

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

Testování cytotoxicity nanomateriálů

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Štěpánka Jelínková
VEDOUCÍ PRÁCE: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.
KONZULTANT: Mgr. Jana Báčová

2022

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

Testing of cellular nanotoxicity

THESIS

AUTHOR: Bc. Štěpánka Jelínková

SUPERVISOR: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

CONSULTANT: Mgr. Jana Báčová

2022

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Štěpánka Jelínková**
Osobní číslo: **C20473**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Testování cytotoxicity nanomateriálů**
Téma práce anglicky: **Testing Of Cellular Nanotoxicity**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na přehled nanomateriálů využívající dělení dle prostorových, chemických a fyzikálně-chemických vlastností. Speciální zřetel věnujte nanomateriálům anorganického původu, a to především těm z oxidu titaničitého. Další kapitoly teoretické části věnujte popisu možností testování nanotoxicity *in vitro*, porovnání používaných metod, či modifikacím původně anorganických nanomateriálů, jež mají za cíl zvýšit biokompatibilitu. Vzhledem k náplni praktické části diplomové práce se především věnujte popisu testování nanotoxicity u suspenzních buněčných linií. Ke zpracování tohoto přehledu využijte elektronické databáze (*ScienceDirect*, *NCBI Pubmed*, *Web of Science*).
2. V rámci praktické části: 1) optimalizujte kultivaci minimálně jedné linie suspenzních buněk (Jurkat, HL-60, aj.); 2) připravte suspenze alespoň tří testovaných nanomateriálů a u těchto otestujte možnou indukci cytotoxicity ve vztahu k jejich koncentraci (do 100 ug/ml) a době inkubace (do 48 hod); 3) k charakterizaci toxického účinku u buněk využijte alespoň dvou rutinních biochemických metod (např. WST-1, MCB, aj.), popř. mikroskopické analýzy.
3. Získaná experimentální data statisticky zpracujte a diskutujte. Své výsledky následně v diskuzní části porovnejte s výstupy jiných autorů.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Jana Báčová**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

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

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem *Testování cytotoxicity nanomateriálů* 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

Bc. Štěpánka Jelínková, v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. a své konzultantce Mgr. Janě Báčové za odborný dohled, vstřícnost při konzultacích a cenné rady, které mi během vypracování diplomové práce věnovali. Za praktické rady bych ráda poděkovala Mgr. Janu Čapkovi, Ph.D., Mgr. Pavlíně Majtnerové, Ph.D. a paní laborantce Bc. Ivaně Fousové.

Velké díky patří i mým kolegyním a kamarádkám Barče, Nikče a Ivče, které mi byly oporou při zpracování diplomové práce i při celém studiu. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu při celém studiu. Díky Vám všem!

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá testováním cytotoxicity nanomateriálů. Teoretická část se věnuje suspenzním buněčným liniím, dále je zde popsána toxicita nanomateriálů, a v závěru jsou uvedeny testy, které se používají k hodnocení cytotoxicity nanomateriálů.

Experimentální část je zaměřena na testování cytotoxicity vybraných nanomateriálů pomocí bioanalytických a mikroskopických metod na suspenzní buněčné linii Jurkat. Pro experimenty jsme zvolili nanočástice TiO₂ P25, TiO₂ rutil a uhlíkové nanotrubičky SWCNTs a MWCNTs. Potencionální toxicitu jsme hodnotili po 24 a 48 hodinách inkubace buněk Jurkat s nanomateriály o koncentraci 0-500 µg/mL. Vliv vybraných nanomateriálů na životaschopnost buněk jsme hodnotili pomocí WST-1 testu a vliv na intracelulární koncentraci glutathionu jsme detekovali pomocí fluorescenční sondy monochlorobiman. Morfologii buněk inkubovaných s nanočásticemi nebo nanotrubičkami jsme pozorovali pod invertovaným mikroskopem ve fázovém kontrastu. V závěru práce jsou prezentovány výsledky a je zhodnocena toxicita nanomateriálů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Cytotoxicita, nanomateriály, nanočástice, nanotrubičky, buněčná linie Jurkat.

ANNOTATION

The aim of this diploma thesis is testing of cellular nanotoxicity. First, the theoretical part of the thesis deals with the suspension cell lines, then the toxicity of nanomaterials is described. Finally, the assays used to evaluate the cytotoxicity of nanomaterials are described.

The experimental part is focused on testing of the cytotoxicity of some nanomaterials using bioanalytical and microscopic methods in the Jurkat cell line. For experiments we chose TiO₂ P25 and rutil nanoparticles together with carbon SWCNTs and MWCNTs nanotubes. The potential cytotoxicity was assessed in Jurkat cells after 24 and 48 hours of incubation with nanomaterials at concentrations 0-500 µg/mL. The effect of presented nanomaterials on cell viability was evaluated using the WST-1 test and the effect on the intracellular level of glutathione was detected using the optimized monochlorobimane assay. We observed the morphology of Jurkat cells incubated with nanoparticles or nanotubes using an phase contrast inverted microscope. At the end of the thesis, the results are presented, and toxicity of nanomaterials is evaluated.

KEYWORDS

Cytotoxicity, Nanomaterials, Nanoparticles, Nanotubes, Jurkat Cell Line.

OBSAH

ÚVOD.....	14
1. TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1 Suspenzní buněčné linie	15
1.1.1 Buněčná linie Jurkat.....	16
1.1.2 Buněčná linie HL-60.....	18
1.1.3 Buněčná linie MOLT-4.....	18
1.1.4 Buněčná linie Raji.....	19
1.2 Nanomateriály	19
1.2.1 Nanočástice a testování cytotoxicity	19
1.2.1.1 Nanočástice na bázi TiO ₂	22
1.2.1.2 Nanočástice na bázi SiO ₂	30
1.2.1.3 Nanočástice na bázi Al ₂ O ₃	33
1.2.1.4 Nanočástice na bázi stříbra.....	33
1.2.1.5 Nanočástice na bázi ZnO	36
1.2.1.6 Další nanočástice.....	37
1.2.2 Nanovlákna, nanodrátky a testování cytotoxicity	39
1.2.2.1 Nanodrátky na bázi Al ₂ O ₃	39
1.2.2.2 Nanovlákna na bázi TiO ₂	40
1.3 Testy používané k hodnocení cytotoxicity nanomateriálů	41
2. CÍLE PRÁCE.....	45
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46
3.1 Pomůcky a přístroje.....	46
3.1.1 Software	46
3.2 Seznam použitých chemikálií.....	47
3.3 Kultivace buněčné linie Jurkat	47
3.4 Příprava roztoků	48
3.5 Testování cytotoxicity nanomateriálů	49
3.5.1 Stanovení dehydrogenázové aktivity buněk.....	49
3.5.1.1 Optimalizace vhodné denzity buněk pro testování toxicity nanomateriálů..	50
3.5.1.2 Stanovení dehydrogenázové aktivity buněk po inkubaci s nanomateriály..	52
3.5.2 Fluorimetrické stanovení koncentrace glutathionu	52
3.5.3 Pozorování morfologie buněk po inkubaci s nanomateriály.....	53

3.5.4	Statistická analýza naměřených dat	53
4.	VÝSLEDKY	54
4.1	Testování cytotoxicity TiO ₂ nanočástic.....	54
4.1.1	Stanovení dehydrogenázové aktivity buněk.....	54
4.1.2	Fluorimetrické stanovení koncentrace glutathionu	56
4.2	Testování cytotoxicity uhlíkových nanotrubiček	58
4.2.1	Stanovení dehydrogenázové aktivity buněk.....	58
4.2.2	Fluorimetrické stanovení koncentrace glutathionu	60
4.3	Pozorování morfologie buněk po inkubaci s nanomateriály	62
5.	DISKUZE	64
	ZÁVĚR	71
	POUŽITÁ LITERATURA	72

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

Obrázek 1: Charakteristická morfologie buněčné linie Jurkat.....	17
Obrázek 2: Charakteristická morfologie buněčné linie HL-60.....	18
Obrázek 3: Vlastnosti nanočástic kovů/oxidů kovů	21
Obrázek 4: Snímek transmisní elektronové mikroskopie nanočástic oxidu titaničitého	22
Obrázek 5: Porovnání adheze buněk MOLT-4 a zdravých leukocytů.....	25
Obrázek 6: Cytotoxická analýza nanočástic oxidu titaničitého s THP-1 buňkami.....	27
Obrázek 7: Charakterizace apoptózy buněk Raji in vitro	32
Obrázek 8: Porovnání stříbrných nanočástic o různých velikostech	34
Obrázek 9: Permeabilita endoteliální monovrstvy indukovaná stříbrnými nanočásticemi	35
Obrázek 10: Buňky Jurkat na vertikálně uspořádaných nanodrátkách.....	40
Obrázek 11: Barvení buněk Annexinem V/propidium jodidem a ethidium bromidem/akridinovou oranží	43
Obrázek 12: Princip testu WST-1	50
Obrázek 13: Konjugace monochlorobimanu s glutathionem	52
Obrázek 14: Vliv nanomateriálů na buněčnou morfologii	63
Tabulka 1: Postup ředění nanomateriálů při testování cytotoxicity nanomateriálů.....	49
Graf 1: Optimalizace denzity buněk Jurkat	51
Graf 2: Vliv TiO ₂ nanočástic na dehydrogenázovou aktivitu.....	55
Graf 3: Vliv TiO ₂ nanočástic na koncentraci glutathionu.....	57
Graf 4: Vliv uhlíkových nanotrubiček na dehydrogenázovou aktivitu.....	59
Graf 5: Vliv uhlíkových nanotrubiček na koncentraci glutathionu	61

SEZNAM ZKRATEK

ATCC	sbírka buněčných kultur (<i>American Type Culture Collection</i>)
cisPt	cisplatina
CoQ10	koenzym Q10 (<i>Coenzyme Q10</i>)
DMSO	dimethylsulfoxid
ECM	extracelulární matrix
FBS	fetální bovinní sérum
GSH	glutathion
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
JNK	c-Jun-N-terminální kináza
LDH	laktátdehydrogenáza
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MCB	monochlorobiman
MDA	malondialdehyd
miRNA	mikro-ribonukleová kyselina
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina
MTT	methyl-thiazolyl-tetrazolium
MWCNTs	mnohostěnné uhlíkové nanotrubičky (<i>Multi-walled Carbon Nanotubes</i>)
NAIP	antiapoptotický gen (<i>Apoptosis Inhibitory Protein</i>)
NET	neutrofilní extracelulární pasti (<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>)
NF- κ B	nukleární faktor-kappa B
NLR	rodina receptorů podobných oligomerizační doméně vázající nukleotid (<i>The Nucleotide-Binding And Oligomerization Domain-Like Receptor Family</i>)
NLRP1	protein 1 z rodiny receptorů podobných oligomerizační doméně vázající nukleotid (<i>NLR Family Pyrin Domain Containing 1</i>)
NLRP3	protein 3 z rodiny receptorů podobných oligomerizační doméně vázající nukleotid (<i>NLR Family Pyrin Domain Containing 3</i>)
NMs	nanomateriály (<i>Nanomaterials</i>)
NPs	nanočástice (<i>Nanoparticles</i>)
Nrf-2	s nukleárním faktorem-E2-související faktor-2 (<i>Nuclear Factor E2-Related Factor 2</i>)

NW	nanodrátky (<i>Nano-Wires</i>)
PBMC	mononukleární buňky periferní krve (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>)
PBS	fosfátový pufr (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PDT	fotodynamická terapie (<i>Photodynamic Therpay</i>)
RBC	erytrocyty (<i>Red Blood Cells</i>)
RBP1	protein 1 vázající retinol (<i>Retinol Binding Protein 1</i>)
RNS	reaktivní formy dusíku (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROS	reaktivní formy kyslíku (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 medium
SOD	superoxiddismutáza
SWCNTs	jednostěnné uhlíkové nanotrubičky (<i>Single-Walled Carbon Nanotubes</i>)
TNF	tumor nekrotizující faktor
TUNEL	metoda <i>Terminal Deoxynukleotidyl Transferase Nick End Labeling</i>
WST-1	tetrazolium-1 rozpustný ve vodě (<i>Water Soluble Tetrazolium-1</i>)

ÚVOD

Nanomateriály, mezi které se řadí i nanočástice, nanotrubičky a nanovlákná, jsou velice často používané v různých odvětvích. Jedná se o věci každodenního použití, oblast elektrotechniky, medicíny a mnoha dalších. Jelikož jsou nanomateriály rozšířené, je nutné zkoumat jejich potenciální cytotoxický účinek.

K hodnocení cytotoxicity nanomateriálů se mimo jiné využívají suspenzní buněčné linie. Charakteristickou vlastností těchto buněk je jejich růst v suspenzi, čímž se liší od buněk adherentních, které přilnou na povrch materiálu, což může být např. nanomateriál nebo kultivační nádoba. U suspenzních buněčných linií je překážkou jejich malá, případně žádná, adheze k materiálům.

Zvláště nanočástice se díky jejich malé velikosti mohou dostat do plic a dále do krevního oběhu, kde se setkávají s krevními buňkami, které mají charakter suspenzních buněk. Na těchto buňkách, a především na nádorových buněčných liniích, se testuje imunotoxicita nebo genotoxicita nanomateriálů.

Suspenzní buňky se dále používají i ve studiích zabývajících se léčbou leukémií. Právě na leukemických buňkách (například Jurkat nebo Raji) se testují různé nanomateriály, které by mohly pomoci v léčbě této skupiny onemocnění. U takových experimentů je ale nutné zkoumat, jestli nanomateriály, které jsou toxické pro leukemické buňky, nejsou toxické pro zdravé buňky.

Nicméně je třeba dále zkoumat interakci suspenzních buněk s nanomateriály, jelikož více studií je prováděných na adherentních buňkách. Mezi zástupce suspenzních buněčných linií se řadí buňky Jurkat, Raji, HL-60 nebo také MOLT-4.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Suspenzní buněčné linie

Buněčné linie jsou dvojího typu: suspenzní a adherentní. Suspenzní buňky jsou charakteristické svým rychlým růstem v kultivačním médiu. Pod mikroskopem jsou vidět jednotlivé buňky nebo se buňky vyskytují ve shlucích. Buňky musí být udržovány v médiu obsahujícím živiny (např. vitamíny, minerály, růstové faktory, hormony, aminokyseliny). Ke kultivaci je zapotřebí inkubátor, který zajistí optimální teplotu 37 °C a 5 % CO₂. Mezi suspenzní buněčné linie patří hematopoetické buňky (*Segeritz et al., 2017*).

Suspenzní buňky se od adherentních liší tím, že adherentní buňky se při kultivaci usadí na dno kultivační nádoby, zatímco suspenzní buňky se nepřichytí a zůstanou v suspenzi roztoku v kulovitém tvaru. Hematopoetické buněčné linie rostou v suspenzi a nespádají se připojují k substrátům (*Bäckström et al., 2020*).

Schopnost ukotvit suspenzní buňky na krátkou dobu na povrch by se mohla ukázat jako užitečná pro řadu testů na buněčných kulturách. Adheze suspenzních buněk je také zásadní pro studie buněčných biomateriálů a navíc, přechodně adherované suspenzní buňky, by mohly být použity pro aplikace tkáňového inženýrství, a to v podobě začlenění do scaffoldu (*Audiffred et al., 2010*). Bylo vyvinuto několik povlaků s cílem lépe připevnit buňky k povrchu. Jedná se o různé biologické materiály včetně proteinů extracelulární matrix (ECM), jako je kolagen, laminin a fibronectin. Oblíbenými povlaky jsou i syntetické polymery, například poly-D-lysin a poly-ornitin (*Bäckström et al., 2020*).

Účinek adheze závislý na séru byl pozorován na substrátech, které byly potaženy fibronectinem, zatímco na neošetřených destičkách nebyl tento účinek pozorován. Existuje tedy přímá korelace mezi koncentrací fibronektinu na povrchu materiálu a procentem připojených Jurkat buněk. Bylo zjištěno, že role séra je kritická pro pozorovanou adhezi buněk (*Audiffred et al., 2010*).

K selektivní izolaci adherentních buněk od těch neadherentních lze použít plast. Tato metoda, která se původně používala například k izolaci monocytů a mononukleárních buněk periferní krve (PBMC), je založena na vlastnostech buněk nespécificky přilnout k plastu tkáňové kultury. Dalším příkladem je schopnost buněk se vázat na ECM, která se využívá k potahování plastových povrchů. Výhoda této izolace je její jednoduchost provedení a nenákladný způsob izolace adherentních buněk ze smíšených buněčných populací (*Carson et al., 2011*).

Interakce mnoha typů buněk s různými nano-strukturními povrchy a povlaky byla poměrně rozsáhle studována s cílem zlepšit lékařské implantáty a zabránit tak jejich selhání, bohužel tyto studie zřídka zahrnují neadherentní rakovinné buňky (*Garcia-Diosa et al., 2021-b*).

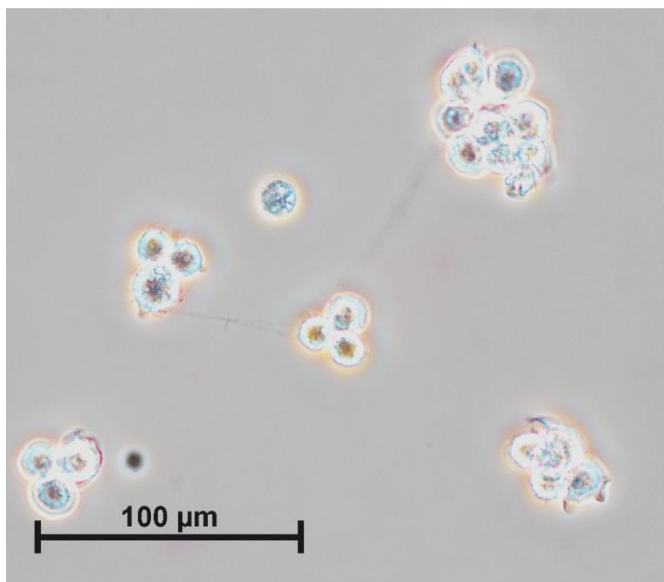
S primárními lidskými neutrofily je prakticky obtížné pracovat kvůli jejich krátké životnosti, zdravotním a bezpečnostním problémům spojených s používáním lidské krve, aktivací během izolace a výsledkům, které obvykle podléhají vysokému stupni variability mezi dárci. Tyto problémy může překonat použití imortalizovaných buněk, jako jsou například buňky HL-60 (*Verdon et al., 2020*).

Mezi zástupce suspenzních buněčných linií patří buněčná linie Jurkat, buněčná linie akutní monocytární leukémie THP-1 a buněčná linie chronické myeloidní leukémie K-562 (*Bäckström et al., 2020*).

1.1.1 Buněčná linie Jurkat

Jurkat buňky jsou lidské leukemické T buňky, které byly původně získány z periferní krve chlapce s T buněčnou leukémií. Jsou široce používané ke zkoumání aktivačních a signalizačních mechanismů T buněk (*Bloemberg et al., 2020*). Tato buněčná linie je jednou z nejpoužívanějších suspenzních buněčných linií využívaných ve studiích zabývajících se léky k léčbě rakoviny až po léčbu elektrickým polem (*Audiffred et al., 2010*). Dále jsou tyto buňky hojně využívány ke studiu imunitních a cytotoxických reakcí na různé biomateriály. Hlavním cílem vlivu fyzikálních vlastností oxidovaného povlaku (např. materiály z titanu) je buněčná membrána (*Khlosov et al., 2016*).

Jurkat buňky mají kulovitý tvar a pod mikroskopem jsou patrné shluky (obrázek 1). Ke kultivaci Jurkat buněk se většinou využívá médium Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) a 10 % fetální bovinní sérum (FBS), dále se přidává 1% penicilin/streptomycin. Buňky se kultivují při 37 °C a 5 % CO₂ (*Shinto et al., 2019; Li et al., 2016-b; Audiffred et al., 2010*).



Obrázek 1: Charakteristická morfologie buněčné linie Jurkat: fázový kontrast, zvětšení 200x, měřítko = 100 μm .

Lidské leukemické T buňky produkují interleukin-2 (IL-2) a na svém buněčném povrchu exprimují znak CD69 (*cluster of differentiation 69*), čehož se využívá při detekci pomocí fluorescenčního barvení protilátek v průtokové cytometrii (Bloemberg *et al.*, 2020).

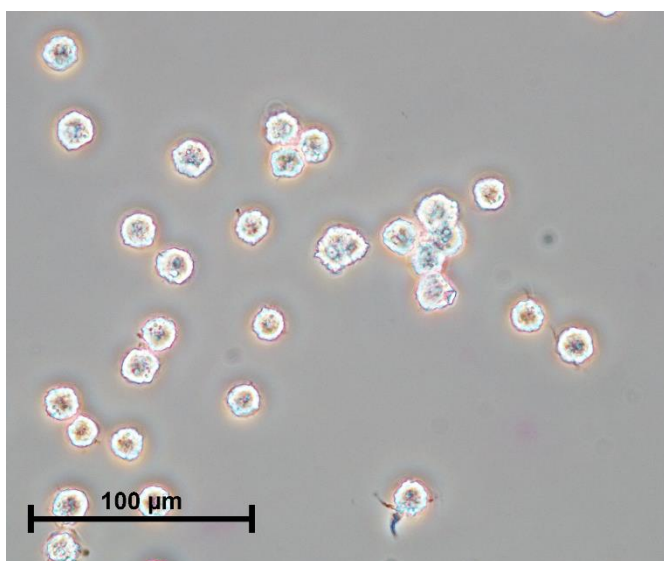
Tyto buňky jsou modelem využívaným k testování možností léčby leukemií. V experimentu vědci využili koncept kombinovaného použití statického magnetického pole a magnetických nanočástic (NPs) pro spuštění potenciálně selektivního zabíjení těchto buněk. Magnetické pole zvyšuje redoxní nerovnováhu iniciovanou magnetickými NPs, což vede k cytotoxické reakci v rakovinných buňkách. Výsledky ukázaly zvýšenou tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS) v buňkách Jurkat (Pshenichnikov *et al.*, 2021).

Stimulace Jurkat buněk pomocí tumor nekrotizujícího faktoru (TNF) významně posiluje jejich adhezi k fibronektinu v biomimetickém *in vitro* testu na dobu kontaktu s buněčným povrchem asi 1,5 vteřiny, zatímco u delší doby kontaktu tento účinek mizí (Li *et al.*, 2016-b). Naopak inhibice TNF- α zvyšuje životaschopnost buněk Jurkat. TNF- α -indukovaná aktivace kaspázy je kriticky zapojena do apoptózy (Chattopadhyay *et al.*, 2014).

Jurkat buňky postrádají důležité ultrafialové-A (UV-A) specifické chromofory, např. melanin přítomný v kůži. Frakce melaninu ve formě feomelaninu je zodpovědná za UV-indukovaný fotokatalytický efekt. Nedostatek těchto UV-A-specifických chromoforů může způsobit, že buňky Jurkat jsou méně vystaveny akutní toxicitě, kterou může UV-A podporovat v kožních buňkách (Caputo *et al.*, 2015).

1.1.2 Buněčná linie HL-60

Jedná se o suspenzní buněčnou linii lidské akutní myeloidní leukémie objevenou v roce 1977, která byla široce využívána ke studiu diferenciaci a migraci neutrofilů. Její použití se od té doby rozšířilo na studium funkcí neutrofilů v různých oblastech výzkumu, včetně zánětlivé reakce zprostředkované nanomateriály (NMs). Tato buněčná linie se používá k testování cytotoxicity NMs vyrobených ze stříbra, oxidu zinečnatého (ZnO), oxidu měďnatého (CuO) nebo oxidu titaničitého (TiO₂) (Verdon *et al.*, 2020; Barbasz *et al.*, 2017). Experiment ukázal, že buňky HL-60 jsou méně citlivé k působení stříbrných NPs než jaterní buňky HepG2 (Avalos *et al.*, 2014). Buňky HL-60 pod mikroskopem vykazují typický kulovitý tvar (obrázek 2). Médium používané ke kultivaci je RPMI 1640 obohacené 10 % FBS a podmínky kultivace jsou 37 °C a 5 % CO₂ (Sun *et al.*, 2016).



Obrázek 2: Charakteristická morfologie buněčné linie HL-60: fázový kontrast, zvětšení 200x, měřítko = 100 μm.

Tato buněčná linie vykazuje neutrofilní promyelocytární morfologii. Buňky HL-60 indukované dimethylsulfoxidem (DMSO) nebo kyselinou retinovou jsou schopny se diferencovat na granulocyty. Ošetřením těchto buněk kyselinou máselnou, butyrátem sodným nebo 12-O-tetradekanoylforbol-13-acetátem se diferencují na eozinofily, monocyty a makrofágy (Barbasz *et al.*, 2021).

1.1.3 Buněčná linie MOLT-4

V případě buněčné linie MOLT-4 se jedná o buňky lymfoblastů typu T od pacienta s akutní lymfoblastickou leukémií. Tato buněčná linie se používá například pro testování cytotoxicity NMs na bázi titanu a zinku (Garcia-Diosa *et al.*, 2021-b; Xiaoshang *et al.*, 2021; Liu *et al.*,

2019). Ke kultivaci buněk je potřeba médium RPMI 1640 a 10 % FBS, dále se přidává 1% penicilin/streptomycin, optimální teplota je 37 °C a 5 % CO₂ (Xiaoshang *et al.*, 2020).

Leukemické buňky MOLT-4 se použily také na testování cytotoxicity biosyntetizovaných ZnO NPs z extraktu listů *Punica garantum* (Liu *et al.*, 2019).

1.1.4 Buněčná linie Raji

Buňky Raji jsou lidská B lymfoblastoidní buněčná linie, která pochází od pacienta s Burkittovým lymfomem. Tyto buňky mají na svém buněčném povrchu receptory pro složky komplementu C1q, C3b, C3bi a C3d, ale postrádají povrchové imunoglobuliny (Ig). Jejich buněčné povrchové Fc IgG receptory mají buď nízkou afinitu, nebo jen malý počet a neinterferují s radioimunoanalýzou. Imunitní komplexy obsahující složky komplementu se vážou na povrch Raji buněk a mohou být izolovány pro detekci (Frank *et al.*, 2014).

Tato buněčná linie je často používaná v experimentech zabývajících se toxicitou mezoporézních nanočástic oxidu křemičitého (Shahbazi *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2017).

1.2 Nanomateriály

Nanobiotechnologie je jednou z nejnovějších vznikajících oblastí vědy, která je na rozhraní mezi biologií a nanotechnologií, analyzuje a vytváří nové funkcionalizované nano-biosystémy. Díky charakteristickým fyzikálně-chemickým a biologickým vlastnostem NMs nachází nanotechnologie využití v různých oblastech (Jafari *et al.*, 2020).

V případě NMs se jedná o takové materiály, které mají alespoň jeden rozměr v rozsahu velikosti mezi jedním a stovkou nanometrů (nm). Tyto materiály zahrnují například již zmíněné NPs, nanofilmy a nanokompozity (Sayes *et al.*, 2009). Díky svým jedinečným vlastnostem závislým na velikosti mají NMs dopad na různé oblasti použití, od stavebního průmyslu přes produkty každodenního života až po aplikace v lékařství a zdravotnictví. NMs mohou být vyrobené například z oxidu křemičitého (SiO₂), TiO₂ a stříbra, dále sem patří také fullereny nebo uhlíkové nanotrubičky (Laux *et al.*, 2018).

1.2.1 Nanočástice a testování cytotoxicity

Nanočástice jsou komerčně vyráběné materiály ve velikosti 1-100 nm. Využití nacházejí jak v oblasti medicíny, tak i na poli elektroniky, biotechnologie a leteckého inženýrství (Bahadar *et al.*, 2016). Syntéza kovových NPs laditelných velikostí a tvarů v normální atmosféře stále zůstává důležitá a náročná. V posledních letech se intenzivně využívají přístupy k výrobě různých kovových nanočástic ve tvaru krystalu (Ranjana *et al.*, 2020).

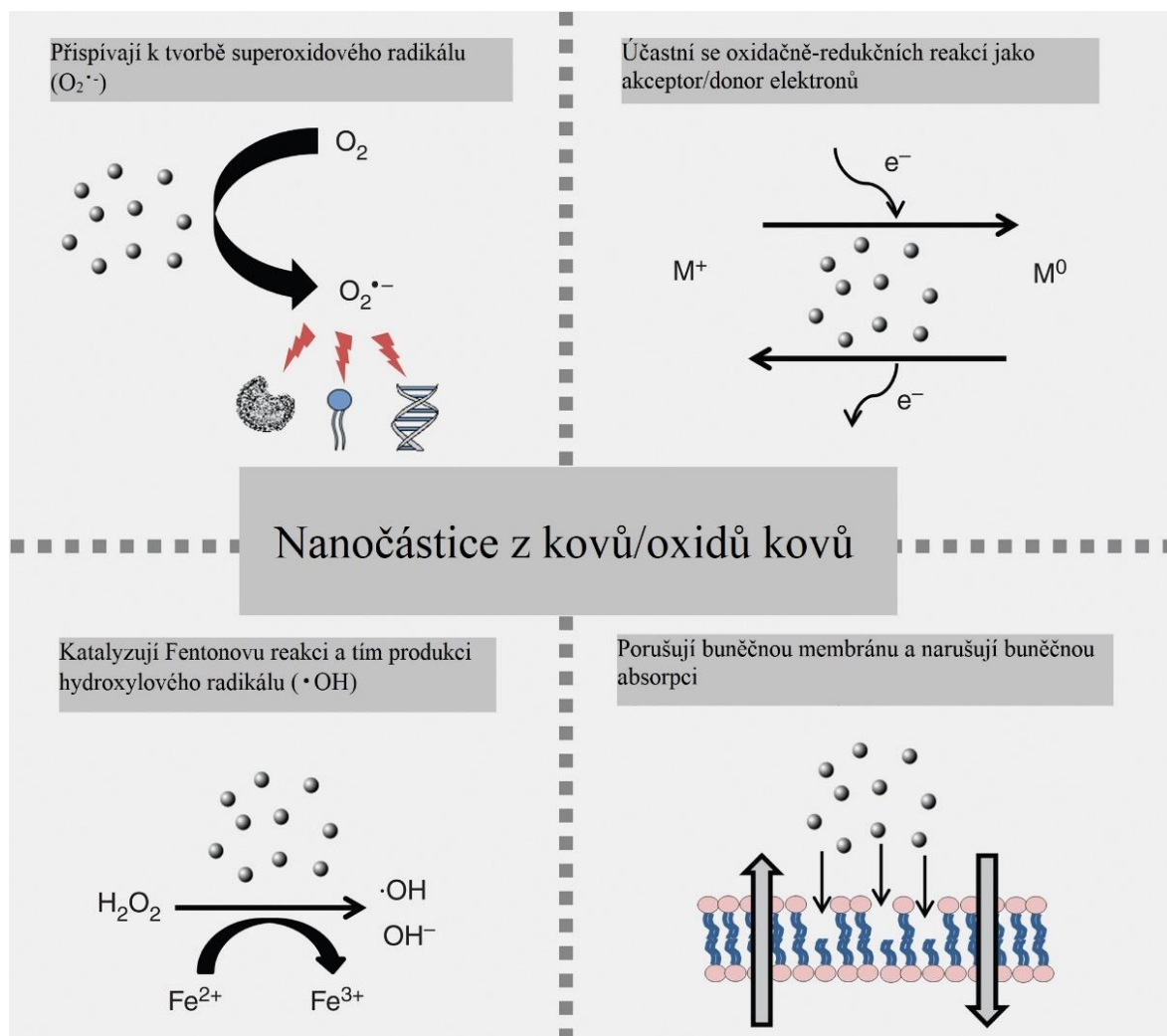
Zejména NPs oxidů kovů jsou důležitými průmyslovými materiály. Během výroby částic a pozdější manipulaci následnými uživateli může nastat vdechnutí částic. NPs vyrobené z TiO_2 , oxidu hlinitého (Al_2O_3) a oxidu ceričitého (CeO_2) vyvolaly snížení dechového objemu doprovázené snížením rychlosti vydechovaného průtoku (Larsen *et al.*, 2016). Obecně mají NMs potenciál v léčbě rakoviny. Ovšem jedna z hlavních hranic chemoterapie pomocí takovýchto materiálů zahrnuje jejich selhání při účinném rozlišení rakovinných buněk (Liu *et al.*, 2020).

S aplikací NPs se tedy pojí i jejich možná toxicita. Mezi vlastnosti NPs ovlivňující jejich toxicitu patří velikost, plocha povrchu, tvar, poměr stran, povrchový povlak, krystalická struktura, rozpouštění a aglomerace (Egbuna *et al.*, 2021; Wongrakpanich *et al.*, 2016). V experimentu, kde byly použity buňky Jurkat, bylo zjištěno, že NPs o velikosti 15 nm mohou ovlivnit tyto suspenzní buňky funkčně závislými způsoby. Vliv velikosti NPs na cytotoxicitu je způsoben hmotností nebo objemem částic a dalším cytotoxickým faktorem je rozpustnost částic (Matsui *et al.*, 2011). Již zmíněná velikost NPs hraje důležitou roli v cytotoxicitě. Bylo zjištěno, že NPs vyrobené z CuO o velikosti 24 nm vykazovaly výrazně vyšší cytotoxicitu než CuO NPs o velikosti 4 nm (Wongrakpanich *et al.*, 2016).

K hodnocení toxicity NPs *in vitro* se využívá několik metod. Tyto metody budou dále probrány detailněji. Jednou z metod je test proliferace používaný ke stanovení buněčného metabolismu hodnocením metabolicky aktivních buněk. Dále se využívá test apoptózy, což je jeden z hlavních markerů pozorovaných při hodnocení toxicity NPs *in vitro*. K hodnocení apoptózy se využívá kometový test, Annexin-V, označování koncových deoxynukleotidyltransferáz dUTP (TUNEL) a kontrola morfologických změn. Nedílnou součástí je také detekce nekrózy, ROS a reaktivních forem dusíku (RNS) (Kumar *et al.*, 2017). Obecně jsou ROS produkovány jako vedlejší produkty biochemických reakcí, což může být mitochondriální dýchání, enzymatický metabolismus cytochromu P450 a fagocytóza zprostředkovaná neutrofily (Tee *et al.*, 2016). Ve spojitosti s oxidy kovů jsou ROS generovány po styku těchto oxidů s buňkami, nebo se některé toxické kovové ionty uvolňují na povrchu NPs, což poté vede k toxicitě v imunitním systému (Madhubala *et al.*, 2019). Podle úrovně produkce ROS se určuje stupeň oxidačního stresu a bylo prokázáno, že nadprodukce ROS má důležitou úlohu v biotoxicitě NPs (Yu *et al.*, 2020; Tee *et al.*, 2016).

Oxidační stres je obecně považován za mechanismus, který je základem toxicity indukované NPs, a to zejména kvůli jejich vlastnosti generovat toxické radikály, účastnit

se redoxních reakcí, katalyzovat Fentonovu reakci a narušovat buněčnou absorpci (obrázek 3) (Wani et al., 2021; Tee et al., 2016).



Obrázek 3: Vlastnosti nanočástic kovů/oxidů kovů: Čtyři mechanismy účinku nanočástic kovů nebo oxidů kovů, které se podílejí na vzniku buněčného oxidačního stresu (Upraveno dle Tee et al., 2016).

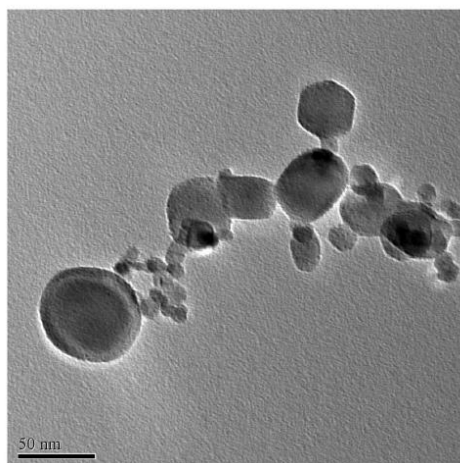
Pro lepší pochopení cytotoxicity NPs je také důležité zkoumat vliv inkubační teploty na buněčnou odpověď NPs (Shinto et al., 2020). Způsob, jakým jsou přidávány NPs do buněčné kultury, může mít významný účinek na to, co pozorujeme u buněčných interakcí (Moore et al., 2019).

Mezi materiály, které jsou využívány k výrobě NPs, patří titan, křemík, hliník, zlato, stříbro, měď a další (Larsen et al., 2016; Wongrakpanich et al., 2016; Wani et al., 2021; McNamara et al., 2016). Tato práce se dále bude věnovat zejména NPs připravených z titanu, křemíku a hliníku. K hodnocení cytotoxicity NPs se používají adherentní buněčné linie i suspenzní.

1.2.1.1 Nanočástice na bázi TiO₂

Nanočástice na bázi TiO₂ se řadí mezi nejvíce používané a vyráběné kovové NPs (*Wani et al., 2021*). Čím dál více se používají v biologických aplikacích, a to zejména díky jejich vysoké chemické stabilitě, fotokatalytické aktivitě, biokompatibilitě a nízké toxicitě. Některé potenciální biomedicínské aplikace TiO₂ NPs zahrnují fotodynamickou terapii (PDT) různých druhů rakoviny, dodávání léčiv a biosnímání. Existuje velmi málo zpráv o ošetření neadherentních rakovinných buněk těmito částicemi (*Garcia-Diosa et al., 2021-b*).

TiO₂ NPs jsou široce používány jako bílé pigmenty v různých průmyslových odvětvích. Nalézány jsou jak v potravinách a produktech denního použití (př. zubní pasty), tak i v ortopedických a zubních implantátech. Jejich tvar je zobrazen na obrázku 4 (*Sukwong et al., 2017; Fadheela et al., 2020*). TiO₂ byl dlouho považován za biologicky inertní kov, a proto byl používán v již zmíněných bílých pigmentech, opalovacích krémech a implantátech. Cytotoxicita TiO₂ částic byla označena jako závislá na velikosti. Inertní materiál se stane toxickým, pokud se například zvětší povrchová plocha materiálu nebo pokud se změní povrchová reaktivita, náboj a tvar. Některé zprávy naznačovaly, že buňky mohou být schopny pohltit takovéto malé částice (*Takaki et al., 2014*).



Obrázek 4: Snímek transmisní elektronové mikroskopie nanočástic oxidu titaničitého: Částice v rozmezí 35-56 nm, s průměrnou velikostí přibližně 51 nm (*Ghosh et al., 2013*).

Tyto částice způsobují poškození jater, ledvin, sleziny i krevních složek a mohou poškodit genetickou výbavu buněk. U lidí, kteří byli exponováni TiO₂ NPs se zvyšuje produkce peroxidu vodíku (H₂O₂), který indukuje oxidační poškození buněčných složek, mění buněčný cyklus, poškozují jaderné membrány a způsobuje apoptózu (*Wani et al., 2021*). Toxicita TiO₂ NPs, které byly extrahovány ze zubní pasty, byla hodnocena u buněčné linie Jurkat. Výsledky ukázaly, že TiO₂ NPs mají negativní vliv na inhibici růstu buněčné linie Jurkat (*Fadheela et al., 2020*).

Pokud jsou imunitní buňky vystaveny stimulu, mohou aktivovat různé signální dráhy, které indukují různé reakce, jako je proliferace, diferenciace, migrace, zánětlivé a imunitní reakce (*Simón-Vásquez et al., 2016*). Nepříznivý vliv TiO₂ NPs je zkoumán na imunitních buňkách, protože právě ty hrají důležitou roli v mechanismu obrany organismu. Hlavními imunitními buňkami v adaptivním imunitním systému jsou lymfocyty. K testování cytotoxicity TiO₂ NPs byly použity Jurkat buňky. V experimentu byly tyto buňky vystaveny různým koncentracím TiO₂ NPs (5, 25, 250 a 500 µg/mL) po dobu 24 hodin. Ve srovnání s neošetřenými buňkami byla životaschopnost buněk Jurkat ošetřených TiO₂ NPs nižší u koncentrací 25-500 µg/mL. Dále byla u Jurkat buněk pozorována zvýšená produkce ROS, a to u koncentrací 25-500 µg/mL. Předpokládá se, že produkce ROS souvisí se snížením životaschopnosti Jurkat buněk. Vysoká koncentrace TiO₂ NPs má tedy silný vliv na životaschopnost buněk a také na poškození deoxyribonukleové kyseliny (DNA) (*Sukwong et al., 2017*).

V jiném experimentu byla u Jurkat buněk vystavených působení TiO₂ NPs pozorována upregulace genu pro inhibitor cyklin-dependentní kinázy 1A (CDKN1A). Tento gen se podílí na zastavení G1 fáze buněčného cyklu, stejně jako gen pro protein z rodiny receptorů podobných oligomerizační doméně vázající nukleotid (NLR) inhibující apoptózu (NAIP) a gen pro enzym pracující jako ubiquitin ligáza (MDM2). Dále byla pozorována downregulace genů pro cytokiny IL-2 a IL-8 a genu pro chemokinový ligand 2 (*Simón-Vásquez et al., 2016*).

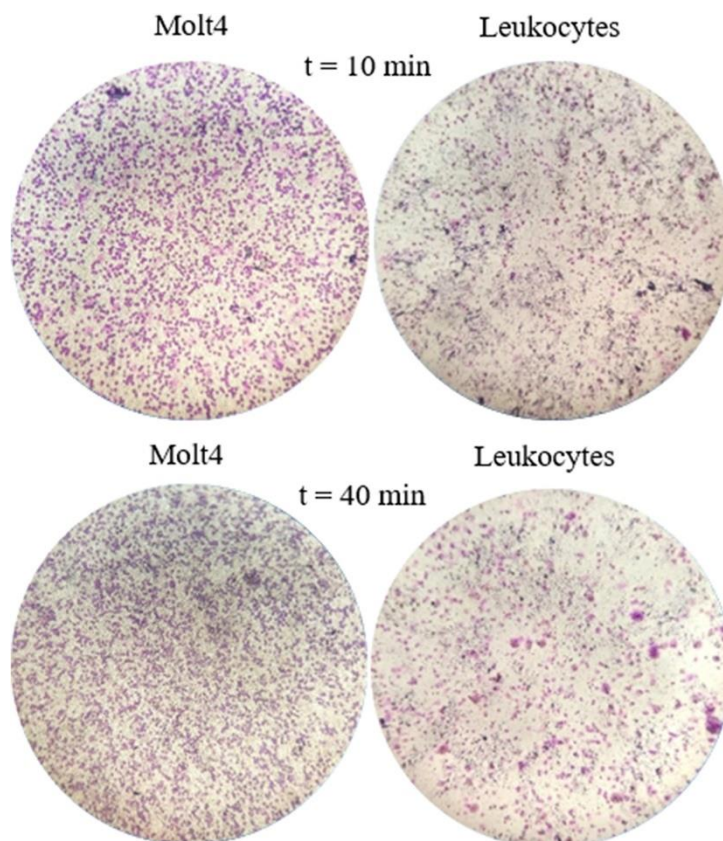
Larsen et al. ve své studii tvrdí, že po inhalaci TiO₂ NPs tyto částice nevyvolávají zánětlivou reakci. V experimentu nechali myši vdechovat tyto částice a následně zkoumali jejich účinek (*Larsen et al., 2016*). Na druhou stranu další studie uvádí, že po vdechnutí těchto částic dochází k retenci částic v plicích během inhalace a po ní. Určitá část inhalované dávky TiO₂ NPs byla přenesena do systémové cirkulace a dostala se tak do jater, ledvin a sleziny, kde byla následně detekovatelná hladina TiO₂ NPs (*Pujalté et al., 2017*).

Princip PDT spočívá v ozáření tkáně světlem vhodné vlnové délky. Samotná tkáň je předem fotosenzibilizovaná chemickou sloučeninou. Při rezonanční absorpci fotonů se aktivuje fotosenzibilizátor a produkuje velké množství volných radikálů a ROS, které napadají buněčné složky, a nakonec vedou k buněčné smrti. U PDT neexistuje riziko šíření rakovinných buněk do sousedních tkání nebo kumulativní toxicita vyvolaná léky. Tato terapie využívá TiO₂ NPs a jedná se o alternativní léčbu různých typů rakoviny (*Garcia-Diosa et al., 2021-b*). V poslední době se ukazuje, že zlepšení terapeutické účinnosti a snížení vedlejších účinků léků, které se používají k léčbě rakoviny, jsou hlavními příležitostmi ke zvýšení kvality/standardu života pacientů s rakovinou. Nevýhodou použití NMs v chemoterapii je jejich

neschopnost účinně diferencovat nádorové buňky. Cytotoxický účinek TiO₂ NPs proti nádorovým buňkám dosud nebyl zcela objasněn (*Xiaoshang et al., 2021*).

Metoda PDT se většinou spojuje s adherentními rakovinnými buňkami. Jen málo zpráv ukazuje aplikaci na neadherentní rakovinné buňky, jako jsou leukemické buňky, a to kvůli inherentním problémům souvisejícím se selektivním cílením a ozařováním neadherentních rakovinných buněk. Řešením by mohly být modifikované TiO₂ NPs, které vykazují pozoruhodnou selektivitu pro zachycení neadherentních rakovinných buněk bez dalších vazebných činidel, jako jsou aptamery nebo protilátky. V experimentu byla použita skleněná sklíčka potažená modifikovanými TiO₂ NPs a inkubovaná byla s buňkami MOLT-4. Adheze leukemických buněk na těchto površích je zvýšena, pokud má povrch vysokou drsnost a nízkou šikmost a špičatost. Výsledky experimentu ukazují, že adheze leukemických buněk na modifikované povlaky TiO₂ NPs je multifaktoriální proces, ve kterém hraje klíčovou roli drsnost povrchu, špičatost, šikmost a homogenita povlaku (*Garcia-Diosa et al., 2021-a*).

Bylo prokázáno, že TiO₂ NPs neindukují genetické poškození nebo mutace ve zdravých buňkách. UV záření používané v PDT s TiO₂ je bezpečné, tedy nezpůsobuje mutace ve zdravých buňkách. *Garcia-Diosa et al.* již ve své předešlé práci využili potažení skleněné desky právě TiO₂ NPs, ale v tomto experimentu porovnávali interakci povrchů s leukemickými a zdravými leukocyty. V tomto experimentu vědci opět použili buňky MOLT-4 a na porovnání měli zdravé leukocyty získané z periferní krve. Bylo zjištěno, že existuje velký rozdíl mezi počtem adherovaných leukemických buněk a adherovaných zdravých leukocytů na povrchu NMs. Na obrázku 5 je vidět, že i po krátké době (10 minut) je plocha NMs překryta buňkami MOLT-4, zatímco zdravé leukocyty jsou vidět v menším množství. Tento výsledek je důkazem selektivity povlaku TiO₂ NPs k leukemickým buňkám. Počet přichycených leukemických buněk ke skleněné desce potažené TiO₂ NPs je přibližně 141x větší než počet těchto buněk přichycených na holém skle, zatímco u zdravých leukocytů nebyla pozorována žádná preference přichycení. Leukemické buňky dále vykazovaly charakteristické struktury améboidního pohybu, zvýšení buněčné adheze pseudopodií a změny v buněčné membráně vzhledem k vychytávání TiO₂ NPs. Tato selektivní interakce mezi leukemickými buňkami a povlakem TiO₂ NPs má obrovský potenciál pro různé biomedicínské aplikace (*Garcia-Diosa et al., 2021-b*).



Obrázek 5: Porovnání adheze buněk MOLT-4 a zdravých leukocytů: Růst buněk na skleněné desce s povlakem nanočástic oxidu titaničitého po dobu 10 a 40 minut (*Garcia-Diosa et al., 2021-b*).

Více ekologickou metodou výroby TiO_2 NPs je využití extraktu listů z rostliny *Salvia Spinosa*. Bylo zjištěno, že životaschopnost buněk MOLT-4 je závislá na koncentraci TiO_2 NPs a na čase, což značí jejich potenciál pro rozvoj nových materiálů a technik pro léčbu dětské leukémie (*Xiaoshang et al., 2021*).

V experimentech zabývajících se cytotoxicitou TiO_2 NPs se kromě výše zmíněných Jurkat a MOLT-4 buněk používají také myší leukemické buňky L1210. Aby se zabránilo aglutinaci částic při počítání životaschopných buněk, byl povrch částic upraven kyselinou polyakrylovou. Tím se zajistí negativně nabitý povrch částic, což způsobí rozptýlení částic v kultivačním médiu v důsledku statické elektřiny. Při poruše integrity buněčné membrány uniká enzym laktátdehydrogenáza (LDH) do média, kde je možné detekovat jeho zvýšenou aktivitu. Výsledky testů ukázaly, že TiO_2 NPs potlačují proliferaci buněk, což vede k buněčné smrti. Byla pozorována i kondenzace jaderného chromatinu, která je typická pro buněčnou smrt, zejména apoptózu. Při inkubaci buněk L1210 s TiO_2 NPs byla pozorována fragmentace DNA. K objasnění, zda tyto částice indukují apoptózu, byla hodnocena aktivita kaspázy-3, což je proteáza, o které je známo, že se účastní apoptotické buněčné smrti. U buněk ošetřených

TiO₂ NPs byla detekována zvýšená aktivita kaspázy-3. Je zajímavé, že nano-polystyrénové částice, na rozdíl od TiO₂ NPs, neaktivují kaspázy-3 v buňkách. To naznačuje, že cytotoxicita NPs je závislá na materiálovém složení částic (Takaki et al, 2014).

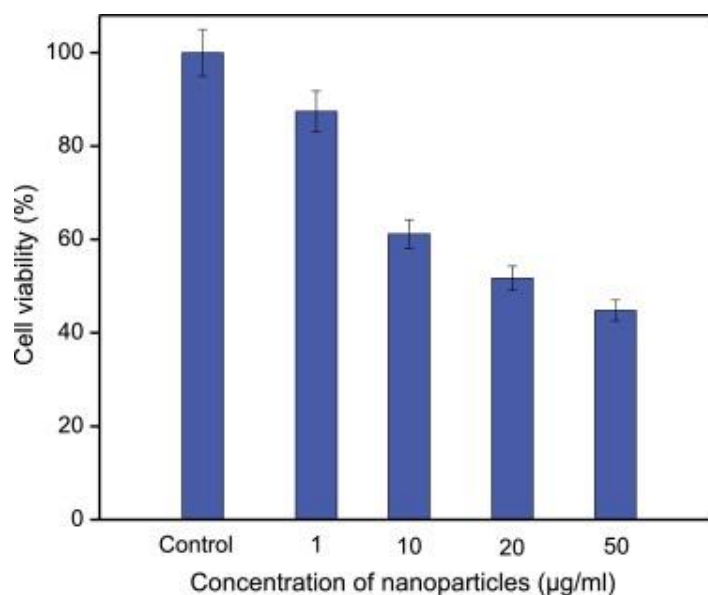
Uvolňování neutrofilních extracelulárních pastí (NET) je proces, při kterém aktivované neutrofilny vyvrhují struktury podobné pavučině složené z DNA, histonů a granulárních antimikrobiálních proteinů, které jsou navrženy k zachycení a zničení extracelulárních patogenů. Tato nová forma programované buněčné smrti se nazývá netóza a je relativně nedávným objevem v oblasti biologie neutrofilů. Přesto se již objevují důkazy, které ukazují, že uvolňování NET hraje roli v zánětu zprostředkovaném NMs. Tvorba NET buňkami HL-60 je náročnější na zkoumání kvůli jejich suspenzní povaze. Výsledky experimentu provedeného týmem Verdon et al. ukázaly, že TiO₂ NM neměl žádný významný dopad na metabolickou aktivitu primárních neutrofilů nebo HL-60 buněk a neindukoval prozánětlivé reakce s ohledem na sekreci cytokinů, respirační vzplanutí nebo uvolňování NET (Verdon et al., 2020).

In vitro testy genotoxicity detekují různé typy genetického poškození (např. poškození struktury chromozomu a poškození řetězce DNA) vyvolané testovanou sloučeninou. Genotoxicita vyvolaná TiO₂ NPs může být dvojího druhu: primární genotoxicita, která je v nepřítomnosti zánětu, a sekundární genotoxicita, která je způsobena tvorbou ROS během zánětu a jeho reakcí s DNA. Lidské lymfocyty periferní krve se rutinně používají jako vysoce citlivý indikátor pro chromozomální strukturní aberace indukované *in vitro* a *in vivo*. K určení genotoxicity TiO₂ NPs se mohou použít testy chromozomové aberace nebo kometový test. Bylo zjištěno, že TiO₂ NPs zhasly fluorescenci DNA a mají silnou vazebnou kapacitu s DNA (Patel et al., 2017).

Genotoxicita TiO₂ NPs byla hodnocena pomocí PBMC a TK-6 buněk, což je lidská lymfoblastická linie běžně používaná k hodnocení genotoxicity. Disperze velkých aglomerátů TiO₂ NPs indukovala nízké, ale signifikantní oxidační poškození DNA při nejvyšší koncentraci TiO₂ NPs v TK-6 buňkách, zatímco disperze aglomerátu TiO₂ NPs menší než 200 nm neindukovala genotoxicitu. Tyto výsledky ukazují, že použitá disperzní metoda může ovlivnit výsledky studií toxicity (Kazimirova et al., 2019). Výsledky ukazují, že TiO₂ NPs mají tendenci více aglomerovat ve vodě než v RPMI médiu pro kultivaci buněk. Sérové proteiny přítomné v médiu pomáhají stabilizovat NPs a zabraňují jejich aglomeraci v kultivačním médiu. Tato tendence aglomerovat je zapříčiněna van der Waalsovými silami (Patel et al., 2017). Genotoxické účinky TiO₂ NPs na buňky TK-6 závisí na tom, jak a v jakém médiu se připravuje zásobní suspenze TiO₂ NPs. Byly zaznamenány kontroverzní výsledky genotoxicity týkající se TiO₂ NPs. Obecně platí, že *in vitro* systémy pro posouzení genotoxicity těchto NPs generují

více pozitivní výsledky než *in vivo* systémy. Testy DNA a poškození chromozomů přinesly více pozitivních výsledků než testy genové mutace. Právě shoda mezi *in vitro* a *in vivo* je kritickým bodem při hodnocení bezpečnosti NMs (Kazimirova et al., 2019).

Životaschopnost buněk THP-1 (linie lidských monocytních leukemických buněk) po inkubaci s TiO₂ NPs byla zkoumána formazanovým testem methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT). Činidlo MTT je buněčnými dehydrogenázami redukováno na purpurově zbarvený formazan, který je rozpustný ve vodě. Při reakci dochází ke změně absorbance, kterou lze detekovat spektrofotometricky. K reakci dochází pouze u metabolicky aktivních buněk. Z obrázku 6 lze odvodit, že životaschopnost buněk THP-1 se významně zvyšuje se snižujícím se množstvím expozice TiO₂ NPs. Experiment ukázal, že nízké koncentrace TiO₂ NPs vedou k imunomodulačnímu účinku aktivací imunitní odpovědi v buňkách THP-1 prostřednictvím cytokinů IL-6 a IL-10 (Nga et al., 2020; Madhubala et al., 2019).



Obrázek 6: Cytotoxická analýza nanočástic oxidu titaničitého s THP-1 buňkami: Životaschopnost buněk byla hodnocena v závislosti na různých koncentracích nanočástic s použitím methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT) testem (Madhubala et al., 2019).

U toxicity indukované TiO₂ NPs je možné zkoumat vliv antioxidantu koenzymu Q10. Koenzym Q10 (CoQ10) je silný antioxidant, který zabraňuje oxidaci membrán buněk a buněčných komponent vylučováním volných radikálů. Tento antioxidant se nachází i ve vnitřní mitochondriální membráně, kde se účastní procesu elektronového transportního řetězce. Exogenní podávání CoQ10 se ukázalo jako přínosné u léčby různých onemocnění, jako je kardiovaskulární onemocnění, rakovina a také proti neurodegenerativním poruchám včetně Parkinsonovy choroby (Li et al., 2016-a; Wani et al., 2021). V experimentu, kde se použily lidské erytrocyty (RBC) a izolované lymfocyty, se ukázalo, že maximální toxicita TiO₂ NPs

byla při 50 $\mu\text{g/mL}$. Bylo pozorováno přibližně sedminásobné zvýšení hemolýzy v erytrocytech ošetřených 50 $\mu\text{g/mL}$ TiO_2 NPs ve srovnání s neošetřenými kontrolními buňkami. V přítomnosti CoQ10 se ale hemolýza drasticky snížila směrem ke kontrolním hodnotám. Antioxidant CoQ10 u ošetřených buněk vystavených působením TiO_2 NPs způsobil také útlum LDH aktivity, zvýšení ATP-ázové aktivity, snížení množství H_2O_2 a malondialdehydu (MDA), zvýšení katalázové aktivity, zvýšení aktivity superoxiddismutázy (SOD), či zvýšení redukovaného glutathionu (GSH) oproti buňkám inkubovaných pouze s TiO_2 NPs a bez ošetření CoQ10. Z tohoto vyplývá, že CoQ10 má schopnost snižovat hemolýzu, což je způsobeno jeho antioxidantními vlastnostmi. Z těchto výsledků lze soudit, že antioxidant CoQ10 se zdá být slibnou chemoprotektivní látkou, která může nabídnout ochranu po expozici TiO_2 (Wani et al., 2021).

Dalším antioxidantem, který může snížit hemolýzu, pokud je přidán k buňkám, které jsou vystaveny působení TiO_2 NPs, je thymochinon. Takovéto účinky měl ale jen při menších dávkách, při těch vyšších prokazoval pro-oxidační aktivitu a indukoval oxidační stres a poškození DNA (Wani et al., 2021-b).

Monocytární linie U937 se používá ke studiu toxicity TiO_2 NPs, protože odpověď buněk U937 na působení NMs může připomínat lokální imunitní odpověď. TiO_2 indukuje v buňkách U937 změny charakteristické pro apoptózu, tj. fragmentace DNA, zmenšení velikosti buněk a snížení propustnosti membrány pro propidium jodid (Vamanu et al., 2008).

Ke studiu cytotoxicity TiO_2 NPs byly použity také lymfocyty periferní krve. K hodnocení se využil mitogenní a blastogenní index. Výsledky ukázaly, že tyto částice mají významné cytotoxické účinky na lymfocyty periferní krve. Se zvyšující se koncentrací TiO_2 NPs se snižovaly oba indexy, zatímco celková chromozomální aberace byla zvýšená (Haleem et al., 2019).

Chemické složení a topografie povrchu mají významný vliv na chování buněk zajišťujících regeneraci orgánů a tkání. Důležité je studium vztahu mezi povrchovou topografií a elektrostatickým potenciálem povlaků TiO_2 tvořeného mikroobloukovou oxidací a fyzikálních mechanismů ovlivňujících vliv povrchu povlaku na chování imunokompetentních nádorových buněk. Se zvyšující se drsností oxidovaného povlaku se snižovala životaschopnost Jurkat buněk. Toto snížení životaschopnosti je způsobeno přímou interakcí buněk s uvolňováním oxidovaného povlaku spíše než s produkty jeho bioresorpce. Buněčná smrt, která byla pozorována v tomto experimentu, nebyla zprostředkována NPs vyrobenými z titanu, které se mohou uvolnit při biodegradaci titanových implantátů (Khlusov et al., 2016).

Krátká expozice TiO₂ NPs u buněk Jurkat nevede ke změnám v genové expresi *in vitro*, což podporuje názor, že TiO₂ není sám o sobě toxický (Tuomela *et al.*, 2013). Experiment na RBC odhalil hemolytické vlastnosti TiO₂ NPs charakterizované sférocytózou a echinocytózou. Sférocytóza byla patrná při nižších koncentracích TiO₂ NPs, zatímco tvorba echinocytů, které se vyznačují ostnatými výběžky z povrchu erytrocytů, byla pozorována při vyšší koncentraci těchto částic. U lidských lymfocytů byla po expozici těmito částicím pozorována apoptóza (Ghosh *et al.*, 2013).

Experiment, kde nebylo v kultivačním médiu použito sérum, tzv. serum-free medium, byl proveden na lidských PBMC. Z fragmentace DNA pozorované na agarózovém gelu bylo zjištěno, že TiO₂ NPs v koncentracích větší než 25 µg/mL mohou indukovat apoptózu. Ve vysokých koncentracích by mohla být namísto apoptózy detekována nekróza (Kongseng *et al.*, 2016). Na lidských PBMC vystavených působení TiO₂ NPs byly detekovány DNA řetězcové zlomy a oxidované DNA puriny, a to pomocí alkalické verze kometového testu modifikovaného specifickým enzymem formamidopyrimidin DNA glykosylázou. Vzorky byly zkoumány pomocí fluorescenčního mikroskopu. Poškození DNA bylo vyjádřeno jako % ocasní DNA, které odpovídalo DNA řetězcovým zlomům a změněným purinům (Kazimirova *et al.*, 2019).

Titanové ionty se často uvolňují ze zubních implantátů do ústní dutiny. V ústech je snížena korozní odolnost titanu, a to za podmínek nízkého rozpuštěného kyslíku, zejména v přítomnosti malého množství fluoridu. Zánětlivé buňky tvoří několik proteinů, včetně proteinů z rodiny receptorů podobných oligomerizační doméně vázající nukleotid, například NLR, protein 1 nebo protein 3 z rodiny NLR (NLRP1, NLRP3). NLRP3, dříve nazývaný Nalp3 nebo kryopyrin, je nejcharakterističtější člen rodiny NLR tvořící zánět. Jedny z nejznámějších meziproductů aktivace zánětu NLRP3 jsou ROS. NLRP1 a NLRP3 jsou z velké části exprimovány v T buňkách a uvádí se, že lidské CD4⁺ T buňky produkují IL-1β způsobem závislým na NLRP3. Buňky Jurkat byly rozděleny do skupin, část buněk byla ošetřena titanovými ionty nebo fytohemaglutininem. Expres NLRP3 v Jurkat buňkách se zvýšila nezávisle na léčbě fytohemaglutininem. Je zajímavé, že zvýšená exprese NLRP3 zprostředkovaná titanovými ionty nemusí být závislá na dávce (Li *et al.*, 2020).

1.2.1.2 Nanočástice na bázi SiO₂

Od počátku roku 2000 jsou NPs na bázi SiO₂ stále častěji zkoumány pro systémy dodávání léčiv a biomedicínské zobrazování a terapii (*Shinto et al., 2020*). Křemík je často používán v průmyslu, zatímco jeho oxidované formy, např. SiO₂, jsou využívány pro biomedicínské aplikace (*Chen et al., 2018*). Právě SiO₂ je jedním z nejvíce studovaných materiálů, díky jeho široké škále použití. Je také rozsáhle zkoumán toxikology kvůli jeho patogenitě, která může vést k rozvoji silikózy, rakoviny plic a autoimunitních onemocnění u lidí vystavených prachu dýchacího krystalického křemene (*Pavan et al., 2013*).

Existují dvě základní formy SiO₂, tj. krystalický a amorfní. Hlavními mechanismy toxicity SiO₂ NPs jsou prozánětlivé reakce, oxidační stres, autofagie a další (*Chen et al., 2018*). Byla popsána aglomerace SiO₂ NPs. Po expozici těchto částic na RBC byla pozorována transformace z diskocytů na sférocyty (*Kozelskaya et al., 2016*).

Bezpečnost NPs na bázi SiO₂ jako nosičů léků a zobrazovacích činidel zůstává ale kontroverzní, protože dosud neexistují validované a akceptované nano-specifické testy, které by předpovídaly potenciální nepříznivý dopad NPs na lidské tělo (*Shinto et al., 2020*). Ve vysoké dávce a zároveň v krátkém časovém úseku způsobují SiO₂ NPs prasknutí buněčné membrány RBC a makrofágů. Hemolytická aktivita SiO₂ částic je již známá. Membrána RBC představuje jednoduchý model biologických membrán, které jsou důležitými cíli SiO₂. Hemolýza je důsledkem několika fyzikálních a chemických interakcí. Mezi těmito interakcemi hraje klíčovou roli povrchová distribuce různě kyselých silanolů a siloxanů, což může vést ke vzniku vzorů odpovídajících membráně RBC prostřednictvím vzájemné vodíkové vazby a elektrostatických interakcí (*Pavan et al., 2013*).

Buňky Jurkat spolu s králičími erytrocyty a maligními melanocyty byly vystaveny bezsérovému médiu obsahujícímu NPs amorfního SiO₂ o různých průměrech a při různých teplotách (4, 15, 26 a 37 °C). V experimentu byl zkoumán především vliv teploty na lýzu membrány vyvolanou SiO₂. Membranolýtická schopnost křemičitých NPs souvisí s povrchovou hustotou a distribucí záporně nabitých silanolových (Si-OH) skupin, které jsou přímo přístupné buněčné membráně. Jurkat buňky mají schopnost pohltnout endocytózou NPs. Tato schopnost je výrazně inhibována inkubací při nízké teplotě. Při nízké teplotě přilne holý povrch křemičitých NPs na extracelulární části membránových proteinů a buněčná membrána se ani po kontaktu s NPs téměř nedeformuje. Naopak při vysoké teplotě je buněčná membrána výrazně deformována (*Shinto et al., 2020*).

Membranolýza indukovaná SiO₂ se dá ovlivnit interfaciálními sérovými proteiny. K experimentu byly využity mimo jiné také RBC a Jurkat buňky. Membranolýza může být

potlačena přidáním 1-2 % FBS do kultivačního média, množství adheze SiO₂ NPs potaženého FBS na buněčný povrch zůstává srovnatelné s množstvím holých SiO₂ NPs. Ačkoli holý a FBS-potažený silikový povrch mají stejnou adhezní sílu k buněčné membráně, používají odlišné mechanismy. Holý silikový povrch využívá nespecifické vazby na buněčnou membránu, zatímco FBS-potažený silikový povrch vykazuje specifickou vazbu mezi některými na něm adsorbovanými proteiny a membránovými receptory (*Shinto et al., 2019*).

Účinky SiO₂ NPs se zkoumají také na PBMC. V experimentu bylo zjištěno, že menší NPs o velikosti 10 nm byly více cytotoxické a vyvolávaly větší oxidační stres než větší NPs o velikosti 100 nm. Bylo pozorováno snížení hladiny GSH, zvýšená tvorba ROS a indukce pro-zánětlivých cytokinů (*Mendoza et al., 2014*).

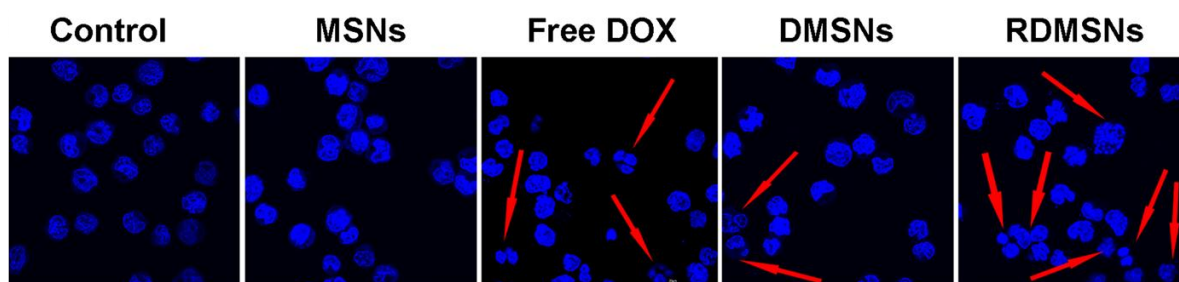
Vrozené imunitní buňky, jako jsou makrofágy, dendritické buňky a monocyty internalizují SiO₂ NPs a produkují prozánětlivé cytokiny IL-1 β a IL-18. Tento proces zahrnuje cytosolický multiproteinový komplex, který se nazývá inflammasom. Ten hraje hlavní roli právě ve vrozené imunitě. NLRP3 inflammasom je jedním z nejlépe charakterizovaných inflammasomů a obsahuje protein NLRP3. Inflammasom NLRP3 reguluje aktivaci kaspázy-1 a zrání IL-1 β a IL-18. Cílem experimentu, kde byly použity SiO₂ NPs na lidských primárních neutrofilech a PBMC, bylo vyhodnotit imunomodulační účinek 12nm a 200nm SiO₂ NPs na expresi prozánětlivých cytokinů a složky zánětu NLRP3. Výsledky experimentu dokazují, že produkce IL-1 β je zprostředkována prostřednictvím inflammasomu NLRP3, 200nm i 12nm SiO₂ NPs vyvolávají mírný zánět. SiO₂ NPs indukují produkci prozánětlivých cytokinů způsobem závislým na dávce (*Sutterwala et al., 2014; Gómez et al., 2017*).

Porézní křemíkové NPs poškozují DNA. U buněk Jurkat vystavených působení porézních křemíkových NPs bylo pozorováno znatelné zvýšení uvolňování RNS i při nízkých koncentracích NPs, zatímco u buněk Raji nebylo zjištěno žádné významné zvýšení. Produkce RNS tedy závisí na buněčném typu. Zvýšená produkce RNS může mimo jiné vyvolat prozánětlivé reakce a také se reverzibilně vázat na mitochondriální cytochrom-c oxidázu, což vede k inhibici dýchání. Toxicita porézních křemíkových NPs je závislá převážně na povrchové chemii a náboji. Cytotoxicita těchto NPs je ovlivněna více povrchovým nábojem NPs než jejich povrchovými vlastnostmi, tzn. hydrofilitou nebo hydrofobicitou (*Shahbazi et al., 2013*).

Již zmíněná pórovitost má zásadní vliv na produkci ROS. Mezoporézní SiO₂ NPs vykazují menší toxicitu než neporézní SiO₂ NPs v důsledku sníženého množství volných radikálů generovaných na rozhraní pevná látka-kapalina (*Lehman et al., 2016*). Mezoporézní SiO₂ NPs přitahují v poslední době velkou pozornost díky svým příznivým vlastnostem, včetně dobré

kompatibility, vysoké stability, laditelného průměru pórů, jedinečné porézní struktury, velké zatěžovací kapacity a snadné funkcionalizace povrchu. Tyto částice se mohou použít jako nosiče léků (Zhou *et al.*, 2017).

Mezoporézní SiO₂ NPs mohou spouštět uvolňování nabitého léku v reakci na vnější nebo vnitřní podněty, jako je teplota, světlo, redoxní reakce, enzymy, hodnota pH nebo biomolekuly. Povrch mezoporézních SiO₂ NPs byl modifikován karboxylovými skupinami, následně byl přidán doxorubicin, který difundoval do mezoporézních kanálů s karboxylovými skupinami. K testu buněčné životaschopnosti byly využity buňky Raji a Jurkat. Bylo zjištěno, že u buněk Raji, inkubovaných s mezoporézními SiO₂ NPs naplněnými doxorubicinem a zároveň konjugovanými s rituximabem, byla pozorována vyšší pozdní apoptóza nebo nekróza než u buněk Raji inkubovaných s mezoporézními SiO₂ NPs naplněnými doxorubicinem a volným doxorubicinem. Tento systém cíleného dodávání léčiv by mohl indukovat apoptózu lymfomových B buněk. Jak je vidět na obrázku 7, buňky Raji, které byly ošetřeny mezoporézními SiO₂ NPs naplněnými doxorubicinem a konjugované s rituximabem, vykazovaly nejvýrazněji nepravidelnou morfologii buněčných jader se smršťovacími rysy ve srovnání s jinými skupinami. Experiment ukázal, že v kyselém prostředí o pH 5 se může uvolnit více doxorubicinu než v neutrálním prostředí o pH 7,4. Dále vědci zjistili, že mezoporézní SiO₂ NPs naplněné doxorubicinem a konjugované s rituximabem vykazovaly cílenou akumulaci a zlepšily cytotoxické účinky na CD20 pozitivních lymfomových B buňkách (Zhou *et al.*, 2017).



Obrázek 7: Charakterizace apoptózy buněk Raji *in vitro*: Morfologická charakterizace jader buněk Raji po různém ošetření po dobu 24 hodin při 37 °C, zvětšení 1000x, barvení DAPI; Control - kontrola, MSNs - mezoporézní nanočástice oxidu křemičitého, free DOX - volný doxorubicin, DMSNs - mezoporézní nanočástice oxidu křemičitého naplněné doxorubicinem, RDMSNs - mezoporézní nanočástice oxidu křemičitého naplněné doxorubicinem a konjugované s rituximabem; červené šipky ukazují na charakteristické variace jádra (Zhou *et al.*, 2017).

1.2.1.3 Nanočástice na bázi Al₂O₃

Charakteristickou vlastností Al₂O₃ NPs je jejich diskovitý tvar. Tyto NPs jsou méně náchylné k aglomeraci ve srovnání s jinými nano-prášky, ale jejich velikosti jsou různé (Kozelskaya et al., 2016).

Využití Al₂O₃ jako potahovacího činidla se využívá u magnetických NPs. Jurkat buňky po působení Al₂O₃ exprimovaly některé antiapoptotické geny a cytokiny IL-2 a IL-8, dále byly upregulovány gen CCAAT/enhancer-vazebný protein beta (CEBPB), tkáňový faktor účastnící se zánětu a imunitní odpovědi, kódující inhibitor proteinu p53 a gen pro syntázu mastných kyselin a gen pro protein 1 vázající retinol (RBP1), které souvisejí s metabolismem lipidů a homeostázou cholesterolu (Simón-Vásquez et al., 2016).

Ke studiu toxicity Al₂O₃ NPs se používají i RBC. Kladně nabitě Al₂O₃ NPs vyvolaly strukturální změny v lipidové dvojvrstvě RBC již při koncentraci 0,05 µg/mL. Po expozici Al₂O₃ NPs ztrácejí RBC svůj bikonkávní tvar a transformují se na echinocyty (Kozelskaya et al., 2016).

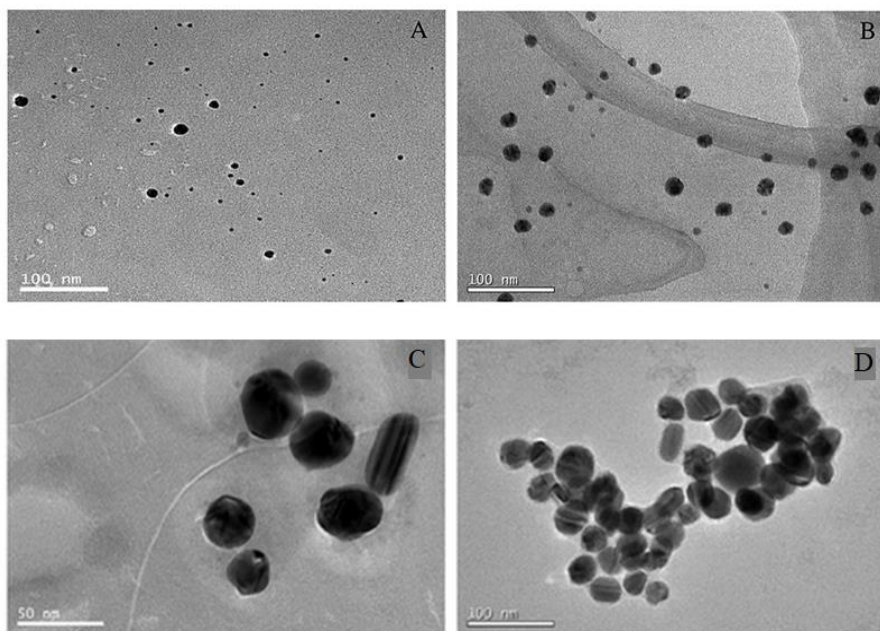
Nano-strukturovaný Al₂O₃ je materiál s insekticidními vlastnostmi. Na lidských lymfocytech z periferní krve byla zkoumána cytotoxicita a genotoxicita tohoto materiálu. Experiment ukázal, že nano-strukturovaný Al₂O₃ vykazoval pouze nízkou cytotoxicitu u lidských lymfocytů. Po expozici tohoto materiálu nebyl ovlivněn genom, s výjimkou případu nabitých částic nano-strukturovaného Al₂O₃, které zvýšily migraci DNA. Autoři dodávají, že tato testovaná sloučenina by mohla být bezpečná pro lidské zdraví a životní prostředí (Vilchez-Aruani et al., 2020).

1.2.1.4 Nanočástice na bázi stříbra

Nanočástice stříbra (Ag NPs) jsou široce rozšířené NPs, které se uplatňují v různých odvětvích vědy a průmyslu a díky svým antibakteriálním vlastnostem se nacházejí i v předmětech každodenního používání (Kang et al., 2012; Barbasz et al., 2017). Fagocytóza Ag NPs stimuluje zánětlivou signalizaci prostřednictvím tvorby ROS v buňkách. Aktivované buňky indukují sekreci prozánětlivých cytokinů a dalších enzymů ze skupiny cysteinových proteáz, označovaných jako kaspázy (Barbasz et al., 2021).

Vhodným modelem ke studiu cytotoxicity Ag NPs jsou buňky histiocytárního lymfomu U-937 a HL-60. Bylo zjištěno, že buňky U-937 jsou odolnější vůči působení kladně nabitých NPs než buňky HL-60. Zároveň nejvyšší toxicitu vůči nádorovým buněčným liniím vykazovaly negativně nabitě Ag NPs, které byly získány s použitím borohydridu sodného a vyznačují se vysokou náchylností k rozpouštění (Barbasz et al., 2017).

Buňky HL-60 byly použity v experimentu, kde se zkoumaly účinky různých velikostí Ag NPs. Menší Ag NPs o velikosti 4,7 nm byly toxicitější než částice o velikosti 42 nm. Velikost a tvar částic jsou ukázány na obrázku 8. Obě velikosti (4,7 nm a 42 nm) částic byly přibližně kulovitého tvaru a částice byly dobře rozptýlené. Po inkubaci v bezbuněčném kultivačním médiu tvořily Ag NPs o velikosti 42 nm aglomeráty. K zabránění cytotoxicitě indukované těmito částicemi se dá účinně zabránit ošetřením NPs N-acetyl-L-cysteinem. Oxidační stres je tedy primárně zodpovědný za cytotoxicitu Ag NPs (Avalos et al., 2014).



Obrázek 8: Porovnání stříbrných nanočástic o různých velikostech: Snímky z transmisního elektronového mikroskopu; A - nanočástice stříbra o velikosti 4,7 nm ve vodném roztoku; B - nanočástice stříbra o velikosti 4,7 nm v bezbuněčném kultivačním médiu po 24 hodinách inkubace; C - stříbrné nanočástice o velikosti 42 nm ve vodném roztoku; D - stříbrné nanočástice o velikosti 42 nm v bezbuněčném kultivačním médiu po 24 hodinách kultivace (Upraveno dle Avalos et al., 2014).

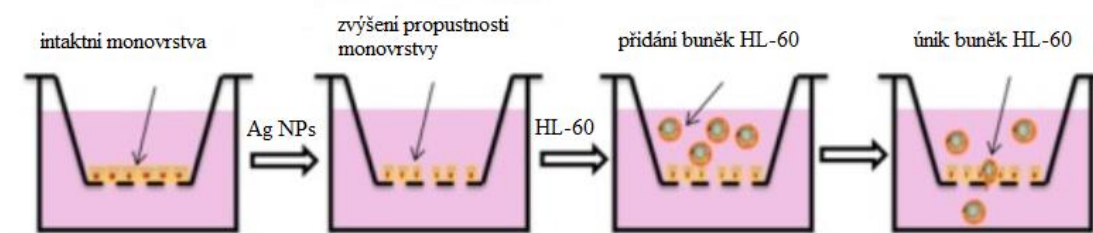
V jiném experimentu vědci zkoumali účinek Ag NPs na produkci cytokinů prostřednictvím dráhy mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) v leukemických buněčných liniích Jurkat a U-937. Působení těchto částic mělo za následek snížení proliferace buněk Jurkat a U-937. Oba buněčné linie reagovaly na působení Ag NPs produkcí cytokinů (Parnsamut et al., 2014).

Přidání čistého antioxidantu k suspenzi Ag NPs ovlivňuje jejich toxicitu. Takovým antioxidantem je kyselina askorbová a kyselina gallová. Ošetřené Ag NPs kyselinou gallovou vykazovaly větší toxicitu u buněk HL-60 a U-937, než Ag NPs ošetřené kyselinou askorbovou. Toxicita Ag NPs ošetřených kyselinou gallovou se projevila silným snížením mitochondriální aktivity a indukcí sekrece IL-6, TNF- α a kaspázy-9. Ag NPs ošetřené kyselinou askorbovou vykazovaly o něco menší toxicitu než Ag NPs ošetřené kyselinou gallovou. Nicméně bylo

zjištěno, že přidání kyseliny askorbové nebo kyseliny gallové k Ag NPs ovlivnilo toxicitu těchto částic (*Barbasz et al., 2021*).

Jak již bylo zmíněno, mechanismem toxicity Ag NPs je oxidační stres. Je možné studovat signální mechanismus, který je zodpovědný za regulaci oxidačního stresu se zaměřením na kaskády MAPK, extracelulární signál regulující kinázu, p38 a c-Jun-N-terminální kinázu (JNK) a redox-senzitivní transkripční faktory, jako je např. nukleární faktor-kappaB (NF- κ B) a s nukleárním faktorem-E2-související faktor 2 (Nrf-2). Jurkat buňky byly v experimentu vystaveny působení Ag NPs a Ag iontům. Test životaschopnosti buněk odhalil, že Jurkat buňky vykazovaly vyšší citlivost na Ag NPs než u expozice Ag iontům. Během časného období expozice byly hladiny buněčných ROS podobné u buněk inkubovaných s Ag NPs i Ag ionty. Nicméně během pozdního období expozice byly detekovány vyšší hladiny buněčných ROS u buněk inkubovaných s Ag NPs. Bylo zjištěno, že oxidační stres byl nepřímo zapojen prostřednictvím p38 MAPK skrze signální dráhy Nrf-2 a NF- κ B a způsobil poškození DNA (*Eom et al., 2010*). Oxidativní proteiny pro opravu DNA v kombinaci s p38 MAPK/PMK-1 působí proti toxicitě vyvolané Ag NPs. Bylo zjištěno, že cesta p38 MAPK pravděpodobně chrání buňky pouze před vnějšími vlivy, tj. Ag NPs, ale ne před poškozením vyvolaným endogenními faktory (*Chatterjee et al., 2014*).

Expozice Ag NPs v nízké dávce vede k extravazaci monocytů HL-60 přes endoteliální membránu (obrázek 9), což naznačuje, že nízké dávky a zároveň krátkodobá expozice byly potenciálními rizikovými faktory pro aterosklerózu. Expozice samotných Ag iontů nemůže vyvolat stejné poškození. Ag ionty uvolněné z Ag NPs nebyly tedy hlavním faktorem při poškození integrity endoteliální bariéry. Výsledky experimentu ukázaly, že nedošlo k žádnému zjevnému zvýšení intracelulární tvorby ROS a apoptózy po nízkých dávkách a krátkodobé expozici Ag NPs, což naznačuje, že permeabilita endotelu, vyvolaná Ag NPs, a extravazace leukocytů byla také nezávislá na oxidačním stresu a apoptóze (*Sun et al., 2016*).



Obrázek 9: Permeabilita endoteliální monovrstvy indukovaná stříbrnými nanočásticemi: Buňky HL-60 unikají z endoteliální monovrstvy po expozici stříbrnými nanočásticemi po 1 hodině (Upraveno dle *Sun et al., 2016*).

Expozice Ag NPs způsobila poškození DNA zprostředkované oxidačním stresem v Jurkat buňkách ovlivněním DNA glykosyláz. Toto zjištění vrhá světlo na potenciál Ag NPs způsobovat karcinogenezi (*Chatterjee et al., 2014*). Exprese syncitinu-1 v leukemických buňkách, konkrétně u MOLT-4 a Jurkat buněk je indukována Ag NPs. Je známo, že exprese syncitinu-1 zvyšuje genetickou nestabilitu a hraje roli v neurodegenerativních onemocněních. Umlčení syncitinu-1 v Jurkat buňkách indukuje výrazný pokles rychlosti růstu těchto buněk (*Alqahtani et al., 2016*).

K porozumění mechanismu různé citlivosti Jurkat buněk na Ag NPs a Ag ionty byly provedeny testy messengerové ribonukleové kyseliny (mRNA) microarray a mikroRNA (miRNA) microarray. Důležitým regulátorem genové exprese a translace proteinů je miRNA. Bylo zjištěno, že více odlišně exprimovaných genů a odlišně exprimovaných miRNA bylo indukováno Ag NPs než samotnými Ag ionty. Výsledky také naznačují potenciální roli miR-504, miR-33 a miR-302 v poškození DNA a apoptóze vyvolané Ag NPs. Exprese miR-32 a miR-622 může také poskytnout vodítko k vysvětlení rozdílné toxicity mezi Ag NPs a Ag ionty v Jurkat buňkách. Celkové výsledky tedy naznačují, že epigenetický mechanismus se podílí na toxicitě Ag NPs a Ag iontů v Jurkat buňkách (*Eom et al., 2014*).

1.2.1.5 Nanočástice na bázi ZnO

Nanočástice oxidu zinečnatého (ZnO NPs) mají vynikající schopnost absorbovat UV, čehož se využívá v UV ochraně v opalovacích krémech a dále se ZnO používá jako antibakteriální nebo protinádorové činidlo (*Smijs et al., 2011; Simón-Vásquez et al., 2016*). Tyto částice se mohou do těla dostat požitím, vdechováním nebo pronikáním kůží, tudíž jejich setkání s imunitními buňkami je nevyhnutelné, a proto se studie cytotoxicity zaměřují na buňky imunitního systému (*Czyżowska et al., 2021*). V jednom experimentu byly ZnO NPs testovány s buňkami HL-60 a zdravými lymfocyty a bylo zjištěno, že rakovinné buňky jsou citlivější na působení ZnO NPs ve srovnání se zdravými buňkami (*Premanathan et al., 2011*). V jiném experimentu autoři zaznamenali, že buňky HL-60 jsou odolnější vůči působení ZnO NPs, zatímco buňky U-937 jsou citlivější. Kontakt se ZnO NPs způsobil peroxidaci lipidů u buněk a koreloval s porušením membrány buněk HL-60. První fáze mechanismu toxicity testovaných NPs souvisí se změnou struktury buněčné membrány, přičemž rozsah těchto změn je striktně závislý na složení membránových lipidů (*Czyżowska et al., 2021*).

Rozpouštění částic způsobuje toxicitu ZnO NPs a právě ionty Zn^{2+} jsou zodpovědné za toxicitu (*Tuomela et al., 2013*). Na druhou stranu *Czyżowska et al.* tvrdí, že Zn^{2+} nejsou hlavním příčinným faktorem toxicity ZnO NPs (*Czyżowska et al., 2021*).

K syntéze ZnO NPs mohou být použity listy *Rhizoma paridis saponins*. Takto syntetizované částice, které měly kulovitý tvar, byly hodnoceny na protirakovinnou aktivitu proti buňkám MOLT-4. Se zvyšujícími se hladinami těchto částic se snižovala životaschopnost buněk MOLT-4 a zároveň toto ošetření mělo u buněk za následek zvýšení ROS, což tedy znamená, že takto připravené částice indukovaly apoptózu (Xu et al., 2020).

Buňky HL-60 jsou využívány ke studiu cytotoxicity a genotoxicity ZnO NPs. Byl pozorován nárůst buněčné smrti se zvyšující se koncentrací ZnO NPs a indukce poškození DNA, což bylo prokázáno prostřednictvím kometového testu. Potenciál poškozování DNA se zvyšoval se zvyšující se koncentrací těchto NPs. U PBMC byla prokázána toxicita ZnO NPs i při nízkých koncentracích (Soni et al., 2017).

Vysoké dávky ZnO NPs paradoxně v jedné studii vedly k menším abnormalitám po 48 hodinách. Autoři experimentu uvádějí, že by to mohlo být způsobeno zvýšenou agregací ZnO NPs při vysokých koncentracích v kultuře lymfocytů. Dále v této studii pozorovali zlomy chromatid, zlomy chromozomů a fragmenty vedoucí k tvorbě mikrojadér, což může být důsledek klastogenního účinku ZnO. Výsledky ukázaly, že ZnO NPs indukují zlomy DNA (Gümüş et al., 2014).

V Jurkat buňkách vystavených ZnO NPs byla exprese RBP1 a IL-2 upregulována, stejně jako exprese genu pro cytochrom P19A1 zapojeného do xenobiotického metabolismu a redoxních reakcí, zatímco exprese genu pro syntázu mastných kyselin byla downregulována (Simón-Vásquez et al., 2016).

1.2.1.6 Další nanočástice

Dalšími NPs, u kterých jsou používány suspenzní buňky, jsou zlaté NPs, které ukázaly potenciál jako zesilovače dávky pro radiační terapii (McNamara et al., 2016). Na syntézu zlatých NPs se soustředí velký zájem kvůli jejich fascinujícím vlastnostem, které vykazují částice různého tvaru, například pozoruhodné odlišné optické vlastnosti vykazované zlatými nano-trojúhelníky a nano-tyčinkami (Ranjana et al., 2020). Jelikož buněčná smrt ionizujícím zářením je obecně iniciována poškozením molekuly DNA, předpokládá se, že zlaté NPs je třeba umístit do buněčného jádra, aby zničily rakovinné buňky. V praxi se však ukázalo, že tyto částice mají tendenci se vychytávat v cytoplazmě buňky, ale i přesto mají účinek zvyšující dávku. Mitochondrie může být důležitým cílem pro záření vně jádra. V experimentu byly využity jak celé buňky Jurkat, tak i izolovaná buněčná jádra a mitochondrie těchto buněk. Autoři zjistili, že mitochondrie mohou být snadno ionizovány, když je buňka ozářena. I přesto, že NPs zlata mají tendenci se lokalizovat v cytosolu, účinky zvýšení dávky nejsou omezeny

na okolí NPs, ale mohou se rozšířit do jádra, a ještě více do sousedních mitochondrií, čímž přispívají k experimentálně pozorovaným účinkům zvýšení dávky NPs (*McNamara et al., 2016*).

Ekologicky nezávadná a nízkonákladová metoda syntézy různě tvarovaných zlatých NPs je možná pomocí hedvábného fibroinu pod UV-B zářením. Hedvábný fibroin zde působí jako redukční a následně stabilizační činidlo. Zlaté NPs jsou zkoumány z hlediska protirakovinných vlastností. Proliferační aktivita takto syntetizovaných zlatých NPs byla testována pomocí lymfocytárních buněk a rakovinné buněčné linie Jurkat. K hodnocení životaschopnosti buněk Jurkat po inkubaci s těmito NPs byl použit test MTT. Po ošetření zlatých NPs hedvábným fibroinem a s různou dobou expozice byl pozorován klesající trend procenta buněčné životaschopnosti. Pro lymfocyty jsou zlaté NPs toxické a tvorba ROS vede k buněčné smrti (*Ranjana et al., 2020*).

Ke studiu genotoxicity NPs na bázi zlata se dají využít buňky HL-60. Po expozici zlatých NPs se u těchto buněk provedl kometový test. Tři velikosti zlatých NPs (30, 50 a 90 nm) významně zvýšily procento DNA ocasu ve všech testovaných dávkách od 1 do 10 $\mu\text{g/mL}$. V tomto experimentu nebyly zlomy řetězce DNA po expozici zlatých NPs závislé na velikosti. Nicméně všechny tři velikosti zlatých NPs byly schopny způsobit oxidační léze DNA, a to i při nízkých koncentracích. Zlaté NPs o velikosti 90 nm o něco více způsobovaly genotoxicitu než zbylé dvě velikosti (*Avalos et al., 2018*).

Vedle TiO_2 NPs se k ochraně před UV zářením používají také CeO_2 NPs. Kombinace těchto dvou NPs umožňuje lepší žáruvzdorné vlastnosti, čímž se zvyšuje ochranný sluneční faktor poskytovaný TiO_2 NPs. Kromě svých stínících vlastností působí CeO_2 NPs jako silné antioxidanty díky redoxnímu přesmyku iontů ceru v 3+ a ve 4+ valenčním stavu v oxidu. K analýze cytoprotektivního účinku byly použity lidské buňky Jurkat. UV-A záření (400-315 nm) bylo v podstatě netoxické, zatímco UV-B (315-280 nm) a UV-C (280-100 nm) způsobilo poškození DNA, které mělo za následek zastavení buněčného cyklu ve fázi G2, inhibici buněčné proliferace a buněčné smrti apoptózou. CeO_2 NPs samy o sobě nezpůsobovaly žádnou toxicitu ani nezvyšovaly toxické účinky ozařování při jakékoli vlnové délce. Výsledky ukazují, že CeO_2 NPs působí dramaticky na ochranu buněk Jurkat před UV-B a UV-C zářením. K detekci antioxidantních účinků CeO_2 se provedla jednobuněčná analýza s dihydrorhodaminem, což je intracelulární sonda, která detekuje širokou škálu druhů volných radikálů. Ozáření UV-A, UV-B nebo UV-C způsobuje zvýšení signálu dihydrorhodaminu. UV-A indukovalo produkci ROS v podobném rozsahu jako UV-B nebo UV-C, i když to nevyvolalo akutní toxicitu. V experimentu bylo zjištěno, že CeO_2 NPs mohou být úspěšným

adjuvans ve vzorcích pleťových vod na bázi TiO₂, protože mají působivou ochranu proti poškození způsobenému přímo UV zářením obecně, stejně jako zejména fotokatalytický efekt ozářených TiO₂ NPs (*Caputo et al., 2015*).

1.2.2 Nanovlákná, nanodrátky a testování cytotoxicity

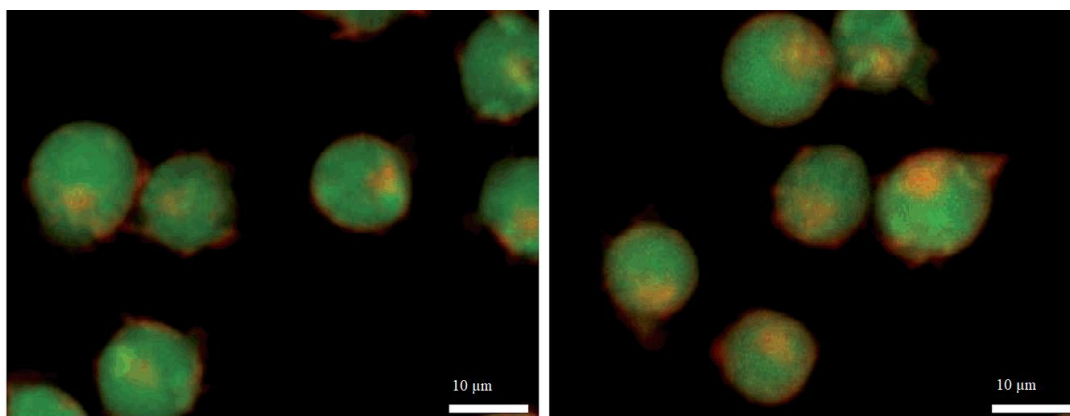
Byl proveden experiment s polystyrenovými nanovlákná, která byla potažena fibronectinem nebo E-selektinem. Na takto modifikovaných nanovláknách byla zkoumána adheze suspenzních buněk, konkrétně buněk lidské myeloidní leukémie K562. Tyto buňky vykazovaly nejnižší adhezní afinitu a kapacitu ke standardnímu tkáňovému kultivačnímu polystyrenovému povrchu, což se také zdálo být závislé na čase. To znamená, že více buněk přilnulo po delší dobu expozice. Potažení nanovláken fibronectinem a E-selektinem mělo za následek nejvyšší stupeň buněčné adheze při krátké inkubační době. Již po 1 hodině inkubace vykazovala nanovlákná potažená fibronectinem a E-selektinem asi o 15 % vyšší účinnost zachycení ve srovnání s polystyrenem pro tkáňové kultury, který zachytil méně než 5 % buněk (*Cao et al., 2014*).

Nanovlákná potažená konkanavalinem A se silně vážou na povrchy T buněk a podporují jejich aktivaci. Jurkat buňky byly inkubovány spolu se stabilními supramolekulárními nanovlákná potaženými konkanavalinem A. Očekávalo se, že nanovlákná potažená konkanavalinem A se budou vázat na povrch T buněk prostřednictvím multivalentních interakcí mezi sacharidy na povrchu buněk a multivalentními lektinovými proteiny k aktivaci T buněk. Po ošetření nano-struktur potažených konkanavalinem A nebo samotným konkanavalinem A byly buňky Jurkat aktivovány a uvolnily IL-2. V testu cytotoxicity se životaschopnost buněk mezi jednotlivými vzorky nano-struktur ošetřenými konkanavalinem A a neošetřenými nano-strukturami výrazně neliší, což tedy dokazuje, že nano-strukтуры ošetřené konkanavalinem A jsou cytokompatibilní, aniž by byla obětována životaschopnost buněk. Řízením konformace a stability nanovláken modifikovaných lektinovými proteiny lze regulovat aktivaci T buněk (*Kim et al., 2013*).

1.2.2.1 Nanodrátky na bázi Al₂O₃

Vertikálně uspořádané nanodrátky (NW) jako kultivační substrát hrají důležitou roli, protože změny v délce, průměru a hustotě NW ovlivňují parametry buněčného růstu, životaschopnost a adhezi. Seskupené a náhodně uspořádané NW se sestávaly z fosfidu india a ZnO. Oba typy NW byly pokryty tenkou vrstvou biokompatibilního Al₂O₃, který pro ZnO slouží jako pasivační vrstva. Na těchto materiálech byla zkoumána životaschopnost buněk

Jurkat a zjistilo se, že životaschopnost nebyla výrazně snížena. Obrázek 10 ukazuje buňky Jurkat na NW. Autoři uvádějí, že zde zkoumané buňky byly v kontaktu pouze se špičkou NW. Charakteristické buněčné vlastnosti buněk Jurkat mohou zůstat zachovány na substrátech NW nezávisle na drsnosti, uspořádání a průměru NW (Harberts *et al.*, 2019).



Obrázek 10: Buňky Jurkat na vertikálně uspořádaných nanodrátkách: Obarvené Jurkat buňky na uspořádaných (obrázek vlevo) a náhodně distribuovaných nanodrátkách (obrázek vpravo); měřítko = 10 µm (Harberts *et al.*, 2019).

1.2.2.2 Nanovláknna na bázi TiO₂

Zejména TiO₂ NMs se používají v různých aplikacích díky jejich jedinečným a všestranným vlastnostem a schopnosti zpracovat je do různých tvarů, jako jsou například již zmíněné NPs, nanovláknna nebo nanotrubičky. Právě titanová vlákna se stále více používají ve fotokatalyzátorech, jako potahovací materiál nebo jako scaffoldy pro lékařské aplikace. Z nanočástic anatasu TiO₂ byly hydrotermálním zpracováním syntetizovány dva typy titanových nanovláken, označené jako TF-1 a TF-2. Oba tyto materiály byly přibližně stejné délky. Z analýzy acidobazické síly vyplynulo, že povrchové pH TF-1 bylo kyselé, zatímco pH TF-2 bylo zásadité. K posouzení cytotoxicity byly použity buňky THP-1. Zatímco kultivace buněk v přítomnosti TF-1 neposkytla významné změny v počtu buněk, bylo zjištěno, že počet živých buněk byl nižší při inkubaci s TF-2, což ukazuje nižší buněčnou proliferaci. Uvolňování zánětlivých cytokinů pozorované po inkubaci s TF-2 bylo pravděpodobně spuštěno vychytáváním velkých částic buňkami THP-1 (Boonrungsiman *et al.*, 2017).

1.3 Testy používané k hodnocení cytotoxicity nanomateriálů

Jednou z nejpopulárnějších kolorimetrických metod pro hodnocení buněčné metabolické aktivity je test MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-difenylnitrotetrazoliumbromid). Tento test je používán jako indikátor buněčné životaschopnosti, proliferace a cytotoxicity. V reakci dochází k redukci rozpustného žlutého MTT na nerozpustný fialový formazan pomocí mitochondriálních, nemitochondriálních a plazmatických membránových reduktáz životaschopných buněk (Avalos et al., 2014; Nga et al., 2020). Životaschopné buňky mají schopnost přeměnit MTT na formazanové barvivo a množství produkovaného formazanu určuje životaschopnost buněk. Metoda má ale omezení, jako je neúplné rozpouštění formazanu, nízká stabilita roztoku formazanu a precipitace proteinu v kultivačním médiu, což vede ke snížení citlivosti a přesnosti biologických testů. K neúčinnějším rozpouštědlům se řadí DMSO, který se používá při práci s adherentními buňkami. Toto rozpouštědlo není vhodné pro suspenzní buňky, protože po přidání do kultivačního média může způsobit precipitaci proteinů odvozených ze suplementovaného séra nebo z lyzovaných buněk. Kombinace DMSO a dodecylsulfátu sodného může být použita pro test MTT na adherentní i suspenzní buněčné linie přidáním přímo do kultivačního média. Zároveň je nutné dodat, že tento postup vyžaduje krátkou inkubační dobu (Wani et al., 2021; Nga et al., 2020). Test MTT ale není vhodný na všechny materiály. Příkladem jsou titanové NMs, které interferují s výsledkem MTT (Boonrungsiman et al., 2017).

Dalším formazanovým testem je WST-1 (tetrazolium-1 rozpustný ve vodě; 2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium; monosodná sůl). WST-1 je jedním z testů, kterým se může stanovit metabolická aktivita buněk a je vhodný pro hodnocení buněčné proliferace, buněčné životaschopnosti a cytotoxicity v savcích buňkách. Princip WST je založen na štěpení tetrazoliové soli WST za vzniku barevného formazanu buněčnými mitochondriálními dehydrogenázami. K této přeměně dochází pouze u životaschopných buněk, což umožňuje přesnou spektrofotometrickou kvantifikaci počtu metabolicky aktivních buněk v kultuře. Pokud je počet životaschopných buněk velký a aktivita mitochondriálních dehydrogenáz vysoká, množství formazanového barviva se zvyšuje (Joo et al., 2019; Pshenichnikov et al., 2020).

K posouzení poškození DNA se používá kometový test, někdy nazývaný také jako jednobuněčná gelová elektroforéza (Wani et al., 2021; Ghosh et al., 2013). Tento test identifikuje poškození DNA, jako jsou zlomy jednovláknové a dvouvláknové DNA, což se projeví zvýšenou migrací DNA v elektrickém poli. Tato metodika se stala jednou

ze standardních metod hodnocení poškození DNA v nanotoxikologii, protože je schopna detekovat časné zlomy DNA s větší citlivostí než konvenční techniky, jako je barvení 4',6'-diamidino-2-fenylindolem a průtoková cytometrie. Ovšem poškození DNA stanovené kometovým testem může také záviset na konkrétních použitých typech buněk (*Kazimirova et al., 2019; Ávalos et al., 2018*). Je možná modifikace tohoto testu tak, aby byla umožněna detekce oxidovaných bází zahrnutím kroku, ve kterém je DNA štěpena formamidopyrimidin-DNA-glykosylázou a endonukleázou III, aby se odhalily oxidující puriny a pyrimidiny (*Ávalos et al., 2018*).

Další metodou pro detekci poškození DNA je TUNEL test. Tento test je založen na schopnosti enzymové koncové deoxynukleotidyltransferázy inkorporovat značený dUTP do volných 3'-hydroxylových konců generovaných fragmentací DNA. Test může být použit k detekci poškození DNA spojeného s neapoptotickými jevy včetně nekrotické buněčné smrti, ale také se používá k detekci apoptotických buněk. Test TUNEL barví buňky podstupující aktivní opravu DNA (*Kumar et al., 2017*).

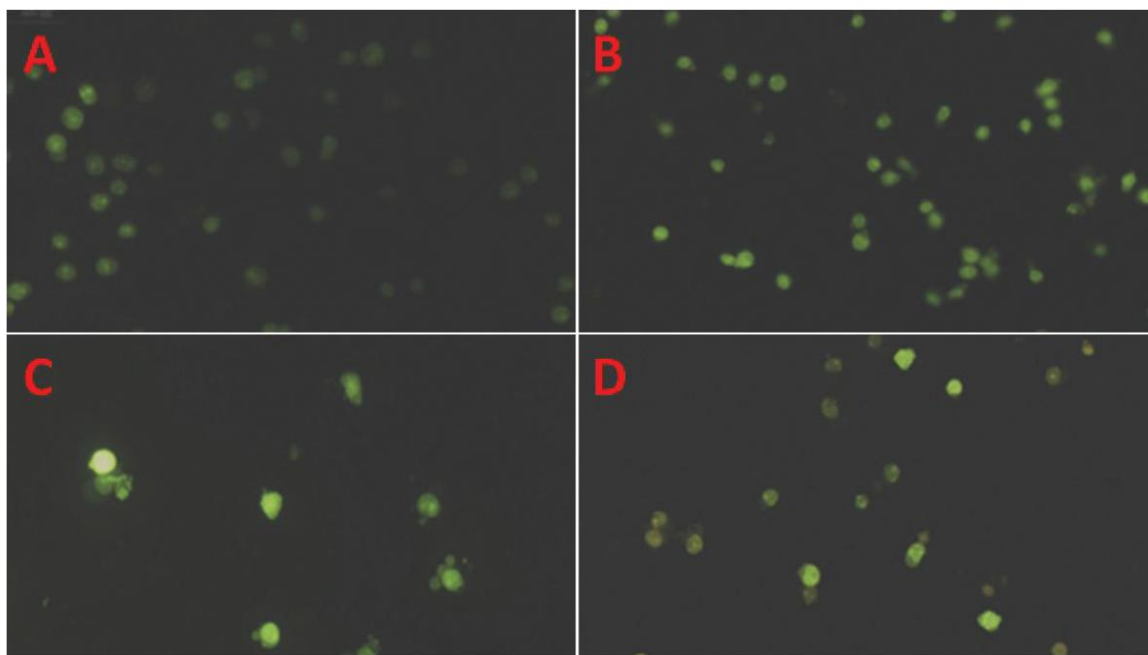
Průtoková cytometrie je velice často používanou metodou. Dopředný rozptyl je indikativní pro buněčnou velikost (objem) a boční rozptyl odráží buněčnou hustotu (zrnitost). Snížený dopředný rozptyl a zvýšený boční rozptyl indikují buněčné smrštění a zvýšenou buněčnou granularitu, což jsou modifikace, se kterými se setkáváme v dřívějších fázích apoptózy. S pozdními fázemi apoptózy se pojí zvýšený dopředný rozptyl a snížený boční rozptyl, zatímco nekróza je charakterizovaná sníženým dopředným i bočním rozptylem (*Vamano et al., 2008*).

Jako velmi citlivý test při stanovení metabolické aktivity buněk vystavených Ag NPs se ukázal LDH test. Jak již bylo zmíněno, LDH uniká z porušené cytoplazmatické membrány buněk. Při stanovení aktivity LDH se využívá schopnosti LDH katalyzovat přeměnu laktátu na pyruvát. V této reakci je kofaktorem nikotin adenin dinukleotid. Přeměna nikotin adenin dinukleotidu na jeho redukovanou formu má za následek nárůst absorpance, kterou lze detekovat spektrofotometricky (*Avalos et al., 2014; Takaki et al., 2014*). Tento test nachází využití při zkoumání poruchy integrity membrány buňky (*Czyżowska et al., 2021*).

Dále se používá detekce mitochondriálního membránového potenciálu (*Xu et al., 2020*). Jedná se o klíčový parametr pro hodnocení mitochondriální funkce a jeho pokles může být spojen s apoptózou. K hodnocení změn mitochondriálního membránového potenciálu je k dispozici několik fluorescenčních barviv, které prostupují buněčnou membránou, jmenovitě se jedná o 3,3'-dihexyloxakarbocyanin jodid, rhodamin-123, tetramethylrhodamin methyl a ethyl estery a JC-1 (*Sakamuru et al., 2016*).

Apoptózu lze hodnotit kvantifikací frakce apoptotických jader pomocí fluorescenční mikroskopie po barvení DNA buněčně permeabilním specifickým barvivem, např. Hoechst 33342, které se přidává do buněčné kultury. Frakce apoptotických jader mezi celkovou buněčnou populací se poté vypočítá spočítáním alespoň 300 buněk ve fluorescenčním mikroskopu v alespoň třech nezávislých náhodně vybraných mikroskopických polích (*Caputo et al., 2015*).

Fluorescenční barvení ethidium bromid/akridinovou oranží anebo barvení Annexin V/propidium jodidem se používá za účelem zjištění apoptózy nebo nekrózy buněk, např. po expozici různým koncentracím NPs. Propidium jodid může vstupovat do buněk přes poškozenou membránu buněk, a proto lze toto barvivo použít k označení nekrózy. Na obrázku 11 je vidět použití tohoto barvení na buňkách MOLT-4 po expozici ZnO NPs (*Liu et al., 2019; Vamanu et al., 2008*).



Obrázek 11: Barvení buněk Annexinem V/propidium jodidem a ethidium bromidem/akridinovou oranží: Buňky MOLT-4 obarvené po expozici nanočástic oxidu zinečnatého (ZnO NPs); A - kontrola, B - 4 ppm ZnO NPs, C - 5 ppm ZnO NPs; D - 6 ppm ZnO NPs (*Liu et al., 2019*).

Dalším testem je test vyloučení barviva trypanová modř. Neschopnost vyloučit trypanovou modř odráží ztrátu integrity plazmatické membrány spojenou s nekrózou (*Ghosh et al., 2013*).

Testy oxidačního stresu zahrnují intracelulárně detekované ROS. Volné radikály se kvantifikují fluorescenčním indikátorem 2',7'-dichlorofluorescein diacetátem. Do testů oxidačního stresu se řadí i antioxidantní enzymová aktivita, která využívá metodu dle Bradfordové. Aktivita SOD se hodnotí jako procento inhibice nitrotetrazoliové modři, a nakonec se odečítá absorbance při 560 nm (*Soni et al., 2017*).

Pro průkaz peroxidace lipidů se stanovuje koncentrace malondialdehydu (MDA) (Czyżowska *et al.*, 2021). MDA je nejčastěji používaným biomarkerem oxidačního stresu u mnoha onemocnění. Stanovení kyseliny thiobarbitorové je nejběžněji používanou metodou pro stanovení MDA v biologických tekutinách. Toto stanovení je založeno na kondenzační reakci dvou molekul kyseliny thiobarbitorové s jednou molekulou MDA, při které rychlost reakce závisí na teplotě, pH a koncentraci kyseliny thiobarbitorové. Reakce se provádí v kyselém roztoku a teplotě přibližně 100 °C v průběhu jedné hodiny a většina MDA vzniká během reakčního procesu rozkladem produktů peroxidace lipidů (Ansarin *et al.*, 2015).

Mikrojaderný test je širokospektrální test mutageneze. Mikrojádra jsou malá jaderná tělíčka vznikající nesprávnou separací chromozomů při mitóze v důsledku špatné opravy poškozené DNA. Hodnocení frakce mikrojaderných buněk mezi buňkami podstupujícími mitózu je měřítkem časné mutageneze po genotoxickém ošetření. Tento test se uplatnil například u hodnocení genotoxicity UV záření u buněk Jurkat. Po ozáření byl k buňkám přidán cytochalasin B, aby se zabránilo buněčnému dělení bez inhibice mitózy. Hodnocení se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu, a to jako počet mikrojaderných buněk na 500 dvoujaderných buněk (Caputo *et al.*, 2015).

2. CÍLE PRÁCE

- 1) Optimalizovat kultivaci suspenzní buněčné linie Jurkat.
- 2) U buněk Jurkat otestovat koncentrační a časovou závislost možné indukce cytotoxicity alespoň u tří nanomateriálů.
- 3) K charakterizaci toxického účinku u buněk využít dvou rutinních biochemických metod (WST-1, MCB), popř. mikroskopické analýzy.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Pomůcky a přístroje

- Analytické váhy (Mettler Toledo, Švýcarsko)
- Automatické pipety Transferpette (TreffLab, Švýcarsko)
- Automatický pipetor Accujet-Pro (BrandTech Scientific, Německo)
- Centrifuga (Hettich, Germany)
- Cytospiny (8jamková mikroskopická skla) (SPL Life Sciences, Jižní Korea)
- Inkubátor Memmert (Memmert, Německo)
- Invertovaný mikroskop Primo Vert (Carl Zeiss, Německo)
- Invertovaný mikroskop (Nikon Eclipse Ts2R, Japonsko)
- Kultivační lahve a ostatní plastové pomůcky pro buněčné linie (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Laminární box Airstream (ESCO, USA)
- Lednice s mrazákem (Liebherr, Německo)
- Mikrotitrační destičky 96jamkové (Thermo Scientific, USA)
- Mikrozkuřavky (Eppendorf, Německo)
- Multisizer 4e (Beckman coulter, USA)
- Pipety Eppendorf a špičky (Eppendorf, Německo)
- Sérologické pipety (Jet Biofil, Čína)
- Spektrofotometr a spektrofluorimetr Tecan (Tecan, Rakousko)
- Ultrazvuková lázeň K2 (Kraintek, Slovensko)
- Vodní lázeň (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Vortex s multifunkčním nastavcem (Heathrow Scientific, USA)

3.1.1 Software

- Tecan Spark Control (Tecan, Švýcarsko)
- Microsoft Office – Word, Excel, PowerPoint (Microsoft, USA)
- OriginPro 9.0.0. (OriginLab, USA)
- Nikon NIC-Elements (Nikon, Japonsko)
- ACD/ChemSketch (Advanced Chemistry Development software, Kanada)

3.2 Seznam použitých chemikálií

- Cell proliferation reagent WST-1 (Roche, Německo)
- Fluorescenční sonda monochlorobiman, MCB (Roche, Německo)
- Jednotěnné uhlíkové nanotrubičky, SWCNTs (*Single-Walled Carbon Nanotubes*) (číslo produktu: 775533; Sigma-Aldrich, USA)
- Mnohostěnné uhlíkové nanotrubičky, MWCNTs (*Multi-Walled Carbon Nanotubes*) (číslo produktu: JRCNM40003a; JRC Nanomaterials Repository)
- Nanočástice krystalické formy (rutil) oxidu titaničitého, TiO₂ rutil NPs (číslo produktu: 637262; Sigma-Aldrich, USA)
- Nanočástice oxidu titaničitého P25; TiO₂ P25 NPs (číslo produktu: 718467; Sigma-Aldrich, USA)

3.3 Kultivace buněčné linie Jurkat

- Buněčná linie lymfoblastomu lidských T-lymfocytů, Jurkat (American Type Culture Collection, ATCC, USA)
- RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA)
- Deionizovaná voda (Lonza, Belgie)
- Fetální bovinní sérum, FBS (*Fetal Bovine Serum*, Gibco, USA)
- Pyruvát sodný (Gibco, USA)
- Penicilin/Streptomycin (Gibco, USA)
- L-glutamin (Gibco, USA)
- Neesenciální aminokyseliny (Gibco, USA)
- Fosfátový pufr (pH 7,4), 10x koncentrovaný, PBS (Gibco, USA)
- Kompletní kultivační médium: RPMI 1640 obohacené o 10 % (v/v) fetálního hovězího séra, 1 mM pyruvát, 2 mM L-glutamin, 50 µg/mL penicilinu a 50 µg/mL streptomycinu a 1 % (v/v) neesenciální aminokyseliny
- Kultivační médium bez fenolové červeně: RPMI 1640 obohacené o 10 % (v/v) fetálního hovězího séra, 1 mM pyruvát, 2 mM L-glutamin, 50 µg/mL penicilinu a 50 µg/mL streptomycinu a 1 % (v/v) neesenciální aminokyseliny

Buněčnou linii Jurkat jsme kultivovali v kompletním kultivačním médiu. Do kultivační nádoby jsme přidali kompletní kultivační médium o objemu 10 ml. Následně jsme přidali

takové množství buněk, aby výsledná koncentrace v kultivační nádobě byla 300 tisíc buněk. Buňky byly následně kultivovány při teplotě 37 °C a 5 % CO₂. Po zhruba čtyřech dnech jsme provedli výměnu kultivačního média.

Po 7 dnech jsme buňky pasážovali. Počet buněk v suspenzi jsme stanovili pomocí analyzátoru Multisizer 4e (Beckman coulter, USA).

Pro experimenty jsme suspenzi buněk ředili kultivačním médiem bez fenolové červeně podle potřeby na příslušné koncentrace. Kultivační médium jsme vždy používali čerstvé.

3.4 Příprava roztoků

Fosfátový pufr (PBS)

Pro přípravu fosfátového pufru jsme k 45 mL deionizované vody přidali 5 mL fosfátového pufru. Takto připravený pufr jsme skladovali v lednici při teplotě 4 °C maximálně 14 dní.

Pracovní roztok monochlorobimanu (MCB) pro fluorimetrické stanovení glutathionu

Pro přípravu pracovního roztoku jsme k PBS přidali zásobní roztok fluorescenční sondy MCB o koncentraci 10 mM, aby vznikl 40 µM roztok.

Zásobní roztoky nanomateriálů

Zásobní roztok o koncentraci 1 mg/mL byl připraven navážením 1 mg nanomateriálů (NMs), který byl rozsuspendován v 1 mL kompletního kultivačního média. Takto připravená suspenze byla následně vložena do ultrazvukové lázně na 10 minut. Zásobní roztoky jsme vždy připravovali čerstvé.

Pracovní roztoky nanomateriálů

Ze zásobního roztoku o koncentraci 1 mg/ml jsme připravili pracovní roztoky NMs. Testovaná koncentrace zásobního roztoku v jamce mikrotitrační destičky byla 500 µg/mL. Zásobní roztoky NMs (SWCNTs, MWCNTs, TiO₂ P25 NPs, TiO₂ Rutil NPs) jsme dále ředili opět pomocí kultivačního média dle tabulky č.1. Pracovní roztoky jsme vždy připravovali čerstvé.

Tabulka 1: Postup ředění nanomateriálů při testování cytotoxicity nanomateriálů.

Testovaná koncentrace [μg/mL]	Koncentrace pracovního roztoku [μg/mL]	Ředění nanomateriálů [μL]	Objem média [μL]
200	400	520	780
100	200	500	500
10	20	100	900
1	2	100	900

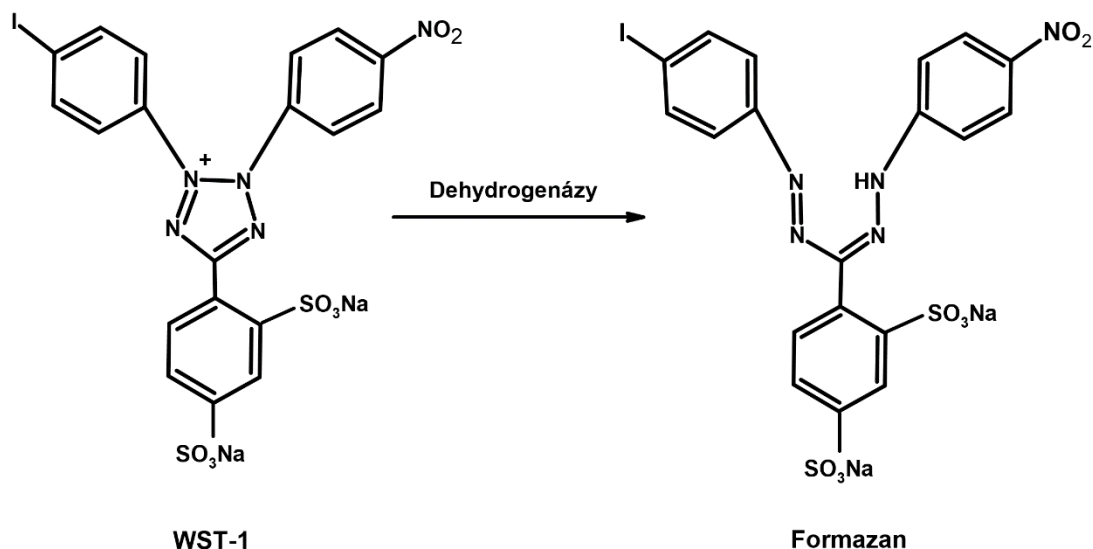
3.5 Testování cytotoxicity nanomateriálů

K testování cytotoxicity NMs jsme použili buněčnou linii Jurkat. Toxicitu NMs jsme sledovali pomocí různých testů. Životaschopnost buněk jsme hodnotili pomocí testu WST-1. Abychom zjistili detailnější mechanismus toxického účinku vybraných NMs, detekovali jsme hladiny intracelulárního antioxidantu glutathionu (GSH).

Tyto testy jsme prováděli v 96jamkových mikrotitračních destičkách. Do mikrotitrační destičky jsme nasazovali na jednu jamku 20 tisíc buněk Jurkat v suspenzi o objemu 50 μL na jamku. Kultivační médium jsme vždy používali bez fenolové červeně. K buňkám jsme ihned přidali NMs o příslušné koncentraci a objemu 50 μL na jamku. Například pokud jsme testovali koncentraci NMs 200 μg/mL, do jamky k 50 μL buněčné suspenze jsme přidali pracovní roztok NMs o koncentraci 400 μg/mL. Výsledný objem NMs a buněk v jamce byl 100 μL. Následovala inkubace dle potřeby stanovení (24 nebo 48 hodin).

3.5.1 Stanovení dehydrogenázové aktivity buněk

K hodnocení životaschopnosti, proliferace a cytotoxicity slouží test WST-1. Principem stanovení je redukce růžové tetrazoliové soli WST na žlutý formazan za katalýzy mitochondriálních dehydrogenáz (obrázek 12). Množství formazanu je detekováno spektrofotometricky při vlnové délce 440 nm (*Yin et al., 2013*).



Obrázek 12: Princip testu WST-1: Redukce tetrazoliové soli (WST-1) na formazan za katalýzy mitochondriálních dehydrogenáz (Upraveno dle *Yin et al., 2013*).

3.5.1.1 Optimalizace vhodné denzity buněk pro testování toxicity nanomateriálů

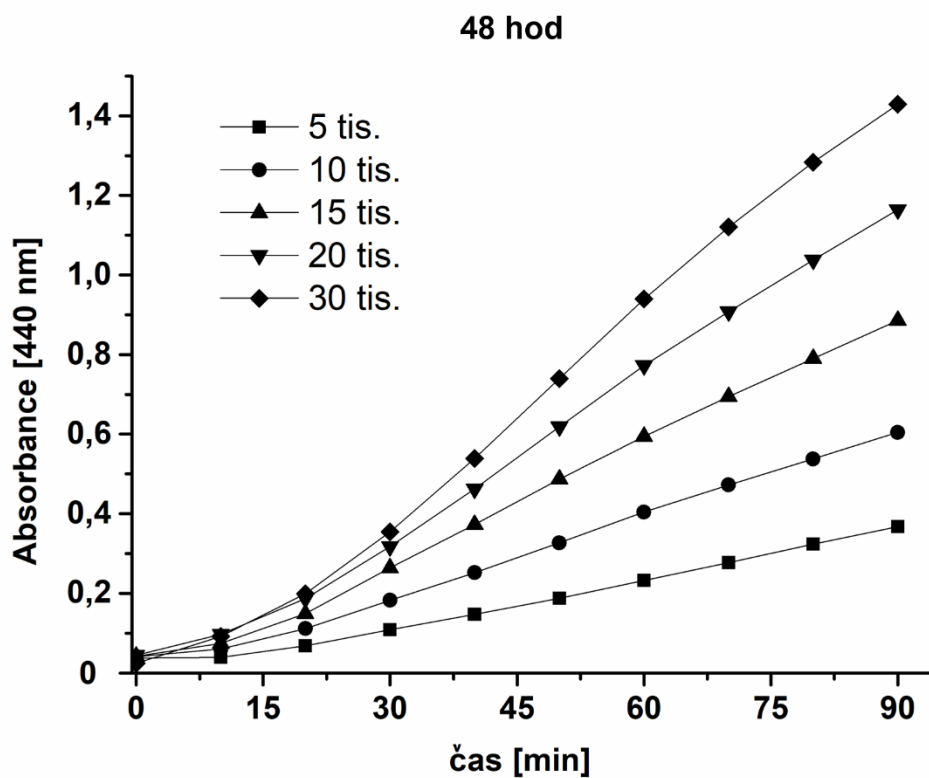
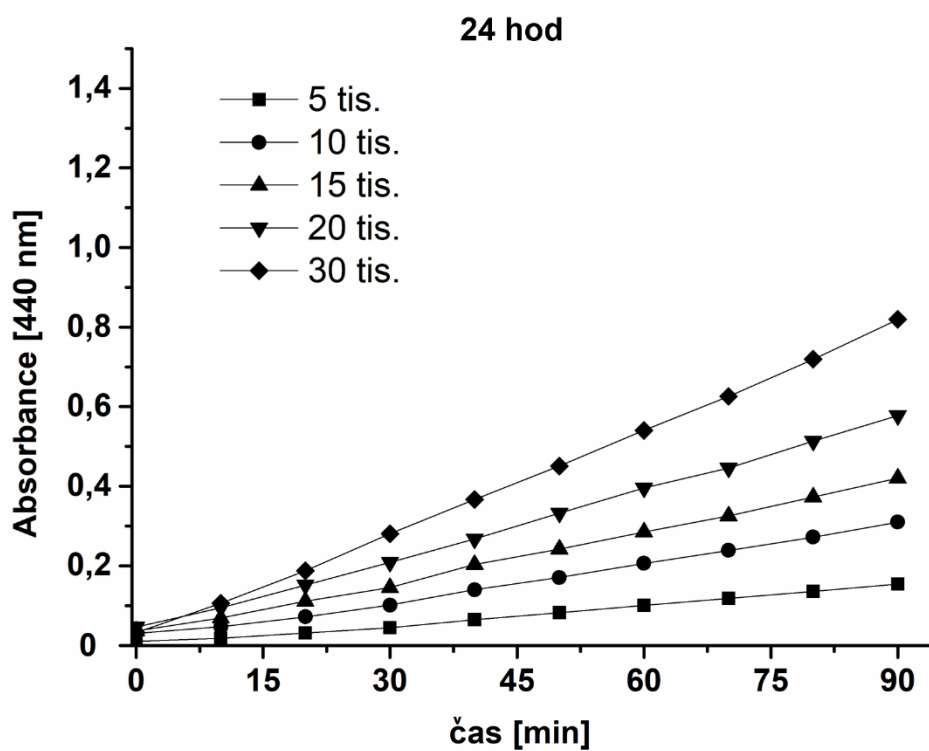
Jako první jsme optimalizovali nejvhodnější denzitu buněk Jurkat pro nasazení do 96jamkové mikrotitrační destičky a dále jsme optimalizovali inkubační dobu pro měření WST-1 testem.

Do 96jamkové mikrotitrační destičky jsme nasadili různé suspenze buněk Jurkat, a to v rozmezí 5 až 30 tisíc buněk o objemu 100 μL na jamku.

Po 24 a 48 hodinách inkubace jsme k buňkám přidali WST-1 reagentii o objemu 10 μL na jamku. Pomocí spektrometru SPARK (Tecan, Rakousko) jsme kineticky měřili absorbanci při vlnové délce 440 nm v 10minutových intervalech po dobu 90 minut.

Výsledky jsme vyjádřili jako závislost absorbance na čase. Od daných denzit jsme vždy odečetli blank v daném čase.

Graf 1 znázorňuje změnu absorbance buněk Jurkat závislou na čase. Aktivita mitochondriálních dehydrogenáz je přímo úměrná inkubační době a je závislá na denzitě buněk. Lineární závislost v čase 0 až 60 minut jsme pozorovali pro denzitu 20 tisíc buněk. Pro výběr vhodné denzity buněk jsme také zhodnotili, jestli budou mít buňky dostatek prostoru pro růst i po delším časovém intervalu inkubace. K testování cytotoxicity NMs po 24 a 48 hodinách jsme jako nejvhodnější denzitu buněk Jurkat pro nasazení do 96jamkových destiček zvolili 20 tisíc buněk Jurkat na jamku.



Graf 1: Optimalizace denzity buněk Jurkat: 5 až 30 tisíc buněk/jamka; 10. pasáž; dehydrogenázová aktivita stanovená WST-1 testem vyjádřená jako závislost absorbance na čase (0-90 min); inkubace 24 a 48 hod.

3.5.1.2 Stanovení dehydrogenázové aktivity buněk po inkubaci s nanomateriály

Test WST-1 jsme použili nejen pro optimalizaci vhodné denzity buněk pro testování cytotoxicity NMs, ale i při samotném testování cytotoxicity NMs, kde jsme detekovali intracelulární dehydrogenázovou aktivitu.

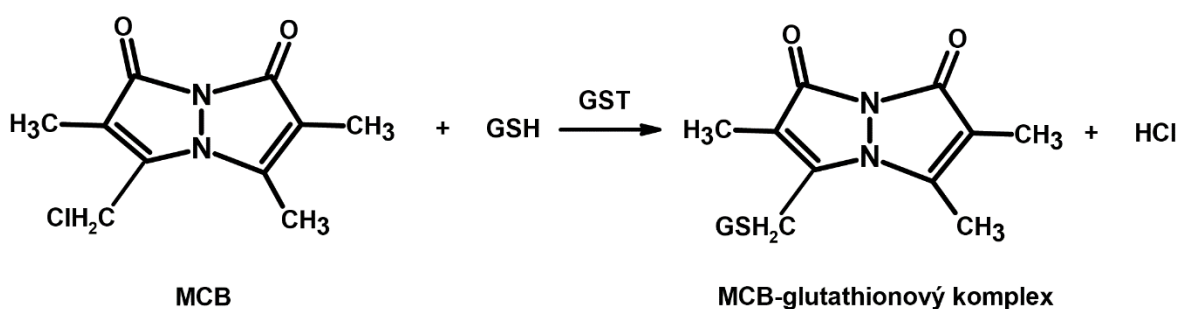
Do 96jamkové mikrotitrační destičky jsme nasadili 20 tis. buněk Jurkat na jamku a přidali pracovní roztok NMs o určité koncentraci, aby celkový objem v jamce byl 100 μL . Výsledné koncentrace v jamce byly 1, 10, 100, 200 a 500 $\mu\text{g/mL}$ NMs. Po 24- nebo 48hodinové inkubaci buněk s NMs jsme přidali 10 μL WST-1 reagentie na jamku.

Ihned jsme změřili absorbanci při vlnové délce 440 nm. Následovala inkubace 60 minut při 37 $^{\circ}\text{C}$, po které byla znovu změřena absorbance. Měření absorbance jsme prováděli pomocí spektrometru SPARK (Tecan, Rakousko). Do výsledků jsme použili rozdíl absorbancí v nulté a jedné hodině. Výsledky byly vztaženy k procentům kontrolních buněk.

3.5.2 Fluorimetrické stanovení koncentrace glutathionu

Jednou z metod pro detekci koncentrace GSH je fluorimetrické stanovení. K detekci koncentrace GSH se používají fluorescenční sondy, do kterých se řadí monochlorobiman (MCB). Test využívající MCB je vhodný pro rutinní stanovení, zejména díky rychlosti provedení, citlivosti a specifitě (Čapek *et al.*, 2017).

Fluorescenční sonda MCB se přidává do kultivačního média s buňkami, kde může reagovat s GSH za vzniku fluorescenčního produktu. MCB pronikají přes buněčnou membránu a reagují přímo s buněčnými thioley. Konjugace MCB s GSH je katalyzována glutathion-S-transferázou (obrázek 13). Halogenované molekuly MCB jsou v podstatě nefluorescenční až do konjugace, a dají se tak použít jako thiol-reaktivní sondy pro kvantifikaci hladin GSH v buňkách (Čapek *et al.*, 2017; Eklund *et al.*, 2002).



Obrázek 13: Konjugace monochlorobimanu s glutathionem: MCB – monochlorobiman, GSH - glutathion, GST - glutathion-S-transferáza, HCl - kyselina chlorovodíková.

Do 96jamkových destiček jsme nasazovali 20 tisíc buněk Jurkat na jamku, ihned jsme přidali 50 μL pracovního roztoku NMs o určité koncentraci, celkový objem v jamce byl 100 μL . Výsledné koncentrace v jamkách byly 1, 10, 100, 200 a 500 $\mu\text{g/mL}$ NMs. Následovala inkubace buněk s NMs po dobu 24 nebo 48 hodin. Po uplynutí doby inkubace jsme do každé jamky v 96jamkové destičce přidali pracovní roztok MCB tak, aby výsledná koncentrace roztoku byla v každé jamce 40 $\mu\text{mol/L}$. Intenzitu fluorescence jsme měřili pomocí spektrometru SPARK (Tecan, Rakousko). Excitační vlnová délka byla 394 nm, emisní vlnová délka byla 490 nm. Výsledky jsme vyjádřili jako intenzitu fluorescence, která byla vztažena k procentům kontrolních buněk.

Hodnotili jsme také možnou interferenci nanočástic a nanotrubiček s testem WST-1 a se stanovením koncentrace GSH. Při testovaných koncentracích nebyla zjištěna významná interference materiálů s žádným z použitých stanovení. Signál pozadí byl pod 10 % signálu u negativních kontrol.

3.5.3 Pozorování morfologie buněk po inkubaci s nanomateriály

Provedli jsme mikroskopickou analýzu morfologie buněk Jurkat po vystavení různým NMs. Konkrétně se jednalo o TiO_2 P25 NPs, TiO_2 rutil NPs, SWCNTs a MWCNTs.

Buňky s NMs jsme nasazovali do 8jamkových cytospinů. Do jedné jamky jsme nasazovali 20 tisíc buněk Jurkat o objemu 100 μL a dále jsme přidali 100 μL pracovního roztoku NMs o určité koncentraci. Celkový objem v jedné jamce byl 200 μL a výsledné koncentrace NMs byly 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Následovala inkubace 48 hodin.

Buňky s NMs jsme pozorovali pod invertovaným mikroskopem ve fázovém kontrastu při zvětšení 200x (Nikon Eclipse Ts2R, Japonsko).

3.5.4 Statistická analýza naměřených dat

Výsledky koncentrace intracelulárního GSH a dehydrogenázové aktivity jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. Výsledky byly podrobeny statistické analýze při zvolené hladině významnosti $p = 0,05$ (*, $p < 0,05$, **; $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$). Pro statistickou analýzu rozptylu jsme použili jednorozměrnou analýzu rozptylu (jednorozměrná ANOVA) s následným Bonferroniho post-testem (OriginPro 9.0.0., USA).

4. VÝSLEDKY

4.1 Testování cytotoxicity TiO₂ nanočástic

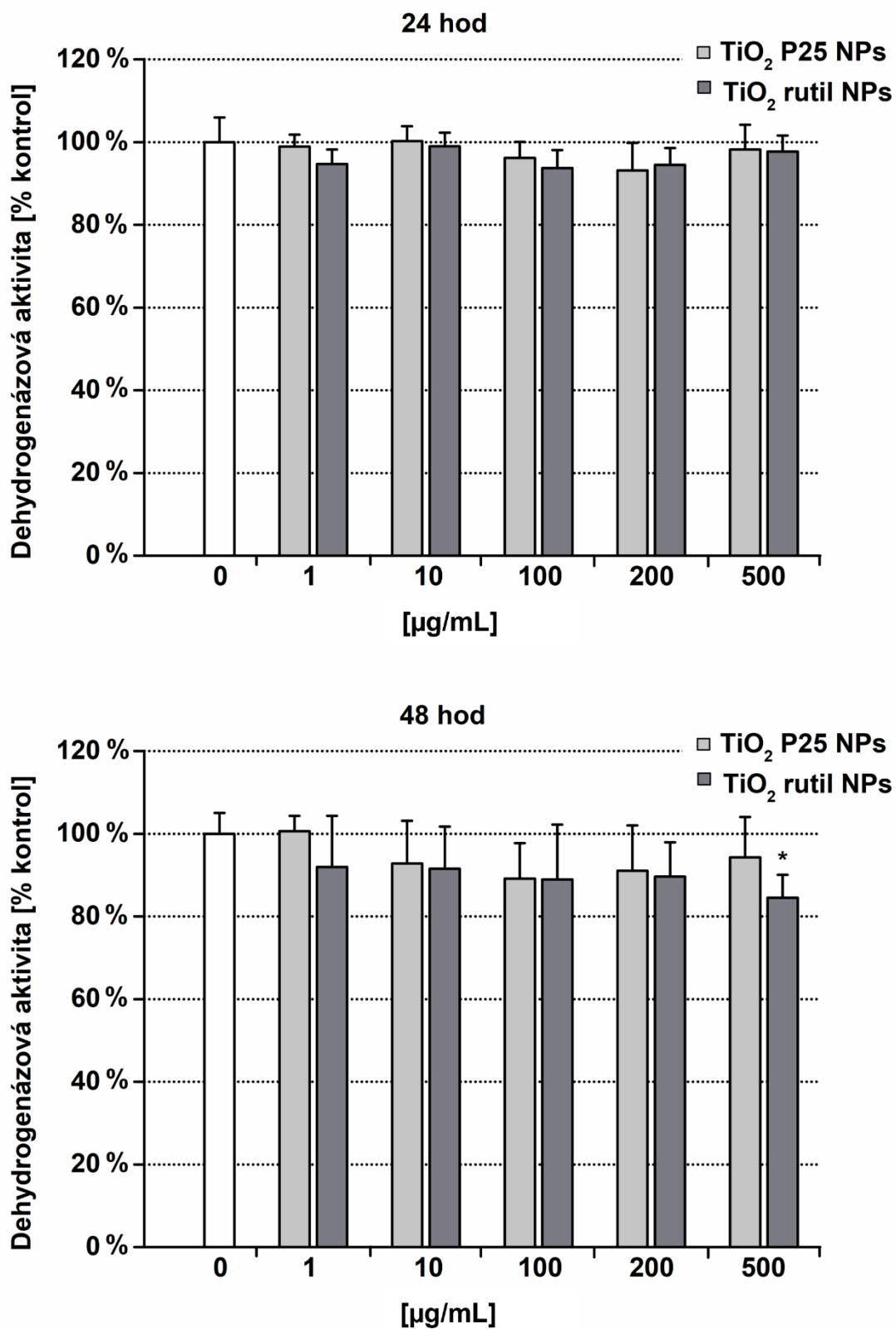
Pro testování cytotoxicity nanočástic na bázi oxidu titaničitého jsme zvolili dva druhy nanočástic TiO₂ P25 a TiO₂ rutil. Testování cytotoxicity této dvojice NPs jsme provedli za účelem porovnání jejich možného cytotoxického účinku na buňky Jurkat v závislosti na koncentraci 0, 10, 100, 200 a 500 µg/mL a době inkubace 24 a 48 hodin.

4.1.1 Stanovení dehydrogenázové aktivity buněk

Intracelulární dehydrogenázovou aktivitu buněk Jurkat jsme hodnotili pomocí testu WST-1. Detekovali jsme možnou změnu životaschopnosti buněk po expozici TiO₂ P25 NPs a TiO₂ rutil NPs a hodnotili jsme jejich vliv ve vztahu k jejich koncentraci a době inkubace.

Z grafu 2 je patrné, že po 24hodinové inkubaci TiO₂ NPs nevyvolaly signifikantní snížení dehydrogenázové aktivity oproti kontrolním buňkám. U buněk inkubovaných s TiO₂ P25 nebo TiO₂ rutil NPs v žádné z testovaných koncentracích nedošlo ke snížení dehydrogenázové aktivity o více než 7 % ve srovnání s kontrolními buňkami.

U obou testovaných TiO₂ NPs jsme po 48 hodinách inkubace s buňkami pozorovali pouze mírnější pokles dehydrogenázové aktivity v porovnání s 24hodinovou inkubací. Signifikantní snížení dehydrogenázové aktivity po 48 hodinách inkubace buněk s TiO₂ NPs jsme pozorovali pouze u buněk Jurkat inkubovaných s 500 µg/mL TiO₂ rutil NPs, a to přibližně o 15 % oproti kontrolním buňkám. Po inkubaci buněk s 500 µg/mL TiO₂ rutil NPs došlo k poklesu dehydrogenázové aktivity z 98 % po 24 hodinách na 85 % po 48 hodinách. Obecně můžeme shrnout, že TiO₂ NPs způsobují pouze mírné snížení dehydrogenázové aktivity hlavně po 48hodinové inkubaci.



Graf 2: Vliv TiO₂ nanočástic na dehydrogenázovou aktivitu: buňky Jurkat; TiO₂ nanočástice (= NPs) – P25 a rutil (0-500 $\mu\text{g/mL}$); 24 a 48 hod; dehydrogenázová aktivita stanovená pomocí WST-1 testu vyjádřena jako % kontrolních buněk (= 100 %); průměr \pm SD (n = 6; *, $p < 0,05$, vs. kontrola).

4.1.2 Fluorimetrické stanovení koncentrace glutathionu

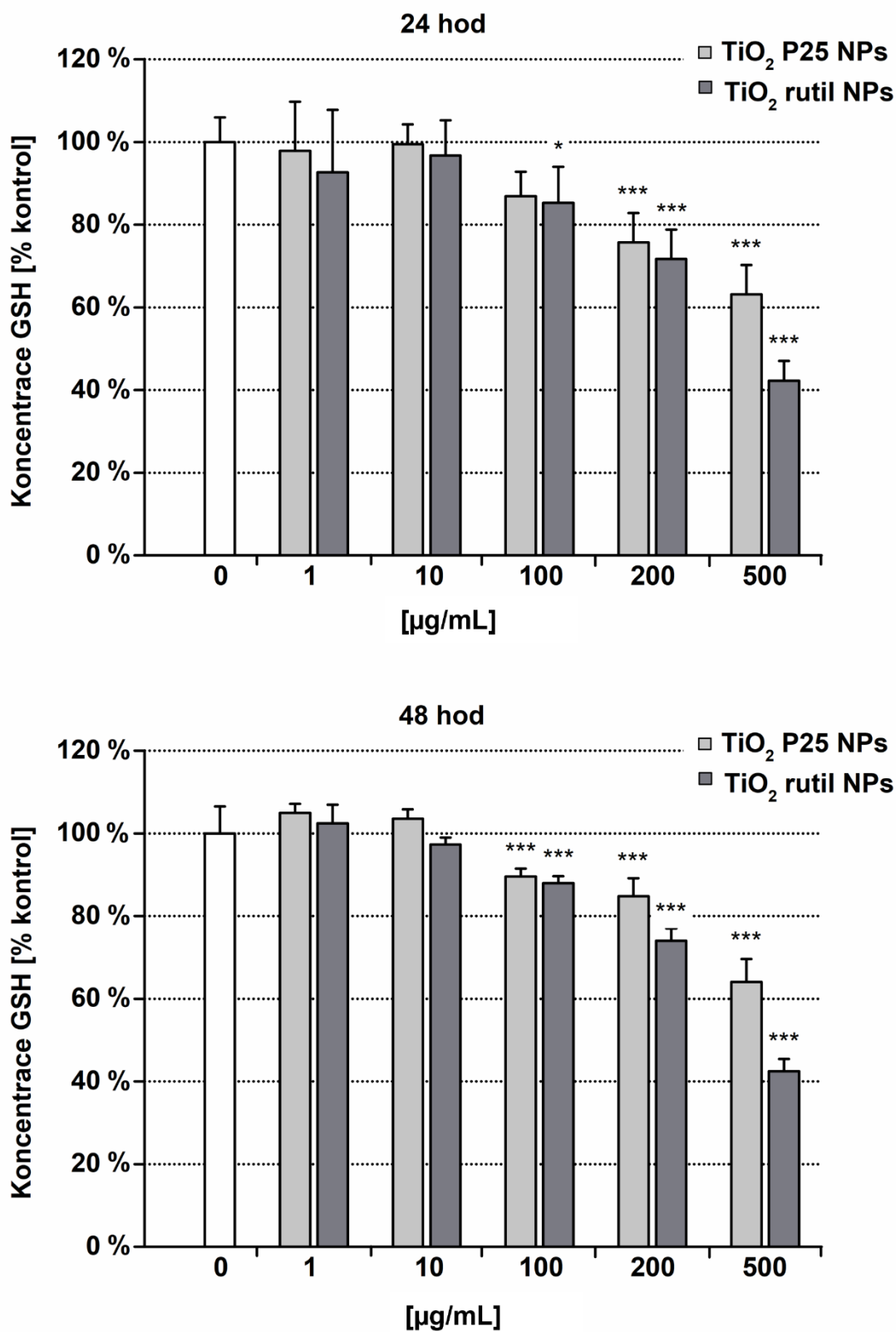
V buňkách Jurkat jsme detekovali intracelulární koncentraci GSH po expozici TiO₂ NPs P25 a rutil pomocí fluorimetrické metody využívající fluorescenční sondu MCB. Buňky Jurkat jsme opět inkubovali 24 a 48 hodin s TiO₂ NPs P25 a rutil o koncentraci 0-500 µg/mL.

Graf 3 znázorňuje intracelulární koncentraci GSH po 24 a 48 hodinách inkubace buněk s TiO₂ NPs P25 a rutil. Po 24hodinové inkubaci s 1, 10 a 100 µg/mL TiO₂ P25 NPs jsme nedetekovali významný pokles koncentrace GSH ve srovnání s kontrolními buňkami. Významné snížení intracelulární koncentrace GSH jsme detekovali po 24hodinové inkubaci buněk Jurkat s 200 a 500 µg/mL TiO₂ P25 NPs ve srovnání s kontrolními buňkami. Signifikantní pokles intracelulární koncentrace GSH oproti kontrolním buňkám jsme zaznamenali také po 24hodinové inkubaci buněk se 100, 200 a 500 µg/mL TiO₂ rutil NPs. U nejvyšší testované koncentrace TiO₂ rutil NPs jsme detekovali depleci koncentrace GSH o přibližně 58 % ve srovnání s kontrolními buňkami.

U buněk Jurkat inkubovaných 48 hodin se 100, 200 a 500 µg/mL TiO₂ P25 NPs jsme detekovali signifikantní pokles intracelulární koncentrace GSH ve srovnání s kontrolními buňkami, zatímco u koncentrace 1 a 10 µg/mL TiO₂ P25 NPs jsme nezaznamenali signifikantní pokles koncentrace GSH. Koncentrace 100, 200 a 500 µg/mL TiO₂ rutil NPs indukovaly depleci intracelulární koncentrace GSH ve srovnání s kontrolními buňkami. Po 48hodinové inkubaci buněk s 500 µg/mL TiO₂ rutil NPs koncentrace GSH dále neklesala a zůstala snížena přibližně o 58 % oproti kontrolním buňkám, což je stejný výsledek jako po 24hodinové inkubaci.

Pokud porovnáme námi vybrané TiO₂ nanočástice, TiO₂ rutil NPs způsobily větší depleci intracelulárního GSH v porovnání s TiO₂ P25 NPs. Tento rozdíl mezi TiO₂ NPs je patrný především u vyšších koncentrací 200 a 500 µg/mL po 48 hodinách inkubace. Největší rozdíl v poklesu koncentrace GSH indukovaný TiO₂ P25 a TiO₂ rutil NPs jsme zaznamenali u buněk inkubovaných s nanočásticemi 500 µg/mL, rozdíl mezi 24 a 48 hodinách inkubace činil 21 %.

Z grafu 3 je také patrné, že intracelulární koncentrace GSH se postupně snižuje v závislosti na době inkubace a koncentraci TiO₂ NPs. Postupnou depleci intracelulární koncentrace GSH jsme detekovali se zvyšující se koncentrací TiO₂ NPs a zároveň se koncentrace GSH snižovala v závislosti na čase.



Graf 3: Vliv TiO₂ nanočástic na koncentraci glutathionu: buňky Jurkat; glutathion (= GSH); TiO₂ nanočástice (= NPs) – P25 a rutil (0-500 $\mu\text{g/mL}$); 24 a 48 hod; intracelulární koncentrace GSH vyjádřena jako % kontrolních buněk (= 100 %); průměr \pm SD (n = 6; *, $p < 0,05$, ***, $p < 0,001$, vs. kontrola).

4.2 Testování cytotoxicity uhlíkových nanotrubiček

K testování cytotoxicity uhlíkových nanotrubiček jsme zvolili jednotěnné (SWCNTs) a mnohostěnné (MWCNTs) uhlíkové nanotrubičky. Opět jsme buňky inkubovali s koncentracemi 0, 1, 10, 100, 200 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a hodnotili jsme jejich vliv v závislosti na jejich koncentraci a době inkubace. Buňky Jurkat se SWCNTs a MWCNTs jsme inkubovali ve dvou časových intervalech 24 a 48 hodin.

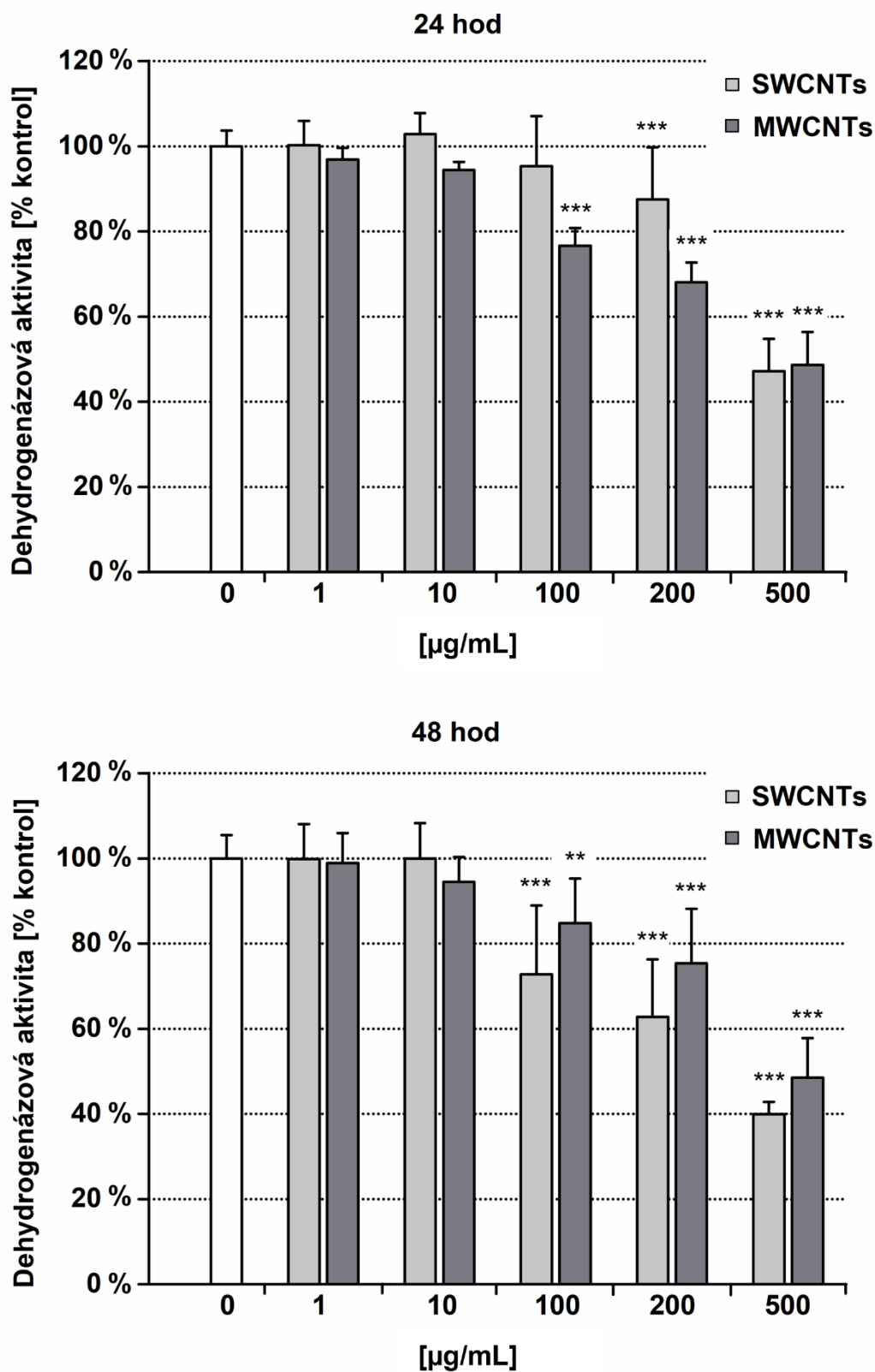
4.2.1 Stanovení dehydrogenázové aktivity buněk

U buněk inkubovaných se SWCNTs a MWCNTs jsme stanovili intracelulární dehydrogenázovou aktivitu buněk Jurkat pomocí testu WST-1, stejně jako tomu bylo v případě TiO_2 NPs. Graf 4 znázorňuje 24- a 48hodinovou inkubaci buněk se SWCNTs a MWCNTs a jejich vliv na dehydrogenázovou aktivitu buněk Jurkat.

Koncentrace 1, 10 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SWCNTs a 1 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MWCNTs neindukovaly významný pokles dehydrogenázové aktivity u buněk Jurkat inkubovaných 24 hodin. Po 24 hodinách inkubace buněk se SWCNTs jsme detekovali signifikantní pokles dehydrogenázové aktivity buněk u koncentrace 200 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve srovnání s kontrolními buňkami. U buněk Jurkat inkubovaných 24 hodin se 100, 200 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MWCNTs došlo k signifikantnímu poklesu dehydrogenázové aktivity, přičemž největší pokles jsme zaznamenali u koncentrace 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MWCNTs, úroveň dehydrogenázové aktivity klesla o více než 50 % ve srovnání s kontrolními buňkami

Koncentrace 1 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SWCNTs a MWCNTs inkubované 48 hodin s buňkami Jurkat neindukovaly významný pokles dehydrogenázové aktivity u buněk. Po 48hodinové inkubaci buněk s nanotrubičkami jsme detekovali pokles dehydrogenázové aktivity u koncentrací 100, 200 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SWCNTs a MWCNTs. Testovaná koncentrace 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SWCNTs indukovala po 48 hodinách inkubace signifikantní pokles dehydrogenázové aktivity o více než 50 % ve srovnání s kontrolními buňkami. Naopak u buněk inkubovaných 48 hodin se 100 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MWCNTs se oproti 24hodinové inkubaci zvýšila dehydrogenázová aktivita buněk. Dehydrogenázová aktivita buněk Jurkat inkubovaných s koncentrací 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MWCNTs zůstávala stále stejná po 48 hodinách jako po 24 hodinách inkubace.

Ze získaných výsledků vyplývá, že po 24hodinové inkubaci způsobují MWCNTs větší pokles dehydrogenázové aktivity ve srovnání se SWCNTs. Po 48 hodinách inkubace jsme zaznamenali, že koncentrace 100, 200 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SWCNTs indukovaly u buněk Jurkat větší pokles dehydrogenázové aktivity v porovnání se stejnými koncentracemi MWCNTs.



Graf 4: Vliv uhlíkových nanotrubiček na dehydrogenázovou aktivitu: buňky Jurkat; uhlíkové nanotrubičky – jednodstěnné (= SWCNTs) a mnohostěnné (= MWCNTs) (0-500 µg/mL); 24 a 48 hod; intracelulární dehydrogenázová aktivita stanovená pomocí WST-1 testu vyjádřena jako % kontrolních buněk (= 100 %); průměr ± SD (n = 9; **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$, vs. kontrola).

4.2.2 Fluorimetrické stanovení koncentrace glutathionu

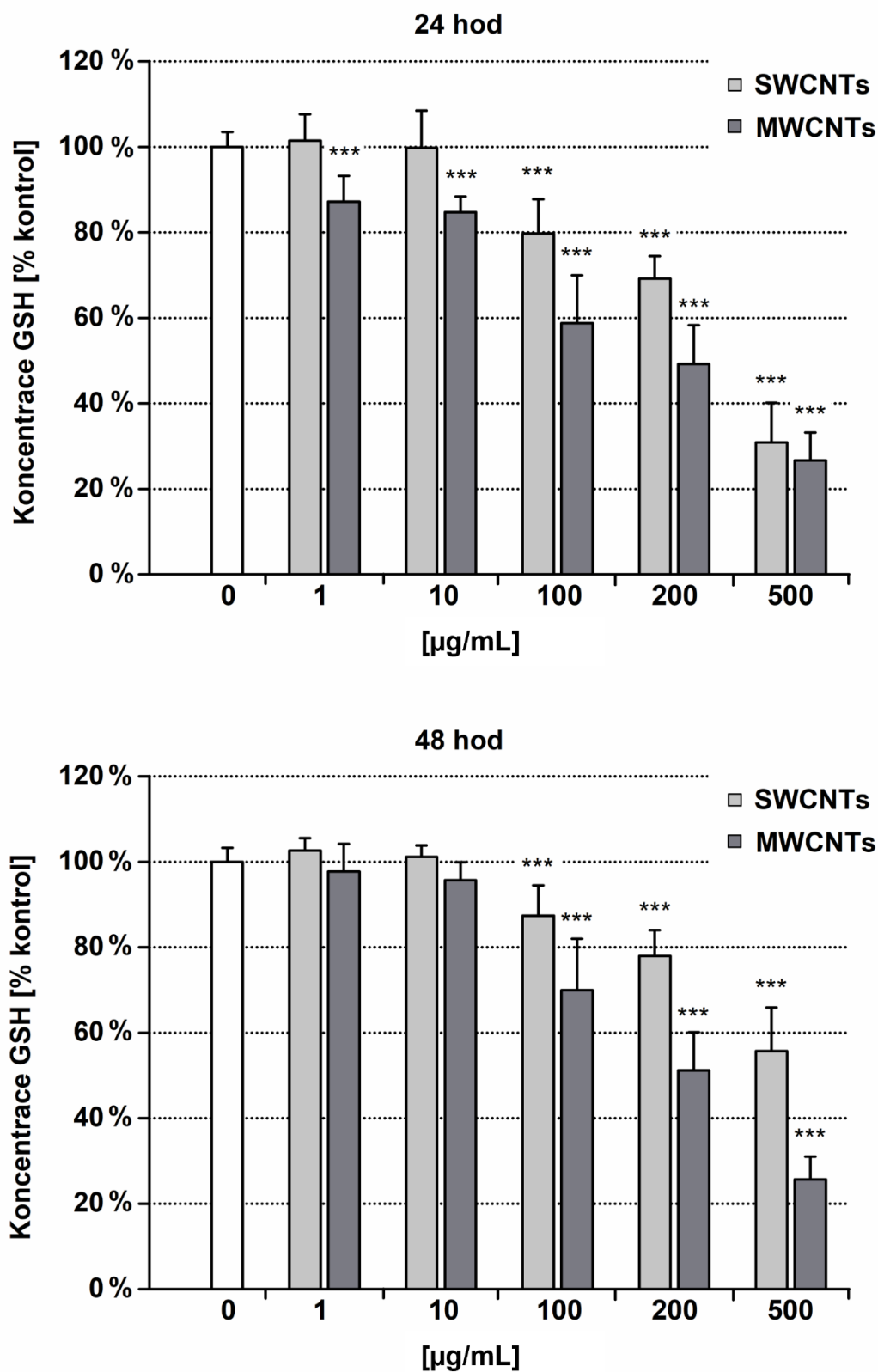
Pro detailnější charakteristiku cytotoxicity SWCNTs a MWCNTs jsme stanovili koncentraci intracelulárního GSH v buňkách Jurkat pomocí fluorimetrického testu s využitím fluorescenční sondy MCB.

Graf 5 znázorňuje vliv SWCNTs a MWCNTs na koncentraci intracelulárního GSH v závislosti na jejich koncentraci a době inkubace. Z grafu 5 je patrné, že se zvyšující se koncentrací uhlíkových nanotrubiček se snižuje koncentrace intracelulárního GSH.

Již u 1 $\mu\text{g/mL}$ MWCNTs jsme po 24hodinové inkubaci s buňkami detekovali signifikantní depleci koncentrace GSH přibližně o 13 % oproti kontrolním buňkám. Po 24 hodinách inkubace jsme detekovali u buněk ovlivněných 500 $\mu\text{g/mL}$ MWCNTs depleci intracelulární koncentrace GSH o více než 70 % ve srovnání s kontrolními buňkami. U koncentrací 100, 200 a 500 $\mu\text{g/mL}$ SWCNTs inkubovaných s buňkami Jurkat po 24 hodinách jsme našli signifikantní pokles intracelulární koncentrace GSH ve srovnání s kontrolními buňkami, zatímco koncentrace 1 a 10 $\mu\text{g/mL}$ SWCNTs neindukovaly depleci koncentrace GSH.

Po 48hodinové inkubaci buněk Jurkat se 100, 200 a 500 $\mu\text{g/mL}$ SWCNTs jsme detekovali signifikantní depleci koncentrace GSH oproti kontrolním buňkám, deplece koncentrace GSH byla ve srovnání s 24hodinovou inkubací nižší. Stejný fenomén, kdy po 24 hodinách inkubace došlo k významnému poklesu intracelulární koncentrace GSH a po 48 hodinách inkubace se naopak koncentrace GSH zvýšila, jsme detekovali také u 10, 100 a 200 $\mu\text{g/mL}$ MWCNTs.

Pokud porovnáme vybranou dvojici uhlíkových nanotrubiček, MWCNTs indukují větší depleci koncentrace intracelulárního GSH než SWCNTs. Rozdíly v depleci koncentrace GSH jsme zaznamenali především po 48 hodinách inkubace, a to zejména u vyšších koncentrací uhlíkových nanotrubiček (100-500 $\mu\text{g/mL}$), nicméně tento rozdíl je v menší míře vidět i u 24hodinové inkubace, v tomto případě deplece koncentrace GSH byla způsobena i nižšími koncentracemi MWCNTs.



Graf 5: Vliv uhlíkových nanotrubiček na koncentraci glutathionu: buňky Jurkat; glutathion (= GSH); uhlíkové nanotrubičky – jedностěnné (= SWCNTs) a mnohostěnné (= MWCNTs) (0-500 µg/mL); 24 a 48 hod; intracelulární koncentrace GSH vyjádřena jako % kontrolních buněk (= 100 %); průměr ± SD (n = 9; ***, $p < 0,001$, vs. kontrola).

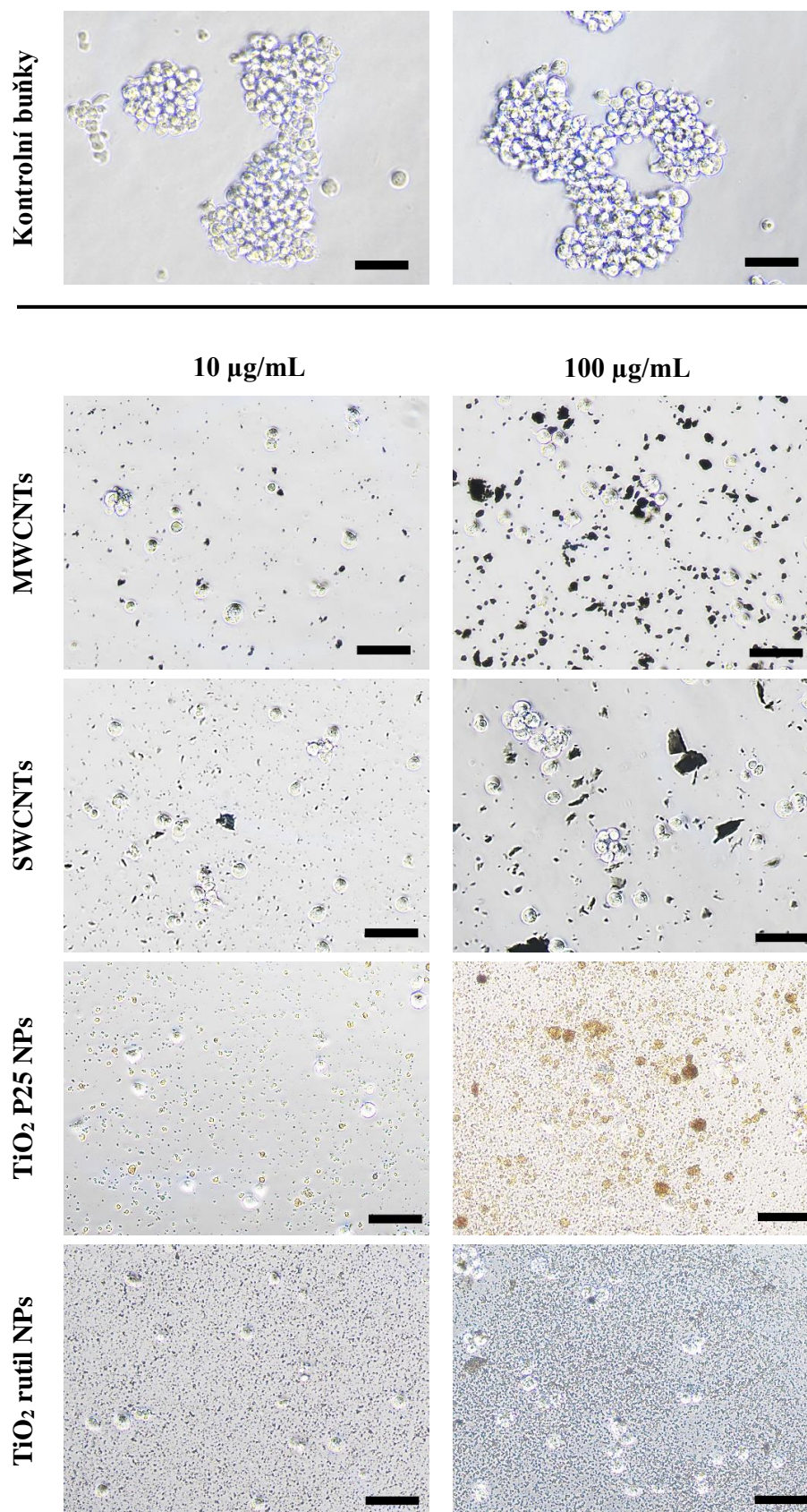
4.3 Pozorování morfologie buněk po inkubaci s nanomateriály

Pro posouzení morfologických změn Jurkat buněk ovlivněných vybranými NMs jsme využili invertovaný mikroskop (Nikon Eclipse Ts2R, Japonsko). Na obrázku 14 jsou snímky buněk inkubovaných s vybranými NMs po časovém intervalu 48 hodin. Pro mikroskopování jsme zvolili SWCNTs, MWCNTs, TiO₂ P25 NPs a TiO₂ rutil NPs. Buňky jsme inkubovali pouze s koncentracemi 10 a 100 µg/mL. Volili jsme nižší koncentrace NMs, jelikož u vyšších koncentrací jsou NMs spolu s buňkami špatně pozorovatelné pod mikroskopem. Sledovali jsme rozptýlení NMs v kultivačním médiu, případnou tvorbu shluků a morfologii buněk Jurkat.

U kontrolních buněk Jurkat jsme pod mikroskopem pozorovali jejich kulovitý tvar, který je charakteristický pro suspenzní buňky. Buňky Jurkat se po 48 hodinách inkubace vyskytovaly ve shlucích, které připomínaly tvar hroznu.

U buněk inkubovaných s koncentracemi 10 a 100 µg/mL TiO₂ P25 a TiO₂ rutil NPs jsme nepozorovali žádné výraznější poškození buněk, což koreluje s našimi výsledky testování dehydrogenázové aktivity, která nebyla signifikantně snížena (graf 2).

Jako další jsme pod invertovaným mikroskopem hodnotili morfologii buněk po inkubaci se SWCNTs a MWCNTs. U buněk inkubovaných s koncentrací 100 µg/mL SWCNTs a MWCNTs jsme pozorovali mírné poškození buněk, což je v souladu s výsledky dehydrogenázové aktivity, která byla signifikantně snížena ve srovnání s kontrolními buňkami (graf 4). Především u koncentrace 100 µg/mL jsme pozorovali shluky těchto uhlíkových nanotrubiček. Rozdíl je patrný především v případě SWCNTs, které byly lépe dispergované, zatímco MWCNTs se vyskytovaly více ve shlucích.



Obrázek 14: Vliv nanomateriálů na buněčnou morfolonii: buňky Jurkat; inkubace 48 hod; uhlíkové nanotrubičky - jednodstěnné (= SWCNTs) a mnohostěnné (= MWCNTs); TiO₂ nanočástice (= NPs) - P25 a rutil; 10 a 100 µg/mL; fázový kontrast; zvětšení 200x; měřítko = 50 µm.

5. DISKUZE

S narůstajícím využitím NMs v různých odvětvích je potřeba testovat jejich cytotoxicitu, jelikož se tyto materiály dostávají stále častěji do přímého kontaktu s lidským organismem. Do lidského organismu se mohou dostat kontaktem s kůží, přes gastrointestinální trakt a především vdechnutím, což je hlavní vstupní brána pro NPs. Po vdechnutí jsou NPs ukládány v periferních částech plic a mohou snadno proniknout do krve, kde se dostávají do kontaktu s krevními buňkami (*Gehr et al., 2018*). Z pohledu imunitního systému představují NMs cizí předměty v těle a v krvi interagují s různými imunitními buňkami, včetně monocytů, makrofágů, dendritických buněk nebo B a T lymfocytů. Interakce anorganických NPs s imunitním systémem a změna normální imunitní funkce vyvolává obavy o bezpečnosti těchto materiálů (*Brzicova et al., 2019; Mohammapdour et al., 2022*).

Pro studium cytotoxicity NMs jsme zvolili suspenzní buněčnou linii Jurkat, která se často používá ve studiích zkoumajících možný cytotoxický účinek NMs, především pak toxicitu NPs (*Pshenichnikov et al., 2021*). Právě imunitní buňky jsou zkoumány v souvislosti s NPs, jelikož tyto materiály stimulují nebo potlačují imunitní systém (*Madhubala et al., 2019*).

Nanomateriály mají mnoho využití, např. v leteckém průmyslu, medicíně, používají se jako nano-tekutiny, povlakové materiály a další (*Sharma et al., 2018*). Toxikologickým účinkům anorganických NPs, do kterých se řadí TiO_2 , je věnována značná pozornost, protože se používají v řadě produktů a kontakt s lidským organismem je tak nevyhnutelný (*Mu et al., 2014*). TiO_2 NPs se mohou nacházet v produktech denní potřeby, např. byly extrahovány ze zubní pasty (*Fadheela et al., 2020*). Tyto velmi malé částice se snadno dostávají do plic a dále do systémové cirkulace a indukují tak cytotoxicitu T buněk. Z tohoto důvodu může buněčná linie Jurkat odvozená od T lymfoblastické leukémie sloužit jako dobrý model pro experimenty týkající se cytotoxicity NPs (*Male et al., 2013; Tong et al., 2008*).

Nanomateriálů existuje nepřehledné množství, my jsme pro naše studium cytotoxicity vybrali nanočástice na bázi TiO_2 a následně jsme testovali toxicitu uhlíkových nanotrubiček. Zvolili jsme komerčně dostupné nanočástice TiO_2 (*Sigma-Aldrich*), které se řadí mezi nejrozšířenější NPs (*Katsumiti et al., 2014*). K testování cytotoxicity nanomateriálů jsme vybrali nanočástice TiO_2 P25 o velikosti 21 nm, které jsou složeny z krystalické formy rutil (70-80 %) a anatas (30-20 %). Dále jsme zvolili TiO_2 rutil NPs a jak je již z názvu patrné, tyto nanočástice obsahují krystalickou strukturu rutil, který je stálejší než anatas (*Gouma et al., 2001; Shi et al., 2013*).

Autoři v experimentech většinou testují koncentrace nanomateriálů do 100 µg/mL, ale existují i další studie, ve kterých se testují koncentrace 1 mg/mL a vyšší (*Hadidi et al., 2012; Gea et al., 2019; Grabowski et al., 2015*). V našich experimentech jsme buňky Jurkat inkubovali s nanomateriály o koncentraci 1, 10, 100, 200 a 500 µg/mL.

Před zahájením experimentů jsme pomocí testu WST-1, který je založený na principu detekce změny dehydrogenázové aktivity buněk, provedli optimalizaci buněčné denzity pro nasazení do 96jamkových destiček, ve kterých jsme prováděli testování cytotoxicity NMs. Denzitu buněk jsme volili tak, aby byl po nejkratším časovém intervalu inkubace 24 hodin dostatečný počet buněk v jamce a zároveň aby i po delší době inkubace 48 hodin nebylo v jamce příliš velké množství buněk a hodnoty absorbance nebyly příliš vysoké. Pro naše experimenty jsme zvolili denzitu 20 tis. buněk Jurkat na jamku. Nasazená denzita buněk v jamce se u dalších autorů liší, někteří nasazovali do 96jamkové destičky 100 tis. buněk na jamku pro inkubaci v časovém intervalu 24 hodin, životaschopnost buněk Jurkat v tomto případě hodnotili pomocí metabolického testu využívajícího alamarovou modř (*Wingett et al., 2016*). *Vaitkuvienė et al.* nasazovali do 96jamkové destičky 60 tis., 600 tis. a 1 mil. buněk Jurkat na jamku pro inkubaci s NPs v časovém intervalu 24 hodin a životaschopnost buněk hodnotili pomocí WST-1 testu (*Vaitkuvienė et al., 2013*). Jiní autoři nasazovali do 6jamkové destičky 1 mil. buněk Jurkat a časový interval inkubace zvolili do 72 hodin (*Hadidi et al., 2012*). Právě rozdíly v počtu nasazených buněk mohou být významným faktorem v porovnání výsledků mezi experimenty provedenými různými týmy vědců.

Cílem diplomové práce bylo testovat možnou cytotoxicitu nanomateriálů pomocí bioanalytických metod. Dehydrogenázovou aktivitu buněk Jurkat po inkubaci s NMs jsme stanovovali pomocí WST-1 testu, který vykazuje nízkou cytotoxicitu a jeho provedení je také rychlejší a citlivější než MTT test (*Kim et al., 2016*). Stanovení životaschopnosti buněk kolorimetrickým testem WST-1 využívají i jiné studie. Ve studiích ale převažuje použití MTT testu nad jinými formazanovými testy (*Zeinabad et al., 2016; Yu et al., 2017; Murugadoss et al., 2020; Brzicova et al., 2019*). Dále jsme fluorimetricky detekovali intracelulární koncentraci GSH pomocí optimalizovaného MCB testu (*Čapek et al., 2017*). V jiných studiích stanovovali koncentraci GSH např. pomocí metody enzymatické reakce mezi GSH a 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoovou kyselinou), kde výsledkem je glutathiondisulfid a žlutě zbarvený produkt (kyselina nitro-5-thiobenzoová). Intracelulární koncentrace GSH se poté stanovovala spektrofotometricky při 412 nm (*Reddy et al., 2010; Wang et al., 2011*). GSH je hlavním rozpustným antioxidantem v buňkách a účastní se např. detoxikace peroxidu vodíku a peroxidů lipidů za katalýzy GSH-peroxidázy. Narušená rovnováha mezi antioxidanty

a reaktivními formy kyslíku (ROS), způsobená buď vyčerpáním antioxidantů nebo akumulací ROS, vede k oxidačnímu stresu (*Dalton et al., 1999*). Důležitým determinantem u oxidačního stresu je poměr mezi redukováním a oxidováním GSH. Vyšší produkce velice reaktivních ROS může změnit strukturu DNA, vést k modifikaci proteinů a lipidů nebo produkci prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů. Nízká koncentrace GSH tak může být spojena s poškozením buněk (*Birben et al., 2012; Shang et al., 2003*). Výsledky bioanalytických testů jsme vztahovali ke kontrolním buňkám, které nebyly inkubovány s žádným z vybraných NMs. Dalším důležitým parametrem hodnoceným při posuzování toxicity NMs je případná změna morfologie buněk po inkubaci s NMs (*Vaitkuvienė et al., 2013*). Pod invertovaným mikroskopem jsme pozorovali vliv TiO₂ nanočástic a uhlíkových nanotrubiček na buněčnou morfologii po 48 hodinách inkubace s buňkami Jurkat.

První dvojicí zvolených NMs byly TiO₂ nanočástice P25 a rutil v rozmezí koncentrací 0-500 µg/mL. Naším cílem bylo porovnání komerčně dodávaných TiO₂ P25, tedy směsi krystalické formy rutilu a anatas, a nanočástic TiO₂ v samostatné krystalické formě rutil.

Naše výsledky neukázaly žádné signifikantní snížení dehydrogenázové aktivity buněk Jurkat po 24hodinové inkubaci s nanočásticemi u žádné z testovaných koncentrací 0-500 µg/mL, což je v souladu s výsledky nedávné studie. Tato studie hodnotila toxicitu TiO₂ NPs na buňkách Jurkat, nanočástice v rozmezí koncentrací 10 až 200 µg/mL neindukovaly pokles životaschopnosti buněk stanovené testem WST. Nejenom, že v této studii autoři nedetekovali snížení životaschopnosti buněk Jurkat inkubovaných s TiO₂ NPs, ale po 48 hodinách inkubace se životaschopnost buněk překvapivě zvýšila. Autoři uvádějí, že TiO₂ NPs mají příznivý vliv na životaschopnost buněk Jurkat (*Fadheela et al., 2020*). V našem experimentu jsme detekovali významný pokles dehydrogenázové aktivity buněk inkubovaných 48 hodin s 500 µg/mL TiO₂ rutil NPs. *Tong et al.* nezaznamenali žádný cytotoxický efekt u buněk Jurkat inkubovaných 20 hodin s TiO₂ NPs v krystalické formě rutil a anatas o koncentraci do 100 µg/mL. V této studii byla cytotoxicita stanovená testem MTT (*Tong et al., 2008*). Výsledky této studie jsou dobře srovnatelné s výsledky, které jsme získali po kultivaci buněk Jurkat s nanočásticemi TiO₂ P25 po 24 hodinách.

Jelikož jsme nedetekovali signifikantní snížení dehydrogenázové aktivity buněk Jurkat inkubovaných s TiO₂ NPs P25 a rutil ani v jedné testované koncentraci, předpokládáme, že tyto NPs neměly významný vliv na životaschopnost buněk Jurkat. Nicméně tyto NPs v koncentraci větší než 100 µg/mL indukovaly depleci intracelulární koncentrace GSH, z čehož předpokládáme, že TiO₂ NPs mohou zapříčiňovat u buněk Jurkat oxidační stres.

Vzhledem k tomu, že existuje málo studií nanotoxicity provedených na buňkách Jurkat, jsou dále diskutovány studie provedené i na jiných buněčných liniích. *Gea et al.* provedli experiment, ve kterém hodnotili pomocí testu WST-1 životaschopnost plicních buněk BEAS-2B po 24hodinové expozici komerčně dodávanými TiO₂ P25 NPs v koncentracích 5, 10, 20, 50 a 80 µg/mL. V tomto experimentu nebylo zjištěno žádné významné snížení životaschopnosti, což koreluje s našimi získanými výsledky (*Gea et al., 2019*).

Zjistili jsme, že se zvyšující se koncentrací TiO₂ NPs se snižuje koncentrace GSH v buňkách Jurkat, což by mohlo souviset se shlukováním NPs ve vyšších koncentracích. Autoři nedávné studie prokázali, že po 24hodinové inkubaci způsobily agregáty TiO₂ NPs v koncentraci 4 až 256 µg/mL depleci GSH v buňkách, a to především u monocytární buněčné linie THP-1, která se také jako buňky Jurkat řadí mezi suspenzní buněčné linie (*Murugadoss et al., 2020*).

Některé studie uvádějí, že krystalická forma nanočástic TiO₂ rutil vykazuje nižší cytotoxické účinky než krystalická forma anatas (*Wilson et al., 2015; De Matteis et al., 2016*). To je v rozporu s našimi provedenými experimenty, ve kterých TiO₂ rutil NPs indukovaly větší pokles intracelulární koncentrace GSH po 24 a 48 hodinách inkubace a po 48 hodinách inkubace v nejvyšší testované koncentraci také pokles životaschopnosti buněk v porovnání s TiO₂ P25 NPs, které obsahují směs anatasu a rutilu. Na druhé straně ve studii *Male et al.*, nanočástice TiO₂ rutil inkubované 3, 6 a 24 hodin vykazovaly větší toxický účinek na plicní fibroblastické buňky V79 ve srovnání se vzorky anatasu. Zároveň autoři uvedli, že toxicita TiO₂ NPs je závislá na použité buněčné linii (*Male et al., 2013*). Po 24 hodinách inkubace byla koncentrace 30 až 40 µg/mL TiO₂ anatasu NPs zjištěna jako toxická pro lidské keratinocyty HaCaT a lidské plicní buňky A549 (*Horie et al., 2010*), zatímco koncentrace 100 µg/mL TiO₂ NPs ve směsi anatas/rutil neindukovala cytotoxicitu u buněk Jurkat po 20hodinové inkubaci (*Tong et al., 2008*).

Uhlíkové nanotrubičky se rozdělují na základě počtu vrstev, ze kterých jsou složeny, na jednostěnné SWCNTs a mnohostěnné MWCNTs (*Kumarathan et al., 2014*). Uhlíkové nanotrubičky se uplatňují v mnoha odvětvích, nejvíce v nanotechnologii, optice, elektronice, textilním průmyslu, biologii nebo medicíně. Jelikož jsou uhlíkové nanotrubičky ohnivzdorné, v textilním průmyslu se používají například na výrobu ohnivzdorných oděvů (*Shahidi et al., 2018*). Dále se uhlíkové nanotrubičky používají jako biosenzory nebo ultrazvukové kontrastní látky. Uhlíkové nanotrubičky se do těla dostávají vdechnutím, požitím, přes sliznice nebo kontaktem s kůží. Jejich toxicita se sleduje především na plicních buňkách, jako jsou například buňky A549 (*Liu et al., 2013; Bussy et al., 2013; Davoren et al., 2007*).

I přes to existují studie o nepříznivém účinku uhlíkových nanotrubiček na krevní buňky a obecně na celý kardiovaskulární systém (Liu *et al.*, 2013). Nicméně můžeme nalézt jen málo studií týkajících se testování uhlíkových nanotrubiček na suspenzních buněčných liniích. Proto jsme testovali cytotoxicitu SWCNTs a MWCNTs na buňkách Jurkat. MWCNTs se ve studiích používají jako srovnávací NMs a pozitivní kontroly, což byl také další důvod, proč jsme je vybrali do našich experimentů (Ghitescu *et al.*, 2018; Abdelgied *et al.*, 2019). Právě tyto dvě formy uhlíkových nanotrubiček jsou často porovnávány ve studiích zabývajících se jejich cytotoxicitou na různých buněčných liniích, např. buněčné linii Jurkat, plicních buňkách A549 a BEAS-2B nebo lidských makrofázích RAW 264.7 (De Nicola *et al.*, 2008; Wadhwa *et al.*, 2011; Khaliullin *et al.*, 2015). Bylo prokázáno, že SWCNTs a MWCNTs jsou toxické pro buňky, ale liší se svými mechanismy účinku (Khaliullin *et al.*, 2015).

Do experimentů jsme zvolili koncentrace 0-500 $\mu\text{g/mL}$ SWCNTs a MWCNTs. Koncentrace 1 a 10 $\mu\text{g/mL}$ SWCNTs i MWCNTs neindukovaly pokles dehydrogenázové aktivity buněk Jurkat po obou časových intervalech inkubace. Signifikantní pokles dehydrogenázové aktivity jsme detekovali u koncentrace 100 $\mu\text{g/mL}$ SWCNTs a MWCNTs inkubovaných 24 a 48 hodin s buňkami Jurkat. S rostoucí koncentrací uhlíkových nanotrubiček docházelo k ještě většímu poklesu dehydrogenázové aktivity buněk Jurkat oproti kontrolním buňkám. Což je v souladu s výsledky studie, kde porovnávali tyto dvě formy uhlíkových nanotrubiček o koncentraci 25 a 100 $\mu\text{g/mL}$ na buňkách Jurkat inkubovaných 24 až 72 hodin testem vyloučení trypanové modři (De Nicola *et al.*, 2008).

Po 24 hodinách inkubace buněk Jurkat se SWCNTs jsme zaznamenali trend, kdy se zvyšující se koncentrací SWCNTs docházelo k postupnému snižování dehydrogenázové aktivity u buněk, což je v souladu s výstupem experimentu Hadidi *et al.*, ve kterém autoři inkubovali buňky Jurkat 24, 48 a 72 hodin s koncentracemi SWCNTs v rozmezí 10-300 $\mu\text{g/mL}$. K detekci životaschopnosti buněk po 24, 48 a 72 hodinách inkubace byl použit test vyloučení trypanové modři, byla hodnocena buněčná proliferace a počet životaschopných buněk byl stanoven počítáním buněk v Neubauerově hemocytometru (Hadidi *et al.*, 2012).

Zatímco v našich experimentech jsme k hodnocení životaschopnosti buněk Jurkat po expozici SWCNTs a MWCNTs použili WST-1 test, jiné studie detekovali životaschopnost například pomocí MTT testu (Davoren *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2013; Zeinabad *et al.*, 2016).

U buněk Jurkat inkubovaných se 100 a 200 $\mu\text{g/mL}$ MWCNTs jsme zaznamenali pokles dehydrogenázové aktivity po 24 hodinách inkubace, přičemž po 48 hodinách inkubace se dehydrogenázová aktivita naopak mírně zvýšila. Tento trend byl zaznamenán i v jiném experimentu, ve kterém inkubovali lymfocyty z periferní krve zdravých dárců s MWCNTs

v koncentracích do 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Životaschopnost buněk byla v této studii stanovena pomocí WST-1 testu. Autoři ale blíže nevysvětlují, proč se ve srovnání s 24hodinovou inkubací dehydrogenázová aktivita po 48 hodinách inkubace s MWCNTs zvýšila (Kim et al., 2016).

Zajímavé je, že po 24hod inkubaci buněk Jurkat s MWCNTs vykazovaly větší pokles dehydrogenázové aktivity, zatímco po 48hodinové inkubaci SWCNTs způsobily větší snížení životaschopnosti buněk. Pokles intracelulární koncentrace GSH ve srovnání s kontrolními buňkami jsme detekovali u koncentrace 1 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MWCNTs inkubovaných pouze 24 hodin s buňkami Jurkat. Zatímco koncentrace v rozmezí 100-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MWCNTs inkubované s buňkami Jurkat v obou časových intervalech indukovaly signifikantní depleci intracelulární koncentrace GSH, což potvrzuje i studie De Nicola et al., kteří toxicitu MWCNTs spojují s přítomností velkých agregátů (De Nicola et al., 2013). Výskyt shluků jsme pozorovali také ve fázovém kontrastu v případě 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MWCNTs po 48hodinách inkubace s buňkami Jurkat.

Z našich výsledků vyvozujeme, že MWCNTs inkubované s buňkami Jurkat způsobují větší depleci intracelulární koncentrace GSH závislou na čase v porovnání se SWCNTs. Koncentrace 5, 10 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MWCNTs inkubované 24, 48 a 72 hodin s plicními buňkami A549 indukovaly pokles koncentrace GSH detekovaného luminiscenčním testem. Deplece koncentrace GSH se prohlubovala s narůstající koncentrací a s časem inkubace. Výstup z tohoto experimentu se shoduje s námi detekovanými koncentracemi GSH u nízkých koncentrací MWCNTs (Patel et al., 2012). Výsledky jedné studie ukázaly, že po 24 hodinách inkubace buněk s 0,11 mg/mL SWCNTs a MWCNTs, indukovaly větší pokles životaschopnosti plicních buněk A549 právě MWCNTs ve srovnání se SWCNTs. Změna životaschopnosti buněk A549 byla detekována testem MTT (Wadhwa et al., 2011). Obecně z těchto studií vyplývá, že SWCNTs a MWCNTs ovlivňují životaschopnost buněk již po 24hodinové inkubaci s různými buněčnými liniemi. Některé studie uvádějí větší cytotoxicitu MWCNTs v porovnání se SWCNTs (Wadhwa et al., 2011), což koreluje s našimi výsledky dehydrogenázové aktivity po 24 hodinách inkubace uhlíkových nanotrubiček s buňkami Jurkat. Existují studie, které tvrdí, že SWCNTs jsou mnohem toxičtější než MWCNTs (Jia et al., 2005). Větší cytotoxicitu SWCNTs ve srovnání s MWCNTs jsme zaznamenali při detekci dehydrogenázové aktivity buněk Jurkat po 48hodinové inkubaci.

V závěru naší práce jsme hodnotili morfologii buněk Jurkat po expozici vybraným NMs pod invertovaným mikroskopem ve fázovém kontrastu. Pro posouzení vlivu NMs na morfologii buněk při mikroskopické analýze jsme zvolili koncentrace 10 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a inkubační doba byla 48 hodin. Tyto koncentrace jsou nejčastěji testovány v souvislosti s cytotoxicitou TiO_2

NPs i uhlíkových nanotrubiček (*Gea et al., 2019; Wadhwa et al., 2011; Kim et al., 2016*). Mikroskopické snímky z fázového kontrastu ukázaly rozptýlení NMs mezi buňkami Jurkat v kultivačním médiu.

Při mikroskopickém pozorování buněk jsme nepozorovali žádné výrazné změny v morfologii buněk po inkubaci s TiO₂ NPs. Žádné významné poškození buněk také nebylo detekováno WST-1 testem. U kontrolních buněk jsme pozorovali shluky charakteristické pro buněčnou linii Jurkat, zatímco u inkubace buněk s NMs se jednalo o samostatné buňky a shluky nebyly přítomny. Především u koncentrace 100 µg/mL TiO₂ NPs P25 a rutil byly buňky špatně pozorovatelné, jelikož TiO₂ NPs buňky Jurkat překrývaly. U uhlíkových nanotrubiček jsme toto převrstvení buněk nepozorovali. U buněk Jurkat inkubovaných se 100 µg/mL SWCNTs a MWCNTs jsme pozorovali mírné poškození buněk, což koreluje s výsledky dehydrogenázové aktivity, která byla snížena ve srovnání s kontrolními buňkami. SWCNTs a MWCNTs mohou při kultivaci tvořit větší či menší shluky kvůli jejich geometrii a hydrofobnímu povrchu. Tvorba takovýchto shluků může ovlivnit jejich cytotoxicitu (*De Nicola et al., 2013; Wick et al., 2007*).

Jestliže na závěr porovnáme vliv TiO₂ NPs (P25 a rutil) a uhlíkové nanotrubičky (SWCNTs a MWCNTs) na buňky Jurkat, větší cytotoxické účinky jsme zaznamenali v případě uhlíkových nanotrubiček, což může být způsobeno jejich odlišným tvarem ve srovnání s nanočásticemi. V této chvíli nejsou studie zabývající se současně porovnáním cytotoxicity nanočástic a nanotrubiček na buňkách Jurkat, a proto je možné diskutovat jejich cytotoxicitu na jiných buněčných liniích. Ve studii porovnávající zároveň TiO₂ NPs ve směsi rutil a anatas a uhlíkové nanotrubičky došli autoři k závěru, že oba testované nanomateriály inkubované s plicními buňkami A549 jsou cytotoxické. Nejnižší testovaná koncentrace 1 µg/mL uhlíkových nanotrubiček indukovala výraznější poškození DNA než TiO₂ NPs (*Karlsson et al., 2008*). V další studii porovnávající anorganické NPs, do kterých zahrnuli TiO₂ NPs, a MWCNTs autoři také použili plicní buňky A549. Cytotoxicita nanomateriálů na buňkách A549 byla hodnocena po 6 a 24 hodinách inkubace pomocí testu MTT. Výsledky studie ukázaly větší cytotoxicitu indukovanou MWCNTs ve srovnání s NPs, což je v souladu s našimi získanými výsledky (*Simon-Deckers et al., 2008*).

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce byla optimalizace denzit kultivace suspenzní buněčné linie Jurkat pro testování toxicity nanomateriálů, dále testování vybraných NMs za účelem zjištění jejich možné cytotoxicity ve vztahu k jejich koncentraci a době inkubace. K charakterizaci toxického účinku jsme využili bioanalytické a mikroskopické metody.

Pro testování jsme zvolili TiO₂ nanočástice (P25 a rutil) a uhlíkové nanotrubičky (SWCNTs a MWCNTs) v rozmezí koncentrací 0-500 µg/mL. Všechny experimenty jsme hodnotili po 24 a 48 hodinách inkubace buněk Jurkat s NMs.

Při testování cytotoxicity jsme detekovali, že TiO₂ NPs P25 a rutil o koncentraci větší než 10 µg/mL snižují koncentraci hlavního buněčného antioxidantu GSH, ale žádná testovaná koncentrace nemá statisticky významný vliv na životaschopnost buněk Jurkat. TiO₂ rutil NPs způsobují ve vyšších koncentracích větší depleci intracelulárního GSH než TiO₂ P25 NPs.

SWCNTs a MWCNTs způsobují pokles životaschopnosti buněk Jurkat již o koncentraci 100 µg/mL a vyšší. Po 24 hodinách inkubace buněk s koncentracemi 10-500 µg/mL MWCNTs jsme detekovali signifikantní pokles intracelulární koncentrace GSH, zatímco po 48hodinové inkubaci jsme zaznamenali statisticky významný pokles pouze u koncentrací 100 až 500 µg/mL MWCNTs. Větší depleci intracelulárního GSH indukovaly MWCNTs v porovnání se SWCNTs.

Závěrem lze shrnout, že SWCNTs a MWCNTs vyvolaly větší cytotoxický efekt na buňkách Jurkat. Buňky Jurkat po inkubaci se SWCNTs a MWCNTs vykazovaly nižší životaschopnost a intracelulární koncentraci glutathionu ve srovnání s inkubací s nanočásticemi TiO₂ P25 a rutil.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Abdelgied, M.; El-Gazzar, A. L.; Alexander, D. B. *et al.* Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats. *Archives of Toxicology*. 2019, 93, str. 909-920.
2. Alqahtani, S.; Promtong, P.; Oliver, A. W. *et al.*: Silver nanoparticles exhibit size-dependent differential toxicity and induce expression of syncytin-1 in FA-AML1 and MOLT-4 leukaemia cell lines. *Mutagenesis*. 2016, 31, str. 695-702.
3. Ansarin, K.; Khoubnasabjafari, M. and Jouyban, A.: Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *BioImpacts*. 2015, 5, str. 123-127.
4. Audiffred, J. F.; De Leo, S. E.; Brown, P. K. *et al.*: Characterization and applications of serum-free induced adhesion in jurkat suspensions cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 6, str. 784-793.
5. Avalos, A.; Haza, A. I.; Mateo, D. *et al.*: Cytotoxicity and ROS production of manufactured silver nanoparticles of different sizes in hepatoma and leukemia cells. *Journal of Applied Toxicology*. 2014, 34, str. 413-423.
6. Ávalos, A.; Haza, A. I.; Mateo, D. *et al.*: *In vitro* and *in vivo* genotoxicity assessment of gold nanoparticles of different sizes by comet and SMART assays. *Food and Chemical Toxicology*. 2018, 120, str. 81-88.
7. Bäckström, A.; Kugel, L.; Gnann, Ch. *et al.*: A sample preparation protocol for high throughput immunofluorescence of suspension cells on an adherent surface. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2020, 68, str. 473-489.
8. Bahadar H.; Maqbool, F.; Niaz K. *et al.*: Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models. *Iran Biomed Journal*. 2016, 20, str. 1-11.
9. Barbasz, A.; Oćwieja, M. and Roman, M.: Toxicity of silver nanoparticles towards tumoral human cell lines U-937 and HL-60. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*. 2017, 156, str. 397-404.
10. Barbasz, A.; Oćwieja, M.; Piergies, N. *et al.*: Antioxidant-modulated cytotoxicity of silver nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology*. 2021, 41, str. 1863-1878.
11. Birben, E.; Sahiner, U. M.; Sackesen, C. *et al.*: Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*. 2012, 5, str. 9-19.

12. Bloemberg, D.; Nguyen, T.; MacLean, S. *et al.*: A high-throughput method for characterizing novel chimeric antigen receptors in Jurkat cells. *Methods & Clinical Development*. 2020, 16, str. 238-254.
13. Boonrungsiman, S.; Suchaoin, W.; Chetprayoon, P. *et al.*: Shape and surface properties of titanate nanomaterials influence differential cellular uptake behavior and biological responses in THP-1 cells. *Biochemistry ad Biophysics Reports*. 2017, 9, str. 203-210.
14. Brzicova, T.; Javorkova, E.; Vrbova, K. *et al.*: Molecular responses in THP-1 macrophage-like cells exposed to eiverse nanoparticles. *Nanomaterials*. 2019, 9, str. 1-19
15. Bussy, C.; Methven, L. and Kostarelos, K.: Hemotoxicity of carbon nanotubes. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013, 65, str. 2127-2134.
16. Cao, X.; Kwek, K.; Chan, J. K. Y. *et al.*: Electrospun nanofibers as a bioadhesive platform for capturing adherent leukemia cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2014, 102, str. 523-531.
17. Caputo, F.; De Nicola, M.; Sienkiewicz, A. *et al.*: Cerium oxide nanoparticles, combining antioxidant and UV shielding properties, prevent UV-induced cell damage and mutagenesis. *Nanoscale*. 2015, 7, str. 15643-15656.
18. Carson, C. T.; Emre, N.; McIntyre, C. *et al.*: Cellular therapies. *Comprehensive Biotechnology*. 2011, 3, str. 411-424.
19. Czyżowska, A.; Dyba, B.; Rudolphi-Szydło, E. *et al.*: Structural and biochemical modifications of model and native membranes of human immune cells in response to the action of zinc oxide nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology*. 2021, 41, str. 458-469.
20. Čapek, J.; Hauschke, M.; Brůčková, L. *et al.*: Comparison of glutathione levels measured using optimized monochlorobimane assay with those from ortho-phthalaldehyde assay in intact cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2017, 88, str. 40-45.
21. Dalton, T. P.; Shertzer, H. G. and Puga, A.: Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1999, 39, str. 67-101.
22. Davoren, M.; Herzog, E.; Casey, A. *et al.*: *In vitro* toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicology in Vitro*. 2007, 21, str. 438-448.

23. De Matteis, V.; Cascione, M.; Brunetti, V. *et al.*: Toxicity assessment of anatase and rutile titanium dioxide nanoparticles: The role of degradation in different pH conditions and light exposure. *Toxicology in Vitro*. 2016, 37, str. 201-210.
24. De Nicola, M.; Bellucci, S.; Traversa, E. *et al.*: Carbon nanotubes on Jurkat cells: effects on cell viability and plasma membrane potential. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2008, 20, str. 1-10.
25. De Nicola, M.; Mirabile Gattia, D.; Traversa, E. *et al.*: Maturation and demise of human primary monocytes by carbon nanotubes. *Journal of Nanoparticle Research*. 2013, 15, str. 1-15.
26. Egbuna, Ch.; Parmar, V. K.; Jeevanandam, J. *et al.*: Toxicity of nanoparticels in biomedical application: nanotoxicology. *Journal of Toxicology*. 2021, 2021, str. 1-21.
27. Eklund, B. I.; Edalat, M.; Stenberg, G. *et al.*: Screening for recombinant glutathione transferases active with monochlorobimane. *Analytical Biochemistry*. 2002, 309, str. 102-108.
28. Eom, H.-J. and Choi, J.: p38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanism of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells. *Environmental Science & Technology*. 2010, 44, str. 8337-8342.
29. Eom, H.-J.; Chatterjee, N.; Lee, J. *et al.*: Integrated mRNA and micro RNA profiling reveals epigenetic mechanism of differential sensitivity of Jurkat T cells to AgNPs and Ag ions. *Toxicology Letters*. 2014, 229, str. 311-318.
30. Fadheela, A.-S.; Ali, A R.; Hawraa, A.-S. *et al.*: Toxicity evaluation of TiO₂ nanoparticles embedded in toothpaste products. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*. 2020, 12, str. 102-115.
31. Frank, M. and Hester, C. G.: Immune complex-mediated diseases. *Middleton's Allergy. Elsevier*, 2014, 2014, str. 601-616.
32. Garcia-Diosa, J. A.; Gonzalez-Orive, A.; Grundemeier, G. *et al.*: Influence of thickness, homogeneity, and morphology of TiO₂-m nanoparticle coatings on cancer cell adhesion. *Surface and Coatings Technology*. 2021-a, 427, str. 1-8.
33. Garcia-Diosa, J. A.; Gonzalez-Orive, A.; Weinberger, Ch. *et al.*: TiO₂ nanoparticle coatings on glass surfaces for the selective trapping of leukemia cells from peripheral blood. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2021-b, 109, str. 2142-2153.

34. Gea, M.; Bonetta, S. Iannarelli, L. *et al.*: Shape-engineered titanium dioxide nanoparticles (TiO₂-NPs): cytotoxicity and genotoxicity in bronchial epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2019, 127, str. 89-100.
35. Gehr, P.: Interaction of nanoparticles with biological systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2018, 172, str. 395-399.
36. Ghitescu, R.-E.; Popa, A. M.; Schipanski, A. *et al.* Catechin loaded PLGA submicron-sized fibers reduce levels of reactive oxygen species induced by MWCNT *in vitro*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018, 122, str. 78-86.
37. Ghosh, M.; Chakraborty, A. and Mukherjee, A.: Cytotoxic, genotoxic and the hemolytic effect of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on human erythrocyte and lymphocyte cells *in vitro*. *Journal of Applied Toxicology*. 2013, 33, str. 1097-1110.
38. Gómez, D. M.; Urcuqui-Inchima, S. and Hernandez, J. C.: Silica nanoparticles induce NLRP3 inflammasome activation in human primary immune cells. *Innate Immunity*. 2017, 23, str. 697-708.
39. Gouma, P. I. and Mills, M. J.: Anatase-to-Rutile Transformation in titania powders. *Journal of the American Ceramic Society*. 2001, 84, str. 619-622.
40. Grabowski, N.; Hillaireau, H.; Vergnaud, J. *et al.*: Surface coating mediates the toxicity of polymeric nanoparticles towards human-like macrophages. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015, 482, str. 75-83.
41. Gümüş, D.; Berber, A. A.; Ada, K. *et al.*: *In vitro* genotoxic effects of ZnO nanomaterials in human peripheral lymphocytes. *Cytotechnology*. 2014, 66, str. 317-325.
42. Hadidi, N.; Hosseini Shirazi, S. F.; Kobarfard, F. *et al.*: Evaluation of the effect of PEGylated single-walled carbon nanotubes on viability and proliferation of Jurkat cells. *Iranian journal of pharmaceutical research*. 2012, 11, str. 27-37.
43. Haleem, A. M.; Abbas, R. H.; Jawad, M. A. *et al.*: Cytotoxic effects of titanium dioxide nanoparticles synthesized by laser technique on peripheral blood lymphocytes and Hep-2 cell line. *Toxicology and Environmental Health Sciences*. 2019, 11, str. 219-225.
44. Harberts, J.; Zierold, R.; Fendler, C. *et al.*: Culturing and patch clamping of Jurkat T cells and neurons on Al₂O₃ coated nanowire arrays of altered morphology. *RSC Advances*. 2019, 9, str. 11194-11201.

45. Horie, M; Nishio, K.; Fujita, K. *et al.*: Cellular responses by stable and uniform ultrafine titanium dioxide particles in culture-medium dispersions when secondary particle size was 100 nm or less. *Toxicology in Vitro*. 2010, 24, str. 1629-1638.
46. Chatterjee, N.; Eom, H. J. and Choi, J.: Effects of silver nanoparticles on oxidative DNA damage – repair as a function of p38 MAPK status: A comparative approach using human Jurkat T cells and the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2014, 55, str. 122-133.
47. Chattopadhyay, S.; Dash, K. S.; Kar Mahapatra, S. *et al.*: Chitosan-modified cobalt oxide nanoparticles stimulate TNF- α -mediated apoptosis in human leukemic cells. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2014, 19, str. 399-414.
48. Chen, L.; Liu, J.; Zhang, Y. *et al.*: The toxicity of silica nanoparticles to the immune system. *Nanomedicine*. 2018, 13, str. 1939-1962.
49. Jafari, S.; Mahyad, B.; Hashemzadeh, H. *et al.*: Biomedical applications of TiO₂ nanostructures: Recent advances. *International Journal of Nanomedicine*. 2020, 15, str. 3447-3470.
50. Jia, G.; Wang, H.; Yan, L. *et al.*: Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall, Multi-wall nanotube, and fullerene. *Environmental Science & Technology*. 2005, 39, str. 1378-1383.
51. Joo, K.-M.; Kim, S.; Koo, Y. J. *et al.*: Development and validation of UPLC method for WST-1 cell viability assay and its application to MCTT HCETM eye irritation test for colorful substances. *Toxicology in Vitro*. 2019, 60, str. 412-419.
52. Kang, K.; Jung, H. and Lim, J.-S.: Cell death by polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles is mediated by ROS-dependent signaling. *Biomolecules Therapeutics*. 2012, 20, str. 399-405.
53. Karlsson, H. L.; Cronholm, P.; Gustafsson, J. *et al.*: Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical Research in Toxicology*. 2008, 21, str. 1726-1732.
54. Kazimirova, A.; Baranokova, M.; Staruchova, M. *et al.*: Titanium dioxide nanoparticles tested for genotoxicity with the comet and micronucleus assays *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2019, 843, str. 57-65.
55. Khaliullin, T. O.; Fatkhutdinova; L. M.; Zalyalov, R. R. *et al.*: *In vitro* toxic effects of different types of carbon nanotubes. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2015, 98, str. 1-7.

56. Khlusov, I. A.; Sharkeev, Y. P.; Pichugin, V. F. *et al.*: Influence of the structure of the titanium oxide coating surface on immunocompetent tumor cells. *Russian Physics Journal*. 2016, 58, str. 1527-1533.
57. Kim, J. S.; Song, K. S. and Yu, I. J.: Multiwall carbon nanotube-induced DNA damage and cytotoxicity in male human peripheral blood lymphocytes. *International Journal of Toxicology*. 2016, 35, str. 27-37.
58. Kim, T.; Lee, H.; Kim, Y. *et al.*: Protein-coated nanofibers for promotion of T cell activity. *Chemical Communications*. 2013, 49, str. 3949-3951.
59. Kongseng, S.; Yoovathaworn, K.; Wongprasert, K. *et al.*: Cytotoxic and inflammatory responses of TiO₂ nanoparticles on human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Applied Toxicology*. 2016, 36, str. 1364-1373.
60. Kozelskaya, A. I.; Panin, A. V.; Khlusov, I. A. *et al.*: Morphological changes of the red blood cells treated with metal oxide nanoparticles. *Toxicology in Vitro*. 2016, 37, str. 34-40.
61. Kumar, V.; Sharma, N. and Maitra, S. S.: *In vitro* and *in vivo* toxicity assessment of nanoparticles. *International Nano Letters*. 2017, 7, str. 243-256.
62. Kumarathanan, P.; Breznan, D.; Das, D. *et al.*: Cytotoxicity of carbon nanotube variants: A comparative *in vitro* exposure study with A549 epithelial and J774 macrophage cells. *Nanotoxicology*. 2014, 9, str. 148-161.
63. Larsen, T. S.; Jackson, P.; Poulsen, S. S. *et al.*: Airway irritation, inflammation, and toxicity in mice following inhalation of metal oxide nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2016, 10, str. 1254-1262.
64. Laux, P.; Tentschert, J.; Riebeling, Ch. *et al.*: Nanomaterials: certain aspects of application, risk assessment and risk communication. *Archives of Toxicology*. 2018, 92, str. 121-141.
65. Lehman, S. E.; Morris, A. S.; Mueller, P. S. *et al.*: Silica nanoparticle-generated ROS as a predictor of cellular toxicity: mechanistic insights and safety by design. *Environmental Science: Nano*. 2016, 3, str. 56-66.
66. Li, L.; Du, J.; Lian, Y. *et al.*: Protective effect of coenzyme Q10 against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in PC12 cell: The role of Nrf2 and antioxidant enzymes. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2016-a, 36, str. 103-111.
67. Li, Q.; Huth, S.; Adam, D. *et al.*: Reinforcement of integrin-mediated T-lymphocyte adhesion by TNF-induced inside-out signaling. *Scientific Reports*. 2016-b, 6, str. 1-10.

68. Li, X.; Tang, L.; Thu, Y. M. *et al.*: Titanium ions play a synergetic role in the activation of NLRP3 inflammasome in Jurkat T cells. *Inflammation*. 2020, 43, str. 1269-1278.
69. Liu, Y.; Zhao, Y.; Sun, B. *et al.*: Understanding the toxicity of carbon nanotubes. *Accounts of Chemical Research*. 2013, 46, str. 702-713.
70. Liu, Z.; Chen, F. and Lu, Z.: Biofabrication of zinc oxide nanoparticles, characterization and cytotoxicity against pediatric leukemia cell lines. *Green Processing and Synthesis*. 2019, 9, str. 56-62.
71. Madhubala, V.; Pugazhendhi, A.; Thirunavukarasu, K. *et al.*: Cytotoxic and immunomodulatory effects of the low concentration of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) on human cell lines – An *in vitro* study. *Process Biochemistry*. 2019, 86, str. 186-195.
72. Male, K. B.; Hamzeh, M.; Montes, J. *et al.*: Monitoring of potential cytotoxic and inhibitory effects of titanium dioxide using on-line and non-invasive cell-based impedance spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*. 2013, 777, str. 78-85.
73. Matsui, Y.; Sakai, N.; Tsuda, A. *et al.*: Relationship between surface modifications of nanoparticle and invasion into suspension cells. *Journal of Physics: Conference Series*. 2011, 304, str. 1-9.
74. McNamara, A. L.; Kam, W. W. Y.; Scales, N. *et al.*: Dose enhancement effects to the nucleus and mitochondria from gold nanoparticles in the cytosol. *Physics in Medicine and Biology*. 2016, 61, str. 5993-6010.
75. Mendoza, A.; Torres-Hernandez, J. A.; Ault, J. G. *et al.*: Silica nanoparticles induce oxidative stress and inflammation of human peripheral blood mononuclear cells. *Cell Stress Chaperons*. 2014, 19, str. 777-790.
76. Mohammadpour, R. and Ghandehari, H.: Mechanisms of immune response to inorganic nanoparticles and their degradation products. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2022, 180, article 114022.
77. Moore, T. L.; Urban, D. A.; Rodriguez-Lorenzo, L. *et al.*: Nanoparticle administration method in cell culture alters particle-cell interaction. *Scientific Reports*. 2019, 9, str. 1-9.
78. Mu, Q.; Jiang, G., Chen, L. *et al.*: Chemical basis of interactions between engineered nanoparticles and biological systems. *Chemical Reviews*. 2014, 114, str. 7740-7781.
79. Murugadoss, S.; Brassinne, F.; Sebaihi, N. *et al.*: Agglomeration of titanium dioxide nanoparticles increases toxicological responses *in vitro* and *in vivo*. *Particle and Fibre Toxicology*. 2020, 17, str. 1-14.

80. Nga, N. T. H.; Ngoc, T. T. B.; Trinh, T. L. *et al.*: Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. *Analytical Biochemistry*. 2020, 610, str. 1-11.
81. Parnsamut, C. and Brimson, S.: Effects of silver nanoparticles and gold nanoparticles on IL-2, IL-6, and TNF- α production via MAPK pathway in leukemic cell lines. *Genetics and Molecular Research*. 2015, 14, str. 3650-3668.
82. Patel, H. and Kwon, S.: Multi-walled carbon nanotube-induced inflammatory response and oxidative stress in a dynamic cell growth environment. *Journal of Biological Engineering*. 2012, 6, str. 1-9.
83. Patel, S.; Patel, P. and Bakshi, S. R.: Titanium dioxide nanoparticles: an *in vitro* study of DNA binding, chromosome aberration assay, and comet assay. *Cytotechnology*. 2017, 69, str. 245-263.
84. Pavan, Ch.; Tomatis, M.; Ghiazza, M. *et al.*: In search of the chemical basis of the hemolytic potential of silicas. *Chemical Research in Toxicology*. 2013, 26, str. 1188-1198.
85. Premanathan, M.; Karthikeyan, K.; Jeyasubramanian, K. *et al.*: Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2011, 7, str. 184-192.
86. Pshenichnikov, S.; Omelyanchik, A.; Efremova, M. *et al.*: Control of oxidative stress in Jurkat cells as a model of leukemia treatment. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2021, 523, str. 1-7.
87. Pujalté, I.; Dieme, D.; Haddad, S. *et al.*: Toxicokinetics of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles after inhalation in rats. *Toxicology Letters*. 2017, 265, str. 77-85.
88. Ranjana, R.; Parushuram, N.; Harisha, K. S. *et al.*: Photo-driven synthesis of snisotropic gold nanoparticles using silk fibroin-cell viability activities in lymphocyte and Jurkat cancer cells. *BioNanoScience*. 2020, 10, str. 864-875.
89. Reddy, A. R. N.; Reddy, Y. N.; Krishna, D. R. *et al.*: Multi wall carbon nanotubes induce oxidative stress and cytotoxicity in human embryonic kidney (HEK293) cells. *Toxicology*. 2010, 272, str. 11-16.
90. Sakamuru, S.; Attene-Ramos, M. S. and Xia, M.: Mitochondrial membrane potential assay. *High-Throughput Screening Assays in Toxicology [online]*. New York, NY: Springer New York. 2016, 1473, str. 17-22.

91. Sayes, Ch. M. and Warheit, D. B.: Characterization of nanomaterials for toxicity assessment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2009, 1, str. 660-670.
92. Segeritz, Ch.-P. and Vallier, L.: Cell Culture. *Basic Science Methods for Clinical Researchers [online]*. Elsevier. 2017, 2017, str. 151-172.
93. Shahbazi, M.-A.; Hamidi, M.; Mäkilä, E. M. *et al.*: The mechanism of surface chemistry effects of mesoporous silicon nanoparticles on immunotoxicity and biocompatibility. *Biomaterials*. 2013, 34, str. 7776-7789.
94. Shahidi, S. and Moazzenchi, B.: Carbon nanotube and its applications in textile industry – A review. *The Journal of The Textile Institute* . 2018, 109, str. 1653-1666.
95. Shang, F.; Lu, M.; Dudek, E. *et al.*: Vitamin C and vitamin E restore the resistance of GSH-depleted lens cells to H₂O₂. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003, 34, str. 521-530.
96. Sharma, P. V.; Sharma, U., Chattopadhyay, M. *et al.*: Advance applications of nanomaterials: a review. *Materials Today: Proceedings*. 2018, 5, str. 6376-6380.
97. Shi, H.; Magaye, R.; Castranova, V. *et al.*: Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology*. 2013, 10, str. 1-33.
98. Shinto, H.; Fukasawa, T.; Yoshisue, K. *et al.*: Effect of exposure temperature on the cell membrane disruption induced by amorphous silica nanoparticles in erythrocytes, lymphocytes, and malignant melanocytes. *Advanced Powder Technology*. 2020, 31, str. 835-842.
99. Shinto, H.; Fukasawa, T.; Yoshisue, K. *et al.*: Effect of interfacial serum proteins on the cell membrane disruption induced by amorphous silica nanoparticles in erythrocytes, lymphocytes, malignant melanocytes, and macrophages. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019, 181, str. 270-277.
100. Simon-Deckers, A.; Gouget, B.; Mayne-L’Hermite, M. *et al.*: *In vitro* investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology*. 2008, 253, str. 137-146.
101. Simón-Vásquez, R.; Lozano-Fernandéz, T.; Dávila-Grana, A. *et al.*: Metal oxide nanoparticles interact with immune cells and activate different cellular responses. *International Journal of Nanomedicine*. 2016, 11, str. 4657-4668.
102. Smijs, T. G. and Pavel, S.: Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnology, Science and Applications*. 2011, 4, str. 95-112.

103. Soni, D.; Gandhi, D.; Tarale, P. *et al.*: Oxidative stress and genotoxicity of zinc oxide nanoparticles to *Pseudomonas* species, human promyelocytic leukemic (HL-60), and blood cells. *Biological Trace Element Research*. 2017, 178, str. 218-227.
104. Sukwong, P.; Kongseng, S.; Chaicherd, S. *et al.*: Comparison effects of titanium dioxide nanoparticles on immune cells in adaptive and innate immune system. *IET Nanobiotechnology*. 2017, 11, str. 759-765.
105. Sun, X.; Shi, J.; Zou, X. *et al.*: Silver nanoparticles interact with the cell membrane and increase endothelial permeability by promoting VE-cadherin internalization. *Journal of Hazardous Materials*. 2016, 317, str. 570-578.
106. Sutterwala, F. S.; Haasken, S and Cassel, S. L.: Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014, 1319, str. 82-95.
107. Takaki, K.; Higuchi, Y.; Hashii, M. *et al.*: Induction of apoptosis associated with chromosomal DNA fragmentation and caspase-3 activation in leukemia L1210 cells by TiO₂ nanoparticles. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2014, 117, str. 129-133.
108. Tee, J. K.; Ong, Ch. N.; Bay, B. H. *et al.*: Oxidative stress by inorganic nanoparticles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2016, 8, str. 414-438.
109. Tong, Y.; Li, Ch.; Liand, F. *et al.*: Probing cytotoxicity of nanoparticles and organic compounds using scanning proton microscopy, scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. 2008, 266, str. 5041-5046.
110. Tuomela, S.; Autio, R.; Buerki-Thurnherr, T. *et al.*: Gene expression profiling of immune-competent human cells exposed to engineered zinc oxide or titanium dioxide nanoparticles. *PLoS ONE*. 2013, 8, str. 1-18.
111. Vaitkuvienė, A.; Kaseta, V.; Voronovic, J. *et al.*: Evaluation of cytotoxicity of polypyrrole nanoparticles synthesized by oxidative polymerization. *Journal of Hazardous Materials*. 2013, 250-251, str. 167-174.
112. Vamanu, C. I.; Cimpan, M. R.; Høl, P. J. *et al.*: Induction of cell death by TiO₂ nanoparticles: Studies on a human monoblastoid cell line. *Toxicology in Vitro*. 2008, 22, str. 1689-1696.
113. Verdon, R.; Gillies, S. L.; Brown, D. M. *et al.*: Neutrophil activation by nanomaterials *in vitro*: comparing strengths and limitations of primary human cells with those of an immortalized (HL-60) cell line. *Nanotoxicology*. 2021, 15, str. 1-20.

114. Vilchez-Aruani, J.; Cuello-Carrión, F. D.; Valdez, S. R. *et al.*: Genomic effects of a nanostructured alumina insecticide in human peripheral blood lymphocytes *in vitro*. *Heliyon*. 2020, 6, str. 1-10.
115. Wadhwa, S.; Rea, C.; O'Hare, P. *et al.*: Comparative *in vitro* cytotoxicity study of carbon nanotubes and titania nanostructures on human lung epithelial cells. *Journal of Hazardous Materials*. 2011, 191, str. 56-61.
116. Wang, J.; Sun, P.; Bao, Y. *et al.*: Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes on PC12 cells. *Toxicology in Vitro*. 2011, 25, str. 242-250.
117. Wani, M. R. and Shadab, G. G. H. A.: Coenzyme Q10 protects isolated human blood cells from TiO₂ nanoparticles induced oxidative/antioxidative imbalance, hemolysis, cytotoxicity, DNA damage and mitochondrial impairment. *Molecular Biology Reports*. 2021, 48, str. 3367-3377.
118. Wani, M. R. and Shadab, G. G. H. A.: Low doses of thymoquinone protect isolated human blood cells from TiO₂ nanoparticles induced oxidative stress, hemolysis, cytotoxicity, DNA damage and collapse of mitochondrial activity. *Phytomedicine Plus*. 2021-b, 1, str. 1-11.
119. Wick, P. Manser, P.; Limbach, L. *et al.*: The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicology Letters*. 2007, 168, str. 121-131.
120. Wilson, Ch. L.; Natarajan, V.; Hayward, S. L. *et al.*: Mitochondrial dysfunction and loss of glutamate uptake in primary astrocytes exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Nanoscale*. 2015, 7, str. 18477-18488.
121. Wingett, D.; Louka, P.; Anders, C. *et al.*: A role of ZnO nanoparticle electrostatic properties in cancer cell cytotoxicity. *Nanotechnology, Science and Applications*. 2016, 9, str. 29-45.
122. Wongrakpanich, A.; Mudunkotuwa, I. A.; Geary, S. M. *et al.*: Size-dependent cytotoxicity of copper oxide nanoparticles in lung epithelial cells. *Environmental Science: Nano*. 2016, 3, str. 365-374.
123. Wu, L.; Man, Ch.; Wang, H. *et al.*: PEGylated multi-walled carbon nanotubes for encapsulation and sustained release of oxaliplatin. *Pharmaceutical Research*. 2013, 30, str. 412-423.
124. Xiaoshang, G.; Murakonda, G. K.; Jarubula, R. *et al.*: Biosynthesized TiO₂ nanoparticles and their applications for the treatment of pediatric acute leukemia. *Materials Research Express*. 2021, 8, str. 1-8.

125. Xu, Z.; Wu, Y.; Song, L. *et al.*: Anticarcinogenic effect of zinc oxide nanoparticles synthesized from *Rhizoma paridis* saponins on Molt-4 leukemia cells. *Journal of King Saud University – Science*. 2020, 32, str. 1865-1871.
126. Yin, L. M.; Wei, Y.; Wang, Y. *et al.*: Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells. *International Journal of Medical Sciences*. 2013, 10, str. 68-72.
127. Yu, Q.; Wang, H.; Peng, G. *et al.*: Different toxicity of anatase and rutile TiO₂ nanoparticles on macrophages: Involvement of difference in affinity to proteins and phospholipids. *Journal of Hazardous Materials*. 2017, 335, str. 125-134.
128. Yu, Z.; Wang, J; Yu, Y. *et al.*: Reactive oxygen species-related nanoparticle toxicity in the biomedical field. *Nanoscale Research Letters*. 2020, 15, str. 1-14.
129. Zeinabad, H. A.; Zarrabian, A.; Saboury, A. A. *et al.*: Interaction of single and multi wall carbon nanotubes with the biological systems: tau protein and PC12 cells as targets. *Scientific Reports*. 2016, 6, str. 1-23.
130. Zhou, S.; Wu, D.; Yin, X. *et al.*: Intracellular pH-responsive and rituximab-conjugated mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery to lymphoma B cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2017, 36, str. 1-14.

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).