) [45].

Nefrotoxicita je závažným vedlejším účinkem mnoha dostupných léků. Akutní selhání ledvin je způsobeno v 19-25 % po expozici lékům. Mezi známé nefrotické léky patří kolistin, gentamicin, cisplatina, cyklosporin A a doxorubicin [46]. Vážnou nefrotoxicitu může způsobit cisplatina (*Cis-diamminedichloplatina*; CisPt). CisPt je běžně používané chemoterapeutikum. Buňky proximálního tubulu jsou bohaté na mitochondrie. CisPt je schopná přednostně se akumulovat v renálních tubulárních epitelálních buňkách a indukovat mitochondriální dysfunkci v důsledku zvýšených hodnot ROS. $O_2^{\cdot-}$ jako prekurzor většiny ROS může působit jako časný projev nefrotoxicity pro detekci a studium akutního renálního selhání. Pro detekci ROS můžeme využít sondu DCFH-DA, pro vyhodnocení MMP sondu JC-1. K zobrazení se často využívá technika CLSM nebo fluorescenční mikroskopie [47]. Nefrotoxicita může být také vyvolána kontrastními látkami. Radiologické vyšetření využívají kontrastní látky pro diagnostiku i pro léčebné účely. Chronické selhání ledvin je spojeno se zvýšeným oxidačním stresem, a proto jsou pacienti náchylnější k nefrotoxicitě vyvolané kontrastními látkami [48].

2.3.2 Neurotoxicita

Neurotoxicita je definována jako jakýkoliv nepříznivý účinek toxické látky na fyziologickou strukturu a funkci nervového systému [49]. Pro studium *in vitro* se používá buněčná linie lidského neuroblastomu (*Human neuroblastoma*; SH-SY5Y). Buněčná linie neuroblastomu SH-SY5Y byla získána klonováním z buněčné linie SK-N-SH, která byla původně vytvořena na počátku 70. let z biopsie kostní dřeně u pacienta s neuroblastomem. Buněčné linie SH-SY5Y se hojně využívají, protože mají mnoho biochemických a funkčních vlastností neuronů. Buňky SH-SY5Y jsou často indukovány k diferenciaci trans-retinovou kyselinou. Trans-retinová kyselina podporuje přežití buněk a snižuje citlivost buněk na neurotoxiny. Neurotoxicita je často studována pro vývoj nových terapeutických léčiv pro Parkinsonovu chorobu a Alzheimerovu chorobu. Běžně používanými neurotoxiny pro vývoj léčiv jsou 6-OHDA (*6-hydroxydopamin*) a MPP+ (*1-methyl-4-fenylpyridiniový iont*) [50]. Je známo, že celá řada látek má nepříznivý dopad na vývoj nervového systému. Příkladem je rtuť, olovo a polychlorované bifenyly [49].

Methylrtuť je vysoce toxická pro centrální nervový systém a zejména pro vyvíjející se mozek. Methylrtuť je organická forma rtuti. Primární expozice člověku je konzumace mořských plodů. Methylrtuť snižuje hodnoty glutathionu (GSH) a inhibuje glutathionperoxidázy a glutathionreduktázu. Dále indukuje mitochondriální dysfunkci, snižuje MMP a inhibuje polymeraci mikrotubulů. Dalším známým neurotoxinem je kyselina okadaová, která je obsažena v mořských měkkýších. Kyselina okadaová je silným inhibitorem proteinových fosfatáz. Neurotoxicita je prokázána také u akrylamidu, který se široce využívá v průmyslu anebo je přirozeně tvořen ve škrobu, který je vařen při vysokých teplotách [51].

Koncentrace intracelulárního vápníku je důležitým údajem pro *in vitro* neurotoxicitu, protože vápník (Ca^{2+}) je zapojen do mnoha základních neurobiologických procesů, včetně neurotransmise, neurodegenerace a nervového vývoje. I malé změny koncentrace Ca^{2+} mohou mít škodlivé účinky. Buňky proto regulují kromě jeho koncentrace i proteiny vázající Ca^{2+} , ukládání Ca^{2+} v mitochondriích a v endoplazmatickém retikulu, transport Ca^{2+} , řízení pomocí napěťových kanálů nebo řízení pomocí Ca^{2+} propustných receptorů neurotransmiterů. Látky mohou narušit homeostázu Ca^{2+} tím, že zacílí své působení na řídicí mechanismus. Změny Ca^{2+} v reálném čase se hodnotí pomocí fluorescenční mikroskopie nebo pomocí mikrodestiček [52].

2.3.3 Hepatotoxicity

Játra jsou odpovědná za detoxikaci endogenních i exogenních molekul. K hepatotoxicitě dochází, pokud nejsou xenobiotika dostatečně eliminována během jejich metabolismu. Nejčastěji používané buněčné linie ke studiu hepatotoxicity jsou buněčné linie lidského hepatocelulárního karcinomu (*Human hepatocellular carcinoma cell line*; HepG2) a lidská hepatální buněčná linie (*Hepatic stem cell line*; HepaRG). HepG2 jsou lidské nenádorotvorné buňky s vysokou mírou proliferace a s podobnou morfologií epitelu jater. Mají podobné jaterní funkce, jako je syntéza a sekrece plazmatických proteinů, metabolismus cholesterolu a triacylglycerolů, metabolismus a transport lipoproteinů, syntéza žlučových kyselin nebo syntéza glykogenu [53]. Buňky HepaRG byly izolovány a kultivovány z hepatomu u pacientky s cirhózou jater po infekci hepatitidy typu C [54].

Hepatotoxicita může být vyvolána léky, alkoholem anebo může dojít k nealkoholovému poškození jater v důsledku zvýšení tuků (steatóza, cholestáza). Když se hromadí tuk v játrech, lipidy se primárně ukládají jako triacylglyceridy. Vznikne následná steatóza a játra poskytují substráty pro peroxidaci lipidů. Steatózu způsobuje např. léčba tetracyklinem nebo doxycyklinem [53]. Cholestáza je onemocnění, při kterém je porušena tvorba a vylučování žluče. Může být výsledkem funkční poruchy tvorby žluči na úrovni hepatocytů

nebo poškození sekrece a toku žluči na úrovni žlučových vodů. Cholestáza vede k intrahepatální akumulaci toxických žlučových kyselin. Při přetrvávání může postoupit k následné nekróze a vést až ke smrti [56].

Hlavní léčivo pro studování poškození jater v rámci buněčné cytotoxikologie je acetaminofen (*N-acetylaminofenol*; APAP). Předávkování acetaminofenem neboli paracetamolem způsobuje vážné poškození jater. APAP je velmi využívané analgetikum a antipyretikum s prokázanou bezpečností v terapeutických dávkách, avšak předávkování vede nejčastěji k akutnímu selhání jater [57]. Při terapeutických dávkách je více než 90 % APAP glukuronidováno nebo sulfatováno v játrech a následně vyloučeno. Zbytek je metabolizován cytochromy P450 na elektrofilní reaktivní metabolit NAPQI (N-acetyl-p-benzochinonimin), který lze neutralizovat konjugací s GSH. Při předávkování je zvýšena tvorba metabolitu, který se poté naváže na buněčné proteiny. Následná mitochondriální dysfunkce vede k inhibici mitochondriálního dýchání, depleci ATP a tvorbě ROS i RNS uvnitř mitochondrií [58].

2.3.4 Plicní toxicita

Výzkum plic vyžaduje modely, které představují fyziologii alveolárního epitelu. K plicní bariéře přispívá více typů buněk, včetně alveolárního epitelu typu I a II. Alveolární buněčná linie lidského plicního adenokarcinomu (*Alveolar human lung adenocarcinoma cell line*; A549) je dostupná linie pro výzkum toxicity [59]. Buněčná linie A549 byla vytvořena a charakterizována v roce 1972. A549 má charakteristické rysy buněk typu II plicního epitelu včetně lamelárních tělísek. Možnost podávání léku plicní cestou nabízí své výhody. Patří mezi ně velká absorpční plocha a nízká extracelulární i intracelulární enzymatická aktivita. Plicní podání umožňuje rychlou absorpci léčiva do krevního oběhu [60].

Amiodaron se často používá k potlačení tachyritmie. Jeho nežádoucím účinkem je amiodaronová plicní toxicita. Toxicita se vyskytuje u 5 % až 15 % pacientů. Závisí na dávce, věku pacienta a předchozím plicním onemocnění. Amiodaron obsahuje jód, který se hromadí i v jiných orgánech než v plicích [61].

Nanočástice se díky svému malému průměru ukládají hluboko do plic. Zde přicházejí do kontaktu s buňkami bronchiálního epitelu a s buňkami pneumocytů typu I a II. Cytotoxicita zlatých nanočástic v buňkách A549 se může prokázat jako zástava buněčného cyklu, vzniku oxidačního stresu až apoptózy [60].

2.4 MORFOLOGICKÉ ZMĚNY BUNĚK PŘI PŮSOBNÍ TOXINŮ

2.4.1 Změna morfologie při působení terc-butylhydroperoxidu

Terc-butylhydroperoxid (t-BHP) je sloučenina s krátkým řetězcem lipidových hydroperoxidů, která napodobuje toxický účinek peroxidovaných mastných kyselin [63]. Látka t-BHP se používá jako přísada do mražených mořských plodů, mazadel, bělicích a dezinfekčních prostředků [64]. Sloučenina t-BHP se běžně používá jako modelová látka pro hodnocení mechanismů buněčných změn vyplývajících z oxidačního stresu v buňkách a tkáních. Sloučenina t-BHP se může metabolizovat dvěma cestami, obě indukují oxidační stres. Metabolizace pomocí cytochromu P450 vede k produkci peroxylových a alkoxylových radikálů. Radikály iniciují lipoperoxidaci membránových fosfolipidů s následnými změnami integrity membrány (tekutost a propustnost). K druhé možné metabolizaci využívá t-BHP enzym glutathionperoxidázu. Sloučenina t-BHP se pomocí glutathionperoxidázy detoxikuje na terc-butanol. Dochází také ke snížení GSH, který se vyčerpá oxidací na disulfidovou formu (GSSG). Lipoperoxidace, vyčerpání GSH a změna mitochondriální permeability jsou obecné mechanismy podílející se na poškození buněk způsobené oxidačním stresem [65].

Látka t-BHP je schopná indukovat nekrózu i apoptózu. Cytotoxický účinek zvýšené koncentrace t-BHP vyvolává typické změny morfologie jader. Dochází ke kondenzaci chromatinu a fragmentaci jader. K pozorování změn morfologie buněčného jádra se využívá sonda Hoechst, která se specificky váže do úseku DNA. Cytotoxicita t-BHP se může detekovat pomocí měření uvolňované laktátdehydrogenázy. Koncentrace laktátdehydrogenázy může být pozorována pomocí akridinové oranže [63]. Toxin t-BHP vyvolává akutní a chronickou toxicitu v hepatocytech, zvyšuje hladinu alaninaminotransferázy a aspartátaminotransferázy. Toxin t-BHP je iniciátorem předčasného stárnutí a zvyšuje rychlost zkracování telomer. Aktivita telomerázy je spojena s odolností vůči apoptóze a poškozením DNA vyvolaným oxidačním stresem [64].

2.4.2 Změna morfologie při působení cisplatiny

Chemoterapeutická činidla odvozená z platiny, včetně CisPt jsou hlavními terapeutickými látkami k léčbě několika druhů rakoviny, včetně rakoviny vaječníků, varlat a močového měchýře. Terapeutické použití CisPt je však omezeno vedlejšími účinky, mezi které patří inhibice transkripce DNA, zastavení buněčného cyklu, tvorba ROS a v konečném důsledku může docházet k apoptotické smrti [66]. CisPt je reaktivní léčivo, které interaguje nejen s DNA, ale také s ostatními buněčnými složkami, která obsahují nukleofilní

místa, jako je RNA, proteiny, membránové fosfolipidy, cytoskeletální mikrofilamenta a molekuly obsahující thiol [67]. Tumor supresorový gen (TP53), který kóduje protein 53 (p53), je důležitý protinádorový gen, který je u rakoviny často mutován. CisPt indukují expresi p53. Jeho exprese hraje důležitou roli při regulaci genů pro glykolýzu, a proto při nadměrné expresi může dojít k apoptóze. CisPt se rychle hromadí v mitochondriích a zhoršuje mitochondriální strukturu a metabolické funkce [66].

Poškození DNA a následná indukce apoptózy je primárním cytotoxickým mechanismem. CisPt se váže na báze guaninového nukleotidu a blokuje replikaci DNA, což vede k poškození DNA a k zastavení buněčného cyklu. Toxin se také podílí na stresové reakci endoplazmatického retikula v rakovinných buňkách, ale i ve zdravých buňkách proximálního tubulu ledvin [68]. Endoplazmatické retikulum hraje důležitou roli při udržování intracelulární homeostázy vápníku a syntéze proteinů, posttranslačních modifikací a správném ukládání proteinů. Stres v endoplazmatickém retikulu je způsoben změnou homeostázy vápníku a akumulace nerozložených proteinů. CisPt indukují membránové a cytoplazmatické změny v nádorových buňkách, jakým je zahuštění buněk, shlukování nukleárního chromatinu a dilatace endoplazmatického retikula [69].

Poškození DNA není dostatečné k vysvětlení cytotoxicity CisPt. Bylo prokázáno, že CisPt může také změnit integritu buněčných membrán. Platina a podobné kovy mohou interagovat s místy přítomnými na plazmatické membráně. Interakce platina-protein je nevratná, zatímco vazba platiny na membránové fosfolipidy je slabá a reverzibilní. I když je vazba slabá a reverzibilní, interakce mění konformaci fosfolipidů a modifikuje membránové funkce. V buněčné linii A549 byly pozorovány změny membránové tekutosti. Stejným způsobem vyvolává CisPt zvýšení tekutosti membrány ledvinných proximálních buněk. Při nízké koncentraci CisPt inhibuje polymeraci aktinu, při vysoké koncentraci indukují depolymerizaci či agregaci aktinu [69].

2.4.3 Změna morfologie při působení chloridu kademnatého

Kadmium je toxický kov, který se přednostně hromadí v ledvinách a způsobuje nefrotoxicitu. Pro testování cytotoxicity se používá CdCl_2 [70]. Kadmium je přirozeně se vyskytující těžký kov, který se často používá v průmyslu. Kadmium je z jedné z hlavních složek cigaretového kouře a je klasifikován jako lidský karcinogen skupiny I. Mnoho studií prokázalo, že kadmium vyvolává různé genotoxické účinky, jakým je poškození DNA a vznik chromozomálních aberací. Při nadměrné expozici kadmia mohou vzniknout onemocnění, např. onemocnění kostí, poškození ledvin a několik forem rakoviny. Kadmium ovlivňuje dráhy

přenosu signálu, zvyšuje hladiny volného vápníku a blokuje vápníkové kanály. Kadmium mění antioxidační obranné mechanismy a zvyšuje tvorbu ROS, včetně $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 [71].

Kadmium se váže v játrech na protein metallothionein, který má k dispozici volný cystein. Komplex se v průběhu času pomalu uvolňuje z jater do ledvin a hromadí se v ledvinné kůře. Volné kadmium i kadmium vázané na metallothionein jsou absorbovány endocytózou zprostředkovanou receptory v renálním proximálním tubulu. Metallothionein je degradován v endosomech a uvolněné volné kadmium v cytosolu vytváří tvorbu ROS a způsobuje buněčné poškození. Všechny buněčné účinky vyvolané kadmii jsou často spojeny s apoptózou vyvolanou signalizací p53. Při koncentraci kadmia, která je nižší než koncentrace inhibující životaschopnost buněk, dochází ke zhoršení aktivity p53 tím, že kadmium inhibuje vazebnou kapacitu DNA. Inhibice vede k chybné replikaci DNA, která způsobuje karcinogenezi [72].

U buněčné linie A549 vystavené $CdCl_2$ se viabilita buněk snižuje se zvyšující se koncentrací. Za účelem studia jaderného poškození vyvolané $CdCl_2$ mohou být označena jádra pomocí sondy Hoechst. V mikroskopu lze poté pozorovat u jader viditelnou kondenzaci chromatinu a poškození DNA [72]. Expozice $CdCl_2$ může způsobit neurotoxicitu prostřednictvím zvýšené produkce ROS. Volné radikály mohou zvyšovat hladinu peroxidace lipidů s následným narušením buněčných membrán, poškozením DNA a konečnou smrtí buněk. Pro studium apoptózy buněk se často využívá hodnocení metabolické aktivity buněk pomocí testu MTT (*methyl tetrazolium test*). Další běžné techniky jsou založeny na testech, které měří ztrátu integrity plazmatické membrány pomocí fluorescenčních barviv schopných proniknout do buňky až po prasknutí membrány. Všechny testy obvykle vyžadují dlouhou přípravu vzorku a vykazují různé citlivosti v závislosti na buněčné linii a na jejich citlivosti na $CdCl_2$ [73].

2.4.4 Změna morfologie při působení nanočástic a nanomateriálů

Nanočástice díky své velikosti ≤ 100 nm hladce pronikají do kůže či dýchacích cest. Po vstupu nanočástic do těla prostupují do mnoha tkání a orgánů včetně mozku, jater a ledvin. V důsledku toho mohou způsobit poruchu imunitního systému a iniciovat zánětlivou odpověď. Vše závisí na vlastnosti nanomateriálů, genetické predispozici člověka, době expozice a dávce nanočástic [74]. Na základě tvaru nanočástic, mohou být nanomateriály rozděleny do čtyř tříd. Do třídy 0-D patří sférické formy, kam se řadí např. zlaté částice nebo fulleren. Jako třída 1-D se označují trubičkové a drátěné formy, jakou je uhlíková nanotrubička. 2-D formy jsou formy plechů a desek, kam se řadí grafen. Mezi 3-D struktury patří např. zlaté nanočástice [75].

Se zmenšující velikostí dochází k vylepšení fyzikálních, chemických, mechanických a optických vlastností. S velikostí nanočástic je také spojen zvýšený nárůst povrchové plochy

částic. Na povrch nanomateriálu se proto může připojit více chemických složek a jejich reaktivita a toxicita se následně zvyšuje. Vylepšené vlastnosti nanočástic se využívají při léčbě obtížně léčitelných nemocí, kdy nanomateriály slouží jako nosiče léků. Terapie založená na nanočásticích nabízí ve srovnání s běžnými léčivy určité výhody, jako je vysoká specifita, selektivita a dodání k cílenému místu. Avšak si musíme uvědomit, že přestože nabízejí slibné biologické účinky, mohou představovat toxické ohrožení [76].

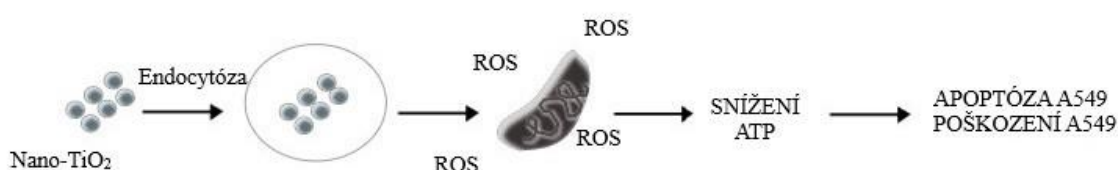
Tabulka 2. Využití běžně používaných nanočástic a nanomateriálů. Převzato a upraveno z [77].

Typ	Aplikace
Uhlíkové nanotrubičky	Biosenzory
Stříbro	Antimikrobiální produkty
Kvantová tečka	Fluorescenční zobrazování
Hliník	Pří sada do paliva
Železo	Magnetické zobrazování
Oxid titaničitý	Barvy, úprava vody, potraviny, kosmetika
Oxid manganatý	Baterie
Oxid zinečnatý	Opalovací krémy

2.4.4.1 Působení nanočástic oxidu titaničitého

Oxid titaničitý (TiO_2) je přírodní minerální oxid, který se může vyskytovat ve formě anatasu, rutilu a brookitu. Anatasové částice způsobují vyšší cytotoxicitu, zánětlivé reakce a tvorbu ROS v různých typech buněk a tkáních než rutilové částice. Nanočástice TiO_2 jsou široce využívány v kosmetice, malířství a při konzervaci potravin. TiO_2 se používají pro výrobu biomateriálů, kvůli své vysoké stabilitě a antimikrobiálním i antikoročním vlastnostem. TiO_2 se do lidského těla může dostat vdechnutím, kontaktem s pokožkou nebo požitím. Inhalace je pravděpodobně hlavní vstupní cestou TiO_2 do lidského těla [78]. Nanočástice TiO_2 , které proniknou plicními cestami, mohou být transportovány do mozku nebo krevní cirkulace, z které se dostanou do ledvin, jater a ostatních orgánů [79]. Expozice TiO_2 může způsobit plicní zánět, fibrózu anebo reakci podobnou emfyzému [80].

V lidských dýchacích cestách se na základě velikosti nanočástic TiO_2 předpokládá, že se ukládají hlavně v alveolách. Pro studování cytotoxicity se proto často využívá buněčné linie A549. *In vitro* se nanočástice TiO_2 akumulují v buňkách hlavně endocytózou a distribuují se v intracytoplazmatických kompartmentech. Nanočástice TiO_2 indukují v buňkách oxidační stres pomocí zvýšené tvorby ROS a snížené antioxidační buněčné odpovědi. Nanočástice TiO_2 také způsobují oxidační poškození DNA, i když se uvnitř buněčného jádra neakumulují [80]. V mikroskopu lze pozorovat u buněk A549 typické apoptotické smršťování buněk. Po obarvení sondou Hoechst lze pozorovat, že nanočástice TiO_2 způsobují kondenzaci chromatinu v jádrech a při vyšších koncentracích lze vidět obarvená jádra apoptotických tělísek [78].



Obrázek 7. Schéma poškození buněk pomocí nanočástic TiO_2 .

2.4.4.2 Působení nanočástic oxidu zinečnatého

Nanočástice oxidu zinečnatého (ZnO) jsou syntetizovány několika metodami a jejich vlastnosti jsou určovány velikostí, chemickým složením a povrchovými vlastnostmi. Nanočástice ZnO se používají v kosmetice, pigmentech, nátěrech, katalyzátorech a v elektronických zařízeních. Dále jsou často využívány pro své antibakteriální vlastnosti v průmyslových odvětvích při výrobě bavlny, gumy a balení potravin. Absorpce nanočástic ZnO vede ke zvýšené koncentraci zinku v játrech, tukové tkáni a slinivce břišní [81].

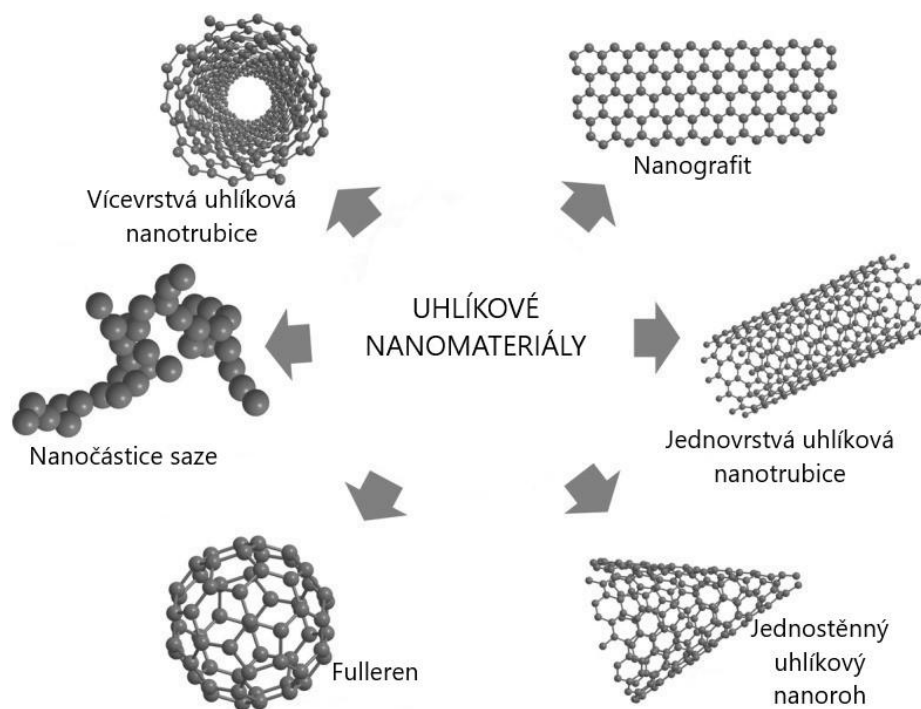
Cytotoxicita, oxidační stres a mitochondriální dysfunkce jsou způsobeny rozpustností nanočástic ZnO a následným zvýšením intracelulární hladiny zinečnatých iontů. Mechanismus cytotoxicity nanočástic ZnO může nastat v důsledku zvýšení hladiny zinečnatých iontů v extracelulární oblasti, následovaná zvýšením intracelulární koncentrace. Nanočástice ZnO mohou vstoupit do buňky přímo a zvýšit hladinu intracelulárních zinečnatých iontů v lysozomech. Zvýšení koncentrace zinečnatých iontů může ovlivnit enzymy závislé na zinku a transkripční faktory. Může také dojít k defektnímu trávení bílkovin a lysozomální destabilizaci [81].

Nanočástice ZnO mohou ovlivnit různé typy buněk. Nanorody (nanotyčky) ZnO jsou považovány pro buňky za toxickejší než sférický (kulovitý) tvar ZnO . Nanorod ZnO indukuje

např. v buňkách A549 cytotoxicitu, zvyšuje hladiny ROS, způsobuje oxidační stres a aktivaci apoptotických kaspáz. Nanočástice ZnO indukují hladinu ROS a snižují hladinu GSH v buňkách HK-2. V buněčné linii SHSY-5Y indukuje produkci mikrojader a poškození DNA [81]. V lidské epidermální buněčné linii bylo pozorováno, že nanočástice ZnO indukují oxidační stres pomocí snížení GSH a snížené katalázy. Genotoxický potenciál v lidských epidermálních buňkách je zprostředkován pomocí peroxidace lipidů a vznikem oxidačního stresu. V mikroskopu lze pozorovat buňky, které změni svůj tvar na sférický. Sférické buňky se oddělí od shluků buněk, které jsou přilehlé na povrchu [82].

2.4.4.3 Působení uhlíkových nanomateriálů

Nanomateriály na bázi uhlíku mají výborné vlastnosti a jsou využívány pro různé aplikace od podání léčiv až po využití v elektronice. Uhlíkové nanomateriály mají různé formace s odlišnými tvary. Rozdělujeme je na černé nanočástice, fullereny, uhlíkové nanotrubicе, vlákna a další příbuzné formy. Existují i přirozeně se vyskytující uhlíkaté částice ve vzduchu, které vznikají ve spalovacích procesech, například při spalování metanu a propanu. Studie o znečištění ovzduší prokázaly, že inhalované uhlíkové nanočástice mohou způsobit poškození plic. Různé výsledky cytotoxicity materiálů na bázi uhlíku souvisí s rozdíly ve fyzikálně-chemických vlastnostech nanomateriálů a typu cílových buněk. Uhlíkové nanomateriály mohou vyvolat indukci ROS, poškození DNA, poškození lyzozomů, mitochondriální dysfunkci a případnou smrt buněk prostřednictvím apoptózy nebo nekrózy [83].



Obrázek 8. Formace uhlíkových nanomateriálů. Převzato a upraveno z [83].

Nanomateriály vyrobené z téměř čistého uhlíku jsou extrémně hydrofobní a snadno agregují v kapalinách. Vícevrstvá uhlíková nanotrubičice (*Multi walled carbon nanotube*; MWCNT) má podobnou patologii, jako azbestová vlákna. Obě mají jehlovitý tvar, prooxidační schopnost a bioperezistenci. MWCNT způsobují v buňkách A549 mitochondriální selhání a intracelulární lysozomální dysfunkci. Změny v lysosomální permeabilitě vedou k uvolnění hydrolytických enzymů v cytoplazmě a vyvolávají apoptózu. Vysoká produkce ROS je způsobena velkou plochou MWCNT [84]. Grafen nevstupuje do buněk A549 a nemá zjevnou cytotoxicitu, avšak může způsobit na buňce závislý oxidační stres a vyvolat mírnou ztrátu životaschopnosti buněk [85]. Buňky A549 po vystavení jednovrstvých uhlíkových nanotrubiček (*Single walled carbon nanotube*; SWCNT) vykazují ve světelném mikroskopu změnu morfologie, kdy lze pozorovat apoptotické a nekrotické buňky [86].

2.5 TYPY BUNĚČNÉ SMRTI

Buněčná smrt je důležitý biologický proces, který určuje vývoj mnohobuněčných organismů. V imunitním systému hraje buněčná smrt zásadní roli ve vývoji imunitních buněk a při obraně patogenů. Nesprávná funkce buněčné smrti může vést k zánětu, autoimunitě nebo imunodeficienci [87]. Buněčná smrt se projevuje makroskopickými morfologickými změnami. Podle změny morfologie klasifikujeme buněčnou smrt do tří různých forem. Buněčnou smrtí typu I je označována apoptóza, která se vykazuje cytoplazmatickým

smrštěním, kondenzací chromatinu (pyknóza), fragmentací jader (karyorrhexis) a tvorbou apoptotických tělísek, které jsou přijímány sousedními buňkami s fagocytární aktivitou a následně degradovány v lysozomech. Buněčná smrt typu II, nebo-li autofagie se projevuje rozsáhlou cytoplazmatickou vakuolizací a následnou lysozomální degradací. Buněčnou smrtí typu III je označována nekróza [88]. Dále se buněčná smrt může rozdělit podle toho, jestli jsou buňky z tkáně odstraněny buď kontrolovaným (programovaným) způsobem nebo nekontrolovaným. Programovaná smrt zahrnuje řadu biochemických a molekulárních dějů. Nekontrolovaná smrt má za následek rozlití obsahu do okolních tkání. Převládající formou programované buněčné smrti je apoptóza, nekontrolovanou buněčnou smrtí je označována nekróza [89].

2.5.1 Apoptóza

Apoptóza je proces, při kterém buňka přestává růst a nedělí se. Apoptóza je energeticky závislý, biochemicky zprostředkovaný proces programované buněčné smrti. Apoptóza je nezbytná pro mnoho procesů, včetně eliminace infikovaných a transformovaných buněk, správně fungujícího imunitního systému, vývoje organismu a udržování homeostázy. Existují dvě hlavní apoptotické signální dráhy. Vnější apoptotická cesta a vnitřní (tzv. mitochondriální cesta apoptózy) [88]. Kaspázy a rodina proteinů Bcl-2 jsou dvě nejdůležitější skupiny proteinů účastnících se apoptózy. Kaspázy jsou na cysteinu závislé endoproteázy, které katalyzují štěpení peptidové vazby. Aby byly kaspázy aktivní, musí se nejprve aktivovat z prokaspáz. V lidských buňkách je známo 14 kaspáz. Většina kaspáz může být rozdělena podle jejich role do tří hlavních skupin. Iniciátorové kaspázy (kaspázy 8 a 9), exekuční kaspázy (kaspázy 3, 6 a 7) a kaspázy účastnící se zánětu (kaspázy 1, 4, 5, 11 a 12). Kaspázová kaskáda je sama katalyzována, jakmile je spuštěna [90]. Po aktivaci mohou exekuční kaspázy, zejména kaspáza 3 a kaspáza 7 zpracovat alespoň 1000 proteinů. Štěpení těchto kaspázových substrátů může mít za následek zisk nebo naopak ztrátu funkce těchto proteinů [91].

Proteiny rodiny Bcl-2 se silně podílejí na regulaci apoptózy jak s proapoptotickými, tak i s antiapoptotickými aktivitami a lze je rozdělit do tří skupin. Antiapoptotická skupina proteinů zahrnuje proteiny Bcl-2, Mcl-1, Bcl-B, Bcl-xL a Bcl-W. Všechny proteiny mají čtyři Bcl-2 homologické domény (BH1, BH2, BH3 a BH4). Proapoptotická skupina je složená z proteinů Bax, Bak a Bok. Proteiny jsou svojí strukturou podobné první skupině, ale postrádají BH4 doménu. Třetí skupina má pouze doménu BH3 a skládá se z Bik, Hrk, Bim, Bad, Bid, PUMA, NOXA a Bmf. Proteiny ze třetí skupiny jsou při nadměrné expresi proapoptotické [90]. Vnější membrána je přísně regulována proteiny rodiny Bcl-2. Proteiny Bcl-2 také řídí několik

dalších buněčných procesů, včetně mitochondriální fúze, autofagie a odtoku Ca^{2+} z endoplazmatického retikula. Proteiny Bax a Bak jsou přímo zodpovědné za ztrátu integrity mitochondriální vnější membrány. Po jejich aktivaci vytvářejí velké oligomery, které se vkládají do membrány a narušují ji [91].

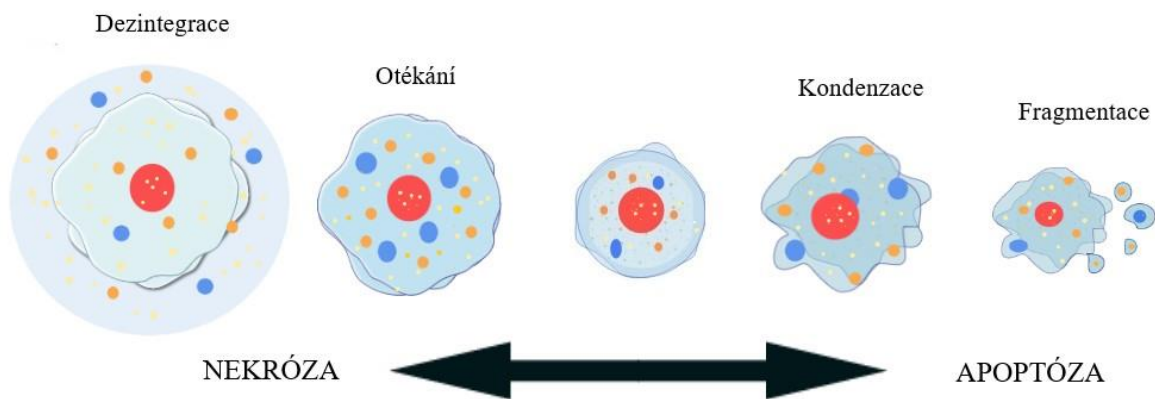
Vnitřní cesta apoptózy je nejběžnějším mechanismem apoptózy u obratlovců. Vnitřní cesta apoptózy je aktivována vnitřními podněty (metabolickým či hypoxickým stresem) nebo může být také vyvolána endoplazmatickým retikulárním stresem. Vnitřní stimuly podporují aktivaci kaspáz a proapoptotických členů rodiny Bcl-2. Aktivace vede k permeabilizaci vnějších membrán mitochondrií prostřednictvím kanálů Bax a k uvolňování cytochromu c z mitochondrií. Cytochrom c vytváří komplex s apoptotickým aktivačním faktorem 1 (*Apoptotic protease activating factor 1*; Apaf-1) a prokaspázou 9. Komplex se nazývá apoptosom Apaf-1 tvoří kostru, kolem které je apoptosom shromážděn. Apoptosom aktivuje prokaspázu 3, která následně aktivuje kaspázu 3. Kaspáza 3 štěpí cílové proteiny. U zdravých buněk se cytochrom c nachází pouze v mitochondriálním mezimembránovém prostoru. Aby mohl integrovat s Apaf-1, musí dojít k mitochondriální permeabilizaci vnější membrány vyvolané apoptotickými podněty [90; 91].

Vnější cesta apoptózy je spuštěna vnějšími podněty buněk a je známá jako cesta smrti pomocí tzv. receptorů buněčné smrti. Mezi receptory smrti patří tumor nekrotizující faktor, který má několik podskupin. Receptory obsahují na intracelulární části tzv. smrtící doménu. Smrtící doména je dlouhá přibližně 80 aminokyselin. Na smrtící doménu se vážají další proapoptotické proteiny, např. Fadd a tvoří membránově vázaný signální komplex navozující smrt (Death inducing signaling complex; DISC), který aktivuje kaspázy. Iniciátorová kaspáza 8 je přijata komplexem DISC a aktivována. Aktivovaná kaspáza 8 štěpí několik substrátů, včetně kaspázy 3. Aktivovaná kaspáza 3 štěpí aktin, jaderné laminy a podporuje degradaci DNA. Štěpení aktinu narušuje buněčné dělení a migraci buněk [89; 92].

2.5.2 Nekróza

Nekróza je zánětlivá forma buněčné smrti. Během nekrózy se narušuje integrita buněčné membrány a cytoplazmatické složky vytékají do extracelulárního prostoru, což vede k následnému zánětu a k poškození tkáně. Nekrózu může způsobit infekce, vysoké dávky záření, šok nebo udušení. Na rozdíl od apoptózy je nekróza energeticky nezávislá forma buněčné smrti, kdy je buňka tak silně poškozena, že není schopna samotné existence. Pokud je apoptóza blokována inhibicí kaspáz, může se režim buněčné smrti přeměnit na nekrózu. Nekrózu spustí zvýšené hladiny ROS a inhibice kaspáz. Existují podobné buněčné smrti

s prasknutím buněčné membrány. Patří mezi ně methuóza, nekroptóza, pyroknóza a pyroptóza. Avšak tyhle „nekrotické“ buněčné smrti jsou regulovány signálními cestami a externími nebo interními induktory a mediátory [89;93]. Prasknutí plazmatické membrány lze pozorovat také v pozdních stádiích apoptotické nebo autofagické buněčné smrti, kdy se mrtvé buňky nedají ze systému odstranit fagocytózou. Proces se označuje jako sekundární nekróza a je nezávislý na jakékoli jiné signalizační události, než na které se původně podílelo (apoptotické nebo autofagické) [91].



Obrázek 9. Rozdíly mezi apoptózou a nekrózou.

3. CÍL PRÁCE

- 1) Kultivace a příprava buněčných linií pro pokročilou mikroskopickou analýzu.
- 2) Charakterizovat cytotoxické působení vybraných toxinů u neuroblastomové buněčné linie SH-SY5Y prostřednictvím základních bioanalytických metod.
- 3) Pomocí pokročilých fluorescenčních mikroskopických metod vizualizovat a charakterizovat cytotoxické působení vybraných koncentrací studovaných toxinů.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Pomůcky a přístroje

- Automatický pipetor Accujet-Pro (BrandTech Scientific, Německo)
- Biostation IM-Q (Nikon, Japonsko)
- CASY counter (Roche, Švýcarsko)
- Centrifuga Labofuge 400 (HERAEUS Instrument, Německo)
- Destičky pro konfokální mikroskopii (SPL, Korea)
- Fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japonsko)
- Inkubátor Memmert (IndiaMART, Indie)
- Invertovaný mikroskop Primo Vert (Carl Zeiss, USA)
- Komůrka, 4jamková (Ibidi, Německo)
- Kultivační lahve a misky pro buněčné linie (TPP, Švýcarsko)
- Laminární box Airstrem (ESCO, USA)
- Lednice a mrazák (Liebherr, Německo)
- Lednice s mrazákem -20 °C (Liebherr, ČR)
- Mikrotitrační destičky, 96jamkové (Nunc, Dánsko)
- Pipety Eppendorf (Eppendorf, Německo)
- Spektrofotometr a spektrofluorimetr Infinite M200 (Tecan, Rakousko)
- Váha (Mettler toledo, Švýcarsko)
- Vortex (Heathrow Scientific, USA)

Software

- Adobe Photoshop (Adobe Inc., USA)
- Microsoft Office – Word, Excel, Powerpoint (Microsoft, USA)
- Nikon NIS-Elements (Nikon, Japonsko)
- OriginPro 9.0.0. (OriginLab, USA)
- Tecan SparkControl (Tecan, Švýcarsko)

4.2 Seznam použitých chemikálií

- *Cell proliferation reagent* WST-1 (Roche, Německo)
- Cisplatina, CisPt (Mr = 300,05; Sigma Aldrich, USA)
- Faloidin značeny fluorochromem FITC (Mr = 1252,44; Sigma Aldrich, USA)
- Fluorescenční sonda Hoechst 33258 (Mr = 623,96; Sigma Aldrich, USA)
- Fluorescenční sonda monochlorobimán, MCB (Mr = 226,66; Sigma Aldrich, USA)
- Formaldehyd (Mr = 30,03; Lachema, Československo)
- Fosfátový pufr (pH 7,4), PBS (GIBCO, USA)
- Chlorid kademnatý, CdCl₂ (Mr = 183,32; Sigma Aldrich, USA)
- Karbonylkyanid-4-(trifluorometoxy)fenylhydrazon, FCCP (Mr = 254, 17; Sigma Aldrich, USA)
- Oxid titaničitý P25, TiO₂ P25 (Mr = 79,87; Sigma Aldrich, USA)
- Tert-butylhydroperoxid, t-BHP (Mr = 90,12; Sigma Aldrich, USA)
- Triton X-100 (Mr = 647; Sigma Aldrich, USA)
- Vícevrstvé uhlíkové nanotrubičky, MWCNTs (JRC Nanomaterials Repository, Itálie)

Biologický materiál

Buněčná linie SH-SY5Y (ATCC, USA)

4.3 Příprava roztoků

Kultivační médium pro buněčnou linii SH-SY5Y

Buněčnou linii SH-SY5Y jsme kultivovali v médiu DMEM/F12 (1:1) s fenolovou červení, které jsme obohatili o 15 % fetálního bovinního séra, 2 mM glutamin, 50 µg/mL penicilin, 50 µg/mL streptomycin a 1 % neesenciálních aminokyselin.

Roztoky pro jednotlivá stanovení

Fosfátový pufr (PBS) - Ke 45 mL deionizované vody bylo přidáno 5 mL zásobního fosfátového pufru (10x). Takto připravený pufr byl uchováván v lednici při 4 °C.

Pracovní roztok pro fluorimetrické stanovení glutathionu (c = 40 µmol/L) - K 1952 µL PBS jsme přidali alikvot zásobního roztoku monochlorobimánů o koncentraci 10 mmol/L. Pracovní roztok se připravoval vždy čerstvý těsně před měřením.

Zásobní roztok Faloidin-FITC – Zásobní roztok jsme připravili rozpuštěním Faloidinu-FITC v PBS. Roztok byl uchováván v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pracovní roztok Hoechst 33258 ($c = 2\text{ }\mu\text{mol/L}$) - K $95,8\text{ }\mu\text{L}$ PBS jsme přidali $4,2\text{ }\mu\text{L}$ zásobního roztoku Hoechst 33258 ($c = 1000\text{ }\mu\text{mol/L}$). Pracovní roztok se připravoval vždy čerstvý těsně před měřením.

Pracovní roztok cisplatinu - Ze zásobního roztoku CisPt ($c = 1\text{ mmol/L}$) byly připraveny roztoky o koncentraci 5 a $50\text{ }\mu\text{mol/L}$. Pro konečnou koncentraci $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ se k $3980\text{ }\mu\text{L}$ média přidalo $20\text{ }\mu\text{L}$ zásobního roztoku CisPt. Pro konečnou koncentraci $50\text{ }\mu\text{mol/L}$ se k $4940\text{ }\mu\text{L}$ média přidalo $260\text{ }\mu\text{L}$ zásobního roztoku CisPt. Příprava proběhla vždy v den ovlivnění buněk.

Pracovní roztok chloridu kademnatého - Ze zásobního roztoku CdCl_2 ($c = 20\text{ mmol/L}$) byly připraveny roztoky o koncentraci 25 a $100\text{ }\mu\text{mol/L}$. Pro konečnou koncentraci $25\text{ }\mu\text{mol/L}$ roztoku se k $3900\text{ }\mu\text{L}$ média přidalo $1300\text{ }\mu\text{L}$ pracovního roztoku o koncentraci $100\text{ }\mu\text{mol/L}$. Pro konečnou koncentraci $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ roztoku se k $6567\text{ }\mu\text{L}$ média přidalo $33\text{ }\mu\text{L}$ zásobního roztoku CdCl_2 . Příprava proběhla vždy v den ovlivnění buněk.

Pracovní roztok tert-butyhydroperoxidu (t-BHP) ($c = 50\text{ }\mu\text{mol/L}$) - Ze zásobního roztoku t-BHP ($c = 5,5\text{ mol/L}$) byl připraven $50\text{ }\mu\text{mol/L}$ roztok pomocí postupného ředění do média. Příprava proběhla vždy v den ovlivnění buněk.

Pracovní roztok karbonylkyanid-4-(trifluorometoxy)fenyldiazoniu (FCCP) ($c = 20\text{ }\mu\text{mol/L}$) - Ke $3920\text{ }\mu\text{L}$ média bylo přidáno $80\text{ }\mu\text{L}$ zásobního roztoku FCCP ($c = 1\text{ mmol/L}$). Příprava proběhla vždy v den ovlivnění buněk.

Pracovní roztok oxidu titaničitého P25 (TiO_2 P25) - Do $999\text{ }\mu\text{L}$ média se navázil 1 mg TiO_2 P25. Z takhle připraveného roztoku se vzalo $520\text{ }\mu\text{L}$ a přidalo se k médiu o objemu $4680\text{ }\mu\text{L}$. Příprava proběhla vždy v den ovlivnění buněk.

Pracovní roztok vícevrstvých uhlíkových nanotrubiček (MWCNTs) - Navázili jsme 1 mg MWCNTBS a k navážce přidali $999\text{ }\mu\text{L}$ média. Z takhle připraveného roztoku se vzalo $520\text{ }\mu\text{L}$ a přidalo se k médiu o objemu $4680\text{ }\mu\text{L}$. Příprava proběhla vždy v den ovlivnění buněk.

Pracovní roztok formaldehydu (3,7 %) - K $1800\text{ }\mu\text{L}$ PBS jsme přidali $200\text{ }\mu\text{L}$ zásobního roztoku formaldehydu (37 %). Pracovní roztok se připravoval vždy čerstvý těsně před měřením.

Příprava roztoku triton X-100 (0,1 %) - K $1998\text{ }\mu\text{L}$ PBS jsme přidali $2\text{ }\mu\text{L}$ zásobního roztoku tritonu X-100 (100 %). Pracovní roztok se připravoval vždy čerstvý těsně před měřením.

4.4 Testování cytotoxicity pomocí bioanalytických metod

K testování cytotoxicity u buněčné linie SH-SY5Y byly použity vybrané toxiny jako CisPt, CdCl₂, FCCP, t-BHP, TiO₂ P25 a MWCNTs. Pomocí testu WST-1 jsme sledovali vliv toxinů na buněčnou viabilitu buněk SH-SY5Y. Intracelulární koncentrace glutathionu byla hodnocena pomocí testu MCB. Pomocí sondy Hoechst 33258 jsme pozorovali vliv toxinů na nukleární kondenzaci.

Testy byly prováděny v 96jamkových destičkách. Na jednu jamku destičky bylo nasazeno 25 tisíc buněk. U buněk následovala inkubace 24 hod, aby buňky v dostatečné míře přisedly na povrch destičky. Následovalo odpipetování kultivačního média a přidání 100 µL média bez fenolové červeně s příslušnou koncentrací toxinu do každé jamky. Ke kontrolním buňkám bylo přidáno pouze médium bez fenolové červeně. Měřili jsme 24, 48 a 72 hod po ovlivnění buněk příslušnými toxiny.

4.4.1 Detekce intracelulární dehydrogenázové aktivity

Test WST-1 detekuje aktivitu extra- a intramitochondriálních dehydrogenáz. Principem testu WST-1 je redukce tetrazoliových solí na žlutý formazan. Množství formazanu je přímo úměrné počtu metabolicky aktivních buněk.

U linie SH-SY5Y byly použity 96jamkové mikrotitrační destičky. Absorbance byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 440 nm za použití spektrofotometru Tecan Spark (Tecan, Rakousko). Absorbance byla měřena ihned po přidání 10 µL WST-1 činidla a podruhé byla měřena po inkubaci, která probíhá při 37 °C po dobu 60 min. Vyhodnocení bylo založeno na odečtení absorbance (1-0 hod). Aktivita dehydrogenáz byla vždy vztažena ke kontrolním buňkám (= 100 %).

4.4.2 Fluorimetrické stanovení hladiny glutathionu

Pro zjištění intracelulární hladiny GSH se využívají fluorescenční sondy monochlorobimánů (MCB), které proniknou přes buněčnou membránu a fluoreskují po navázání na GSH.

U linie SH-SY5Y byly použity 96jamkové mikrotitrační destičky. K buňkám bylo přidáno 20 µL pracovního roztoku MCB. Intenzita fluorescence byla měřena ihned po přidání roztoku. Intenzita fluorescence (394/490 nm) byla měřena po dobu 20 min za použití fluorometru Tecan Spark (Tecan, Rakousko). Změna fluorescenčního signálu byla vždy vztažena ke kontrolním buňkám (= 100 %).

4.4.3 Fluorometrická detekce vlivu toxinů na nukleární kondenzaci

Sonda Hoechst 33258 patří mezi jednu z nejvyužívanějších sond k vizualizaci DNA v živých i fixovaných buňkách. Přednostně se váže na páry adenin-thymin, má vysokou specifitu i selektivitu. Sonda Hoechst 33258 snadno proniká do buněk kvůli své lipofilní ethylové skupině.

Buňky SH-SY5Y byly nasazeny do 96jamkové destičky a po inkubaci s příslušnými toxiny jsme destičku centrifugovali při 8000 g po dobu 5 min při laboratorní teplotě. Po centrifugaci jsme odebrali 70 μL média a následně přidali 70 μL PBS. Do každé jamky jsme přidali 10 μL pracovního roztoku Hoechst 33258. Destičku jsme inkubovali 5 min při laboratorní teplotě a měřili intenzitu fluorescence (352/461 nm) pomocí přístroje Tecan Spark (Tecan, Rakousko). Změna fluorescenčního signálu byla vždy vztažena ke kontrolním buňkám (= 100 %).

4.5 Mikroskopické testování cytotoxicity

K mikroskopickému testování cytotoxicity buněčné linie SH-SY5Y byly použity toxiny jako CisPt, CdCl_2 , t-BHP, TiO_2 P25 a MWCNTs. Pro hodnocení cytotoxicity byla použita sonda Hoechst 33258, podle které můžeme hodnotit působení toxinů na jádro a dále byl využit fluorescenčně značený Faloidin-FITC, kterým lze pozorovat změny buněčného cytoskeletu. Testování cytotoxicity se hodnotilo po 24, 48 a 72 hod inkubace buněk SH-SY5Y s toxiny.

4.5.1 Sonda Hoechst 33258

Sonda Hoechst 33258 je často využívána i při společném barvení buněk, protože emisní i excitační spektra se nepřekrývají s jinými běžně používanými fluorofory.

K buňkám se do 200 μL média přidalo 10 μL pracovního roztoku Hoechst 33258 vytemperovaného na 37 °C. Buňky byly poté inkubovány po dobu 10 min při 37 °C ve tmě. Po inkubaci jsme buňky jednou promyli roztokem PBS. Přidali jsme krycí sklo a následovalo mikroskopování. V mikroskopu jsme pozorovali modré zbarvení buněčných jader.

4.5.2 Fluorescenčně značený Faloidin

Pro vizualizaci aktinových vláken se využívá fluorescenčně značený Faloidin. Faloidin je izolovaný toxin z hub *Amanita phalloides*. Využívá se na značení fixovaných buněk, protože toxin má nízkou permeabilitu pro buněčné membrány živých buněk.

Před fixací jsme buňky jednou promyli roztokem PBS. Buňky jsme fixovali pomocí 200 μL 3,7 % formaldehydu. Buňky jsme inkubovali s formaldehydem po dobu 5 min při 37 °C

ve tmě. Po inkubaci jsme formaldehyd odtáhli a k buňkám jsme přidali 200 μL 0,1 % roztoku tritonu X-100. Po 15min inkubaci při 37 °C jsme buňky 2x promyli roztokem PBS (37 °C). Přidali jsme 200 μL pracovního roztoku Faloidinu a nechali jsme buňky inkubovat po dobu 40 min při laboratorní teplotě ve tmě. Přidali jsme krycí sklíčko a následovalo mikroskopování. V mikroskopu jsme viděli zelená aktinová vlákna.

4.6 Testování cytotoxicity pomocí přístroje BioStatin IM-Q

Přístroj BioStation IM-Q (Nikon, Japonsko) poskytuje stabilní prostředí pro buňky a umožňuje nám sběr dat i po dobu několika dní. Přístroj nám umožní pořizovat fluorescenční snímky i snímky ve fázovém kontrastu.

Pro dlouhodobou analýzu cytotoxického působení většího počtu látek naráz jsme použili 4jamkovou komůrku, do které jsme nasadili buňky v denzitě 20 tisíc buněk v 300 μL média. V každé jamce byl následně objem doplněn kultivačním médiem na 700 μL . Po 24 hod jsme odsáli médium a vyměnili za takové, které obsahovalo kromě CisPt a CdCl_2 také fluorescenční barvivo Hoechst 33258. Médium jsme doplnili tak, aby v každé komůrce byla výsledná koncentrace 2 μL Hoechst 33258. Poté jsme komůrku umístili do přístroje a nastavili analýzu po dobu 72 hod.

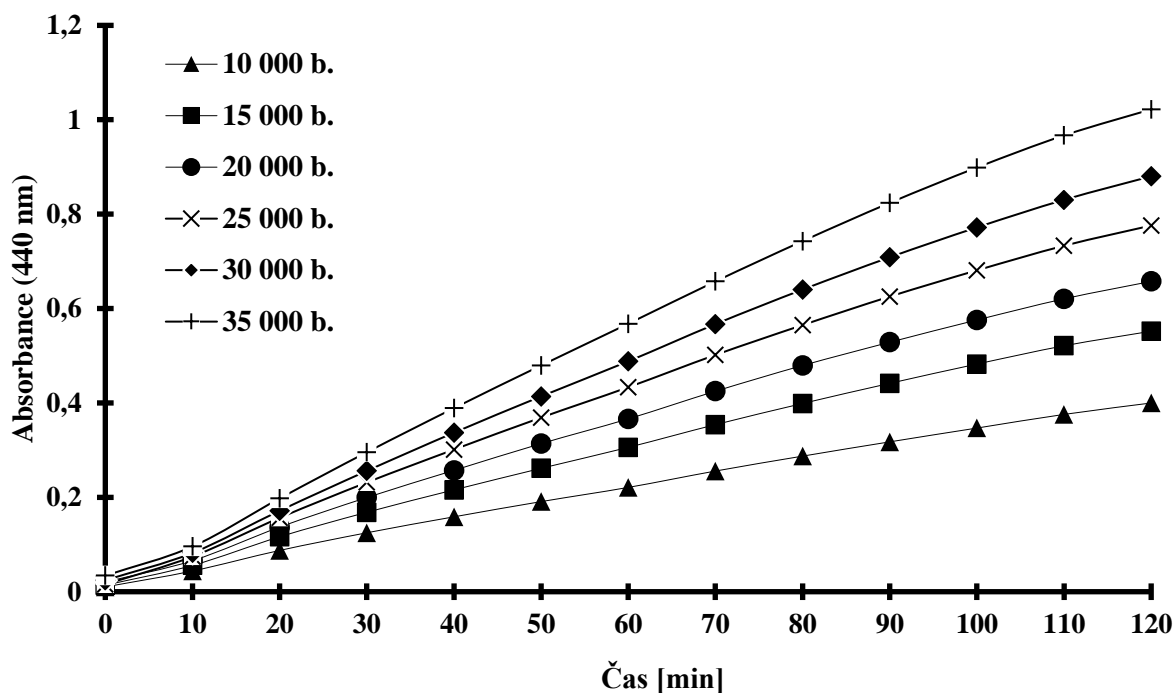
4.7 Statistická analýza naměřených dat

Výsledky dehydrogenázové aktivity a koncentrace GSH jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, výsledky nukleární kondenzace jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Výsledky byly podrobeny statistické analýze při zvolené hladině významnosti $p = 0,05$. Pro statistickou analýzu byla použita jednorozměrná analýza rozptylu (jednorozměrná ANOVA) s následným Bonferroniho post-testem (OriginPro 9.0.0, USA).

5. VÝSLEDKY

5.1 Optimalizace buněčné denzity

Před začátkem experimentů jsme definovali nejvhodnější denzitu buněk SH-SY5Y pro nasazení do 96jamkové mikrotitrační destičky. Do destičky byly nasazeny suspenze buněk v rozmezí 10-35 tisíc buněk o objemu 100 μL na jamku a nechali jsme ji inkubovat po dobu 24 hod (37 °C, 5 % CO_2). Poté jsme vyměnili médium a opět jsme ji inkubovali 24 hod. Po inkubaci jsme k buňkám do každé jamky přidali 10 μL reagentu WST-1. Následně jsme pomocí spektrofotometru Tecan Spark kineticky měřili absorbanci při vlnové délce 440 nm v 10min intervalech po dobu 2 hod. Změnu absorbance v závislosti na čase u buněk SH-SY5Y nasazených v různých denzitách znázorňuje graf 1. V rozmezí 0 až 1 hod jsme pozorovali patrnou lineární závislost u denzity 25 tisíc buněk na jamku. Hodnoty absorbancí byly pozorovány i po více než 1 hod, aby byly naměřené hodnoty dostatečně odlišitelné od měřeného signálu pozadí. Pro volbu vhodné denzity bylo také zásadní, aby buňky měly v delších časových intervalech dostatek prostoru pro růst a zároveň, aby v nejkratším časovém intervalu inkubace (24 hod) byl počet buněk v jamkách dostatečný. Po zhodnocení buněčné konfluence, která činila v nejdélším časovém intervalu (72 hod) přibližně 90 % při denzitě 25 tisíc buněk na jamku jsme se rozhodli brát tuhle denzitu buněk jako optimální pro studium cytotoxického působení vybraných látek.



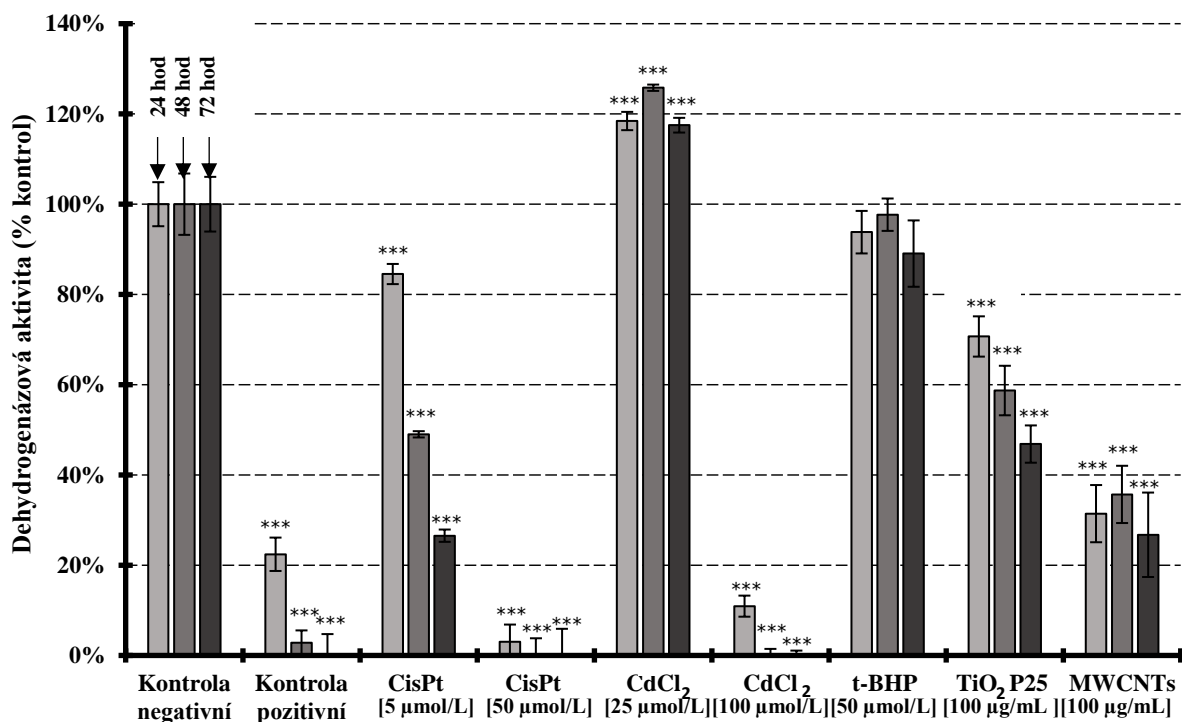
Graf 1. Optimalizace denzity buněk SH-SY5Y. Buňky SH-SY5Y; 10-35 tisíc buněk/jamku; 0-2 hod; WST-1 (440 nm).

5.2 Studium cytotoxicity pomocí bioanalytických metod

5.2.1 Stanovení dehydrogenázové aktivity

Dehydrogenázovou aktivitu buněk jsme hodnotili pomocí WST-1 testu. Detekovali jsme změnu životaschopnosti buněk po expozici toxinů a hodnotili jsme jejich vliv v závislosti na jejich koncentraci a době inkubace. Buňky SH-SY5Y jsme inkubovali 24, 48 a 72 hod s 5 a 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt, 25 a 100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂, 50 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP, 100 $\mu\text{g/mL}$ TiO₂ P25 a 100 $\mu\text{g/mL}$ MWCNTs.

Z grafu 2 je patrné, že po 24 hod byl zaznamenán signifikantní pokles dehydrogenázové aktivity u buněk inkubovaných s 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt a se 100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ ve srovnání s kontrolními buňkami. Pokles byl dále detekován v obou delších časových intervalech, přičemž tento propad se prohloubil a zapříčinil téměř absolutní útlum intracelulární dehydrogenázové aktivity. U buněk inkubovaných s 5 $\mu\text{mol/L}$ CisPt a 100 $\mu\text{g/mL}$ TiO₂ P25 jsme detekovali na čase závislý pokles dehydrogenázové aktivity, který značí postupný větší vliv toxického působení sledovaných látek. Snížení jsme detekovali i ve všech časových intervalech u buněk inkubovaných s 100 $\mu\text{g/mL}$ MWCNTs. Naopak u buněk inkubovaných s 25 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ došlo ke zvýšení dehydrogenázové aktivity ve srovnání s kontrolními buňkami.



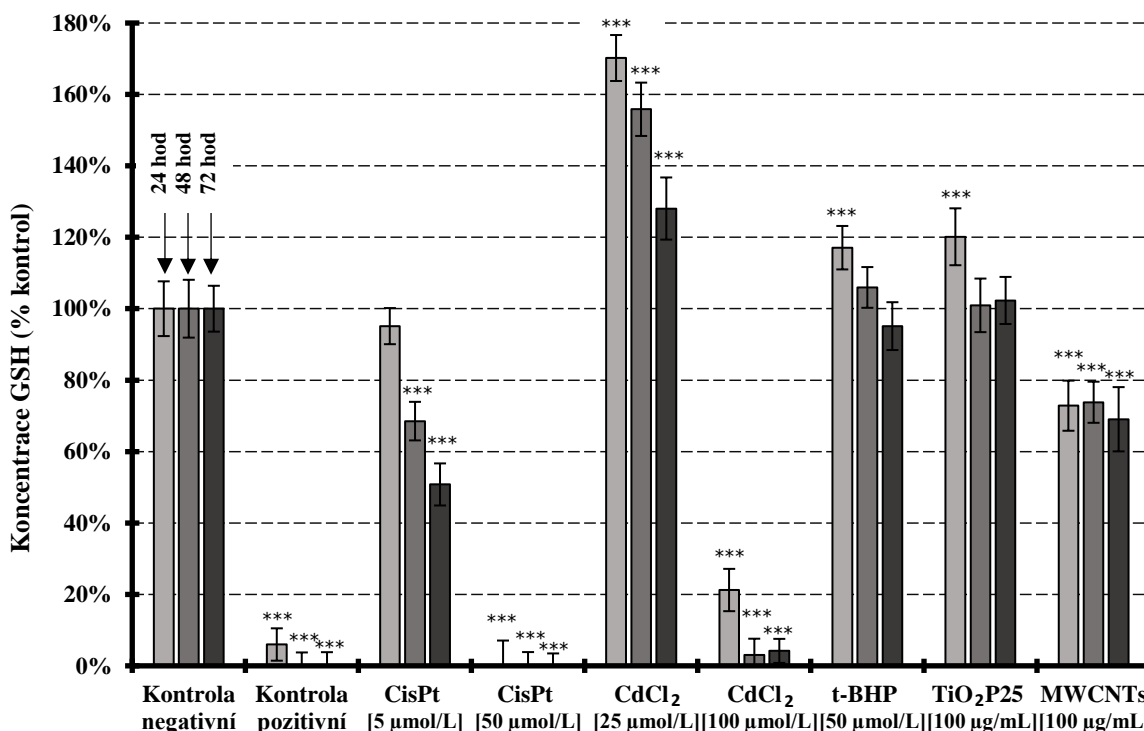
Graf 2. Vliv toxinů na intracelulární dehydrogenázovou aktivitu (24, 48 a 72 hod). Buňky SH-SY5Y inkubované s toxiny: cisplatina (CisPt; 5 µmol/L, 50 µmol/L); CdCl₂ (25 µmol/L, 100 µmol/L); tert-butylhydroperoxid (t-BHP; 50 µmol/L); TiO₂ P25 (100 µg/mL); vícevrstvé uhlíkové nanotrubičky (MWCNTs; 100 µg/mL). Pozitivní kontrola: karbonylkyanid-4-(trifluorometoxy)fenylhydrazon (FCCP; 20 µmol/L). Test WST-1 (440 nm). Průměr ± SD (n = 11-16; ***, *p* < 0,001).

5.2.2 Stanovení intracelulární hladiny glutathionu

V buňkách SH-SY5Y jsme detekovali hladiny intracelulární koncentrace GSH po expozici toxinů prostřednictvím MCB metody. Buňky jsme inkubovali opět s 5 a 50 µmol/L CisPt, 25 a 100 µmol/L CdCl₂, 50 µmol/L t-BHP, 100 µg/mL TiO₂ P25 a 100 µg/mL MWCNTs po dobu 24, 48 a 72 hod.

Koncentrace GSH po expozici s vybranými toxiny po 24, 48 a 72 hod je znázorněna v grafu 3. S využitím spektrofluorometru jsme detekovali absolutní depleci GSH u buněk inkubovaných s 50 µmol/L CisPt již po 24 hodinách. Oproti tomu, u buněk inkubovaných s 5 µmol/L CisPt je patrné snížení koncentrace GSH až po 48 hod ve srovnání s kontrolou. Po 72 hod toto snížení ještě narůstá a hodnota klesá až na úroveň 51 ± 6 % ve srovnání s kontrolními buňkami. Podobný klesající trend zaznamenáváme i u t-BHP či 25 µmol/L CdCl₂. V případě 25 µmol/L CdCl₂ je tento klesající efekt patrný spolu s efektem nárůstu intracelulární koncentrace GSH po 24 hod inkubaci. Zvýšení GSH nastalo také po 24 hod u buněk ovlivněných 50 µmol/L t-BHP a 100 µg/mL TiO₂ P25. Po 24 hod inkubaci buněk s toxiny můžeme pozorovat snížení GSH u buněk ovlivněných 100 µmol/L CdCl₂, kde po 72 hod klesla

intracelulární koncentrace GSH až na úroveň $4 \pm 3 \%$ a u $100 \mu\text{g/mL}$ MWCNTs klesla hodnota na $69 \pm 3 \%$ ve srovnání s kontrolními buňkami.

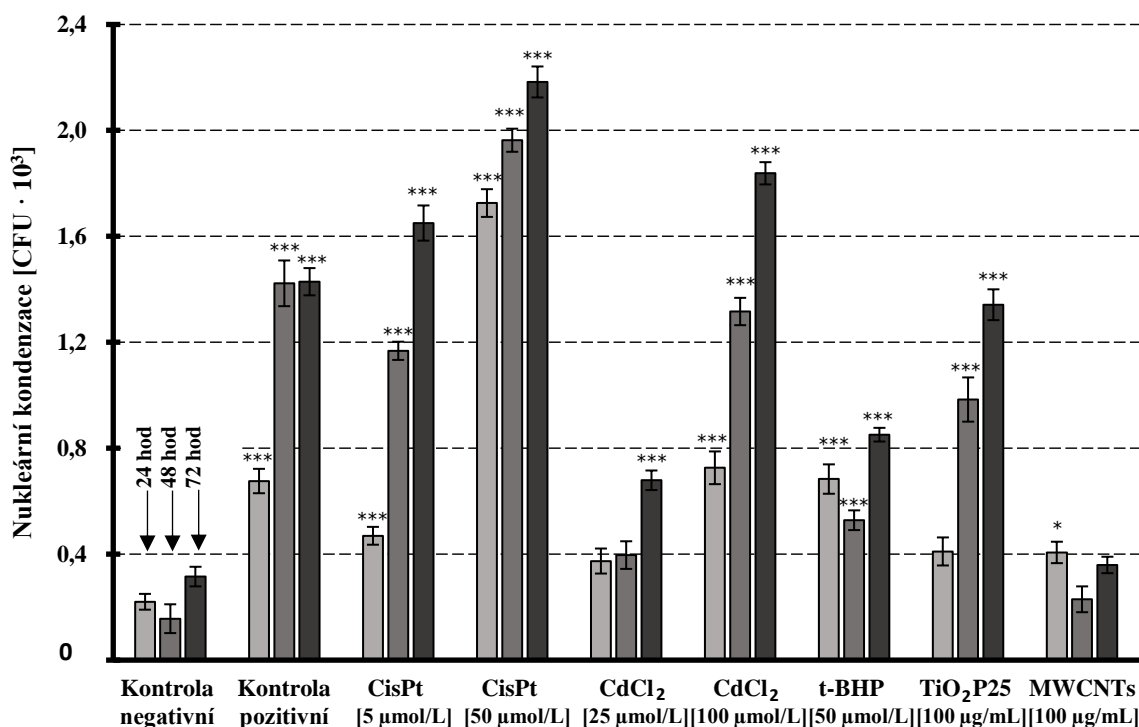


Graf 3. Koncentrace glutathionu po expozici vybraným toxinům (24, 48 a 72 hod). Buňky SH-SY5Y inkubované s toxiny: cisplatina (CisPt; $5 \mu\text{mol/L}$, $50 \mu\text{mol/L}$); CdCl_2 ($25 \mu\text{mol/L}$, $100 \mu\text{mol/L}$); tert-butyhydroperoxid (t-BHP; $50 \mu\text{mol/L}$); TiO_2 P25 ($100 \mu\text{g/mL}$); vícevrstvé uhlíkové nanotrubičky (MWCNTs; $100 \mu\text{g/mL}$). Pozitivní kontrola: karbonylkyanid-4-(trifluorometoxy)fenylylhydrazon (FCCP; $20 \mu\text{mol/L}$). Test MCB. Průměr \pm SD ($n = 12-16$; ***, $p < 0,001$).

5.2.3 Vliv toxinů na nukleární kondenzaci

Pro fluorometrické stanovení vlivu toxinů na nukleární kondenzaci jsme buňky SH-SY5Y inkubovali se stejným spektrem toxinů, jako tomu bylo v předchozích dvou stanoveních. Jednalo se opět o 5 a $50 \mu\text{mol/L}$ CisPt, 25 a $100 \mu\text{mol/L}$ CdCl_2 , $50 \mu\text{mol/L}$ t-BHP, $100 \mu\text{g/mL}$ TiO_2 P25 a $100 \mu\text{g/mL}$ MWCNTs po dobu 24, 48 a 72 hod.

Z grafu 4 můžeme pozorovat postupné zvyšování nukleární kondenzace, kdy nejvyšších hladin dosahují toxiny po 72 hod. Výjimkou je $100 \mu\text{g/mL}$ MWCNTs, u kterého pozorujeme nejvyšší nukleární kondenzaci po 24 hod. Nejvyšší nukleární kondenzaci způsobuje u buněk $50 \mu\text{mol/L}$ CisPt, kdy po 72 hod byla hodnota nukleární kondenzace více než šestinásobná vzhledem ke kontrolním buňkám. Poté jsme detekovali druhé největší zvýšení u $100 \mu\text{mol/L}$ CdCl_2 , kdy po 72 hod byla hodnota nukleární kondenzace více než pětinasobná oproti kontrolním buňkám.



Graf 4. Vliv toxinů na nukleární kondenzaci (24, 48 a 72 hod). Buňky SH-SY5Y inkubované s toxiny: cisplatina (CisPt; 5 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$); CdCl_2 (25 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$); tert-butylhydroperoxid (t-BHP; 50 $\mu\text{mol/L}$); TiO_2 P25 (100 $\mu\text{g/mL}$); vícevrstvé uhlíkové nanotrubičky (MWCNTs; 100 $\mu\text{g/mL}$). Pozitivní kontrola: karbonylkyanid-4-(trifluorometoxy)fenylhydrazon (FCCP; 20 $\mu\text{mol/L}$). Průměr \pm SEM (n = 6-8; *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$).

5.3 Změny morfologie buněk

5.3.1 Mikroskopická fluorescenční analýza buněčné morfologie

Pro studium a posouzení morfologických změn SH-SY5Y buněk ovlivněných vybranými toxiny jsme využili vlastností fluorescenčních sond. Doba inkubace SH-SY5Y buněk s toxiny byla 24, 48 a 72 hod. Pro mikroskopickou analýzu byly zvoleny 5 a 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt, 100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 , 50 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP, 100 $\mu\text{g/mL}$ TiO_2 P25 a 100 $\mu\text{g/mL}$ MWCNTs. Pro mikroskopickou analýzu jsme vynechali 25 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 , u kterého jsme v bioanalytických metodách zaznamenali fenomén nárůstu dehydrogenázové aktivity a nedetekovali jsme u něho ani snížení intracelulárního GSH. U buněk jsme prostřednictvím fluorescenčních sond vizualizovali buněčná jádra i aktinová vlákna, a to pomocí sondy Hoechst 33258 a pomocí fluorescenčně značeného Faloidinu (Faloidin-FITC).

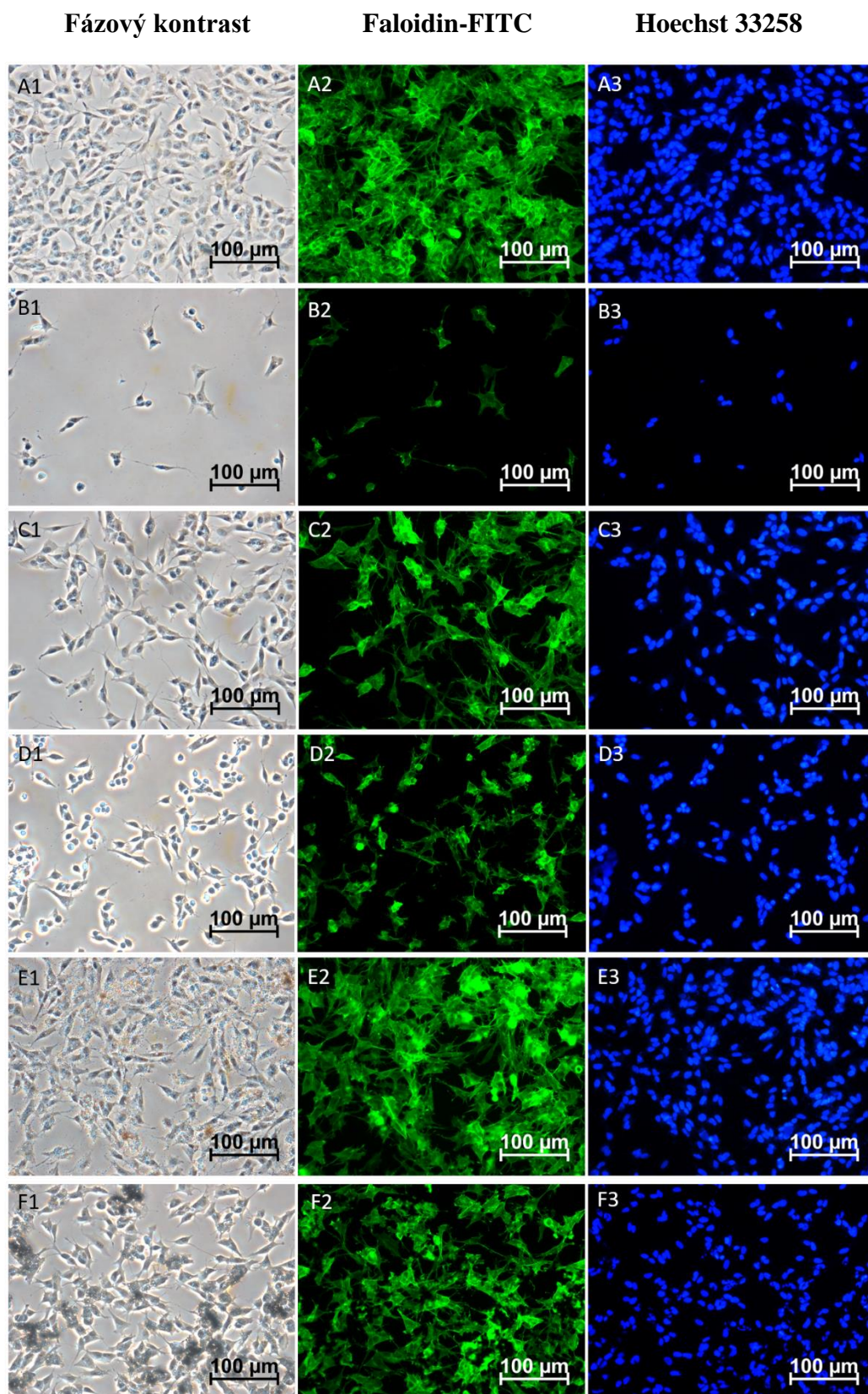
Jak je patrné z obrázku 10, tak u buněk SH-SY5Y inkubovaných 24 hod s toxiny můžeme sledovat nejvýznamnější změny v morfologii u buněk inkubovaných s 100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 . U buněk se významně snížil jejich počet, který pokles zhruba o 70 % vůči kontrolním buňkám. Dále můžeme pozorovat i změnu tvaru buněk, jak ve fázovém kontrastu, tak i pomocí

vizualizace buněčného cytoskeletu. Významné změny lze také pozorovat u buněk ovlivněnými 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt, kdy je patrné zejména snížení jejich počtu, změna jejich tvaru a snížení schopnosti adherence buněk ke dnu kultivační nádoby. Dále můžeme pozorovat změny jaderného chromatinu i cytoskeletu u buněk ovlivněných 100 $\mu\text{g/mL}$ MWCNTs.

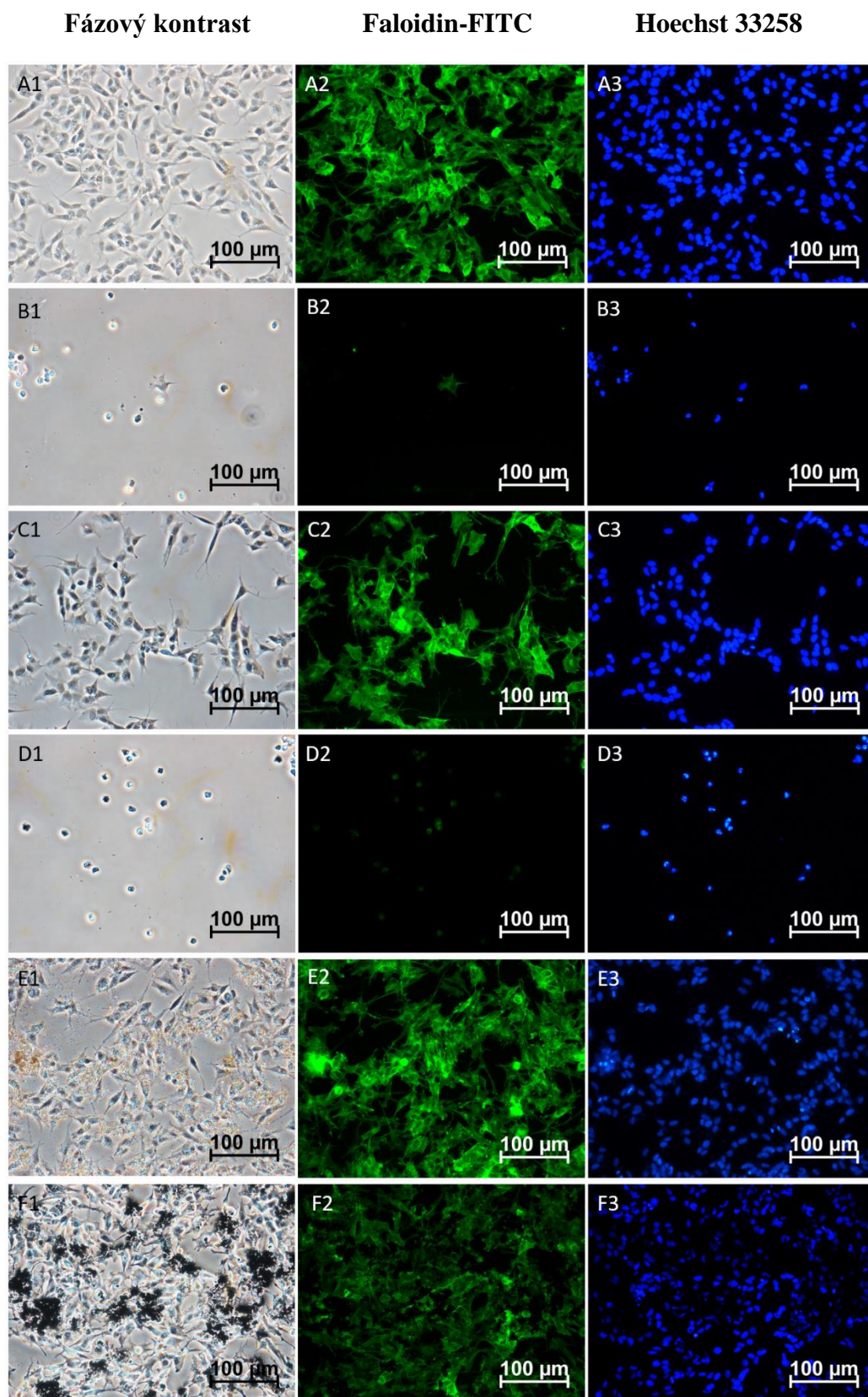
Na obrázku 11 jsou buňky SH-SY5Y inkubované 48 hod s toxiny. Opět vidíme signifikantní změny u buněk inkubovaných s 100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 a 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt. U buněk inkubovaných s těmito toxiny pozorujeme kulovitý tvar buněk a poškozený jaderný chromatin. Po expozici buněk s 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt se snížil počet buněk zhruba o 60 % v porovnání s buňkami inkubovanými se stejným toxinem v 24 hod intervalu. Dále můžeme sledovat změny v počtu u buněk ovlivněnými 100 $\mu\text{g/mL}$ MWCNTs. Počet se zvýšil, díky jejich nepřerušnému přirozenému dělení buněk.

Dále jsme pozorovali změny u buněk SH-SY5Y po inkubaci 72 hod s toxiny. Změny jsou zobrazeny na obrázku 12. Po expozici buněk s 100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 pozorujeme opět apoptotická tělíska, po expozici buněk s 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt už pozorujeme jen rozpadlé buňky. U buněk ovlivněnými 100 $\mu\text{g/mL}$ MWCNTs se již počet buněk snížil. Snížení počtu pozorujeme i u buněk inkubovaných s 100 $\mu\text{g/mL}$ TiO_2 P25.

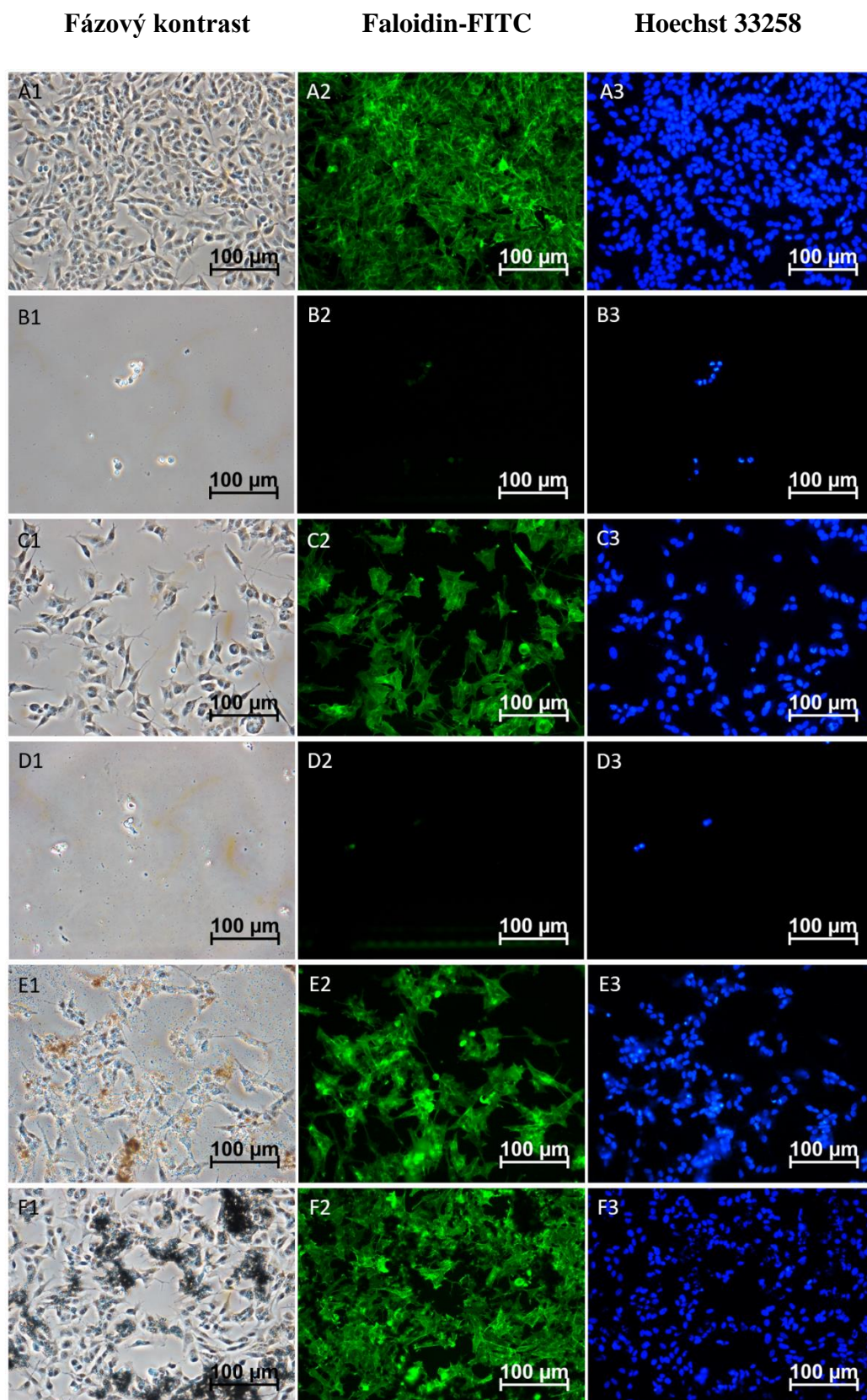
Na obrázcích 10-12 můžeme pozorovat i přítomnost nanomateriálů, kdy u MWCNTs pozorujeme přítomnost černých nanotrubiček a u buněk ovlivněných TiO_2 P25 pozorujeme světle šedé nanopartikelky.



Obrázek 10. Mikroskopická analýza vlivu toxinů na buňky SH-SY5Y (24 hod). Zvětšení 200x; sloupec 1: fázový kontrast; sloupec 2: sonda faloidin-FITC; sloupec 3: sonda Hoechst 33258. A: kontrola; B: CdCl₂ 100 μmol/L; C: t-BHP 50 μmol/L; D: CisPt 50 μmol/L; E: TiO₂ P25 100 μg/mL; F: MWCNTs 100 μg/mL.



Obrázek 11. Mikroskopická analýza vlivu toxinů na buňky SH-SY5Y (48 hod). Zvětšení 200x; sloupec 1: fázový kontrast; sloupec 2: sonda faloidin-FITC; sloupec 3: sonda Hoechst 33258. A: kontrola; B: CdCl₂ 100 μmol/L; C: t-BHP 50 μmol/L; D: CisPt 50 μmol/L; E: TiO₂ P25 100 μg/mL; F: MWCNTs 100 μg/mL.



Obrázek 12. Mikroskopická analýza vlivu toxinů na buňky SH-SY5Y (72 hod). Zvětšení 200x; sloupec 1: fázový kontrast; sloupec 2: sonda faloidin-FITC; sloupec 3: sonda Hoechst 33258. A: kontrola; B: CdCl_2 100 $\mu\text{mol/L}$; C: t-BHP 50 $\mu\text{mol/L}$; D: CisPt 50 $\mu\text{mol/L}$; E: TiO_2 P25 100 $\mu\text{g/mL}$; F: MWCNTs 100 $\mu\text{g/mL}$.

5.3.2 Změny buněčné morfologie v průběhu časoběrné obrazové analýzy

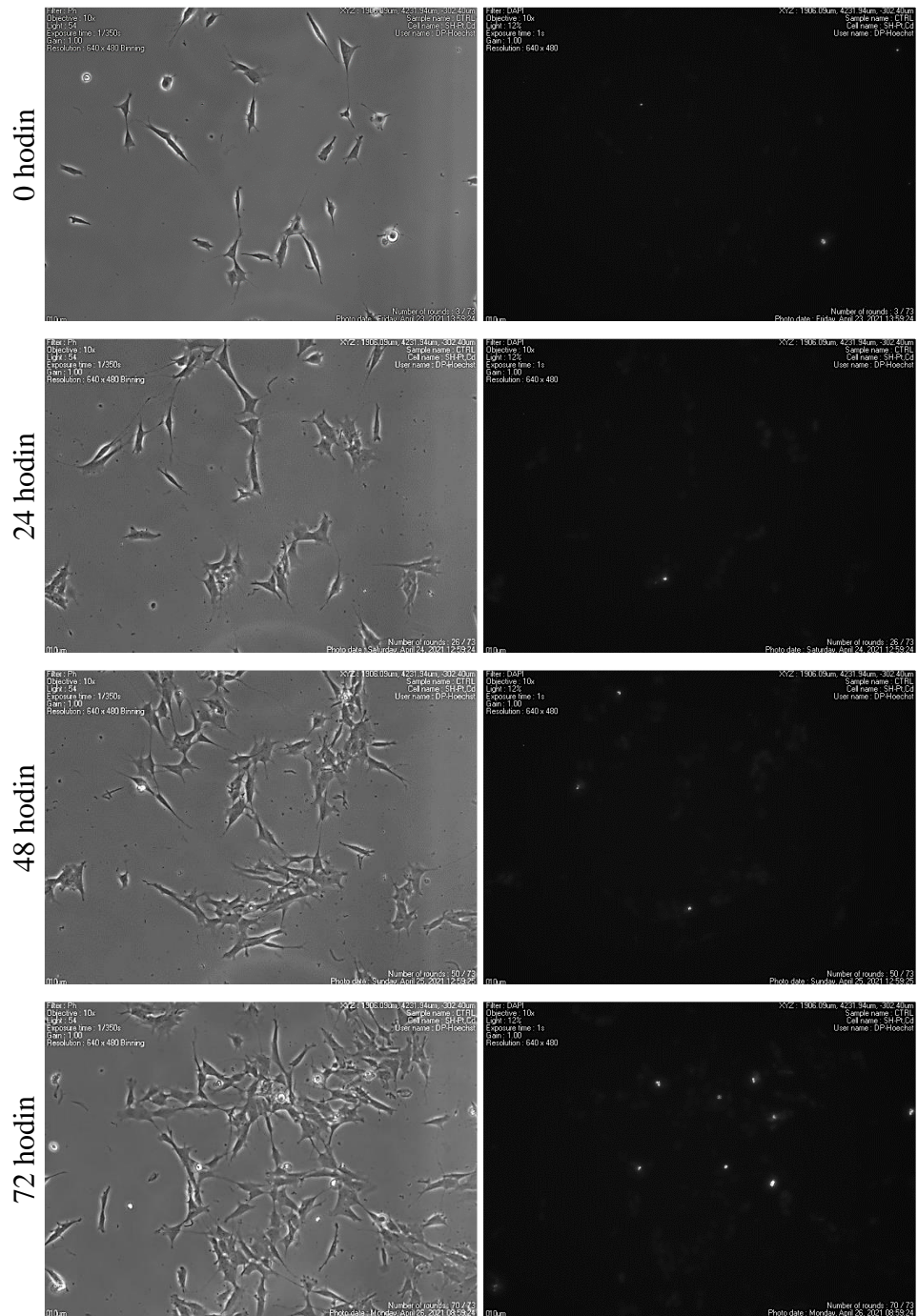
Pomocí přístroje BioStation IM-Q jsme se pokusili o detailnější prostudování toxického působení vybraných látek, které na základě výše popsaných výsledků působily na buněčnou linii SH-SY5Y nejvíce negativním způsobem. Nejdříve jsme se rozhodli otestovat toxicitu samotné sondy Hoechst 33258 na neovlivněných buňkách SH-SY5Y. Použili jsme koncentrace 0,5; 1 a 2 $\mu\text{mol/L}$ Hoechst 33258. Zjistili jsme, že toxicita použité fluorescenční sondy ve zvolených koncentracích není významná. Dále jsme se soustředili na časoběrnou obrazovou analýzu zaměřenou na změnu morfologie buněk ovlivněných toxiny. Z předešlých testů je patrné, že největší změny na SH-SY5Y buňkách způsobilo 100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 a 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt, a proto jsme se soustředily právě na jejich toxicitu. Pro porovnání toxicity závislé na dávce jsme 4jamkovou komůrku doplnili o 5 $\mu\text{mol/L}$ CisPt. Buňky jsme sledovali v rozmezí 0-72 hod po inkubaci s toxiny v intervalu 1 hod ve fázovém kontrastu a pomocí sondy Hoechst 33258, u které jsme nepozorovali typické modré zbarvení jader jako u předchozí mikroskopie, protože jsme použili černobílou kameru.

Buňky inkubované s toxiny jsme porovnávali vždy s kontrolními neovlivněnými buňkami, které jsou zobrazeny na obrázku 13. Na obrázku 14 jsou buňky ovlivněné 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt. Po 24 hodinách už pozorujeme změnu tvaru buněk na kulovitý, buňky jsou méně přisedlé a vykazují poškození jader. Změny jsou ještě ve větší míře pozorovatelné po 48 a 72 hod. Na obrázku 15 jsou buňky ovlivněné stejným toxinem, ale s nižší koncentrací CisPt (5 $\mu\text{mol/L}$). Po 24 hod vidíme, že některé buňky se začínají zakulacovat a mají poškozené jádro, ale ani po 72 hod není viditelné poškození buněčných jader u všech buněk.

Na obrázku 16 jsou buňky SH-SY5Y ovlivněné 100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 a jak jsme předpokládali, poškození je viditelné už po 24 hodinách. Buňky jsou zmenšené, kulaté a jsou méně přisedlé. V dalších časových intervalech pozorujeme prohloubení již dříve viditelných patologických změn a zvýšení počtu svítících buněčných jader.

Fázový kontrast

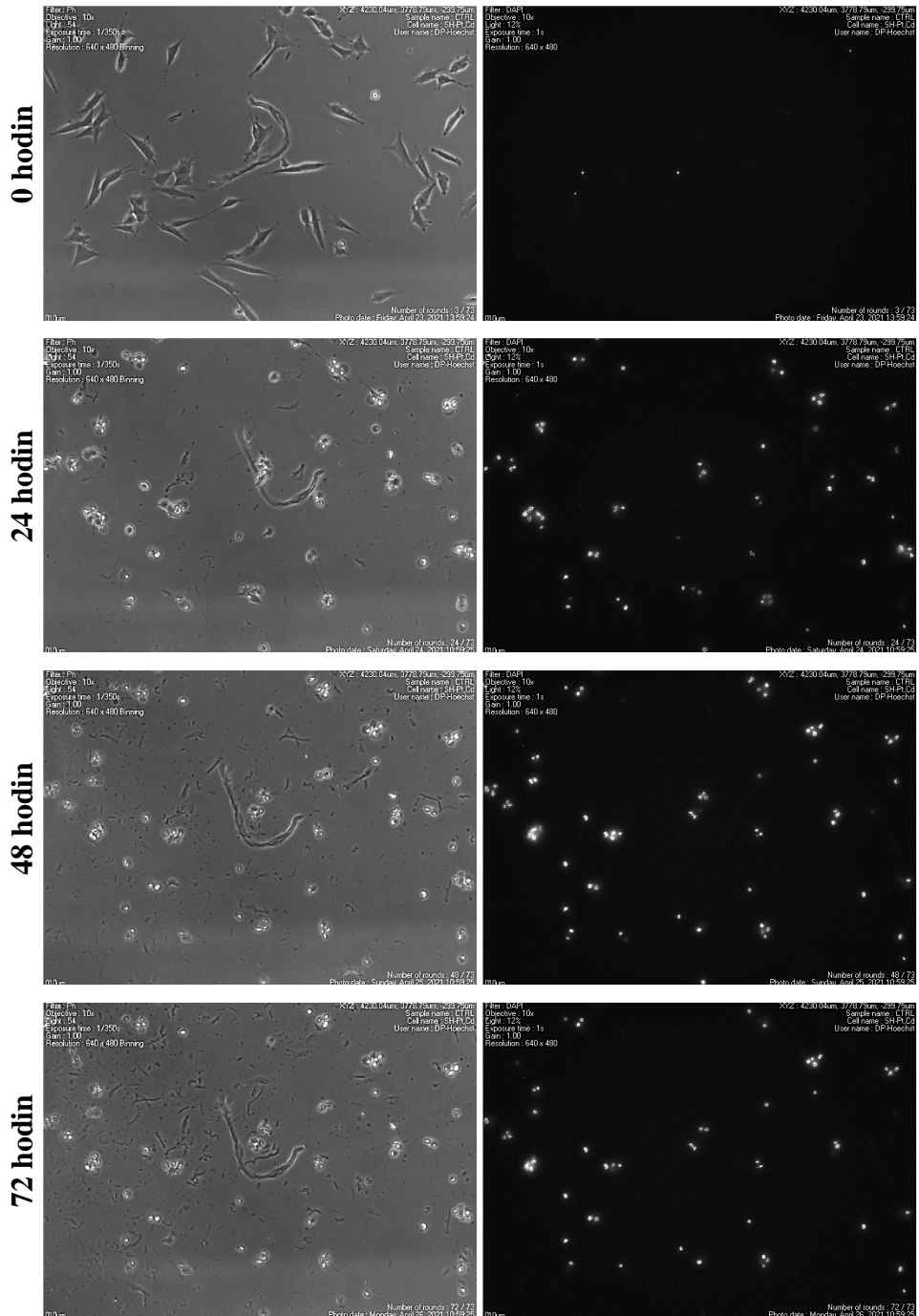
Hoechst 33258



Obrázek 13. Kontrolní SH-SY5Y buňky (0, 24, 48, 72 hod). Zvětšení 100x. Fázový kontrast, Hoechst 33258.

Fázový kontrast

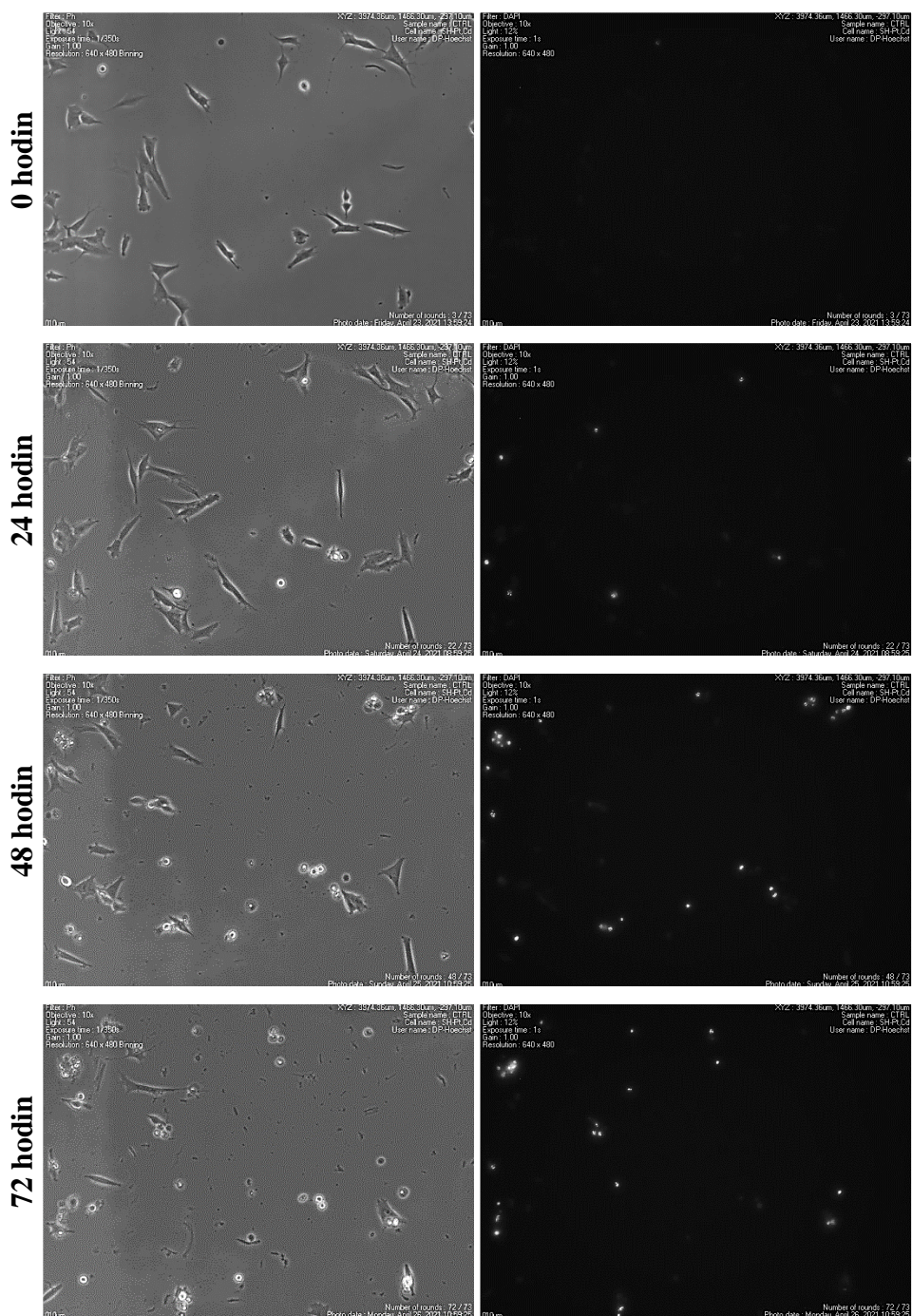
Hoechst 33258



Obrázek 14. SH-SY5Y buňky ovlivněné 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt (0, 24, 48 a 72 hod). Zvětšení 100x. Fázový kontrast, Hoechst 33258.

Fázový kontrast

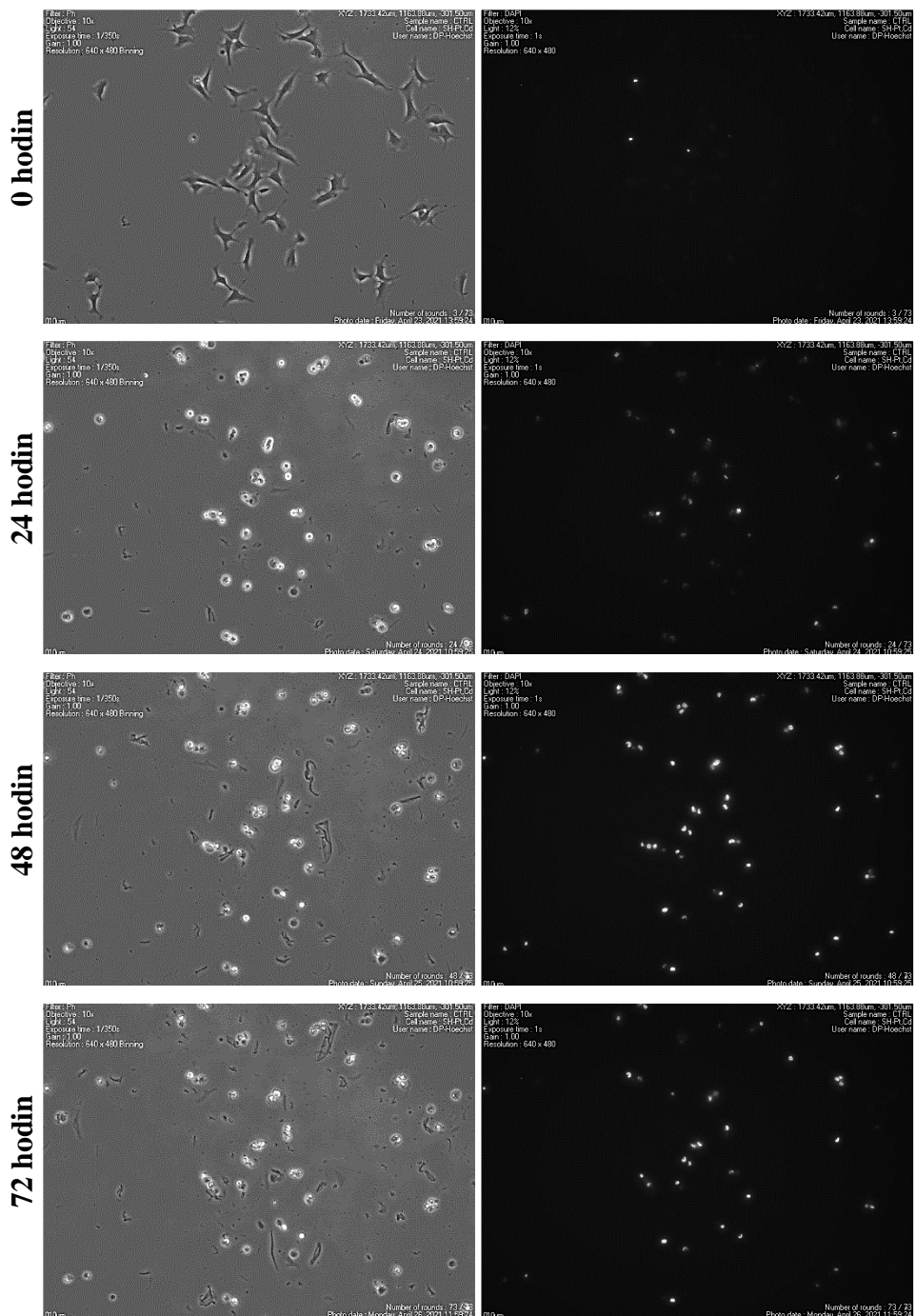
Hoechst 33258



Obrázek 15. SH-SY5Y buňky ovlivněné 5 μmol/L CisPt (0, 24, 48 a 72 hod). Zvětšení 100x. Fázový kontrast, Hoechst 33258.

Fázový kontrast

Hoechst 33258



Obrázek 16. SH-SY5Y buňky ovlivněné 100 μmol/L CdCl₂ (0, 24, 48 a 72 hod). Zvětšení 100x. Fázový kontrast, Hoechst 33258.

6. DISKUZE

Pro charakterizaci buněčné toxicity jsme si zvolili buněčnou linii SH-SY5Y, která je velmi využívanou linií pro studium neurodegenerativních chorob. Použili jsme modelové toxiny t-BHP, CisPt, CdCl₂, TiO₂ P25 a MWCNTs. Nejdříve jsme se zaměřili na volbu optimální denzity u buněk pro nasazení do 96jamkové destičky. Při studiu neurotoxického působení na buňkách SH-SY5Y se volba počáteční denzity liší, pohybuje se především v rozmezí 10-50 tisíc buněk na jamku [94; 95; 96]. Na základě studií jsme pro optimalizaci buněčné denzity zvolili 10-35 tisíc buněk na jamku, z níž jsme vybrali denzitu 25 tisíc buněk na jamku s ohledem na co nejnižší spotřebu buněk a dobu inkubace. Dále jsme testovali cytotoxicitu pomocí bioanalytických metod. Detekovali jsme vliv toxinů na buněčnou viabilitu pomocí testu WST-1, dále jsme detekovali změnu intracelulární hladiny GSH pomocí testu MCB a pozorovali jsme i vliv toxinů na nukleární kondenzaci. Výsledky jsme vztahovali ke kontrolním buňkám, které nebyly ovlivněny toxiny (kontrola negativní). Jako pozitivní kontrolu jsme zvolili látku FCCP, která inhibuje mitochondriální dýchání a je nazývána jako tzv. rozpojovač [97].

Prvním zvoleným toxinem byl t-BHP, který se hojně využívá jako stimulátor oxidačního stresu. Pro experiment jsme použili koncentraci 50 $\mu\text{mol/L}$. Pomocí bioanalytických metod jsme zjistili, že t-BHP ani po 72 hod nezpůsobí významné snížení životaschopnosti buněk, v jeho přítomnosti nedochází ani k vyčerpání GSH. Naopak jsme zaznamenali významný růst nukleární kondenzace, která dosáhla nejvyšších hodnot v 72 hod. Ve studii [98] pozorovali účinky t-BHP na buňky SH-SY5Y pomocí MTT testu, který je obdobný testu WST-1. Životaschopnost buněk měřili po 12 hod inkubaci buněk s toxinem. Byla pozorována na koncentraci závislá buněčná smrt. Koncentrace 250 $\mu\text{mol/L}$ způsobila u 50 % buněk buněčnou smrt. V jiné studii zkoumali cytotoxicitu také pomocí testu MTT na SH-SY5Y buňkách po hodinové expozici buněk s toxiny. Zvolili koncentrace t-BHP od 125 do 1500 $\mu\text{mol/L}$. V nejvyšší koncentraci došlo ke snížení životaschopnosti buněk na 38 % [99].

Druhým zvoleným toxinem byla CisPt, která je velmi využívaná jako chemoterapeutikum, avšak jejím problémem je známá neurotoxicita [100]. Proto jsme CisPt zvolili jako modelový toxin pro buňky SH-SY5Y. U bioanalytických metod jsme studovali 5 a 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt. Detekovali jsme u všech testů toxicitu závislou na dávce a času. U 5 $\mu\text{mol/L}$ CisPt jsme detekovali po 24 hod sníženou životaschopnost buněk o 15 %, po 72 hod se snížila životaschopnost buněk o více než 70 %. Koncentrace GSH klesla o 51 %

po 72 hod. Nukleární kondenzace byla významně zvýšena už od 24 hod. Oproti tomu 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt způsobila už po 24 hod snížení životaschopnosti buněk o 97 %, po 48 hod už jsme detekovali nulovou hladinu dehydrogenázové aktivity. Hladiny GSH byly u 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt vyčerpány už po 24 hod. Nukleární kondenzace byla u 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt nejvyšší ze všech modelových toxinů. Řadou jiných autorů byla také zkoumána CisPt na buněčné linii SH-SY5Y. Cytotoxický účinek CisPt stanovili ve studii [101] pomocí testu MTT. Zjistili, že 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt způsobila po 24 hod u 90 % buněk smrt, 5 $\mu\text{mol/L}$ CisPt způsobila jen nepatrný pokles životaschopnosti buněk. Výsledky se tedy shodují s našim experimentem. Ve studii [102] také použili různé koncentrace CisPt a studovali cytotoxicitu pomocí MTT testu. Jako nejvyšší koncentraci zvolili 20 $\mu\text{mol/L}$, ale i ta způsobila pokles životaschopnosti buněk o více než 60 %.

Dalším zvoleným toxinem byl CdCl_2 . Kadmium je všudepřítomný těžký kov, u kterého je dobře známo, že indukuje neurotoxicitu. Kadmium je zahrnuto mezi etiopatogenetický faktor některých neurodegenerativních onemocnění. Neurotoxicita vyvolaná kadmíem zahrnuje tvorbu ROS, která vede k aktivaci apoptotické kaskády, kromě toho indukuje i stres v ER [103]. Zvolili jsme si dvě koncentrace pro bioanalytické testy, 25 a 100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 . Zatímco u 25 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 docházelo ke zvýšení dehydrogenázové aktivity a zvýšení hladin GSH, 100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 způsobilo u buněk významné snížení GSH již po 24 hod. Dále jsme detekovali u 100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 po 24 hod snížení životaschopnosti buněk o více než 85 %. V dalších časových intervalech už byla dehydrogenázová aktivita nulová. Zvýšení nukleární kondenzace bylo významné u obou koncentrací. Ve studii [103] zkoumali pomocí testu MTT životaschopnost buněk SH-SY5Y po ovlivnění 10 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 . Po 24 hod expozici došlo u buněk ke snížení životaschopnosti o více než 20 %. Ve studii [104] také zkoumali životaschopnost buněk SH-SY5Y pomocí MTT. Po 24 hod expozici došlo ke zvýšení životaschopnosti jen do 3 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 , poté životaschopnost výrazně klesla, u koncentrace 30 $\mu\text{mol/L}$ až o více než 80 %. Podobných výsledků dosáhli i v experimentu [105], kde podle testu MTT detekovali životnost buněk SH-SY5Y po ovlivnění nízkými koncentracemi CdCl_2 . U námi provedeného experimentu byl využit test WST-1, a proto se výsledky mohou lišit.

Pro studování cytotoxicity jsme si zvolili i nanomateriály. Prvními zkoumanými nanočásticemi byly TiO_2 P25. Částice TiO_2 P25 narušují oxidační metabolismus buněk prostřednictvím různých mechanismů, nejčastěji ale pomocí generování ROS. Pro náš experiment jsme zvolili koncentraci 100 $\mu\text{g/mL}$ TiO_2 P25. Částice způsobily snížení dehydrogenázové aktivity, která byla závislá na čase. Po 72 hod se snížil počet životaschopnosti buněk o více než 50 %. Koncentrace GSH překvapivě po 24 hod inkubaci buněk s toxinem

stoupla, v dalších časových intervalech ale neklesla pod 100 %, jak jsme předpokládaly. Nukleární kondenzace byla po 48 a 72 hod vysoká. V roce 2020 sledovali vliv TiO_2 na buněčné linii SH-SY5Y. Buňky byly vystaveny koncentracím TiO_2 po dobu 24 hod. Pro testování životaschopnosti byl použit test MTT. Z výsledku bylo patrné, že koncentrace do 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TiO_2 nezpůsobila u buněk změny, naopak koncentrace 50 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vyvolala výrazné zvýšení životaschopnosti buněk [106]. U námi provedeného experimentu byl využit test WST-1, čímž se výsledky mohou lišit. Dále mohou být rozdílné výsledky způsobeny počtem nasazených buněk. V našem experimentu bylo použito 25 tisíc buněk na jamku, zatímco v experimentu [106] byla použita buněčná suspenze 16 tisíc buněk na jamku. Dále může být rozdíl v použitých nanočásticích. V dalším experimentu studovali také viabilitu buněk pomocí testu MTT po 4, 24 a 48 hod expozici nanočástic TiO_2 na buňky SH-SY5Y. Buňky byly vystavené zvyšujícím se koncentracím od 1,5 do 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Po 4 hod nevykazovala žádná dávka nanočástic cytotoxicitu. Po 24 hod vyvolaly cytotoxicitu koncentrace vyšší než 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, kdy se snížila životaschopnost buněk přibližně o 25 %. Po 48 hod vykazovaly buňky SH-SY5Y přibližně 30-60 % buněčnou smrt při dávkách v rozmezí od 15 do 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [107]. Výsledky experimentu jsou podobné našim výsledkům.

Druhým zvoleným nanomateriálem byly nanotrubičky MWCNTs. Vzhledem k morfologické podobnosti s azbestovými vlákny mají MWCNTs schopnost vytvářet toxické účinky, například oxidační stres, mitochondriální poškození a buněčnou smrt. Mnoho studií *in vivo* a *in vitro* zkoumalo toxikologický a prozánětlivý účinek MWCNTs na plíce. Inhalací se ale mohou nanomateriály díky svým hydrofobním vlastnostem dostat přes hematoencefalickou bariéru do CNS [108]. Pro všechny experimenty jsme zvolily koncentraci 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MWCNTs. Už po 24 hod expozici buněk s toxinem došlo k významnému snížení životaschopnosti o více než 65 % oproti kontrolním buňkám. Po 72 hod už to bylo o snížení životnosti buněk přes 70 %. Ve všech časových intervalech došlo k významnému snížení koncentrace GSH o více než 20 %. Nukleární kondenzace se významně zvýšila po 24 hod, v dalších časových intervalech už ale bylo zvýšení vzhledem ke kontrole zanedbatelné. Ve starší studii z roku 2009 využili testy MTT a WST-1 k detekci životaschopnosti buněk SH-SY5Y po expozici 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MWCNTs. Data získána testem MTT naznačují 12 % až 15 % ztrátu životaschopnosti po 72 hod, test WST-1 neprokázal žádné snížení životaschopnosti. Tento nesoulad v testech byl způsoben nerozpustnou povahou formazanu, který vzniká při MTT testu [109].

V druhé části práce jsme pozorovali morfologii buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu. S využitím fluorescenčních sond jsme vizualizovali buněčný cytoskelet

(Faloidin-FITC) a buněčná jádra (Hoechst 33258). Při zvětšení 200x jsme pozorovali změny u buněk SH-SY5Y ovlivněných 100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 , 50 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP, 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt, 100 $\mu\text{g/mL}$ TiO_2 P25 a 100 $\mu\text{g/mL}$ MWCNTs. Mikroskopickým pozorováním buněk jsme se snažili potvrdit naše výsledky z bioanalytických měření. Toxin t-BHP nezpůsobil významné změny v životaschopnosti buněk ani po 72 hod, nedošlo ke změně morfologie a ani ke změně kondenzace jaderného chromatinu. Dále jsme si potvrdili i působení 100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 , u kterého jsme již po 24 hod mohli vidět velké snížení životaschopnosti a změnu tvaru buněk. Po 48 hod jsme už pozorovali vzniklá apoptotická tělíska, která byla v menší míře viditelná i po 72 hod. Při pozorování 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt jsme zjistili, že buňky snížili svoji životaschopnost, po 48 hod jsme pozorovali apoptotická tělíska s poškozenými jádry a po 72 hod už byly vidět jen rozpadlé buňky bez viditelného cytoskeletu a jader. U nanočástic jsme mohli vypořadovat, že po 48 hod nedošlo k úbytku životaschopných buněk a buňky se naopak dále přirozeně dělily. K viditelnému úbytku došlo až po 72 hod. Výsledky z bioanalytických měření se nám tedy neshodují s výsledky z fluorescenčního mikroskopu. Předpokládáme, že při bioanalytických měřeních nanočástice, především MWCNTs ovlivnily měření svým černým zbarvením a zkreslily nám výsledky.

V poslední části práce jsme pomocí časosběrné mikroskopie pozorovali buňky SH-SY5Y ovlivněné 5 a 50 $\mu\text{mol/L}$ CisPt a 100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 . U zvolených toxinů jsme v předešlých testech zjistili největší toxicitu, a proto jsme se zaměřili právě na ně. Buňky jsme pozorovali při zvětšení 100x ve fázovém kontrastu a pomocí sondy Hoechst 33258. Komůrka byla umístěna do přístroje BioStationu IM-Q a nastavili jsme analýzu po dobu 72 hod. Fotografie přístroj pořizoval každou hodinu. To je obrovská výhoda přístroje oproti klasickému fluorescenčnímu mikroskopu. Byli jsme schopni pozorovat u buněk změnu morfologie, vznik apoptotických tělísek a působení toxinů na jádra buněk v hodinových intervalech a lépe tak zachytit toxické působení látek na buňky. Zjistili jsme ale i nevýhody přístroje. Jednou z nevýhod je zamlžení komůrky při vložení do přístroje, které trvalo vždy kolem hodiny. Další z nevýhod je tvorba bublinek, které bychom ve fluorescenčním mikroskopu vyřešili posunutím do jiné části zorného pole.

7. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce byla charakterizace buněčné toxicity pomocí mikroskopických technik. Nejprve jsme detekovali cytotoxicitu vybraných toxinů pomocí bioanalytických metod, kterou jsme dále ověřovali pomocí fluorescenčního mikroskopu a přístroje BioStation IM-Q. Testování jsme prováděli na námi zvolené buněčné linii neuroblastomu SH-SY5Y, která je využívána pro studování neurotoxicity.

Pro testování jsme zvolili CisPt, CdCl₂, t-BHP, TiO₂ P25 a MWCNTs. Buňky SH-SY5Y jsme u všech provedených testů inkubovali s toxiny po dobu 24, 48 a 72 hod. Nejvíce toxický efekt na buňky jsme detekovali bioanalytickými metodami u 50 μmol/L CisPt a u 100 μmol/L CdCl₂. U obou toxinů jsme detekovali nulovou dehydrogenázovou aktivitu po 48 hod inkubaci buněk s toxiny. Dále jsme u 50 μmol/L CisPt detekovali úplnou depleci intracelulární hladiny GSH již po 24 hod. Koncentrace GSH klesla u 100 μmol/L CdCl₂ po 24 hod expozici buněk s toxinem o více než 95 %. Poškození buněk bylo následně potvrzeno mikroskopickou analýzou, kdy u buněk po expozici s 50 μmol/L CisPt a 100 μmol/L jsme pozorovali ztrátu fyziologického uspořádání cytoskeletu, zakulacení buněk a jejich uvolnění od dna mikroskopického sklíčka. V poslední části práce jsme pro vizualizaci morfologických změn zvolili časosběrnou analýzu. Morfologické změny jsme pozorovali v hodinových intervalech a byli jsme schopni lépe zachytit toxický efekt vybraných toxinů oproti toxickému poškození ve fluorescenčním mikroskopu.

ZDROJE

- [1] KULKARNI V. S. a CH. SHAW. Microscopy Techniques. *Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages*. Elsevier, 2016, 183-192. ISBN 9780128010242.
- [2] STEPHENS D. J. Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging. *Science*. 300(5616), 82-86. ISSN 00368075.
- [3] WALKER-DANIELS J. Live Cell Imaging Methods. *Materials and Methods*. 2012, 2. ISSN 2329-5139.
- [4] LIANG R., J. K. ERWIN a M. MANSURIPUR. Variation on Zernike's phase-contrast microscope. *Applied Optics*. 2000, 39(13). ISSN 0003-6935.
- [5] KEMPER B. a G. BALLY. Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection. *Applied Optics*. 2007, 47(4).
- [6] ANGEHANENBERG P., G.BALLY a B. KEMPER. Application of partially coherent light in live cell imaging with digital holographic microscopy. *Journal of Modern Optics*. 2010, 57(9), 709-717. ISSN 0950-0340.
- [7] COBLE P., J. LEAD, A. BAKER, et al. The Principles of Fluorescence. *Aquatic Organic Matter Fluorescence*. Cambridge: Cambridge University Press. 2014. ISBN 9781139045452.
- [8] LAKOWICZ J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3th Ed. New York: Kluwer Academic Publishers. 2016. ISBN 978-0387-31278-1.
- [9] SANDERSON M. J., I. SMITH, I. PARKER a M. D. BOOTMAN. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2014(10). ISSN 1559-6095.
- [10] LIU E., S. VEGA, M. D. TREISER, et al. Fluorescence Imaging of Cell–Biomaterial Interactions. *Comprehensive Biomaterials*. Elsevier. 2011, 291-303. ISBN 9780080552941.
- [11] LICHTMAN J. W. a J.-A. CONCHELLO. Fluorescence microscopy. *Nature Methods*. 2005, 2(12), 910-919. ISSN 1548-7091.
- [12] WEBB D. J. a C. M. BROWN. Epi-Fluorescence Microscopy. TAATJES. *Cell Imaging Techniques*. Totowa, NJ: Humana Press, 2013, 29-59. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-62703-055-7.

- [13] SHIKAWA-ANKERHOLD H. C., R. ANKERHOLD a G. P. C. DRUMMEN. Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules*. 2012, 17(4), 4047-4132. ISSN 1420-3049.
- [14] STACHS O., R. F. GUTHOFF a S. AUMANN. *In Vivo* Confocal Scanning Laser Microscopy. In: Bille JF, editor. High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology: New Frontiers in Biomedical Optics. Springer. 2019. Chapter 12.
- [15] PADDOCK S. W. a K. W. ELICEIRI. Laser Scanning Confocal Microscopy: History, Applications, and Related Optical Sectioning Techniques. Springer New York. 2014, 2014-8-24, 9-47. ISBN 978-1-58829-351-0.
- [16] YILDIZ A. a R. D. VALE. Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2015. ISSN 1940-3402.
- [17] MIDORIKAWA M. Real-time imaging of synaptic vesicle exocytosis by total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. *Neuroscience Research*. 2018, 136, 1-5. ISSN 01680102.
- [18] MAROIS E. A. a K. SUHLING. Quantitative Live Cell FLIM Imaging in Three Dimensions. DMITRIEV, Ruslan I., ed. *Multi-Parametric Live Cell Microscopy of 3D Tissue Models*. Springer International Publishing. 2017, 31-48. Advances in Experimental Medicine and Biology. ISBN 978-3-319-67357-8.
- [19] SHIKAWA H. C., R. ANKERHOLD a G. P. C. DRUMMEN. Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules*. 2012, 17(4), 4047-4132. ISSN 1420-3049.
- [20] ALEXIEV U., P. VOLZ, A. BOREHAM, et al. Time-resolved fluorescence microscopy (FLIM) as an analytical tool in skin nanomedicine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017, 116, 111-124. ISSN 09396411.
- [21] GIAKOUMAKIS N. N., M. A. RAPSOMANIKI a Z. LYGEROU. Analysis of Protein Kinetics Using Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP). *Light Microscopy*. New York, NY: Springer New York. 2017, 243-267. ISBN 978-1-4939-6808-4.
- [22] HOUTSMULLER A. B. Fluorescence Recovery after Photobleaching: Application to Nuclear Proteins. RIETDORF, Jens, ed. *Microscopy Techniques*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 2005, 177-199. ISBN 978-3-540-23698-6.

- [23] HANSEN CH. V., H. J. SCHROLL a D. WÜSTNER. A Discontinuous Galerkin Model for Fluorescence Loss in Photobleaching. *Scientific Reports*. 2018, 8(1). ISSN 2045-2322.
- [24] UENO T. a T. NAGANO. Fluorescent probes for sensing and imaging. *Nature Methods*. 2011, 8(8), 642-645. ISSN 1548-7091.
- [25] BOUTORINE A., D. NOVOPASHINA, O. KRASHENININA, et al. Fluorescent Probes for Nucleic Acid Visualization in Fixed and Live Cells. *Molecules*. 2013, 18(12), 15357-15397. ISSN 1420-3049.
- [26] BUCEVIČIUS J., G. LUKINAVIČIUS a R. GERASIMAITĖ. The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and beyond. *Chemosensors* 2018, 6(2). ISSN 2227-9040.
- [27] JUSKOWIAK B. Nucleic acid-based fluorescent probes and their analytical potential. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011, 399(9), 3157-3176. ISSN 1618-2642.
- [28] ZHU H., J. FAN, J. DU a X. PENG. Fluorescent Probes for Sensing and Imaging within Specific Cellular Organelles. *Accounts of Chemical Research*. 2016, 49(10), 2115-2126. ISSN 0001-4842.
- [29] ZOROVA L. D., V. A. POPKOV, E. Y. PLOTNIKOV, et al. Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*. 2018, 552, 50-59. ISSN 00032697.
- [30] LI X., Y. ZHAO, J. YIN a W. LIN. Organic fluorescent probes for detecting mitochondrial membrane potential. *Coordination Chemistry Reviews*. 2020, 420. ISSN 00108545.
- [31] PERRY S. W., J. P. NORMAN, J. BARBIERI, et al. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques*. 2011, 50(2), 98-115. ISSN 0736-6205.
- [32] PEKARČÍKOVÁ L., L. KNOPFOVÁ, E. ONDROUŠKOVÁ a J. ŠMARDA. The Use of Flow Cytometry for Analysis of the Mitochondrial Cell Death. *Klinická onkologie*. 2014, 27, 15-21. ISSN 0862495X.
- [33] DICKINSON B. C., D. SRIKUN a CH. J. CHANG. Mitochondrial-targeted fluorescent probes for reactive oxygen species. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2010, 14(1), 50-56. ISSN 13675931.

- [34] GOMES A., E. FERNANDES a J. L. F. C. LIMA. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2005, 65(2-3), 45-80. ISSN 0165022X.
- [35] DIKALOV S. I. a D. G. HARRISON. Methods for Detection of Mitochondrial and Cellular Reactive Oxygen Species. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014, 20(2), 372-382. ISSN 1523-0864.
- [36] LEMIEUX M. G., D. JANZEN, R. HWANG, et al. Visualization of the actin cytoskeleton: Different F-actin-binding probes tell different stories. *Cytoskeleton*. 2014, 71(3), 157-169. ISSN 19493584.
- [37] ENGELKE H., D. HEINRICH a J. O. RÄDLER. Probing GFP-actin diffusion in living cells using fluorescence correlation spectroscopy. *Physical Biology*. 2010, 7(4). ISSN 1478-3975.
- [38] THIEDE B. R. a J. T. CORWIN. Permeation of Fluorophore-Conjugated Phalloidin into Live Hair Cells of the Inner Ear Is Modulated by P2Y Receptors. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*. 2014, 15(1), 13-30. ISSN 1525-3961.
- [39] MELAK M., M. PLESSNER a R. GROSSE. Actin visualization at a glance. *Journal of Cell Science*. 2017, 130(3), 525–530. ISSN 0021-9533.
- [40] N. Inc., "BioStation IM-Q | Live Cell Screening Systems | Products | Nikon Instruments-Microscopes and Imaging Systems", Nikoninstruments.com, 2016. Dostupný z: www.nikon.com/products/microscope-solutions/lineup/integrated/imq/index.htm.
- [41] CERVINKA M., Z. CERVINKOVA a E. RUDOLF. The role of time-lapse fluorescent microscopy in the characterization of toxic effects in cell populations cultivated in vitro. *Toxicology in Vitro*. 2008, 22(5), 1382-1386. ISSN 08872333.
- [42] HEIDARI-SORESHJANI S., M. ASADI-SAMANI, Q. YANG a A. SAEEDI-BOROJENI. Phytotherapy of nephrotoxicity-induced by cancer drugs: an updated review. *Journal of Nephropathology*. 2017, 6(3), 254-263. ISSN 2251-8363.
- [43] KANG H. M., J. H. LIM, K. H. NOH, et al. Effective reconstruction of functional organotypic kidney spheroid for in vitro nephrotoxicity studies. *Scientific Reports*. 2019, 9(1). ISSN 2045-2322.

- [44] SOHN S.-J., S. Y. KIM, H. S. KIM, et al. In vitro evaluation of biomarkers for cisplatin-induced nephrotoxicity using HK-2 human kidney epithelial cells. *Toxicology Letters*. 2013, 217(3), 235-242. ISSN 03784274.
- [45] RYAN M. J., G. JOHNSON, J. KIRK, et al. HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney International*. 1994, 45(1), 48-57. ISSN 00852538.
- [46] HUANG J. X., G. KAESLIN, M. V. RANALL, et al. Evaluation of biomarkers for in vitro prediction of drug-induced nephrotoxicity: comparison of HK -2, immortalized human proximal tubule epithelial, and primary cultures of human proximal tubular cells. *Pharmacology Research & Perspectives*. 2015, 3(3). ISSN 2052-1707.
- [47] LV Y., D. CH. DAN CHENG, D. S. DONGDONG SU, et al. Visualization of oxidative injury in the mouse kidney using selective superoxide anion fluorescent probes. *Chemical Science*. 2018, 9(39), 7606-7613. ISSN 2041-6520.
- [48] HAEUSSLER U., M. RIEDEL a F. KELLER. Free Reactive Oxygen Species and Nephrotoxicity of Contrast Agents. *Kidney and Blood Pressure Research*. 2004, 27(3), 167-171. ISSN 1420-4096.
- [49] CROFTON K. M., W. R. MUNDY a T. J. SHAFER. Developmental neurotoxicity testing: A path forward. *Congenital Anomalies*. 2012, 52(3), 140-146. ISSN 09143505.
- [50] CHEUNG Y.-T., W. K.-W. LAU, M.-S. YU, et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as *in vitro* model in neurotoxicity research. *NeuroToxicology*. 2009, 30(1), 127-135. ISSN 0161813X.
- [51] POPOVA D., J. KARLSSON a S. O. P. JACOBSSON. Comparison of neurons derived from mouse P19, rat PC12 and human SH-SY5Y cells in the assessment of chemical-and toxin-induced neurotoxicity. *BMC Pharmacology and Toxicology*. 2017, 18(1). ISSN 2050-6511.
- [52] MEIJER M., H. S. HENDRIKS, H. J. HEUSINKVELD, et al. Comparison of plate reader-based methods with fluorescence microscopy for measurements of intracellular calcium levels for the assessment of *in vitro* neurotoxicity. *NeuroToxicology*. 2014, 45, 31-37. ISSN 0161813X.

- [53] DONATO M. T., L. TOLOSA a M. J. GÓMEZ-LECHÓN. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *In vitro Hepatocyte Research*. 2015, 77-93. ISBN 978-1-4939-2073-0.
- [54] MCGILL M. R., H.-M. YAN, A. RAMACHANDRAN, et al. HepaRG cells: A human model to study mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*. 2011, 53(3), 974-982. ISSN 02709139.
- [55] CHOI J. M., S. J. OH, J.-Y. LEE, et al. Prediction of Drug-Induced Liver Injury in HepG2 Cells Cultured with Human Liver Microsomes. *Chemical Research in Toxicology*. 2015, 28(5), 872-885. ISSN 0893-228X.
- [56] ZOLLNER G., M. WAGNER a M. TRAUNER. Nuclear receptors as drug targets in cholestasis and drug-induced hepatotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics*. 2010, 126(3), 228-243. ISSN 01637258.
- [57] ARITOMI K., Y. ISHITSUKA, Y. TOMISHIMA, et al. Evaluation of Three-Dimensional Cultured HepG2 Cells in a Nano Culture Plate System: an In Vitro Human Model of Acetaminophen Hepatotoxicity. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2014, 124(2), 218-229. ISSN 1347-8613.
- [58] MCGILL M. R., H.-M. YAN, A. RAMACHANDRAN, et al. HepaRG cells: A human model to study mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*. 2011, 53(3), 974-982. ISSN 02709139.
- [59] COOPER J. R., M. B. ABDULLATIF, E. C. BURNETT, et al. Long Term Culture of the A549 Cancer Cell Line Promotes Multilamellar Body Formation and Differentiation towards an Alveolar Type II Pneumocyte Phenotype. *PLOS ONE*. 2016, 11(10). ISSN 1932-6203.
- [60] FOSTER K. A., CH. G. OSTER, M. M. MAYER, et al. Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Experimental Cell Research*. 1998, 243(2), 359-366. ISSN 00144827.
- [61] SWEIDAN A. J., N. K. SINGH, N. DANG, et al. Amiodarone-Induced Pulmonary Toxicity – A Frequently Missed Complication. *Clinical Medicine Insights: Case Reports*. 2016, 9. ISSN 1179-5476.

- [62] LEIBROCK L., S. WAGENER, A. V. SINGH, et al. Nanoparticle induced barrier function assessment at liquid–liquid and air–liquid interface in novel human lung epithelia cell lines. *Toxicology Research*. 2019, 8(6), 1016-1027. ISSN 2045-4538.
- [63] PIRET J.-P., T. ARNOULD, B. FUKS, et al. Mitochondria permeability transition-dependent tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis in hepatoma HepG2 cells. *Biochemical Pharmacology*. 2004, 67(4), 611-620. ISSN 00062952.
- [64] YEH Y.-CH., T.-J. LIU a H.-CH. LAI. Pathobiological Mechanisms of Endothelial Dysfunction Induced by tert-Butyl Hydroperoxide via Apoptosis, Necrosis and Senescence in a Rat Model. *International Journal of Medical Sciences*. 2020, 17(3), 368-382. ISSN 1449-1907.
- [65] KUČERA O., R. ENDLICHER, T. ROUŠAR, et al. The Effect of tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress on Lean and Steatotic Rat Hepatocytes In Vitro. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014, 1-12. ISSN 1942-0900.
- [66] CHOI Y.-M., H.-K. KIM, W. SHIM, et al. Mechanism of Cisplatin-Induced Cytotoxicity Is Correlated to Impaired Metabolism Due to Mitochondrial ROS Generation. *PLOS ONE*. 2015, 10(8). ISSN 1932-6203.
- [67] GONZALEZ V. M., M. A. FUERTES, C. ALONSO a M. PEREZ. Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis? *Molecular Pharmacology*. 2001, 59(4), 657-663. ISSN 0026-895X.
- [68] YU F., J. MEGYESI a P. M. PRICE. Cytoplasmic initiation of cisplatin cytotoxicity. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2008, 295(1), F44-F52. ISSN 1931-857X.
- [69] REBILLARD A., D. LAGADIC-GOSSMANN a M.-T. DIMANCHE-BOITREL. Cisplatin Cytotoxicity: DNA and Plasma Membrane Targets. *Current Medicinal Chemistry*. 2008, 15(26), 2656-2663. ISSN 09298673.
- [70] L'AZOU B., I. PASSAGNE, S. MOUNICOU, et al. Comparative cytotoxicity of cadmium forms (CdCl₂, CdO, CdS micro-and nanoparticles) in renal cells. *Toxicol. Res*. 2014, 3(1), 32-41. ISSN 2045-452X.
- [71] SKIPPER A., J. SIMS, C. YEDJOU a P. TCHOUNWOU. Cadmium Chloride Induces DNA Damage and Apoptosis of Human Liver Carcinoma Cells via Oxidative

Stress. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2016, 13(1). ISSN 1660-4601.

[72] RAVINDRAN G., D. CHAKRABARTY a A. SARKAR. Cell specific stress responses of cadmium-induced cytotoxicity. *Animal Cells and Systems*. 2016, 21(1), 23-30. ISSN 1976-8354.

[73] MUGNANO M., P. MEMMOLO, L. MICCIO, et al. In vitro cytotoxicity evaluation of cadmium by label-free holographic microscopy. *Journal of Biophotonics*. 2018, 11(12). ISSN 1864063X.

[74] ALI A., M. SUHAIL, S. MATHEW, et al. Nanomaterial Induced Immune Responses and Cytotoxicity. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2016, 16(1), 40-57.

[75] MADANNEJAD R., N. SHOAIE, F. JAHANPEYMA, et al. Toxicity of carbon-based nanomaterials: Reviewing recent reports in medical and biological systems. *Chemico-Biological Interactions*. 2019, 307, 206-222. ISSN 00092797.

[76] SAIFI M. A., W. KHAN a CH. GODUGU. Cytotoxicity of Nanomaterials: Using Nanotoxicology to Address the Safety Concerns of Nanoparticles. *Pharmaceutical Nanotechnology*. 2018, 6(1), 3-16. ISSN 22117385.

[77] SCHRAND A. M., L. DAI, J. J. SCHLAGER a S. M. HUSSAIN. Toxicity Testing of Nanomaterials. *New Technologies for Toxicity Testing*. 2012, 58-75. ISBN 978-1-4614-3054-4.

[78] WANG Y., H. CUI, J. ZHOU, et al. Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Environ Sci Pollut Res*. 2015, 22, 5519–5530. ISSN 0944-1344.

[79] SHAKEEL M., F. JABEEN, S. SHABBIR, et al. Toxicity of Nano-Titanium Dioxide (TiO₂-NP) Through Various Routes of Exposure: a Review. *Biological Trace Element Research*. 2016, 172(1), 1-36. ISSN 0163-4984.

[80] BIOLA-CLIER M., J.-CH. GAILLARD, T. RABILLOUD, et al. Titanium Dioxide Nanoparticles Alter the Cellular Phosphoproteome in A549 Cells. *Nanomaterials*. 2020, 10(2). ISSN 2079-4991.

[81] PANDURANGAN M. a D. H. KIM. In vitro toxicity of zinc oxide nanoparticles: a review. *Journal of Nanoparticle Research*. 2015, 17(3). ISSN 1388-0764.

- [82] SHARMA V., R. K. SHUKLA, N. SAXENA, et al. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology Letters*. 2009, 185(3), 211-218. ISSN 03784274.
- [83] YUAN X., X. ZHANG, L. SUN, et al. Cellular Toxicity and Immunological Effects of Carbon-based Nanomaterials. *Particle and Fibre Toxicology*. 2019, 16(1). ISSN 1743-8977.
- [84] VISALLI G., M. P. BERTUCCIO, D. IANNAZZO, et al. Toxicological assessment of multi-walled carbon nanotubes on A549 human lung epithelial cells. *Toxicology in Vitro*. 2015, 29(2), 352-362. ISSN 08872333.
- [85] CHANG Y., S-T. YANG, J.-H. LIU, et al. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicology Letters*. 2011, 200(3), 201-210. ISSN 03784274.
- [86] DAVOREN M., E. HERZOG, A. CASEY, et al. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicology in Vitro*. 2007, 21(3), 438-448. ISSN 08872333.
- [87] CHAN F. K.-M., N. F. LUZ a K. MORIWAKI. Programmed Necrosis in the Cross Talk of Cell Death and Inflammation. *Annual Review of Immunology*. 2015, 33(1), 79-106. ISSN 0732-0582.
- [88] GALLUZZI L., I. VITALE, S. A. AARONSON, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*. 2018, 25(3), 486-541. ISSN 1350-9047.
- [89] D'ARCY M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*. 2019, 43(6), 582-592. ISSN 1065-6995.
- [90] GRILO A. L. a A. MANTALARIS. Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnology Advances*. 2019, 37(3), 459-475. ISSN 07349750.
- [91] GREEN D. R. a F. LLAMBI. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2015, 7(12). ISSN 1943-0264.
- [92] YANUMULA A. a J. K. CUSICK. Biochemistry, Extrinsic Pathway of Apoptosis. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2020.
- [93] NIRMALA J. G. a M. LOPUS. Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biology and Toxicology*. 2020, 36(2), 145-164. ISSN 0742-2091.

- [94] YANG Y., Y. YU, J. WANG, et al. Silica nanoparticles induced intrinsic apoptosis in neuroblastoma SH-SY5Y cells via CytC/Apaf-1 pathway. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2017, 52, 161-169. ISSN 13826689.
- [95] GONZÁLEZ-SARRÍAS A., M. Á. NÚÑEZ-SÁNCHEZ, F. A. TOMÁS-BARBERÁN a J. C. ESPÍN. Neuroprotective Effects of Bioavailable Polyphenol-Derived Metabolites against Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017, 65(4), 752-758. ISSN 0021-8561.
- [96] ROMERO A., E. RAMOS, V. CASTELLANO, et al. Cytotoxicity induced by deltamethrin and its metabolites in SH-SY5Y cells can be differentially prevented by selected antioxidants. *Toxicology in Vitro*. 2012, 26(6), 823-830. ISSN 08872333.
- [97] SCHNEIDER L., S. GIORDANO, B. R. ZELICKSON, et al. Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011, 51(11). ISSN 08915849.
- [98] CHOI Y.-J., E.-B. KWAK, J.-W. LEE, et al. Cytoprotective Effects of Docosyl Caffeate against tBHP-Induced Oxidative Stress in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *Biomolecules and Therapeutics*. 2011, 19(2), 195-200. ISSN 1976-9148.
- [99] LU, D., A. XU, H. MAI, et al. The Synergistic Effects of Heat Shock Protein 70 and Ginsenoside Rg1 against Tert-Butyl Hydroperoxide Damage Model In Vitro. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015, 1-22. ISSN 1942-0900.
- [100] CALLS, Aina, Valentina CAROZZI, Xavier NAVARRO, Laura MONZA a Jordi BRUNA. Pathogenesis of platinum-induced peripheral neurotoxicity: Insights from preclinical studies. *Experimental Neurology*. 2020, 325. ISSN 00144886.
- [101] DONZELLI E., M. CARFÌ, M. MILOSO, 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(1/2), 65-73. ISSN 0167-594X.
- [102] ALTUN Z. S., D. GÜNEŞ, S. AKTAŞ, et al. Protective Effects of Acetyl-L-Carnitine on Cisplatin Cytotoxicity and Oxidative Stress in Neuroblastoma. *Neurochemical Research*. 35(3), 437-443. ISSN 0364-3190.

- [103] BRANCA J. J.V., G. MORUCCI, M. MARESCA, et al. Selenium and zinc: Two key players against cadmium-induced neuronal toxicity. *Toxicology in Vitro*. 2018, 48, 159-169. ISSN 08872333.
- [104] SUDO K., C. VAN DAO, A. MIYAMOTO a M. SHIRAISHI. Comparative analysis of *in vitro* neurotoxicity of methylmercury, mercury, cadmium, and hydrogen peroxide on SH-SY5Y cells. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2019, 81(6), 828-837. ISSN 0916-7250.
- [105] PAK, Eun Joo, Gi Dong SON a Byung Sun YOO. Cadmium Inhibits Neurite Outgrowth in Differentiating Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *International Journal of Toxicology*. 2014, 33(5), 412-418. ISSN 1091-5818.
- [106] FERRARO S. Ar., M. G. DOMINGO, A. ETCHEVERRITO, et al. Neurotoxicity mediated by oxidative stress caused by titanium dioxide nanoparticles in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2020, 57. ISSN 0946672X.
- [107] COCCINI T., S. GRANDI, D. LONATI, et al. Comparative cellular toxicity of titanium dioxide nanoparticles on human astrocyte and neuronal cells after acute and prolonged exposure. *NeuroToxicology*. 2015, 48, 77-89. ISSN 0161813X.
- [108] VISALLI G., M. CURRÒ, D. IANNAZZO, et al. In vitro assessment of neurotoxicity and neuroinflammation of homemade MWCNTs. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2017, 56, 121-128. ISSN 13826689.
- [109] VITTORIO, Orazio, Vittoria RAFFA a Alfred CUSCHIERI. Influence of purity and surface oxidation on cytotoxicity of multiwalled carbon nanotubes with human neuroblastoma cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2009, 5(4), 424-431. ISSN 15499634.

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).