

Toto PDF obsahuje kapitolu z knihy:  
Zdeněk Fiala, Drahomíra Holmannová (ed.):  
*Uhlíkové nanomateriály. Biomedicínské aplikace a toxicita*,  
Praha: Karolinum 2025,  
<https://doi.org/10.14712/9788024659848>.

**Příloha: Soubor optimalizovaných metodik pro testování  
cytotoxicity, genotoxicity a imunotoxicity nanočástic**

© Univerzita Karlova, 2025

This work is licensed under a Creative Commons Attribution  
4.0 International License (CC BY 4.0), which permits unrestricted use,  
distribution, and reproduction in any medium, provided the original  
author and source are credited.

<https://doi.org/10.14712/9788024659848.16>

# PŘÍLOHA: SOUBOR OPTIMALIZOVANÝCH METODIK PRO TESTOVÁNÍ CYTOTOXICITY, GENOTOXICITY A IMUNOTOXICITY NANOČÁSTIC

Laboratorní výstupy projektu NanoBio (ERDF projekt „Posilování mezioborové spolupráce ve výzkumu nanomateriálů a jejich účinků na živé organismy“; CZ.02.1.01/0.0/0.0/17\_048/0007421; OP VVV; ITI Hradecko-pardubické aglomerace; 2018–2022)

# METODIKY ÚSTAVU LÉKAŘSKÉ BIOLOGIE A GENETIKY

Lékařská fakulta v Hradci Králové

## TEST METABOLICKÉ AKTIVITY ALAMARBLUE (TEST CYTOTOXICITY)

### Teoretický základ metodiky

AlamarBlue je netoxický roztok, oxidačně redukční indikátor na bázi resazurinu, který je živými buňkami metabolizován na fluorescenční resorufin, který lze fluorescenčně kvantifikovat při emisní vlnové délce 590 nm (excitace 530–560 nm). Množství naměřené fluorescence je přímo úměrné aktivitě dehydrogenáz, které jsou typické pro živé buňky.

### Podrobnější popis metodiky

#### Kultivace:

Buňky se kultivují v  $\alpha$ MEM bez fenolové červeně s 10% FSB, 1% antibiotiky (penicilinem, streptomycinem), 10mM Hepes, 1mM pyruvátém sodným a 2mM L-glutaminem. Buňky se nasadí do 96jamkových destiček v koncentraci 5000–10 000 buněk na jednu jamku, vždy s prvním sloupcem jamek bez buněk (blank) a inkubují se přes noc. Po 24 hodinách se médium vymění za médium s nanomateriálem (NM), a to vždy 100  $\mu$ l/jamku. Inkubace s NM trvá dle potřeby 1–72 hodin.<sup>1</sup>

*Roztoky:* zásobní roztok alamarBlue: Termofischer Scientific DAL1100

#### Postup:

- 1) Přidejte 11  $\mu$ l roztoku alamarBlue do každé jamky (lze použít i druhou variantu, kdy je po inkubaci s NM veškeré médium z jamek odsáto, eventuálně jsou jamky 1 $\times$  propláchnuty PBS bez iontů a jsou nahrazeny novým médiem alamarBlue v poměru 1:10).
- 2) Proměřte fluorescenci v čase 0 h ex. 560 nm / em. 590 nm.
- 3) Inkubujte 1 nebo 2 hodiny v termostatu 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>.
- 4) Změřte fluorescenci.
- 5) Nejprve vypočítejte rozdíl absorbancí v čase 1 h (eventuálně 2 h) a 0 h. Od naměřených absorbancí odečtěte blank. Naměřené hodnoty lze vyjádřit jako % kontroly.

## Použitelnost metodiky pro testování NM

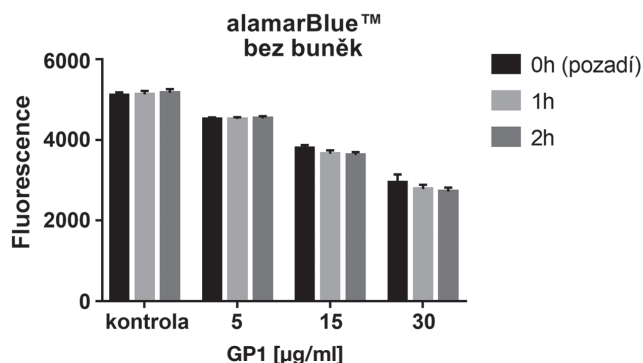
Metoda je rychlá, citlivá, ale je nutno počítat s možností zhášení fluorescence, která by však, pokud se vhodně změní v čase 0 h jako pozadí, neměla významně ovlivnit výsledné sledování cytotoxicity NM.

### Souhrn nejzajímavějších výsledků

Z důvodu potřeby ověřit možnost ovlivnění pozadí při měření fluorescence jsme testovali grafen GP1 (Plasmachem). Grafen byl inkubován pouze s roztokem alamarBlue po metabolické aktivaci bez buněk po dobu 1 a 2 hodin v koncentracích (5, 15 a 30  $\mu\text{g/ml}$ ). Se zvyšující se koncentrací GP1 se snižuje výsledná fluorescence (zhášení). Ke snížení dojde hned po přidání alamarBlue, proto je možné čas 0 h v případě testování cytotoxicity v buněčném systému použít jako pozadí, od kterého se bude sledovat nárůst fluorescence způsobený metabolickou činností buněk. Přesto musíme počítat s mírným poklesem fluorescence v průběhu měření (Tabulka 5). Tento pokles bude falešně snižovat výsledné hodnoty testu cytotoxicity. Tomuto poklesu lze částečně předejít, když bude po přidání roztoku alamarBlue následovat pětiminutová pauza, a teprve poté bude měřen čas 0 h (Obrázek 21). Interference grafenu byla publikována v práci Šestákové et al.<sup>2</sup>

**Tabulka 5.** Hodnoty z grafu vyjádřeny v procentech čase 0 h – GP1

Doba inkubace	K	5 $\mu\text{g/ml}$	15 $\mu\text{g/ml}$	30 $\mu\text{g/ml}$
0 h	100,0	100,0	100,0	100,0
1 h	100,5	100,0	96,4	94,3
2 h	101,3	100,4	95,6	92,5



**Obrázek 21.** Interference grafenu s fluorescencí metody alamarBlue v acelulární pokusu, kde byly testovány příslušné koncentrace grafenu.

# TEST ZÁCHYTU NEUTRÁLNÍ ČERVENĚ (NEUTRAL RED UPTAKE – NRU; TEST CYTOTOXICITY)

## Teoretický základ metodiky

Princip metody je založen na schopnosti živých buněk hromadit neutrální červeně v lysozomech. Příjem neutrální červeně (supravitální barvivo) (3-amino-7-dimethylamino-2-methylfenidát hydrochlorid – cat. no. N2889, Merck) buňkami do lysozomů závisí na schopnosti buňky tvořit ATP a vytvářet pH gradient. Při fyziologickém pH prochází neutrální červeně plazmatickou membránou mechanismem difuze. V případě, že je buňka mrtvá, dochází k vyplavení barviva. Živé buňky vychytávají barvivo do lysozomů, jsou lyzovány a uvolněné barvivo je měřeno pomocí spektrometrie (absorbance při vlnové délce 540 nm).

## Podrobnější popis metodiky

### Kultivace:

Buňky se kultivují v  $\alpha$ MEM bez fenolové červeně s 10% FSB, 1% antibiotiky (penicilinem, streptomycinem), 10mM Hepes, 1mM pyruvátém sodným a 2mM L-glutaminem. Buňky se nasadí do 96jamkových destiček v koncentraci 5 000–10 000 buněk na jamku, vždy s prvním sloupcem jamek bez buněk (blank), a inkubují se přes noc. Po 24 hodinách se médium vymění za médium s NM (vždy 100  $\mu$ l/jamku). Inkubace s NM trvá dle potřeby 1–72 hodin.

### Roztoky:

- Fixační roztok: 1 g / 100ml  $\text{CaCl}_2$  v 0,5% formaldehydu
- Lyzační roztok: 1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  v 50% EtOH
- Zásobní roztok: neutrální červeně (0,33 % – 3,3 g/l)
- Pracovní roztok neutrální červeně (80  $\mu$ g/ml v médiu)

### Postup:

1. Odsajte 100  $\mu$ l média z jamek.
2. Přidejte 100  $\mu$ l roztoku neutrální červeně (80  $\mu$ g/ml) do každé jamky (konečná koncentrace neutrální červeně je 40  $\mu$ g/ml).
3. Inkubujte 3 hodiny v termostatu 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ .
4. Vše odsajte a přidejte 100  $\mu$ l fixačního roztoku.
- 5) Inkubujte 15 minut při pokojové teplotě.
6. Opláchněte buňky dvakrát 100  $\mu$ l PBS bez iontů.
7. Přidejte 200  $\mu$ l lyzačního roztoku.
8. Inkubujte 15 minut při pokojové teplotě.
9. Destičky protřepávejte na třepačce dalších 15 minut.
10. Změřte destičku fotometrem SPEKTRAFleur Plus, Tecan (Salzburg, Rakousko) při 540 nm.

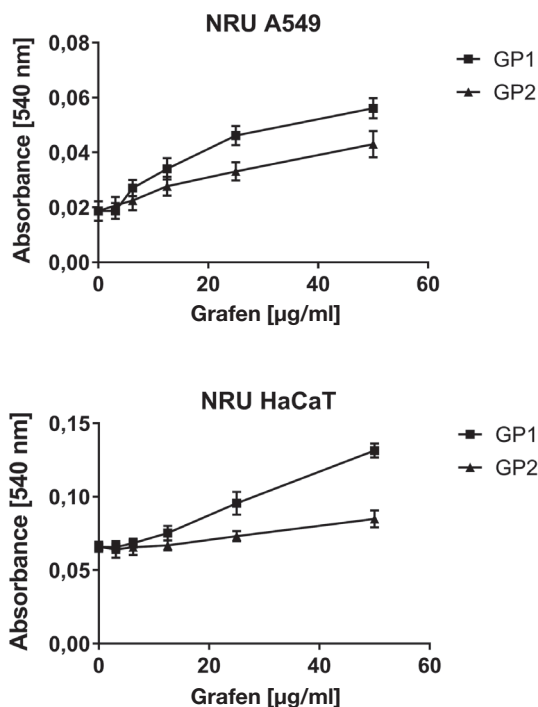
Od naměřených absorbancí odečtete blank. Naměřené hodnoty testovaných látek vyjádřete jako % kontroly

## Použitelnost metodiky pro testování NM

Metoda záchytu neutrální červeně je založena na schopnosti buněk přijímat neutrální červeně. V případech, kdy jsou buňky aktivovány k vyšší absorpci, může docházet k falešně pozitivním výsledkům. Některé NM tuto aktivaci indukují, a proto nepovažujeme metodu NRU za zcela spolehlivou pro testování jejich cytotoxicity.

## Souhrn nejzajímavějších výsledků

Metodou NRU byly na dvou buněčných liniích testovány dva druhy grafenu (GP1, Plasma-chem, a GP2, Trinity College, Dublin). Buňky byly exponovány grafenům po dobu 24 hodin. Jak vyplývá z výsledků (Obrázek 22), vyšší koncentrace grafenů měly za následek zvýšení hladin absorbance (více než 200 % hodnoty kontrol). V případě toxicity by absorbance měla klesat, v případě biokompatibility stagnovat. Zdá se tedy, že NRU není vhodná metoda pro testování grafenových nanočástic. Za pozornost stojí rozdíly v hodnotách absorbance mezi oběma grafeny, které mají identické chemické složení, ale jiné fyzikální charakteristiky.



**Obrázek 22.** Test záchytu neutrální červeně (NRU) po inkubaci dvou buněčných linií A549 a HaCaT s dvěma typy grafenů (GP1 a GP2)

# POČÍTÁNÍ BUNĚK POMOCÍ OBRAZOVÉHO CYTOMETRU METODOU BARVENÍ JADER DAPI (TEST CYTOTOXICITY)

## Teoretický základ metodiky

Prosté počítání buněk představuje jednoduchý způsob, jak kvantifikovat cytotoxicitu. U většiny jaderných buněk lze předpokládat přímou úměru: kolik jader, tolik buněk. Jádra fixovaných buněk lze barvit fluorescenčním barvivem 4',6-diamidin-2-fenylindolem (DAPI). Fluorochrom DAPI se váže do dvojřetězce DNA v oblasti AT bázi a po navázání se intenzita jeho fluorescence zvýší přibližně dvacetkrát. V testu je sledována fluorescence při emisním maximu 461 nm (excitační maximum 358 nm).

## Podrobnější popis metodiky

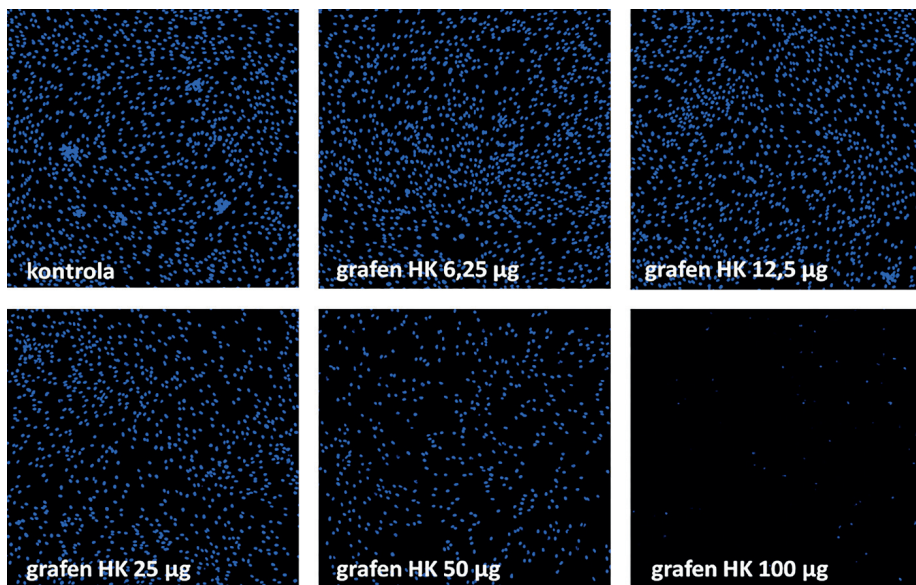
Zásobní roztok DAPI Sigma D9542: 1 mg / 1 ml redestilované vody

### Postup:

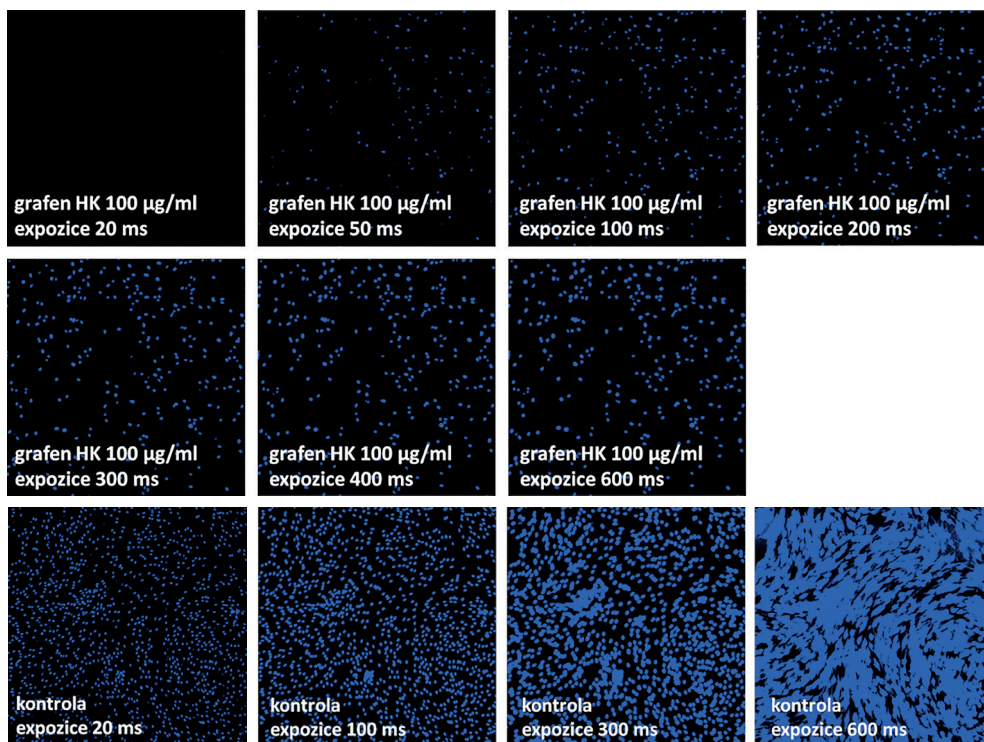
1. Po inkubaci s NM 1x propláchněte v PBS bez iontů (200 ul/jamku).
2. Fixujte 5 minut 70% ethanolem (100 ul/jamku) nebo 15 minut při  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ice-cold methanol): typické pro imunofluorescenci (<http://www.cellsignal.com/learn-and-support/protocols/protocol-if-methanol-fixation>).
3. Vyklepněte, nechte odpařit nebo 1x propláchněte PBS + 100 ul PBS a uložte do chladničky.
4. Barvení DAPI (1000× ředěný zásobní roztok v redestilované vodě; 5 minut; 100 ul/jamku) proveďte optimálně v ten samý den jako měření fluorescence.
5. Vyklepněte a dvakrát propláchněte v PBS bez iontů (200 ul/jamku).
6. Změřte fluorescence na přístroji ImageXpress.
7. Vyhodnoťte počty jader a vztáhněte na kontrolní počty.

## Použitelnost metodiky pro testování NM

Barvení jader DAPI představuje přímou metodu měření cytotoxicity, při které nedochází k zatížení výsledků falešným zvyšováním hodnot, jako tomu může být u testů založených na metabolické přeměně substrátů. Počty buněk lze stanovit různými způsoby: trypanovou modří, počítáním v Bürkerově komůrce anebo využitím vysokokapacitního zobrazovacího cytometru. Počítání v komůrce je časově náročné a test trypanové modří nemusí být vždy vhodný (například buňky s akumulovaným grafenem jsou při optickém stanovení touto metodou obtížně rozlišitelné). V případě zobrazovacího cytometru musí být brána v úvahu možnost stínění (nebo zhášení) fluorescence testovaným NM. Při testování grafenu byly vhodné koncentrace pro testování cytotoxicity do 30  $\mu\text{g/ml}$ . Při automatickém snímání nelze parametry nastavit tak, aby bylo možno pořídit snímky všech jamek. Při expozici nastavené na kontroly jsou jamky s vyšší vrstvou grafenu tmavé, pokud se expozice nastaví podle nich, jsou zase zvýšeně exponované kontroly. Proto je nutno hledat kompromisní expozici pro zachycení většiny jamek (Obrázek 23).



Obrázek 23. Expozice 50 ms nastavená podle kontroly při rostoucí koncentraci grafenu



Obrázek 24. Grafen (100 µg/ml) při zvyšující se úrovni expoziční (stejně snímané pole)



## Souhrn nejzajímavějších výsledků

Byla provedena kultivace lidských dermálních fibroblastů (HDF) s grafenem o koncentracích 6,25, 12,5, 25, 50 a 100  $\mu\text{g/ml}$  po dobu 48 hodin. Po expozici grafenem byla obarvena jádra DAPI dle výše uvedeného protokolu a byly sledovány změny fluorescence v závislosti na rostoucích koncentracích grafenu (Obrázek 23) a změny fluorescence v závislosti na rostoucí expozici při stejné koncentraci grafenu 100  $\mu\text{g/ml}$  (Obrázek 24).

Při expozici vhodné pro grafen se vysoce exponovaná jádra u kontrol slévají a analýza obrazu je nerozlišuje. Jednotlivé koncentrace lze snímat zvlášť při různých expozicích a také analyzovat po každé expozici zvlášť. Tento postup není vhodný pro automatické odečítání. Metoda je použitelná pro nižší koncentrace NM a pro materiály, které opticky nestíní.

## DLOUHODOBÉ SLEDOVÁNÍ BUNĚČNÉ PROLIFERACE POMOCÍ KUMULOVANÉHO POČTU POPULAČNÍCH ZDVOJENÍ (TEST CYTOTOXICITY)

### Teoretický základ metodiky

Kumulovaný počet populačních zdvojení (*population doubling level*; PDL) vyjadřuje násobky zdvojení populace buněk od času izolace (případně od jiného definovaného časového bodu v historii buněčné linie). Tento ukazatel se běžně používá při sledování stáří primárních buněčných linií, lze jej však také využít pro měření poklesu proliferace v rámci cytotoxických a genotoxických studií.

### Podrobnější popis metodiky

**PDL se počítá podle následujícího vzorce:**

$$\text{PDL}_{(n)} = 3.32 (\log C_f - \log C_i) + \text{PDL}_{(n-1)}$$

$\text{PDL}_{(n)}$  = hodnota PDL na konci n-té pasáže

$\log C_f$  = počet buněk sklizených na konci n-té pasáže

$\log C_i$  = počáteční počet buněk nasazených na začátku n-té pasáže

$\text{PDL}_{(n-1)}$  = hodnota PDL vypočítaná v minulé pasáži

Konečná hodnota PDL po poslední pasáži je tedy součtem všech hodnot dosažených v průběhu kultivace buněčné linie po celkovou definovanou dobu. V praxi se PDL stanoví následujícím způsobem:

Buňky jsou pravidelně pasážovány v souladu s jejich požadavky. Během každé pasáže se do kultivačních nádob nasazuje konstantní počet ( $C_i$ ) buněk. Po období exponenciálního růstu jsou buňky sklizeny, spočítány, je zjištěna konečná dosažená koncentrace buněk v rámci pasáže ( $C_f$ ) a vypočítá se PDL.

*Poznámka:* Počáteční hustotu nasazení buněk ( $C_i$ ) a interval pasážování kultury je třeba předem optimalizovat pro daný typ buněk a kultivačních podmínek. Buňky je třeba sklízet ještě v období exponenciálního růstu, před dosažením konflunce.

## Stanovení PDL u linie normálních dermálních fibroblastů během chronické expozice grafenovým nanočásticím

### Buňky a materiál:

Lidské dermální neonatální fibroblasty (HDFn) byly zakoupeny od firmy ThermoFisher Scientific (cat. no. C0045C). Byly kultivovány v médiu Human Fibroblast Expansion Basal Medium (ThermoFisher Scientific, cat. no. M106500) s přidavkem směsi růstových faktorů Low Serum Growth Supplement (LSGS, ThermoFisher Scientific, cat. no. S00310), podle doporučení dodavatele. Pro experiment byly využity buňky od 5. pasáže.

Grafenové nanočástice označené jako GP1 byly zakoupeny od firmy PlasmaChem GmbH (Berlín, Německo, cat. no. PL-P-G750), grafenové nanočástice označené jako GP2 byly darovány institutem CRANN (Trinity College, Dublin, Irsko). Zásobní roztok byl připraven o koncentraci 250  $\mu\text{g/ml}$  grafenových nanočástic v 0,02% vodném roztoku cholátu sodného, sonikován a skladován při pokojové teplotě (Svadlakova et al.).<sup>3</sup>

Počítací komůrka BLAUBRAND® Neubauer Improved Counting Chamber (cat. no. BR717805), roztok Trypsin-EDTA (cat. no. 59417C) a trypsin-neutralizační roztok (Trypsin Neutralizing Solution, cat. no. C-41120) byly zakoupeny od firmy Merck.

### Postup:

1. V pondělí jsme nasadili buňky do 25  $\text{cm}^2$  kultivační lahve. Počáteční koncentrace byla  $1 \times 10^5$  buněk na lahev, v 10 ml kultivačního média.
2. Ve středu jsme médium vyměnili za 10 ml čerstvého média v případě kontrolních vzorků, nebo za 10 ml kultivačního média obsahujícího 10  $\mu\text{g/ml}$  GP1 nebo GP2. Všechny varianty jsme testovali v triplicátech.
3. Buňky jsme nechali proliferovat do příštího pondělí.
4. V pondělí, týden po nasazení, jsme buňky sklídili:
  - a. Slili jsme médium a buňky opláchli 2 ml fosfátového pufru PBS (37 °C).
  - b. Opláchli jsme buňky 2 ml roztoku Trypsin-EDTA a umístili do inkubátoru (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ) na 3 minuty.
  - c. Uvolněné buňky jsme opatrně resuspendovali ve 3 ml trypsin-neutralizačního roztoku přenesli do 50 ml centrifugační zkumavky.
  - d. Buňky jsme centrifugovali 5 minut při 500 rpm, poté jsme slili trypsin-neutralizační roztok a buněčnou peletu jsme resuspendovali ve 3 ml kultivačního média.

Poznámka: Kultivační médium doporučené pro kultivaci HDFn obsahuje pouze 2 % séra, proto je potřeba používat trypsin-neutralizační roztok ke včasné inaktivaci trypsinu, aby nedošlo k poškození buněk. V případě, že médium obsahuje dostatečné množství séra, je možné v kroku 4c resuspendovat buňky přímo v čerstvém kultivačním médiu. Je třeba se řídit doporučením dodavatele buněčné linie, případně vlastními zkušenostmi s daným typem buněk.

5. Do každé poloviny počítací komůrky jsme pipetovali 10  $\mu\text{l}$  výsledné buněčné suspenze a spočítali počet buněk v 1 ml suspenze.
6. Spočítali jsme celkový počet buněk ve 3 ml suspenze a získali tak hodnotu  $C_f$ .
7. Stanovili jsme hodnotu PDL podle výše uvedeného vzorce.
8. Buněčnou suspenzi obsahující  $1 \times 10^5$  buněk jsme přenesli do nové kultivační lahve a doplnili jsme kultivační médium na celkem 10 ml.

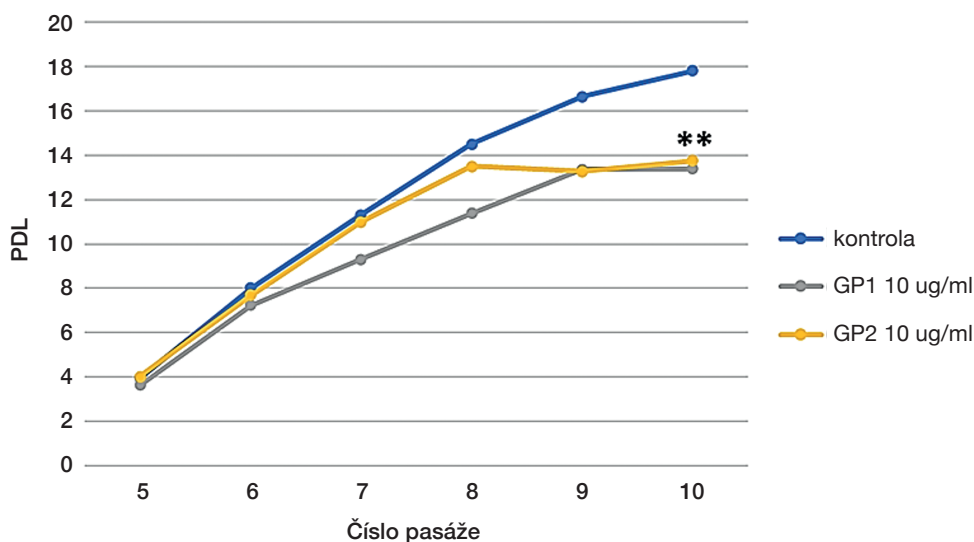
9. Kultivační lahve jsme umístili do inkubátoru (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).
10. Kroky 4–9 jsme opakovali po dobu 6 týdnů.
11. Po uplynutí této doby jsme získali konečnou hodnotu PDL.
12. Rozdíl v konečné hodnotě PDL mezi ovlivněnými a kontrolními vzorky byl hodnocen v programu GraphPad Prism 7.0 za použití nepárového t-testu.

## Použitelnost metodiky pro testování NM

Primární buněčné linie (například normální fibroblasty) jsou geneticky stabilní a uchovávají si své vlastnosti po mnoho pasáží. Zhruba po 60–70 populačních zdvojeních (počítáno od izolace primokultury) vstupují do stavu senescence (stárnutí), kdy dále přežívají, ale již neproliferují a vykazují typický (se senescencí asociovaný) fenotyp. Výzkumník má tak k dispozici řadu týdnů pro provedení (sub)chronického experimentu. Navíc je možné monitorovat buňky až do stadia senescence a zkoumat vliv testovaných látek na její nástup a na změny charakteristického buněčného fenotypu.

Výhodou metody je její jednoduchost. Počítání buněk v počítací komůrce je ekonomicky nenáročný a přitom velice přesný způsob monitorování buněčné proliferace. Nevýhodou je pracnost a časová náročnost. Komůrku lze nahradit automatickým počítačem buněk, je však vždy nutno ověřit, zda tento postup poskytuje validní výsledky i při nízkých koncentracích buněk.

Určitou nevýhodou metody je nutnost větších objemů testovaných NM. Další problém představuje klesající míra proliferace během experimentu, což má za následek pokles počtu



**Obrázek 25.** Vývoj kumulativního počtu populačních zdvojení (PDL) během chronické expozice normálních kožních fibroblastů nanočásticím grafenu

*Poznámka:* Směrodatné odchylky byly v grafu pro přehlednost vynechány – nedosáhly 7 % průměrné hodnoty PDL vypočítané ze tří měření. Statisticky významný rozdíl v konečné hodnotě PDL u obou ovlivněných vzorků oproti kontrole, nepárový t-test, \*\* statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolou,  $p < 0,05$ .

buněk pro nasazení do následných pasáží. Pokud by tedy byl experiment zakončen například testy genové exprese, je nutno včas rozdělit kultivace do paralelních vzorků. To dále zvyšuje nároky na množství testovaného materiálu a na časovou náročnost experimentů.

Považujeme za nutné upozornit na skutečnost, že chronické expozice NM mohou vykazovat toxické účinky i v koncentracích, které se v krátkodobých experimentech jeví jako netoxické (biokompatibilní). Při hodnocení rizika je proto naprosto nezbytné věnovat pozornost (vedle výsledků *in vitro* testů akutní a subakutní toxicity) rovněž výsledkům testů subchronické a chronické toxicity.

## Souhrn nejzajímavějších výsledků

Grafenové nanočástice obou typů během šestitýdenní chronické expozice významně snížily proliferaci buněk stanovenou jako kumulativní počet populačních zdvojení (Obrázek 25). Výsledky byly publikovány v práci Šestákové et al.<sup>2</sup>

## TEST METABOLICKÉ AKTIVITY WST-1 (TEST CYTOTOXICITY)

### Teoretický základ metodiky

Stabilní tetrazoliová sůl WST-1 je komplexním buněčným mechanismem štěpena na rozpustný formazan, který se vyskytuje primárně na buněčném povrchu. Uvedená bioredukce je do značné míry závislá na glykolytické produkci NAD(P)H v životaschopných buňkách. Množství vytvořeného formazanového barviva koreluje s počtem metabolicky aktivních buněk v kultuře.

### Podrobnější popis metodiky

#### Kultivace:

Buňky se kultivují v  $\alpha$ MEM bez fenolové červeně s 10% FSB, 1% antibiotiky (penicilinem, streptomycinem), 10mM Hepes, 1mM pyruvátém sodným a 2mM L-glutaminem. Poté se nasadí do 96jamkových destiček v koncentracích 5000–10 000 buněk na jamku (vždy s prvním sloupcem jamek bez buněk; blank) a nechají se inkubovat přes noc. Po 24 hodinách se médium vymění za médium s NM (100  $\mu$ l/jamku) a následuje inkubace po dobu 1–72 hodin.

#### Zásobní roztok WST: Roche 1 644 807

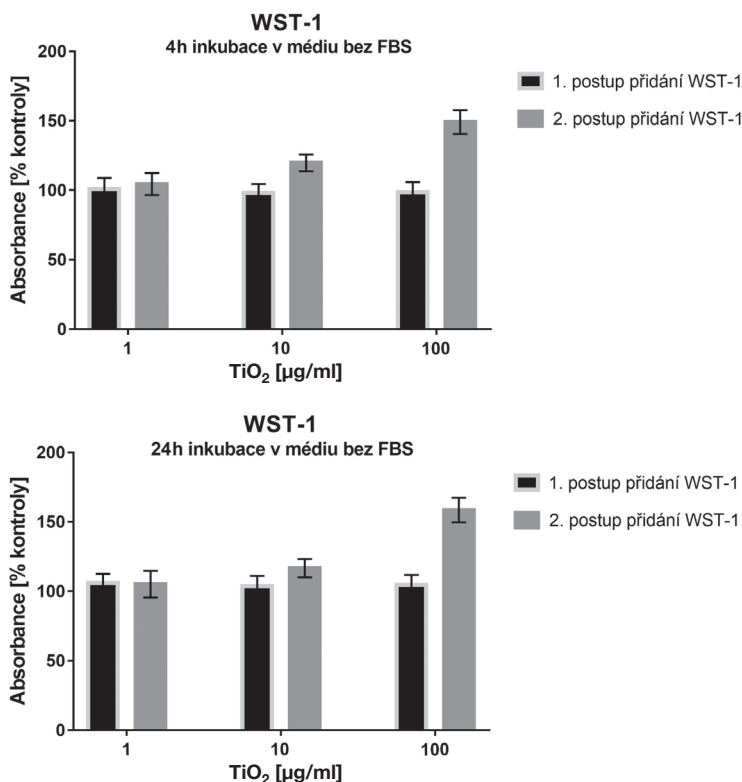
1. Přidejte 5  $\mu$ l roztoku WST-1 do každé jamky (postup 1). Lze použít i alternativní postup, kdy po inkubaci s NM je veškeré médium z jamek odsáto a nahrazeno novým médiem s WST-1 v poměru 1:20 (postup 2).
2. Proměřte absorbanci v čase 0 h při 450/650 nm (650 nm – referenční vlnová délka).
3. Inkubujte 1 nebo 2 hodiny v termostatu 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>.
4. Nejprve vypočítejte rozdíl absorbancí v čase 1 h (eventuelně 2 h) a 0 h. Od naměřených absorbancí odečtěte blank. Naměřené hodnoty lze vyjádřit jako % kontroly.

## Použitelnost metodiky pro testování nanočástic

Metoda je rychlá a reprodukovatelná. Je ale nutno zvážit, jakou variantu přidavku WST-1 provést (zda přidat pouze 5  $\mu\text{l}$  do jamky s testovaným NM nebo vyměnit celý obsah média v jamce). S tím souvisí i složení média, konkrétně přítomnost FBS (fetálního bovinního séra), viz dále. U druhého postupu sice předpokládáme vyšší zátěž buněk, ale zároveň dochází k odstranění testovaného materiálu, který může interferovat s měřením absorbance (jak tomu je například u grafenu). Některé metodiky používají ke kultivaci médium bez FBS. Jedním z důvodů je tvorba proteinové korony na povrchu částic, která následně ovlivňuje jejich biologické interakce. Na druhou stranu je FBS důležité pro vlastní kultivaci buněk a zároveň zlepšuje disperzi NM v médiu.

### Souhrn nejzajímavějších výsledků

Byly porovnány oba výše uvedené postupy provedení metody WST-1, lišící se způsobem přidání substrátu. V experimentu byl kultivován NM oxid titaničitý ( $\text{TiO}_2$ ; Plasmachem) o koncentracích 1, 10 a 100  $\mu\text{g/ml}$  s buněčnou linií A549 (5 000 bb/ml) v médiu bez FBS. Inkubace trvala 4 a 24 hodin (Obrázek 26; Tabulka 6). Zjistili jsme, že při použití druhého



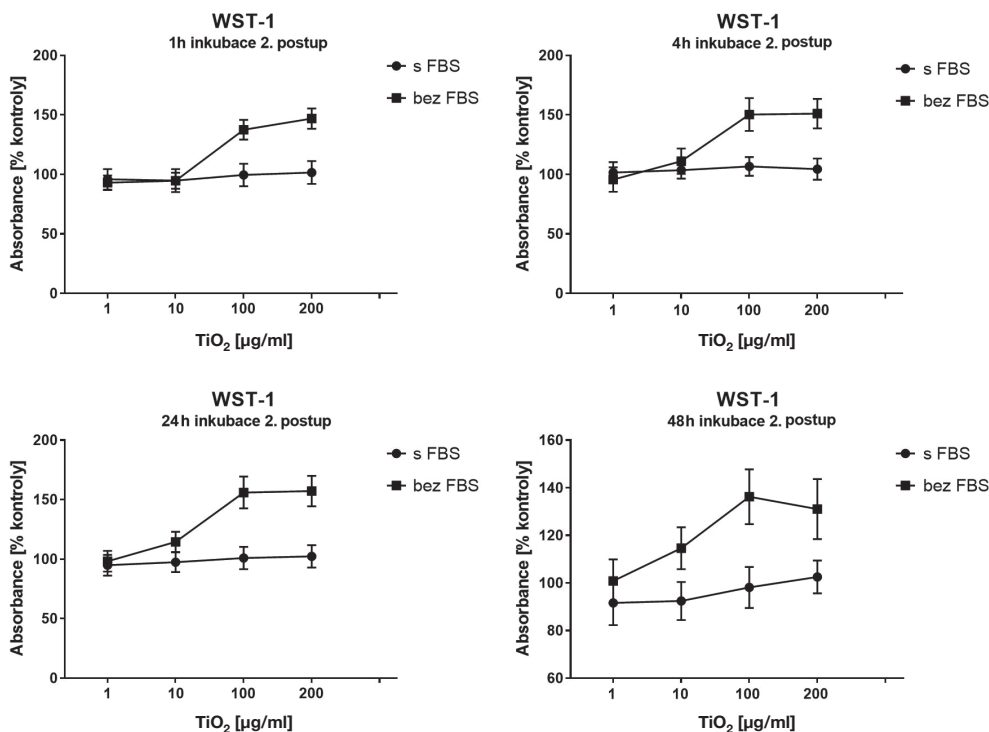
Obrázek 26. Porovnání dvou postupů provedení WST-1 při 4hodinové a 24hodinové inkubaci

postupu (výměna celého obsahu jamky za médium se substrátem) dochází v médiu bez FBS ke zvyšování metabolické aktivity buněk. Z této skutečnosti lze usuzovat zátěž buněk médiem bez FBS a rovněž tak i výměnou média při provedení testu WST-1.

**Tabulka 6.** Hodnoty z obrázku 6 vyjádřeny v procentech kontroly (expozice TiO<sub>2</sub>)

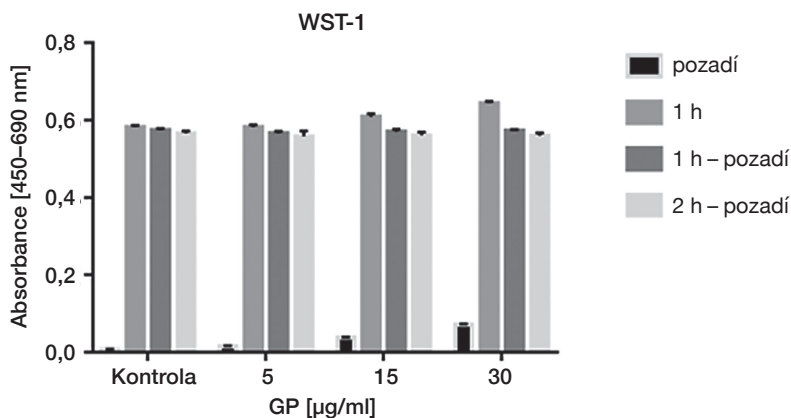
Koncentrace TiO <sub>2</sub> (µg/ml)	4 h		24 h	
	první postup	druhý postup	první postup	druhý postup
0 (K)	100,0	100,0	100,0	100,0
1	101,0	104,5	105,9	105,2
10	98,0	119,7	103,6	116,7
100	98,6	149,1	104,7	158,5

V dalším kroku byl také studován vliv složení použitého média (s FBS a bez FBS) na výsledky WST-1. V experimentu byl kultivován TiO<sub>2</sub> (koncentrace 1, 10, 100 a 200 µg/ml) s buněčnou linií A549 (5 000 buněk/ml) v médiu s přítomností a bez přítomnosti FBS (1, 4, 24 a 48 hodin). WST-1 byl prováděn druhým postupem (Obrázek 27). Jak vyplývá z výsledků, test prováděný bez přítomnosti FBS vedl k významným změnám metabolické aktivity buněk (v porovnání s kontrolou). Podrobněji je tato problematika popsána v článku Jany Báčové et al.<sup>4</sup>



**Obrázek 27.** Kultivace A549 s TiO<sub>2</sub> v rozdílném médiu (s a bez FBS) při použití druhého postupu WST-1

Významnou roli při měření absorbance mají hodnoty absorbančního pozadí. Z tohoto důvodu byl u metody WST-1 posuzován vliv přítomnosti grafenu (GP1) na hladinu absorbančního pozadí metody WST-1. Grafen byl inkubován pouze s roztokem WST-1 po metabolické aktivaci bez buněk po dobu 1 a 2 hodin v koncentracích 5, 15 a 30  $\mu\text{g/ml}$  (Obrázek 28; Tabulka 7). Nejdříve byla změřena hodnota absorbance samotné suspenze grafenu bez substrátu a byly sledovány její změny v čase (1–2 hodiny). Z výsledků vyplývá, že grafen vykazuje (v závislosti na koncentraci) určitou hodnotu pozadí, nicméně tato hodnota je pro danou koncentraci stabilní a lze ji odečítat od hodnot absorbance naměřených hodnot vzorků.<sup>5</sup>



**Obrázek 28.** Vliv přítomnosti grafenu (GP1) a doby kultivace na hladinu absorbance (metoda WST-1, experiment bez buněk)

**Tabulka 7.** Hodnoty z obrázku 8 vyjádřeny v procentech kontroly (expozice GP1)

Doba inkubace	K	5 $\mu\text{g/ml}$	15 $\mu\text{g/ml}$	30 $\mu\text{g/ml}$
1 h	100	100,6	104,6	110,6
1 h – pozadí	100	99,1	99,2	99,7
2 h – pozadí	100	98,7	99,2	99,0

## LITERATURA

- Greenwood SK, Hill RB, Sun JT et al. Population Doubling: A Simple and More Accurate Estimation of Cell Growth Suppression in the In Vitro Assay for Chromosomal Aberrations That Reduces Irrelevant Positive Results. *Environ Mol Mutagen.* 2004;43(1):36–44. doi:10.1002/em.10207.
- Šestáková B, Schröterová L, Bezrouk A et al. The Effect of Chronic Exposure of Graphene Nanoplates on the Viability and Motility of A549 Cells. *Nanomaterials.* 2022;12(12):2074. doi:10.3390/nano12122074.
- Svadlakova T, Hubatka F, Turanek Knotigova P et al. Proinflammatory Effect of Carbon-Based Nanomaterials: In Vitro Study on Stimulation of Inflammasome NLRP3 via Destabilisation of Lysosomes. *Nanomaterials.* 2020;10(3):418. doi:10.3390/nano10030418.

4. Bacova J, Knotek P, Kopecka K et al. Evaluating the Use of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles for Toxicity Testing in Pulmonary A549 Cells. *Int J Nanomedicine*. 2022;17:4211–4225. doi:10.2147/IJN.S374955.
5. Schröterová L, Šestáková B, Rudolf E et al. Testování biokompatibility NMsů-Grafen. In: *XXX. Xenobiochemnické Sympóziium – Sborník*. Pezinok, Slovakia; 15.–17. květen, 2019:40.



# METODIKY ÚSTAVU HISTOLOGIE A EMBRYOLOGIE VE SPOLUPRÁCI S ÚSTAVEM LÉKAŘSKÉ BIOFYZIKY (Lékařská fakulta v Hradci Králové)

## LDH TEST (TEST CYTOTOXICITY)

### Teoretický základ metodiky

LDH test je kolorimetrickou metodou, kterou lze kvantitativně analyzovat buněčnou cytotoxicitu. Její princip je založen na měření množství extracelulární laktátdehydrogenázy (LDH). Tento enzym je přítomen v široké škále savčích buněk a konkrétně je lokalizován v buněčném cytosolu. Extracelulární výskyt LDH je spojován s narušením integrity buněčné membrány, a proto se tato metoda používá pro kvantifikaci buněčné viability. Uvolněná LDH je konvertována na pyruvát prostřednictvím  $\text{NAD}^+$  redukce na NADH, která je následně redukována na tetrazoliovou sůl, jejíž množství koreluje s množstvím LDH uniklého v kultivačním médiu. LDH test bývá poměrně často používán pro stanovení vlivu exogenních či endogenních agens na buněčnou populaci.

### Podrobnější popis metodiky

#### Postup CyQUANT™ LDH (ThermoFisher) cytotoxické analýzy pro zjištění vlivu grafenu na adherentní linii myoblastů C2C12

1. Nasaďte C2C12 myoblasty na 96jamkovou destičku ( $0,5 - 2 \times 10^4$  buněk/jamka) ve 100 ml bezfenolového kultivačního média (DMEM, 10% FBS, 1% ATB). Bezfenolové médium snižuje falešnou pozitivitu výsledku. Množství buněk na jamku je nutno volit dle konkrétní buněčné linie (příliš vysoká koncentrace buněk se může projevat falešnou pozitivitou ve smyslu vyšší cytotoxicity). Výrobce také doporučuje používat tuto esej s buňkami, které byly kultivovány v přítomnosti séra. Při kultivaci buněk v podmínkách bez séra může docházet k uvolňování endogenní LDH do média, což s sebou přináší riziko falešně pozitivních výsledků. Na destičce je nutné vyčlenit dvě skupiny buněk, které slouží jako kontrola: spontánní LDH reakce (SLR) a maximální LDH aktivita (MLA).
2. Inkubujte buňky po dobu 24 hodin při 37 °C a 5 %  $\text{CO}_2$ .
3. Odsajte kultivační médium tak, aby nebyla porušena adheze monovrstva buněk a následně přidejte grafen suspendovaný v požadované koncentraci (5–100 mg/ml; triplikát) v bezfenolovém kultivačním médiu. Inkubujte následujících 24–48 hodin.

4. Do jamek, kde je triplikát pro SLR, aplikujte 10 ml sterilní, ultračisté vody. Do jamek s MLA aplikujte 10 ml lyzačního pufru (10×). Obě reagentie inkubujte 45 minut při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.
5. Odsajte 50 ml média z každé jamky, přeneste do jiné 96jamkové destičky (i SLR, MLA) a přidejte 50 ml reakční směsi. Reakční směs obsahuje „substrate mix“ a „assay buffer“ (600 ml) a vystačí přibližně na dvě 96jamkové destičky. Tato směs vydrží při –20 °C přibližně 3–4 týdny. Centrifugační zkumavku s tímto mixem je potřeba chránit před světlem (zabalení do alobalu).
6. Inkubujte buňky s reakční směsí po dobu 30 minut při laboratorní teplotě bez dosahu světla (zabalte do alobalu).
7. Přidejte 50 ml „stop solution“.
8. Míchejte po dobu 1 minuty na vortexu.
9. Změřte absorbanci při 490 nm na spektrofotometru; referenční vlnová délka by neměla být vyšší než 680 nm.
10. Výpočet pro stanovení cytotoxicity:  $\frac{\text{absorbance ošetřených buněk} - \text{SLR}}{\text{MLA-SLR}} \times 100$ . Takto vychází cytotoxicita v procentech.

## Použitelnost metodiky pro testování NM a souhrn nejzajímavějších výsledků

LDH analýza je poměrně často využívanou metodou pro stanovení míry cytotoxicity buněčných populací vyvolané prostřednictvím NM. Její výhodou je sensitivita, která je vyšší než u původně užívaných metod podobného principu (XTT, MTT). Také je stabilnější a rychlejší než zmíněné MTT nebo XTT.<sup>1</sup> Tato metoda není náročná na přístrojové vybavení a ve standardně vybavené laboratoři ji lze snadno použít. S výhodou je možné provést jak LDH, tak WST-1 analýzu najednou. U LDH testu se spotřebovává pouze část ovlivněného kultivačního média, naproti tomu u WST-1 se používají ovlivněné buňky. Tímto způsobem se ušetří čas pro analýzu obou metod, sníží se počet buněk a výsledky obou metod je možné srovnat a vyhodnotit.

Nevýhodou použití této metody může být užití bezfenolového média, které může způsobovat falešnou pozitivitu (je zde tedy vhodná vyšší investice v podobě specifického typu kultivačního média). Navíc je nutné počítat s kultivací buněk v kultivačním médiu s obsahem séra, což může být problém u buněčných linií, které se standardně kultivují v prostředí bez séra. Toto jsme řešili u embryonálních kmenových buněk, které se začínají diferencovat v přítomnosti séra v kultivačním médiu.<sup>2</sup> Nicméně existují varianty séra, které nezpůsobují diferenciaci buněk. Jejich pořizovací cena je však mnohonásobně vyšší než u běžných kultivačních médií.

LDH analýza byla použita pro kvantitativní stanovení cytotoxicity tří typů NM (dva druhy grafenu a oxid titaničitý) vůči různým buněčným populacím (C2C12 myoblastům, myším embryonálním fibroblastům, plicním alveolárním epitelovým buňkám a embryonálním kmenovým buňkám). Byla zjištěna koncentrační i časová závislost cytotoxicity u grafenů, nikoliv však u oxidu titaničitého. Podobné výsledky byly popsány i v publikacích Liho et al. a Zhanga et al.<sup>3,4</sup>

## MTT TEST (TEST CYTOTOXICITY)

### Teoretický základ metodiky

MTT test je kolorimetrickou metodou, kterou lze kvantitativně analyzovat buněčnou viabilitu, proliferaci a cytotoxicitu. Metoda je založena na hodnocení metabolické aktivity zkoumaných buněk. Během analýzy dochází (působením mitochondriálních dehydrogenáz) ke konverzi ve vodě rozpustného MTT (3-/4,5-dimethylthiazol-2-yl/-2,5-difenyltetrazolium bromidu) na nerozpustný formazan. Schopnost přeměny MTT na formazan je vázána na metabolicky aktivní buňky; čím více metabolicky aktivních buněk kultura obsahuje, tím větší množství formazanu vzniká. Krystaly formazanu jsou následně rozpuštěny v DMSO (dimethylsulfoxidu) a roztok je proměřován pomocí spektrofotometru.

### Podrobnější popis metodiky

#### Postup MTT (SigmaAldrich) cytotoxické analýzy pro zjištění vlivu grafenu na adherentní linii myoblastů C2C12.

1. Nasadíte C2C12 myoblasty na 96jamkovou destičku ( $0,5 - 2 \times 10^4$  buněk/jamku), 100 ml kultivačního média (DMEM, 10% FBS, 1% ATB).
2. Inkubujte buňky po dobu 24 hodin při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.
3. Odsajte médium tak, aby nebyla porušena adhezaní monovrstva buněk, a následně přidejte grafen, suspendovaný v požadované koncentraci (5–100 mg/ml; triplikát) v kultivačním médiu. Inkubujte následujících 24–48 hodin.
4. Do každé jamky pipetujte 100 ml zásobního MTT roztoku (1 g tetrazoliové soli MTT + 200 ml PBS pufru). Hotový MTT roztok je přefiltrován a uchovává se (v objemech po 10 ml) v mrazicím boxu při –20 °C; takto připravený roztok je možné skladovat po dobu 6 měsíců.
5. Inkubujte MTT roztok s buňkami po dobu 4 hodin při 37°C a 5 % CO<sub>2</sub>.
6. Odeberte médium a přidejte 100 ml DMSO (rozpuštění formazanových krystalů).
7. Míchejte po dobu 10 minut na vortexu.
8. Na spektrofotometru změřte absorbanci při 490 nm; referenční vlnová délka by neměla být vyšší než 680 nm.

### Použitelnost metodiky pro testování NM a souhrn nejzajímavějších výsledků

MTT analýza je poměrně často využívanou metodou kvantifikace buněčné viability. Jedná se o rychlou, jednoduchou a přístrojově nenáročnou metodu. Nevýhodou MTT testu je nízká stabilita formazanové soli a možnost interferencí v případě přítomnosti metabolicky vysoce aktivních buněk. Tyto buňky disponují vyšším množstvím mitochondrií a z toho plyne vyšší kapacita přeměny MTT na formazan. Uvedený jev zvyšuje riziko falešně pozitivních výsledků. Navíc u buněk podléhajících apoptóze dochází k redukci MTT z důvodu intaktních mitochondrií, což se opět může odrážet na kvalitě výsledků.<sup>5</sup> Tyto důvody vedou k postupnému nahrazování MTT analýzy metodami s vyšší sensitivitou (např. WST-1 a LDH).

MTT analýza byla zpočátku zařazena do našich experimentů s expozicemi NM (analýzy buněčné viability kmenových buněk). Po zjištění nižší míry validity výsledků (v porovnání se stabilnějšími a citlivějšími metodami jako bylo LDH nebo WST-1) bylo od používání této metody upuštěno.

## GENOVÁ KVANTIFIKACE PROSTŘEDNICTVÍM RT-QPCR (REAL-TIME QPCR)

### Teoretický základ metodiky

Informace nutné pro tvorbu funkčních proteinů jsou přenášeny z DNA na RNA a dále do procesu jejich strukturování a produkce (transkripce, translace, genová exprese). Metoda genové kvantifikace je založena na stanovení množství RNA. Protože RNA nemůže být stanovována přímo, je nutné ji nejdříve transformovat (pomocí reverzní transkriptázy) do formy, která se nazývá komplementární DNA (cDNA). Ta je následně amplifikována prostřednictvím genově specifických „primerů“ za přítomnosti interkalačních barviv (SYBR green) nebo hybridizačních sond (Taqman). Hladina fluorescenčního signálu potom koreluje s mírou genové exprese. Metody genové kvantifikace jsou využívány pro rychlé stanovení míry genové exprese. Množství RNA je stanovováno pomocí předem charakterizovaných „housekeeping“ genů, které tvoří vnitřní standard pro normalizaci hladiny genové exprese cílového genu. Real-time qPCR je výkonné a citlivé zařízení pro studium malých změn genové exprese.

### Podrobnější popis metodiky

#### Izolace RNA

1. Proveďte lýzu buněk prostřednictvím 500  $\mu$ l TRI Reagent (kombinace fenolu a guanidin isothiokyanátu).
2. K lyzovanému vzorku přidejte 500  $\mu$ l čistého etanolu (bez přítomnosti nukleáz).
3. Směs přeneste na „silica spin column“ (zde se zachytí vzorek) a po dobu 30 vteřin odstředíte při 16 000  $\times$  g společně s ependorfkou na zachycení odpadu vzorku.
4. Odstraňte ependorfku s odpadem a opatřit „silica spin column“ novou ependorfkou. Přidat 400  $\mu$ l RNA „wash buffer“ do silica spin column“ a po dobu 30 vteřin odstředíte při 16 000  $\times$  g. Přidejte 75  $\mu$ l „DNA digestion buffer“ k 5  $\mu$ l „DNázy I“; obě reagentie promíchejte a přidejte „do silica spin column“. Natrávení DNA probíhá po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Tento krok odstraňuje genomickou DNA, která by mohla při kvantifikaci vytvářet falešnou pozitivitu.
5. Do „silica spin column“ přidat 400  $\mu$ l „pre-wash buffer“ a po dobu 30 vteřin odstředíte při 16 000  $\times$  g.
6. Odstranit ependorfku s odpadem a opakovat krok 5.
7. Do „silica spin column“ přidejte 700  $\mu$ l „RNA wash bufferu“ a pro kompletní odstranění pufry odstředíte po dobu 2 min při 16 000  $\times$  g. Odstraňte odpadní vzorek a obsah „silica spin column“ přeneste do ependorfky, která je prostá nukleáz.
8. Extrahujte RNA přidáním 50  $\mu$ l ultračisté vody (bez přítomností nukleáz) a po dobu 30 vteřin odstředíte při 16 000  $\times$  g.
9. Následuje syntéza cDNA (zbylá RNA je uchovávána při  $-80$  °C).

## Syntéza cDNA

1. Pro cDNA syntézu použijte 500 ng RNA.
2. RNA rozpusťte v ultračisté vodě (bez přítomnosti nukleáz) na výsledný objem 10  $\mu$ l.
3. Komponenty a jejich množství pro syntézu „cDNA enzym mixu“:

Komponenty	Objem pro jednu reakci
10X RT buffer	2,0 $\mu$ l
25X dNTP mix (100 mM)	0,8 $\mu$ l
10X RT Random primer	2,0 $\mu$ l
MultiScribe Reverse transcriptase enzyme	1,0 $\mu$ l
Ultračistá voda	4,2 $\mu$ l
Celkem	10,0 $\mu$ l

4. 10  $\mu$ l cDNA mixu přidejte k 10  $\mu$ l rozpuštěné RNA.
5. Nastavení pro cDNA syntézu:

Nastavení	Krok 1	Krok 2	Krok 3	Krok 4
Teplota	25 °C	37 °C	85 °C	12 °C
Čas	10 min	120 min	5 min	$\infty$

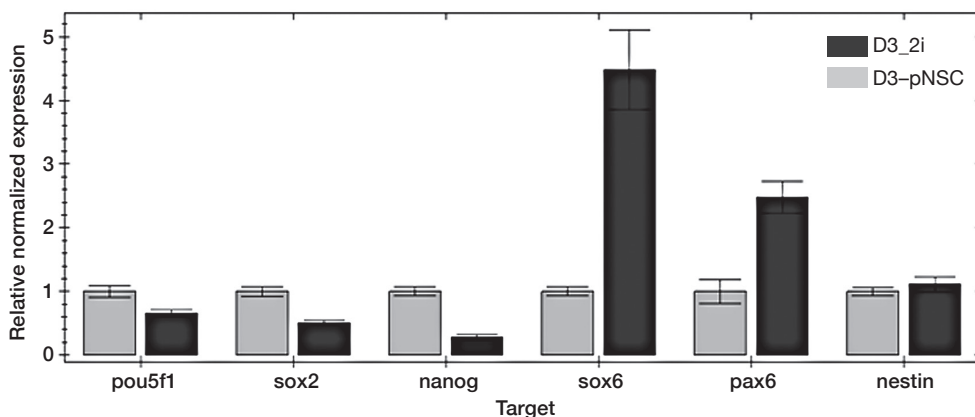
## Real-time qPCR

1. Procedura „Real-time qPCR“ byla prováděna pomocí sady firmy Roche (Roche Light-Cycler 480 SYBR Green I master mix) v přítomnosti primeru komplementárního ke zkoumanému genu (koncentrace 400 nM). Celkový objem roztoku byl 15  $\mu$ l.
2. Genová exprese je vztažena k referenčnímu genu  $\beta$ -aktinu. Pro kvantifikaci bylo použito 10 ng cDNA (vzorky byly analyzovány v triplicátech).
3. Měření bylo prováděno na přístroji firmy BioRad CFX96 Touch s takto nastavenými parametry:

Nastavení	Krok 1	Krok 2	Krok 3	Krok 4		Krok 5
Teplota	95 °C	95 °C	60 °C	72 °C	Opakování kroku; 40 cyklů	Křivka tání (60 °C až 95 °C)
Čas	5 min	10 s	20 s	30 s (přírůstek)		Kontinuální přírůstek

## Použitelnost metodiky pro testování NM a souhrn nejzajímavějších výsledků

Výsledky metody „RT-qPCR“ mohou být ovlivňovány interferencemi NM s komponentami použitými v metodice. To klade velký důraz na průběžné ověřování výsledků. Některé referenční geny se navíc mohou v přítomnosti NM stát nestabilními a volba stabilního referenčního genu se tak stává jedním z klíčových kroků metody.



**Obrázek 29.** Analýza genové exprese různých buněk linie embryonálních myších buněk (ES) D3 linie  
*Poznámka:* Výsledky prezentují rozdíl v genové expresi diferenciovanych ES D3 buněk a nediferenciovanych ES D3 buněk.  $\beta$ -aktin byl použit jako referenční gen a výsledek je po 6 dnech od začátku buněčné diferenciaci. Data jsou vyjádřena jako průměry se směrodatnou odchylkou.

V našich experimentech jsme prostřednictvím malých molekulárních inhibitorů a LIF izolovali neurální kmenové buňky z myších embryí. Kombinace CHIR99021, XAV939, LDN 193189, SB431542 a LIF indukuje neuroektodermový potenciál v embryonálních kmenových buňkách. Tyto buňky pak exprimují neurogenní markery jako je Sox1 a Pax6, společně s pluripotentními markery Pou5f1, Sox2 a Nanog (Obrázek 29). Uvedené markery by mohly sloužit k analýze změn genové exprese vlivem expozice NM.

## XCELLIGENCE (BUNĚČNÁ PROLIFERACE, ADHEZE, VIABILITA, MORFOLOGIE)

### Teoretický základ metodiky

Systém xCELLigence firmy Roche je elektronický systém s biosensory, které umožňují v reálném čase sledovat buněčnou proliferaci, adhezi, viabilitu, morfologii a kvantifikovat  $CI_{50}$  (*cell index*). Pro sledování tohoto „biologického statusu“ buňky není zapotřebí značení buněk, měří se změna elektrické impedance prostřednictvím zabudovaných mikroelektrod na dně speciálních destiček. Sledování těchto změn v reálném čase je umožněno prostřednictvím softwaru, který uživateli poskytuje možnost analyzovat data v průběhu experimentu. Jakmile buňky přisednou na dno jamek s mikroelektrodami, dojde ke změně CI. Jestliže buňky na dno jamky nepřisednou, je hodnota CI nulová; v případě adheze hodnota CI roste úměrně k množství adherovaných buněk. Do celkové hodnoty CI se promítá rovněž změna buněčného tvaru, viability a proliferace.

## Podrobnější popis metodiky

### Protokol pro RTCA DP systém xCELLigence pro zjištění vlivu grafenu firmy na adhe- rentní linii myoblastů C2C12

*Poznámka:* Je nutné dobře promyslet rozložení destičky (layout). Každá destička má 16 jamek, každá pojme až 200 ml kultivačního média s buňkami. Důležité je předem nastavit parametry experimentu (měření všech destiček najednou nebo separátně, počet buněk v jedné jamce, koncentrace NM, čas přidání NM, doba měření a počet sweeps za hodinu/minutu). Důležitá je informace o čase, ve kterém buňky dosáhnou fáze „plató“. V této fázi je vhodné přidávat NM.

1. Nasaďte C2C12 myoblasty na destičku pro RTCA DP systém (100–1500 buněk/jamku) ve 100 ml kultivačního média (DMEM, 10% FBS, 1% ATB).
2. Inkubujte buňky po dobu 24 hodin při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.
3. Připravte média s různými koncentracemi grafenu (5–100 mg/ml; triplikát). Přidejte 100 ml kultivačního média s grafenovou suspenzí na destičku. Nedoporučujeme zcela odsát původní kultivační médium a přidat nové médium s NM: dochází pak k porušení adheované monovrstvy, což má za následek změnu CI.
4. Inkubujte následujících 24–48 hodin.
5. Vyhodnoťte plot a hodnoty CI.

### Použitelnost metodiky pro testování nanočástic a souhrn nejzajímavějších výsledků

Na rozdíl od běžně dostupných testů (WST-1, LDH, XTT a MTT) není xCELLigence rozšířenou metodou pro sledování buněčné proliferace a cytotoxicity. Hlavním důvodem jsou vyšší investice do přístrojového vybavení a do destiček s mikroelektrodami, které lze použít pouze jedenkrát. Na druhou stranu metoda xCELLigence umožňuje zachycování širokého spektra změn v buněčné viabilitě, proliferaci, adhezi a morfologii v reálném čase a není omezena tak jako klasické „end-point“ analýzy.

Sledování viability a adheze buněk metodou xCELLigence jsme použili pro zhodnocení cytotoxického vlivu tří typů NM (dvou druhů grafenu a oxidu titaničitého) na různé buněčné linie (C2C12 myoblasty, plicní alveolární epitelové buňky a embryonální kmenové buňky). Byla zjištěna koncentrační i časová závislost cytotoxicity (snížení viability) u grafenů, nikoliv však u oxidu titaničitého. Monitorování biologického statusu buněk bylo použito i v jiných studiích, které zkoumaly potenciálně toxický vliv NM na buněčné kultury (Kvako-va et al.).<sup>6</sup>

## HISTOLOGICKÁ ANALÝZA

### Teoretický základ metodiky

Techniky histologické analýzy se používají pro sledování mikroskopické morfologie tkáň a orgánů ve fyziologickém stavu nebo po ovlivnění exogenními či endogenními faktory

(změny prostorového uspořádání). Vzorky orgánu či tkáně mohou být odebrány z živého (biopsie) či neživého (nekropsie) organismu. Zvláštní formou je peroperační biopsie, která se provádí během chirurgického výkonu. Odebraný vzorek je v co nejkratší době fixován (prevence autolytických procesů) a zpracován do podoby zmrazeného řezu. Takto zhotovený řez je připraven k okamžitému vyhodnocení, což umožňuje sdělit operátorovi během výkonu, zda se jedná o vzorek ve fyziologickém či patologickém stavu.

## Podrobnější popis metodiky

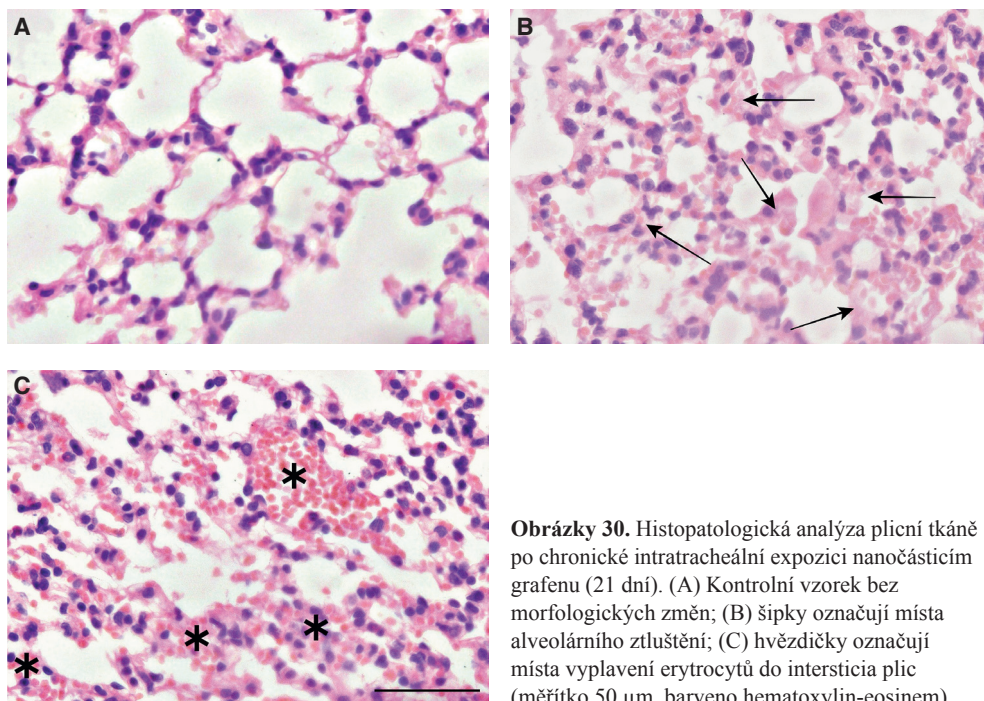
### Postup histologického zpracování orgánů po intratracheální a perorální expozici myši C57Bl/6 nanočásticím grafenu:

1. Po expozici nanočásticím grafenu byly myši usmrceny letální dávkou isofluranu. Následně byly odebrány orgány (plíce, srdce, žaludek, tenké střevo, játra a ledviny).
2. Orgány byly fixovány 10% formalínem (tímto procesem dochází k denaturaci bílkovin, která inhibuje aktivitu autolytických enzymů, jež by v případě aktivace poškodily morfologii orgánu či tkáně) po dobu 3–4 dnů (délka fixace je úměrná velikosti a komplexnosti orgánu).
3. Po fixaci byly orgány dehydratovány vzestupnou alkoholovou řadou (60–100% etanol) a prosyceny xylenem ve tkáňovém automatu (autotechnikonu).
4. Orgány byly zality do roztaveného parafinu. Ztuhnutím vznikl parafinový bloček připravený pro krájení řezů.
5. Z parafinového bločku byly na mikrotomu nakrájeny řezy o tloušťce 5  $\mu\text{m}$ . Řezy byly přeneseny na podložní sklo potažené želatinou, která usnadňuje přilnutí řezu na povrch skla.
6. Před obarvením byly řezy odparafinovány a hydratovány v roztocích Ottix plus (2  $\times$  7 minut) a Ottix shaper (2  $\times$  7 minut). Řezy byly opláchnuty destilovanou vodou a obarveny hematoxylinem, který obarvuje bazofilní struktury orgánu (například jádro či drsné endoplazmatické retikulum). V hematoxylinu byly řezy barveny 3–10 minut (délka barvení závisí na čerstvosti a typu hematoxylinu) a poté oplachovány zhruba 10 minut pod tekoucí vodou. Dobarvení eosinofilních struktur (cytoplazmy a mitochondrií) bylo provedeno za použití eosinu; řezy byly barveny po dobu 3–5 minut (doba barvení se odvíjí od čerstvosti eosinu).
7. Obarvené řezy byly dehydratovány v roztocích Ottix shaper a Ottix plus a zamontovány montovacím médiem DPX, které umožňuje dlouhodobé uchovávání histologických preparátů.

## Použitelnost metodiky pro testování nanomateriálů (NM) a souhrn nejzajímavějších výsledků

Histologické zpracování je rutinní záležitostí, které je používáno ve všech histologických laboratořích. Metody se liší v roztocích, které jsou používány pro přípravu preparátů. Vedle standardní přípravy obarvených tkáňových řezů lze provést také imunohistochemické detekce antigenů v tkáni.<sup>7</sup> Výhodou parafinových řezů je možnost dlouhodobého skladování, barvení širokou škálou metod a zachování morfologie orgánů. Při nešetrné fixaci může docházet

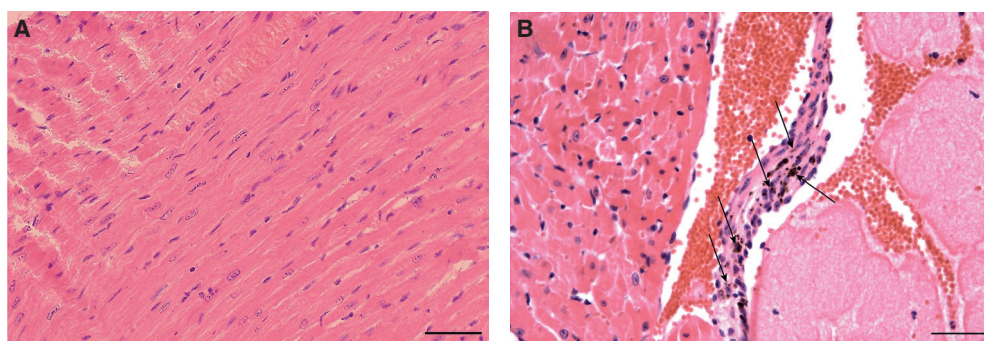




**Obrázky 30.** Histopatologická analýza plicní tkáně po chronické intratracheální expozici nanočásticím grafenu (21 dní). (A) Kontrolní vzorek bez morfologických změn; (B) šipky označují místa alveolárního ztlustění; (C) hvězdičky označují místa vyplavení erytrocytů do intersticia plic (měřítko 50  $\mu\text{m}$ , barveno hematoxylin-eosinem).

k porušení antigenních epitopů, což znesnadňuje imunohistochemickou analýzu. Chyby při alkoholovém odvodnění mohou mít za následek svráštění tkáně a tvorbu artefaktů.

Histologická analýza byla použita pro zhodnocení vlivu intratracheální a perorální expozice nanočásticím grafenu na tkáň myši kmene C57Bl/6. Byly použity dvě expoziční koncentrace (5 a 50 mg/ml) v akutní, subakutní a chronické formě expozice. Orgány byly odebírány po 1, 7 a 21 dnech expozice. Akutní ani subakutní forma expozic (intratracheálních i perorálních) neměla na morfologii orgánů žádný vliv. Vlivem chronické intratracheální expozice



**Obrázky 31.** Histopatologická analýza srdeční tkáně po chronické intratracheální expozici (21 dní). (A) Kontrolní vzorek bez morfologických změn; (B) šipky označují místa akumulace grafenových nanočástic ve vazivu endokardu (měřítko 50  $\mu\text{m}$  (A) a 20  $\mu\text{m}$  (B), barveno hematoxylin-eosinem).

došlo ke ztluštění alveolárních stěn (zřejmě v důsledku zánětlivé reakce) a k vylití erytrocytů do intersticiální plicní tkáně. V srdci byla zjištěna kumulace malých depozit grafenových částic ve vazivu endokardu (Obrázky 30 a 31). Nepozorovali jsme však kumulaci těchto částic v plicní tkáni, tak jak to uvádějí jiní autoři.<sup>8,9</sup>

Odborná literatura popisuje změny morfologie orgánů po perorální expozici grafenu.<sup>10–12</sup> V našem (výše uvedeném) experimentu jsme však žádné orgánové morfologické změny nenašli. Důvodem by mohly být nízké expoziční koncentrace (v našem experimentu), jejichž negativní účinek byl eliminován adaptačními a reparačními mechanismy organismu (přijetí xenobiotika bez vyvolání zánětlivých či morfologických změn).

## TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

### Teoretický základ metodiky

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) umožňuje vizualizovat NM a identifikovat jejich lokalizaci v buňkách (*in vitro*) nebo ve tkáních laboratorních zvířat (*in vivo*). Po fixaci a zalití biologických vzorků (exponovaných buněk nebo vzorků tkání) do pryskyřice jsou nejdříve připravovány polotenkové řezy, které lze analyzovat ve světelném mikroskopu. Tak lze vyhledat oblasti řezu vhodné pro vyšetření v TEM. Následně jsou zhotovovány ultratenké řezy o tloušťce 50–60 nm. TEM pracuje na principu prozáření ultratenkého řezu svazkem urychlených elektronů. Některé elektrony řezem procházejí bez ovlivnění, u jiných dochází k interakcím s atomy a k jejich rozptylu. Výsledný obraz vzniká na fluorescenčním stínítku. Zvětšení a rozlišení dosahovaná TEM poskytují možnost pozorovat částice o rozměru několika nanometrů.

### Podrobnější popis metodiky

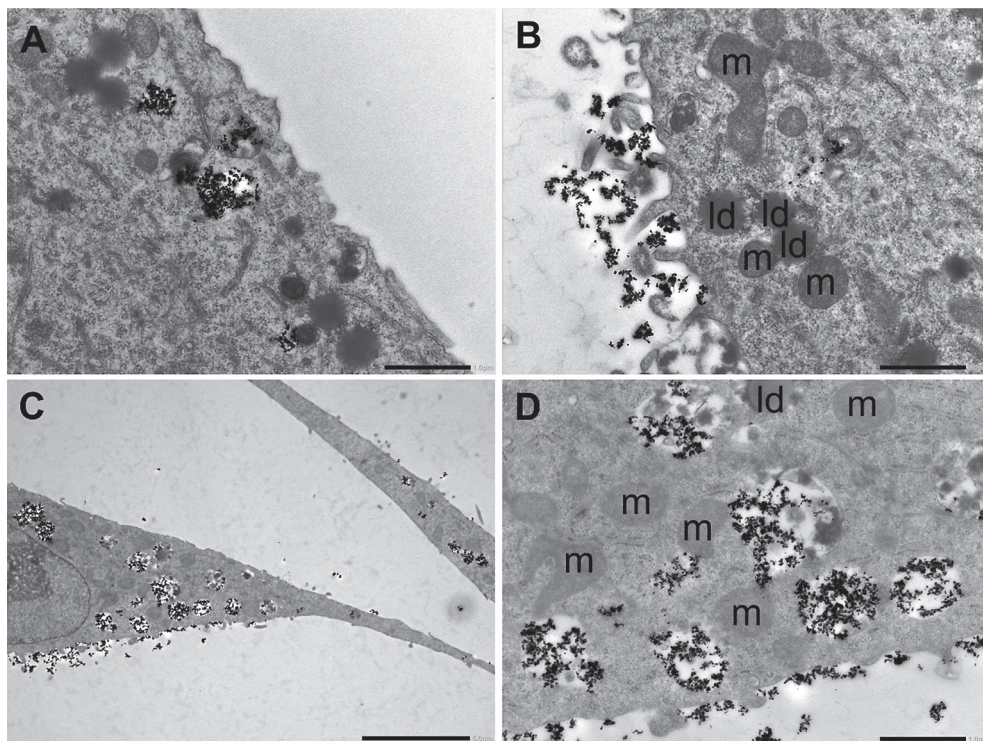
#### Postup zpracování buněčných kultur a jejich vyšetření v TEM

1. Fixace buněk je prováděna ve dvou krocích. Nejdříve jsou buňky fixovány 3% glutaraldehydem v 0,1 M kakodylátovém pufru (pH 7,2; Sigma) při laboratorní teplotě po dobu 3 hodin. Po oplachu v 0,1 M kakodylátovém pufru jsou buňky „dofixovány“ 1% oxidem osmičelým v 0,1 M kakodylátovém pufru při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny. Následuje intenzivní oplach v 0,1 M kakodylátovém pufru. Fixace buněk se provádí přímo v kultivačních nádobkách.
2. Po fixaci jsou buňky dehydratovány etanolem (vzestupnou řadou 50%, 75%, 96% a 100%) a propylenoxidem a infiltrovány směsí pryskyřic Epon 812 a Durcupan ACM (Sigma). Po infiltraci jsou buňky zality do želatinových kapslí. Pryskyřice se nechá polymerovat po dobu 3 dnů při 60 °C za vzniku bločku.
3. Na ultramikrotomu (Ultrotome Nova, LKB, Švédsko) se z bločků krájí ručně zhotoveným skleněným nožem polotenkové řezy o tloušťce 0,5 nebo 1 μm, které jsou přeneseny na skleněné podložní sklíčko, obarví se toluidinovou modří a pozorují ve světelném mikroskopu. Na polotenkém řezu se identifikuje oblast vhodná pro vyšetření v transmisním elektronovém mikroskopu. Poté se bloček zmenší (aby se zredukovala plocha řezu), přičemž oblast zájmu zůstává zachovaná.

- Na ultramikrotomu jsou následně z bločku diamantovým nožem krájeny ultratenké řezy o tloušťce 50 až 60 nm. Ty jsou přeneseny na speciální měděné nebo niklové sítky, které jsou potažené „formvarovým“ filmem a „naprášené“ uhlíkem. Pro zvýšení kontrastu se ultratenké řezy dobarvují (kontrastují) uranyl acetátem a citrátem olovnatým.
- Ultratenké řezy jsou analyzovány v TEM JEOL JEM 1400Plus při 120 kV. Výsledné obrázky jsou nasnímány integrovanou 8Mpix CCD kamerou a zpracovány pomocí softwaru TEM Center (Ver. 1.7.3.1537, JEOL, Japonsko).

## Použitelnost metodiky pro testování NM

TEM umožňuje identifikaci a charakterizaci tvaru a velikosti NM v buňkách kultivovaných v prostředí *in vitro* nebo ve tkáních exponovaných laboratorních zvířat. TEM je jedinou metodou, která poskytuje přesné informace o nativních (neznačených) NM v buněčných kompartmentech (například v cytosolu, mitochondriích, autofagozomech nebo v jádře). Je velmi vhodná pro elektronodenní anorganické NM, jako je například  $\text{TiO}_2$ , nicméně i nanočástice grafenu dosahují dostatečného kontrastu nezbytného k jejich vizualizaci. Obecnými



**Obrázky 32.** Buňky linie A549 exponované nanočásticím  $\text{TiO}_2$  v kulturačním médiu s přidavkem fetálního bovinního séra (A, B) a bez přidavku fetálního bovinního séra (C, D)

*Poznámka:* mitochondrie (m), tuková kapénka (ld), jádro (n); měřítko A, B, D 1  $\mu\text{m}$ , C 5  $\mu\text{m}$ .

nevýhodami TEM je časová i finanční náročnost a nutnost specializovaného pracoviště s vyskolenými pracovníky.

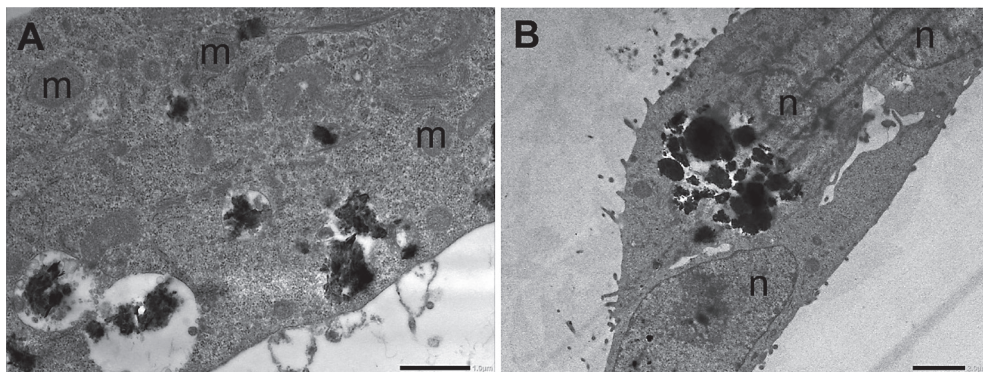
Mezi metodické problémy analýzy biologických vzorků s NM patří (1) používání diamantového nože při krájení ultratenkých řezů a (2) kontrastování ultratenkých řezů. Při krájení ultratenkých řezů biologických vzorků s internalizovanými NM dochází k poškozování ostří diamantového nože. Vzhledem k tomu, že broušení diamantového nože je finančně velmi nákladné, nabízí se alternativa krájení ultratenkých řezů ručně zhotoveným skleněným nožem. Řezy nakrájené skleněným nožem jsou však většinou silnější, což vede ke snížení kvality obrazu.

Kontrastování ultratenkých řezů má někdy za následek tvorbu artefaktů, které mohou být při pozorování v TEM chybně považovány za NM. Identifikace nanočástic  $\text{TiO}_2$  je díky jejich charakteristickému tvaru a velikosti jednoznačná i na kontrastovaných ultratenkých řezech. Naproti tomu nanočástice grafenu se v buňkách obvykle částečně shlukují a mohou připomínat výše zmíněné artefakty. Při pochybnostech je možné kontrastování řezů vynechat. Tím sice dojde ke snížení kvality kontrastu obrazu, ale zabrání se chybnému vyhodnocení.

## Souhrn nejzajímavějších výsledků

TEM potvrdila internalizaci nanočástic  $\text{TiO}_2$  (P25 disperze) buňkami linie A549 po expozici v kultivačním médiu s přidavkem fetálního bovinního séra (Obrázky 32 A, B) a bez přidavku fetálního bovinního séra (Obrázek 32). Nanočástice  $\text{TiO}_2$  se vyskytovaly v cytoplazmě buněk, především ve váčcích tvořených biomembránou. Na volném povrchu buněk, který byl v kontaktu s kultivačním médiem, se nacházely štíhlé cytoplazmatické výběžky, v jejichž blízkosti se nanočástice  $\text{TiO}_2$  akumulovaly.<sup>13</sup>

TEM potvrdila internalizaci dvou typů nanočástic grafenu (z Trinity College Dublin, Irsko, a od firmy PlasmaChem) buňkami linie A549 po krátkodobé (48 h) i dlouhodobé (osmítýdenní) kultivaci. V experimentu byly použity tři koncentrace grafenu. Většina buněk linie A549, exponovaných nanočásticím grafenu firmy PlasmaChem (o koncentraci 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )



**Obrázek 33.** Buňky linie A549 exponované nanočásticím grafenu (z firmy PlasmaChem) po krátkodobé (A) a dlouhodobé (B) kultivaci

*Poznámka:* mitochondrie (m), jádro (n); měřítko A 1  $\mu\text{m}$ , B 2  $\mu\text{m}$ .

po dobu 48 hodin, grafenové nanočástice internalizovala. Ve většině případů byly kumulovány v membránových váčcích, menší volné shluky byly pozorovány v cytoplazmě. Váčky s nanočásticemi se vyskytovaly nejčastěji v blízkosti volného povrchu buněk. Po dlouhodobé kultivaci (při zachování shodné koncentrace) se nanočástice grafenu nacházely výhradně v membránových váčcích, které dosahovaly větších rozměrů, než tomu bylo po krátkodobé kultivaci. Tyto váčky se vyskytovaly ve všech oblastech cytoplazmy (Obrázek 33).<sup>14</sup>

## LITERATURA

1. Wörle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF. Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays. *Nano Lett.* 2006;6(6):1261–1268. doi:10.1021/nl060177c.
2. Balbasi E, Guven G, Terzi Cizmecioğlu N. Mouse Embryonic Stem Cell Culture in Serum-Containing or 2i Conditions. *Methods Mol Biol.* 2022;2520:275–294. doi:10.1007/7651\_2021\_438.
3. Li Y, Liu Y, Fu Y et al. The Triggering of Apoptosis in Macrophages by Pristine Graphene Through the MAPK and TGF-beta Signaling Pathways. *Biomaterials.* 2012;33(2):402–411. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.091.
4. Zhang Y, Ali SF, Dervishi E et al. Cytotoxicity Effects of Graphene and Single-Wall Carbon Nanotubes in Neural Phaeochromocytoma-Derived PC12 Cells. *ACS Nano.* 2010;4(6):3181–3186. doi:10.1021/nn1007176.
5. Grell E, Ząbek A, Grabowiecka A. Interferences in the Optimization of the MTT Assay for Viability Estimation of *Proteus mirabilis*. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2015;7(4):159–167.
6. Kvakova M, Stroffekova K, Stofilova J et al. Toxicological Evaluation of Fluorescent 11-Mercaptooundecanoic Gold Nanoclusters as Promising Label-Free Bioimaging Probes in Different Cancer Cell Lines. *Toxicol In Vitro.* 2021;73:105140. doi:10.1016/j.tiv.2021.105140.
7. Mokřý J. Versatility of Immunohistochemical Reactions: Comprehensive Survey of Detection Systems. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 1996;39(4):129–140.
8. Gao H, Hammer T, Zhang X et al. Quantifying Respiratory Tract Deposition of Airborne Graphene Nanoplatelets: The Impact of Plate-Like Shape and Folded Structure. *NanoImpact.* 2021;21:100292. doi:10.1016/j.impact.2021.100292.
9. Kim JK, Shin JH, Lee JS et al. 28-Day Inhalation Toxicity of Graphene Nanoplatelets in Sprague-Dawley Rats. *Nanotoxicology.* 2016;10(7):891–901. doi:10.3109/17435390.2015.1133865.
10. Chang Y, Yang ST, Liu JH et al. In Vitro Toxicity Evaluation of Graphene Oxide on A549 Cells. *Toxicol Lett.* 2011;200(3):201–210. doi:10.1016/j.toxlet.2010.11.016.
11. Shin JH, Han SG, Kim JK et al. 5-Day Repeated Inhalation and 28-Day Post-Exposure Study of Graphene. *Nanotoxicology.* 2015;9(8):1023–1031. doi:10.3109/17435390.2014.998306.
12. Wang K, Ruan J, Song H et al. Biocompatibility of Graphene Oxide. *Nanoscale Res Lett.* 2011;6(1):8. doi:10.1007/s11671-010-9751-6.
13. Bacova J, Knotek P, Kopecka K et al. Evaluating the Use of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles for Toxicity Testing in Pulmonary A549 Cells. *Int J Nanomedicine.* 2022;17:4211–4225. doi:10.2147/IJN.S374955.
14. Šestáková B, Schröterová L, Bezrouk A et al. The Effect of Chronic Exposure of Graphene Nanoplatelets on the Viability and Motility of A549 Cells. *Nanomaterials.* 2022;12(12):2074. doi:10.3390/nano12122074.

# METODIKY ÚSTAVU KLINICKÉ IMUNOLOGIE A ALERGOLOGIE

(ÚKIA, Fakultní nemocnice Hradec Králové)

ve spolupráci s Výzkumným ústavem veterinárního  
lékařství, v. v. i. (VÚVeL)

## PŘÍPRAVA SUSPENZE NANOMATERIÁLŮ PRO TESTOVÁNÍ IMUNOTOXICITY

Před vlastním testováním biologických účinků musí být veškeré nanomateriály (NM) řádně charakterizovány a převedeny do takové suspenze, aby nedocházelo k nadměře agregace a aby samotné suspenzní médium neovlivňovalo viabilitu a aktivační stav modelových buněk. Ideální je suspenze ve vodě nebo v biokompatibilním pufru (např. PBS). V případě hydrofobních NM je nutné přistoupit ke stabilizaci různými detergenty. Vhodné jsou detergenty, které se neváží kovalentně (např. sodná sůl kyseliny cholové), případně proteiny. Je proto důležité, aby příprava suspenze vycházela ze spolupráce s materiálovými fyziky a chemiky, kteří zajišťují správnou fyzikálně-chemickou charakterizaci a hodnocení stability NM a NP v zásobních suspenzích. Detailní postup přípravy a charakterizace nemodifikovaných grafe-nových plátek (GP) a karbonových nanotrubic (MWCNT) lze najít v publikaci Švadlákové et al. z roku 2020.<sup>1</sup>

### **Příklad**

#### **Ukázka úvodní optimalizace suspenze nemodifikovaných GP (úvodní měření, porovnání hodnot)**

Hodnocení stability suspenze probíhalo na základě hodnot hydrodynamického průměru (*Z-average*), hodnot polydisperzního indexu (Pdl) získaných na základě měření dynamického rozptylu světla DLS a hodnot Zeta-potenciálu ( $\zeta$ ). Výsledky *Z-average* byly porovnávány s transmisí elektronovou mikroskopií (hodnoty získané pomocí DLS v případě planárních částic bývají spíše orientační).

#### **GP1 (Plasmachem):**

Velikost (laterální dimenze):  $\leq 2 \mu\text{m}$

Tloušťka: 1–4 nm

Přístrojové vybavení: analytické váhy s ionizérem (Ohaus), tyčový sonikátor (QSonica 700/ Bandelin), Zetasizer Nano-Ultra (Malvern Panalytical Ltd)

**Příprava (Tabulka 8):**

1. Navážení, cca 200 µg /ml 0,25 % cholátu sodného v destilované vodě.
2. Sonikace 30 min, pulzy 1 s on / 1 s off – amplituda 75 %, tyčový sonikátor.
3. Rozdělení do vialek (každá ředěna jiným rozpouštědlem) a měření DLS.

**Tabulka 8.** Hodnoty Z-average a PdI pro reakční složky suspenze GP

<b>Z-average</b>				
0,25% cholát	186,5_PdI 0,203	–	–	<b>25 °C</b>
Ředěno do:	0 h	20 h	96 h	Teplota m.
voda filtr.	198,4_PdI 0,226	187,7_PdI 0,215	179,4_PdI 0,213	37 °C
10% FBS	264,4_PdI 0,250	247,7_PdI 0,221	210,6_PdI 0,226	37 °C
PBS	239,7_PdI 0,235	1173_PdI 0,529	2602_PdI 0,438	37 °C
RPMI 1640	227,9_PdI 0,214	767,9_PdI 0,422	1125_PdI 0,354	37 °C

**Titrace koncentrace cholátu (Tabulka 9):**

1. Příprava 250 µg/ml suspenze GP, rozdělení do vialek s rozdílnými koncentracemi cholátu.
2. Sonikace každé vialky 30 min, pulzy 1 s on / 1 s off – amplituda 75 %, tyčový sonikátor.
3. Měření DLS, kontrola pohledem na přítomnost agregátů.

**Tabulka 9.** Hodnoty Z-average a PdI pro různé koncentrace cholátu

<b>Z-average</b>		
<b>Koncentrace cholátu (%)</b>	<b>0 h</b>	<b>20 h</b>
0,001	-	786,4_PdI 0,936
0,005	205,5_PdI 0,216	215,7_PdI 0,175
0,007	175_PdI 0,102	204,4_PdI 0,257
0,01	184,7_PdI 0,195	187,7_PdI 0,017
<b>0,02</b>	<b>244_PdI 0,006</b>	<b>196_PdI 0,347</b>

Okem pozorovatelné agregáty rychle klesají ke dnu, zejména následující den, proto byla vybrána koncentrace 0,02 %.

**Měření ζ-potenciálu (porovnání různých rozpouštědel) (Tabulka 10):**

1. Příprava 250 µg/ml suspenze GP v různých detergentech (cholát, triton) nebo ve fosfátu.
2. Sonikace 30 min, pulzy 1 s on / 1 s off – amplituda 75 %, tyčový sonikátor.
3. Měření.

**Tabulka 10.** Hodnoty  $\zeta$ -potenciálu v závislosti na rozpouštědle a Z-average

Suspenze GP, 250 $\mu\text{g/ml}$ ve	Z-average (nm)	$\zeta$ -potenciál (mV)
H <sub>2</sub> O bez cholátu	942,5	-31,00
0,25% cholát, dále 5 $\times$ ředění	–	-30,40
0,25% cholát, dále 3 $\times$ centrifugace 20 000 $\times$ g 5min, 5 $\times$ ředění	119,9	-27,30
5mM fosfátu	800,3	-31,90
5mM fosfátu, dále centrifugace 1000 $\times$ g 10 min, supernatant	486,6	-35,80
5mM fosfátu + 0,125 % cholátu, dále 10 $\times$ ředění fosfátem	166,6	-40,70
5mM fosfátu + 0,125 % cholátu, dále ředění kys. pH 2,5	–	-5,49
5mM fosfátu + 0,02% Triton X 100, dále ředění 10 $\times$ fosfátem	320,2	-37,70
0,125% cholát +0,1% BSA, dále centrifugace Air-fuge 3 $\times$ 30 min, peleta	212,5	-33,30
0,02% cholát, dále ředění 2 $\times$ čistým RPMI bez FBS	754,6	-30,30
0,02% cholát, dále ředění 2 $\times$ plným RPMI bez FBS	1012,0	-23,80
ředění 2 $\times$ plným RPMI bez FBS ale s 0,1% BSA	768,1	-23,50
<b>0,02% cholát, dále ředění 2<math>\times</math> plným RPMI + 10% FBS</b>	<b>226,3</b>	<b>-10,80</b>

**Suspenze grafenu pro následující testování buněk (Tabulka 11):**

1. Příprava 250  $\mu\text{g}$  GP na 1 ml 0,02% cholátu.
2. Sonikace, pulzy 1 s on / 1 s off – amplituda 65 %, tyčový sonikátor.
3. Sterilizace autoklávkem, 121  $^{\circ}\text{C}$ , 20 min (dle měření nemá vliv).
4. Naředění 1:1 s plným RPMI + 10% FBS.
5. Měření.

**Tabulka 11.** Hodnoty  $\zeta$ -potenciálu v závislosti na rozpouštědle a Z-average

Suspenze GP	Z-average (nm)	$\zeta$ -potenciál (mV)
v 0,02% cholátu, dále 2 $\times$ ředění H <sub>2</sub> O	175,5	-33,3
v 0,02% cholátu, dále ředění 1:1 pln. RPMI + 10 % FBS	212,8	-9,35
po expozici (50 $\mu\text{g/ml}$ )	196,5	-6,95



## TESTOVÁNÍ BIOLOGICKÉ KONTAMINACE SUSPENZÍ NM

Hodnocení kontaminace zásobní suspenze NM by mělo předcházet veškerému testování imunotoxicity a obecně toxicity. Přestože suspenze nemusí být nutně kontaminovány celými mikroorganismy, často se na jejich površích nacházejí jejich části, jako je například lipopolysacharid (LPS), který patří mezi nejběžnější kontaminace výzkumných laboratoří. Jeho přítomnost prokazatelně ovlivňuje jak pohlcování nanočástic (například makrofágy), tak i výslednou imunitní odpověď. Logicky tak dochází ke zkrácení a k chybné interpretaci výsledků.

Nejčastěji používaný test na hodnocení přítomnosti LPS je LAL (Limulus Amoebocyte Lysate), který ovšem často s nanomateriály interferuje. LAL test je založen na LPS-indukované koagulační kaskádě vedoucí k tvorbě gelové sraženiny. Bylo však zjištěno, že například oxidované karbonové NM adsorbují přítomný zymogen, což vede k aktivaci koagulace i v nepřítomnosti LPS. Jiná alternativa je založena na nepřímém průkazu LPS pomocí detekce TNF- $\alpha$ , produkovaného primárními lidskými makrofágy v přítomnosti nebo nepřítomnosti polymyxinu B, inhibitoru LPS.<sup>2</sup> Tento test je však omezen cytotoxickým potenciálem testovaných nanomateriálů. Další alternativou je využití specifických reportérových buněčných linií citlivých na toll-like receptor (TLR) agonisty, jakým je právě LPS.

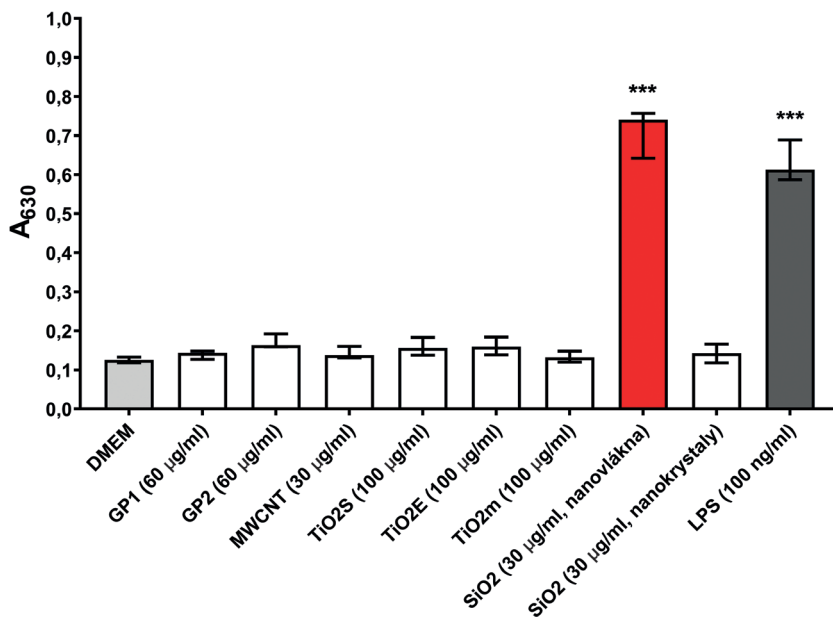
### Buněčná esej – TLR

Esej využívá reportérové buněčné linie vycházející z HEK293 (*human embryonic kidney carcinoma*), které mají vnesený gen pro sekretovanou alkalickou fosfatázu (AP). Gen je navázaný na signální dráhu NF- $\kappa$ B, která je výlučně spojena s konkrétním TLR (v našem případě TLR4 nebo TLR2). Po navázání příslušného agonisty dochází k aktivaci a produkci AP do supernatantu, kde je detekována médiem, které v přítomnosti AP modrá. Výsledná absorbance je přímo úměrná hladině agonisty (například LPS nebo peptidoglykanů).

#### Příklad

##### Postup stanovení LPS v suspenzích nanomateriálů

1. HEK-Blue<sup>TM</sup>-4 (150  $\mu$ l, Invivogen) se v bezfenolovém médiu (DMEM, 10 % FBS s nízkým obsahem endotoxinu, 2 mM glutamin, antibiotika) nasadí do 96jamkové kultivační destičky (5  $\times$  10<sup>4</sup> buněk/jamka) a inkubují se 20–24 hodin při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub> s 50  $\mu$ l vzorků GP, MWCNTs nebo TiO<sub>2</sub>. Používají se nejvyšší pracovní koncentrace, případně nejvyšší necytotoxické koncentrace, které by měly spadat do testovaného koncentračního rozmezí při vlastním hodnocení imunotoxicity. Buňky bez expozice (přidání pouze DMEM) a buňky kultivované s ultra čistým lipopolysacharidem (LPS<sub>up</sub>, 100 ng/ml) slouží jako kontroly.
2. Destička se odstředí při 1000  $\times$  g, 10 min a 20  $\mu$ l supernatantu se přenese do nové 96jamkové destičky.
3. K supernatantům se přidá 180  $\mu$ l detekčního média a destička se nechá 30 minut až 3 hodiny (průběžně kontrolujeme zbarvení) inkubovat při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.
4. Výsledná absorbance je měřena na destičkovém spektrofotometru (readeru) při vlnové délce 630 nm proti referenční vlnové délce 750 nm, která se odečítá.



**Obrázek 34.** Výsledky testování biologické kontaminace testovaných suspenzí NM. Hodnocení aktivace HEK-Blue<sup>TM</sup>-4

*Poznámka:* Data jsou prezentována jako medián s 95 % CI; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  (statistická významnost ve srovnání s neexponovanou kontrolou DMEM).

U TLR (i LAL) testu je nutné kontrolovat možné interference a je nutné, aby testované NM nebyly pro HEK toxické. Limitací je i nutnost použití FBS s certifikovaným ultra nízkým endotoxinem, což dělá metodu více finančně náročnou. Na druhou stranu se jedná o velmi citlivou metodu (0,01 EU/ml). Zároveň lze hodnotit i absenci nespecifických interakcí s konkrétními TLR receptory. V případě pozitivní odpovědi je nutné doplnit metodu jinou alternativou.

Dostupné různé varianty TLR buněk nabízí možnost hodnocení většího počtu možných kontaminantů. V případě HEK-Blue<sup>TM</sup>-4 lze metodu i kvantifikovat pomocí koncentrační řady standardního LPS. Pomocí HEK-Blue<sup>TM</sup>-4 a HEK-Blue<sup>TM</sup>-2 (Invivogen) byla průběžně kontrolována sterilita všech testovaných suspenzí NM. Pomocí buněk byla pozitivní odpověď nalezena pouze u SiO<sub>2</sub> nanovláken, které byly na základě toho z testování imunotoxicity na monocitech a makrofázích vyřazeny (Obrázek 34).

## Hodnocení imunotoxicity

Imunotoxicita představuje negativní (toxický) vliv daného faktoru na imunitní systém. Obecně zahrnuje cytotoxické, imunosupresivní a imunostimulační reakce. Hlavním projevem imunotoxického působení je zánět.

## Hodnocení cytokinů jako mediátorů zánětu

Akutní zánět je komplexní obranná reakce organismu na narušení vnitřního prostředí. Za fyziologických podmínek odeznívá bez následků. Jestliže dojde k selhání regulačních mechanismů nebo přetrvává-li stimulační agens v organismu, přechází akutní zánět do chronického zánětu. Dlouhodobě přetrvávající chronický zánět je patologický proces, který může vyústit v nevratné poškození tkání, rozvrat imunitních funkcí a nádorové bujení. Mezi klíčové mediátory zánětu jsou řazeny cytokiny a zejména interleukiny (IL), signální molekuly (obvykle polypeptidy a proteiny) produkované imunokompetentními, ale i epitelovými či endotelialními buňkami.

Na základě stanovení jejich hladiny v plazmě a séru (potažmo v supernatantech) lze hodnotit prozánětlivý nebo protizánětlivý stav. Klíčovými buňkami v procesu zpracování a eliminace NM jsou profesionální fagocyty. Jedná se o monocyty cirkulující v krvi a z nich diferencované makrofágy a tkáňové (rezidentní) makrofágy. Z toho důvodu je pro testování imunotoxicity *in vitro* vhodné používat (jako buněčný model) právě tyto buňky, případně jejich varianty. Při použití nádorových linií je vhodné doplnit měření na více typech buněk nebo lépe na primárních buňkách.

## ELISA

Enzymová imunosorbční analýza (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) je standardní metoda využívaná ke stanovení protilátek nebo antigenů, včetně interleukinů, v biologickém vzorku. Principem je specifická interakce antigenu a protilátky, přičemž jeden z této dvojice nese kovalentně navázaný enzym (nejčastěji peroxidázu nebo alkalickou fosfatázu). Enzym katalyzuje chemickou přeměnu bezbarvého substrátu, který je přidán do reakční směsi, na barevný produkt. V případě klasické sendvičové ELISA je pak výsledná absorbance barevného produktu přímo úměrná koncentraci testovaného cytokinu.

### Příklad

**Postup stanovení hladiny IL-10 v supernatantu metodou sendvičové ELISA** (Quantikine, Biotechne) u primárních monocytů exponovaných uhlíkovým NM a následně teplem usmrčeným bakteriím; sledování modulačního účinku NM na reaktivitu vůči bakteriím:

1. Sebrané supernatanty je nutné stočit při  $300 \times g$ , 5 min, aby se odstranily buňky (v našem případě i nepohlčené bakterie), a přenést do nových zkumavek. Pokud jsou stále přítomné nanočástice, které by mohly interferovat s metodou, je nutné je znovu stočit při  $10\,000 \times g$ , 10 min.
2. Výsledné supernatanty lze rovnou použít nebo případně uschovat zamrazením při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (IL-10 lze ponechat i při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  cca po dobu tří týdnů).

Další postup vychází z protokolu výrobce:

3. Všechny reagentie včetně 96jamkové destičky se dle pokynů temperují na laboratorní teplotu ( $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), případně se upraví dle pokynů.
4. Do čistých polypropylenových vialek se připraví kalibrační řada standardů postupným (dvojkovým) ředěním. Poslední (osmá) vialka, obsahující pouze puft/rozpouštědlo, slouží jako standard o nulové koncentraci.

5. Testované vzorky se předem pětkrát naředí (nutné předem ověřit) pomocí ředícího pufru.
6. Připravené standardy a testované ředěné vzorky jsou aplikovány (200 µl) do 96jamkové destičky, která se zalepí přiloženou fólií a nechá se 2 hodiny inkubovat při laboratorní teplotě.
7. Všechny jamky se odsají a třikrát promyjí (300 µl) promývacím pufrům pomocí promývačky, případně multikanálové pipety. Po posledním promytí se destička důkladně (ale krátce) vyklepe proti buničině (nesmí zcela vyschnout).
8. Do všech jamek se napipetuje 200 µl konjugátu a destička zalepená novou fólií se nechá 1 hodinu inkubovat.
9. Promytí jako v bodě 7.
10. Do všech jamek se napipetuje 200 µl substrátu a destička zalepená novou fólií se nechá inkubovat ve tmě, kdy se příležitostně kontroluje vznikající modré zbarvení (max 30 minut).
11. Do všech jamek se přidá STOP roztok (50 µl).
12. Výsledná absorbance se odečítá pomocí spektrofotometru (readeru) při 450 nm proti 570 nm jako referenční vlnové délce.
13. Koncentrace se vypočítá pomocí hodnot kalibrační řady standardu.

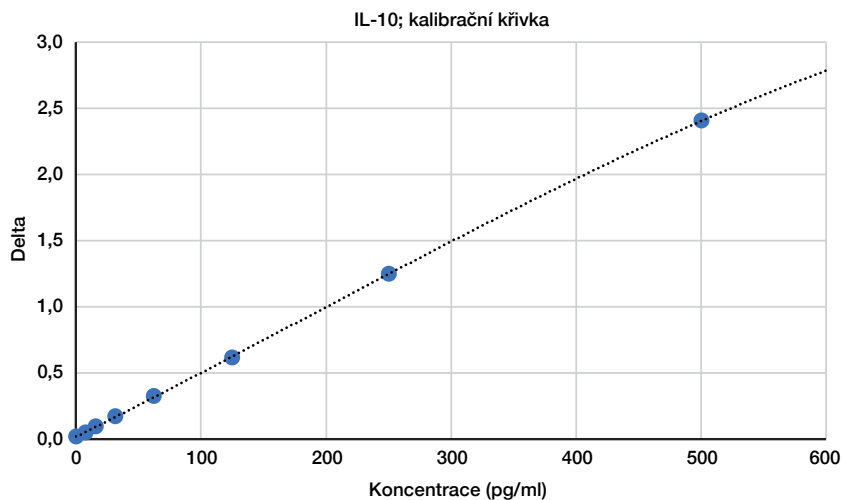
**Ukázka výstupu měření (Tabulka 12; Obrázek 35):**

**Tabulka 12.** Hodnoty absorbance kalibrační křivky (sloupec 1) a vzorků

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<b>A</b>	2,405	2,45	2,436	2,643	0,810	0,888	1,022						Delta
<b>B</b>	1,251	1,571	1,516	1,792	0,503	0,473	0,487						Delta
<b>C</b>	0,617	2,105	2,39	2,499	0,828	0,576	0,778						Delta
<b>D</b>	0,327	1,208	1,411	1,122	0,282	0,281	0,395						Delta
<b>E</b>	0,173	2,133	2,126	2,22	0,025	0,024	0,025						Delta
<b>F</b>	0,094	1,628	1,202	1,427	0,026	0,024	0,026						Delta
<b>G</b>	0,050	1,853	1,896	1,904	0,027	0,027	0,028						Delta
<b>H</b>	0,020	1,256	1,495	1,274	0,022	0,022	0,023						Delta

ELISA je nejvíce využívanou metodou ke stanovení hladiny cytokinů v supernatantech. Výhodami jsou vysoká citlivost, kvantifikace výsledku, možnost automatizace a rozmanitý výběr v testovaných antigenech. Většina esejí nevyžaduje složitou přípravu vzorku, nicméně zejména sendvičová úprava může být časově náročná. To platí zejména v případě, kdy není možné odebrané supernatanty uchovávat. V závislosti na typu sledovaného analytu může během uchování v mrazicím boxu docházet k degradaci vzorku, což snižuje kvalitu výsledku.

Problémem esejí může být interference složek reakční směsi s testovanými NM. To lze redukovat až eliminovat opakovaným promýváním. Další komplikací představuje skutečnost, že NM mohou měřené cytokiny vyvazovat, což vede k falešně negativním výsledkům. Z tohoto důvodu je nutné provádět test interference, kdy se vzorek s definovanou koncentrací cytokinu (například se standardem) nebo vzorek získaný z buněk předem stimulovaných



Obrázek 35. Kalibrační křivka

definovaným stimulantem inkubuje s NM a výsledky po centrifugaci (odstranění NM s potenciálně navázanými cytokiny) jsou porovnávány se stejnými vzorky bez NM. V případě prokázané interference je nutné přistoupit k alternativním metodám detekce proteinu nebo k molekulárním metodám. V našem případě testování nemodifikovaných karbonových NM k významným interferencím nedocházelo.

## Buněčné eseje

Alternativou hodnocení cytokinů jsou buněčné eseje, založené na reportérových buňkách, v našem případě na systému HEK-Blue™ (Invivogen). Princip eseje spočívá ve vnesení genu pro sekretovanou alkalickou fosfatázu (AP), který je navázán na signální dráhu příslušného transkripčního faktoru. Dráha je spojena s povrchovým receptorem specifickým pro konkrétní cytokin. Po navázání cytokinu dochází k aktivaci této dráhy a následně k produkci AP, kterou lze v supernatantu detekovat pomocí média obsahujícího substrát (dochází k barevné změně). Výsledná absorbance je přímo úměrná koncentraci původního cytokinu.

### Příklad

**Postup stanovení hladiny IL-10 v supernatantu metodou HEK-Blue™ IL-10** u primárních monocytů exponovaných uhlíkovým NM a následně teplem usmrceným bakteriím; sledování modulačního účinku NM na reaktivitu vůči bakteriím

1. Sebrané supernatanty je nutné stočit při  $300 \times g$ , 5 min, aby se odstranily buňky (v našem případě i nepohlčené bakterie) a přenést do nových zkumavek. Pokud jsou stále přítomné nanočástice, které by mohly interferovat s metodou, je nutné je znovu stočit při  $10\,000 \times g$ , 10 min.
2. Výsledné supernatanty lze rovnou použít nebo případně uschovat zamrazením při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (IL-10 lze ponechat i při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  cca po dobu tří týdnů).

*Další postup vychází z protokolu výrobce (nutno dodržovat sterilní podmínky). Součástí je předchozí kultivace reportérových buněk v selekčním bezfenolovém médiu (DMEM) s obsahem 2 mM glutaminu, 10 % FBS, které musí být inaktivované kvůli eliminaci přirozeně se vyskytující AP, a s obsahem selekčních antibiotik daných výrobcem.*

3. Kontroly a vzorky jsou aplikovány (20 µl; triplikáty) do 96jamkové kultivační destičky.
4. Ke všem vzorkům je přidáno 180 µl buněčné suspenze ( $0,28 \times 10^6$  buněk/ml) v kultivačním „bezfenolovém“ médiu (bez selekčních antibiotik) a buňky se nechají 20–24 hodin inkubovat při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.
5. Aplikace 20 µl supernatantů ze vzorků a kontrol do nové 96jamkové destičky.
6. Přidání 180 µl detekčního média (předem připraveno smícháním 1 ml reagentu, 1 ml pufru s 98 ml destilované vody) a nechá se inkubovat (30 minut až 3 hodiny).
7. Výsledná absorbance je měřena pomocí spektrofotometru (readeru) při vlnové délce 630 nm.

### Ukázka výstupu měření (Tabulka 13):

**Tabulka 13.** Hodnoty absorbance měřených vzorků

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<b>A</b>	0,042	0,042	0,043	0,042	0,041	0,043	0,042	0,041	0,041	0,043	0,042	0,042	630
<b>B</b>	0,041	1,387	1,359	1,420	1,426	1,432	1,404	0,600	0,654	0,643	0,043	0,042	630
<b>C</b>	0,040	0,961	0,892	1,070	1,019	0,878	1,024	0,311	0,293	0,325	0,043	0,041	630
<b>D</b>	0,043	1,172	1,210	1,311	1,193	1,210	1,241	0,596	0,354	0,473	0,043	0,043	630
<b>E</b>	0,042	0,956	1,017	0,959	1,096	1,100	1,121	0,233	0,262	0,256	0,043	0,042	630
<b>F</b>	0,041	0,137	0,159	0,149	0,158	0,144	0,17	0,15	0,146	0,112	0,044	0,041	630
<b>G</b>	0,041	0,105	0,147	0,106	0,041	0,044	0,043	0,043	0,042	0,041	0,043	0,041	630
<b>H</b>	0,044	0,043	0,042	0,042	0,043	0,043	0,043	0,042	0,046	0,043	0,042	0,043	630

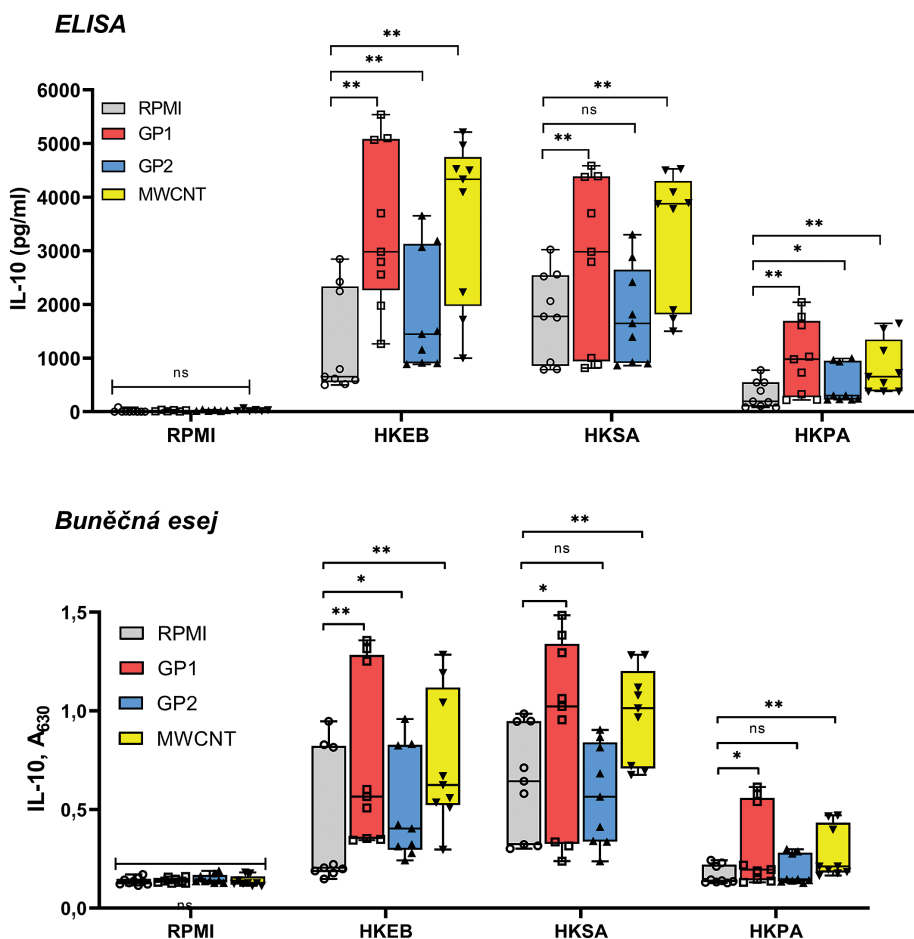
Buněčné eseje jsou původní metodou testování cytokinů. Na rozdíl od ELISA nejsou kvantitativní a mívají nižší citlivost. Časově náročnou součástí testů je udržování buněčných linií. Výhodou je naproti tomu možnost specifické detekce (pouze) bioaktivních forem cytokinů, což u některých ELISA zajištěno není (případně není jasně uvedeno, co se konkrétně testuje). Při testování vysokého počtu vzorků jsou buněčné eseje vhodné jako levná screeningová metoda porovnání různých koncentrací stimulantů (například NM). Vlastní nasazení supernatantů k buňkám zabere obvykle do 30 minut (sendvičová ELISA trvá obvykle 4–6 hodin). Z tohoto pohledu představují buněčné eseje vhodnou metodu stanovení rychle degradujících cytokinů či současného stanovení skupiny cytokinů.

V našich experimentech docházelo při testování IL-1β k jeho degradaci v uskladněných zmrazených vzorcích. Z tohoto důvodu byla pro stanovení vybrána metoda buněčné eseje, kdy byly supernatanty ihned přenášeny na nové destičky a inkubovány s reportérovými buňkami. Jednou osobou tak mohly být ve zbylých supernatantech prováděny současně i další analýzy, například detekce LDH (viz viabilita). Podobně jako u ELISA metody bylo nutné i zde kontrolovat interference a zajistit, aby testované supernatanty neobsahovaly cytotoxické koncentrace stimulantů. To je v případě testování NMs řešeno jejich odstředěním na 10 000 g.

V našich experimentech byly využívány obě metodiky detekce cytokinů pro hodnocení imunotoxicity GP, karbonových nanotrubic (MWCNT) a nano-TiO<sub>2</sub>. Používání buněčných esejí nám umožňovalo současný screening několika prozánětlivých i protizánětlivých cytokinů. Část výsledků a detailní postup lze najít v publikaci Švadlákové et al.<sup>3</sup>

## Porovnání ELISA a buněčné esej při měření hladiny IL-10

(Testování modulačních účinků nemodifikovaných karbonových NM na cytokinovou odpověď monocytů vůči bakteriím)



**Obrázek 36.** Produkce IL-10 u izolovaných monocytů stimulovaných GP (60 µg/ml), MWCNT (30 µg/ml) a bakteriemi HKEB, HKSA a HKPA ( $1 \times 10^7$ )

*Poznámka:* Data jsou prezentována jako krabicový graf od minima do maxima se všemi body. Hodnoty \*\*  $p < 0,01$  a \*  $p < 0,05$  označuje statistickou významnost ve srovnání s odpovídající kontrolou (RPMI); ns – nesignifikantní.

## HODNOCENÍ AKTIVACE NLRP3

V rámci testování mediátorů zánětu (při sledování imunotoxických účinků NM) je za nejvýznamnější cytokin považován prozánětlivý cytokin IL-1 $\beta$ , jakožto produkt aktivace inflama-zomu (intracelulárního makromolekulárního komplexu). NLRP3 inflamazom je klíčovým zprostředkovatelem imunotoxicity NM. Důvodem je jeho „univerzálnost“ a široké spektrum možných aktivátorů, které mají charakter jak PAMP/MAMP (vzory spojené s mikrobiální kontaminací), tak i DAMP (vzory spojené s poškozením buněk). Pomocí stanovení aktivace NLRP3 lze odhalit sterilní zánět, ke kterému vlivem expozice NM často dochází.

Nejjednodušším způsobem monitorování aktivace NLRP3 je měření hladiny cytokinu IL-1 $\beta$ . Nejčastěji se hodnotí kanonická aktivace NLRP3, která probíhá u makrofágů. Za tímto účelem je vhodné využít (jako *in vitro* buněčný model) právě lidské primární makrofágy, které ovšem nejsou snadno dostupné. Do jisté míry přijatelnou alternativu představují nádorové linie, jejichž odpovědi však nemusí být zcela adekvátní k odpovědím nepozměněných buněk. Jako optimální se jeví použití geneticky modifikovaných (transfekovaných) linií, specificky určených k hodnocení konkrétního mechanismu.

Pro naše experimenty byly zvoleny modifikované lidské monocyty THP1-null a THP1-deff, které umožnily specifické monitorování aktivity NLRP3. Práce s těmito liniemi je analogická práci s klasickými THP-1 (bezfenolové RPMI1640, 10 % FBS, 2 mM glutaminu, 10 mM HEPES), s výjimkou použití selekčních antibiotik v kultivačním médiu. Pro všechny imunitní buňky je vhodné, aby použité FBS bylo inaktivované (s certifikovaným nízkým obsahem endotoxinu) a zabránilo se tak nechtěným „předaktivacím“ buněk a násobením reakcí. Postup hodnocení vychází z doporučení dodavatele buněk.

### Příklad

#### Postup stanovení kanonické aktivace NLRP3 po expozici uhlíkovým NM

1. THP1-null/deff (Invivogen) se v koncentraci  $3,6 \times 10^5$  buněk/jamka / 200  $\mu$ l nasadí do 96jamkové kultivační destičky (alternativně lze předem THP1 v koncentraci  $1,8 \times 10^6$  buněk/jamka / 200  $\mu$ l 3 hodiny aktivovat pomocí phorbol-myristát acetátu (300 ng/ml) a po výměně média 72 hodin diferencovat v makrofágy).
2. Ke všem buňkám včetně negativní kontroly se přidá ultračistý LPS ve výsledné koncentraci 1  $\mu$ g/ml a buňky se nechají 3 hodiny inkubovat při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub> („priming“ – nezbytný první signál předcházející kanonickou aktivaci, který ale k samotné aktivaci nevede).
3. Ze všech jamek se opatrně odsaje médium s LPS a přidá se 200  $\mu$ l čerstvého média s různými koncentracemi NM. K negativní kontrole se přidá pouze čerstvé médium. Jako pozitivní kontrola může sloužit ATP, krystaly kyseliny močové nebo nanočástice SiO<sub>2</sub>. Buňky se nechají 24 hodin inkubovat při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.
4. Supernatanty se dle potřeby odstředí (viz zpracování supernatantů výše) a přenesou se po 50  $\mu$ l do nové 96jamkové destičky, do které se přidá po 150  $\mu$ l suspenze HEK-Blue™ IL-1 $\beta$  ( $0,33 \times 10^6$  buněk/ml).
5. Další postup je analogický se stanovením IL-10 (viz výše). Při slabé odpovědi lze nechat buňky inkubovat až 48 hodin.

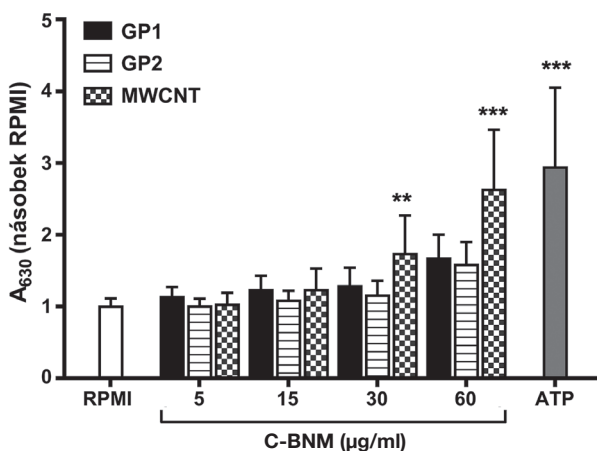
Postup zahrnující modifikované THP1 buňky s následnou detekcí IL-1 $\beta$  (pomocí buněčné eseje) byl využit i pro hodnocení imunotoxicity TiO<sub>2</sub> nanočástic. V průběhu hodnocení nebyla



prokázána interference testovaných NM s esejemi. Problém by však mohl nastat u NM, které jsou výrazně cytotoxické a u kterých je nutné optimalizovat testovanou koncentraci. Možnou nevýhodou uvedené metody je vyšší pořizovací cena modifikovaných buněk, nicméně dané buňky lze namnožit a uchovávat téměř neomezeně dlouhou dobu v parách dusíku nebo v kapalném dusíku. Pro metodu je možné využít i základní linii THP-1, nicméně v tomto případě je nutná rozsáhlejší optimalizace. Deficientní buňky lze nahradit použitím specifického inhibitoru MCC950. Samotná metoda není náročná na přístrojové vybavení, kdy je nutné vlastnit pouze destičkový spektrofotometr s monochromátorem, případně s filtry pro dané vlnové délky.

## Výsledek hodnocení kanonické aktivace NLRP3

Detailní výsledky shrnující prozánětlivý potenciál karbonových NM lze najít v publikaci Švaldřákové et al. z roku 2020.<sup>1</sup>



**Obrázek 37.** THP1-null: produkce IL-1 $\beta$  po expozici GP1, GP2 a MWCNT

*Poznámka:* Data jsou prezentována jako podíl produkce IL-1 $\beta$  exponovaných buněk a neexponované kontroly (RPMI) a zobrazena jako průměr  $\pm$  standardní odchylka; \*\*  $p < 0,01$  a \*\*\*  $p < 0,001$  (statistická významnost ve srovnání s RPMI).

Zásadní význam hodnocení IL-1 $\beta$  se potvrdil během porovnávání několika různě modifikovaných MWCNT. Zatímco cytokiny neasociované s inflamazomem (IL-6 nebo TNF- $\alpha$ ) byly produkovány pouze v jednom případě, IL-1 $\beta$  byl produkován vždy. Prozánětlivý účinek všech testovaných typů MWCNT byl tak potvrzen pouze na základě IL-1 $\beta$ . Z uvedeného vyplývá, že hladina IL-1 $\beta$  by při testování imunotoxických účinků měla být hodnocena vždy.<sup>4</sup>

## HODNOCENÍ VIABILITY

Nezbytnou součástí sledování imunotoxicity je hodnocení viability buněk. Vedle sledování intracelulární distribuce je rovněž nutné sledovat, zda danou cytokinovou odpověď nedoprovází i zvýšená úmrtnost, zejména pyroptóza, která je nefyziologickou součástí aktivace NLRP3 a bývá součástí chronického zánětu. Za tímto účelem se využívá měření úniku laktátdehydrogenázy (LDH). Výhodou je možné „párování“ s detekcí IL-1 $\beta$ , kdy pozitivní nález produkce cytokinu a zároveň úniku LDH lze hodnotit jako pyroptózu, tedy specifickou smrt buňky, při níž dochází k jejímu prasknutí a vylití silně prozánětlivého obsahu do svého okolí. Dále LDH esej, konkrétně u nemodifikovaných karbonových NM, představuje jednu z mála robustních cytotoxických metod, při které nedochází k interferencím. Nicméně NM je nutné z reakční směsi odstraňovat, protože mohou vyvazovat formazan a bránit tak barevné změně. Z uvedeného důvodu byl z palety našich testů vyřazen klasický cytotoxický test MTT. Variabilita výsledků WST-1 byla vázána na charakter použitých buněk.

LDH esej byla využita při hodnocení všech našich buněčných modelů a dostupných NM (GP, MWCNT, TiO<sub>2</sub> a SiO<sub>2</sub>). Byla využita i pro stanovení pyroptózy, kdy jeho spolehlivost byla ověřována pomocí reportérových buněk THP1-HMGB1-Lucia<sup>TM</sup> (Invivogen).

## LITERATURA

1. Svadlakova T, Hubatka F, Turanek Knotigova P et al. Proinflammatory Effect of Carbon-Based Nanomaterials: In Vitro Study on Stimulation of Inflammasome NLRP3 via Destabilisation of Lysosomes. *Nanomaterials*. 2020;10(3):418. doi:10.3390/nano10030418.
2. Mukherjee SP, Lozano N, Kucki M et al. Detection of Endotoxin Contamination of Graphene Based Materials Using the TNF- $\alpha$  Expression Test and Guidelines for Endotoxin-Free Graphene Oxide Production. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166816. doi:10.1371/journal.pone.0166816.
3. Svadlakova T, Kolackova M, Vankova R et al. Carbon-Based Nanomaterials Increase Reactivity of Primary Monocytes Towards Various Bacteria and Modulate Their Differentiation into Macrophages. *Nanomaterials*. 2021;11(10):2510. doi:10.3390/nano11102510.
4. Svadlakova T, Hubatka F, Masek J et al. Activation of NLRP3 Inflammasome as a Key Indicator of Carbon Nanotubes Proinflammatory Potential. *Eur J Immunol*. 2019;49:601–601.

# METODIKY ÚSTAVU PREVENTIVNÍHO LÉKAŘSTVÍ (Lékařská fakulta v Hradci Králové)

## MIKRONUKLEUS TEST (TEST GENOTOXICITY A CYTOTOXICITY)

### Teoretický základ metodiky

Mikronukleus test s blokací cytokineze (*cytokinesis block micronucleus test*; CBMN) pomocí Cytochalasinu B představuje robustní, levnou, rychlou a senzitivní metodu hodnocení cytotoxických/cytostatických a genotoxických potenciálů chemických látek. Je rovněž vhodná pro hodnocení účinků expozic NM v experimentálních podmínkách (*in vitro* i *in vivo*) a pro biomonitoring exponovaných osob v epidemiologických studiích.<sup>1,2</sup>

Metoda je založena na detekci až devíti biomarkerů cytotoxického a genotoxického účinku testovaného materiálu v cytoplasmě interfazických buněk. V případě hodnocení cytotoxického potenciálu se jedná o „*cytokinesis-block proliferation index*“ (CBPI), replikační index (RI), index dělení jader (*nuclear division index*; NDI) a s nimi asociované procento cytostázy (% cytostasis) a počet či procentuální zastoupení nekrotických a apoptických buněk. K hodnocení genotoxického potenciálu je využívána detekce počtu či procentuálního zastoupení binukleárních buněk (BNC) s přítomností mikrojádra (MN), jaderného pupenu (*nuclear bud*; NBUD) či nukleoplasmatického můstku (*nucleoplasmic bridge*, NPB) v cytoplasmě.<sup>3</sup>

### Podrobnější popis metodiky

**Expoziční scénář vychází z doporučení OECD (2016). CBMN je prováděn podle modifikované metody dle Fenecha (Fenech 2007).**

**Buněčná linie** (v případě našich experimentů THP-1) je v objemu 2,5 ml a koncentraci buněk  $2 \times 10^5$  buněk/ml nasazena do 6jamkové destičky a exponována zvolené koncentraci NM (smícháno 1,25 ml buněčné kultury o dvojnásobné koncentraci, tedy  $4 \times 10^5$  buněk/ml, a 1,25 ml suspenze NM o dvojnásobné koncentraci, než je konečná testovaná koncentrace NM). Jsou zařazeny i pozitivní kontroly s genotoxickou látkou (v našem případě cytosin arabinosid v konečné koncentraci 5 a 20 ng/ml) a negativní kontrola (buněčná linie v médiu bez ovlivnění). Doba expozice (kultivace) NM je 1,5 až dvojnásobek délky buněčného cyklu, aby byl zajištěn i kontakt NM s jaderným obsahem a mitotickým aparátem buňky během

dělení. Dobu expozice je tedy nutné upravovat podle použité buněčné linie. V případě THP-1 buněčné linie je doba expozice 40 hodin.

Kultivace buněk probíhá v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Po skončení expozice jsou buňky odstředěny při 300 × g po dobu 5 minut a za sterilních podmínek dvakrát opláchnuty PBS. Médium je vyměněno za čerstvé a do všech kultur je přidán Cytochalasin B v konečné koncentraci 5 µg/ml (kultivace pokračuje dalších 30 hodin). Následně jsou kultury přeneseny do konických zkumavek, odstředěny při 200 × g (8 min) a v digestori fixovány v prvním kroku 8 ml roztoku metanolu a ledové kyseliny octové v poměru 3:1 s přidavkem 225 µl 36–38% formaldehydu. V dalších dvou krocích jsou fixovány 8 ml roztoku metanolu a ledové kyseliny octové v poměru 3:1 pro každý vzorek (příprava je nutná těsně před zpracováním a roztok je nutné uchovat v chladu). Mezi každým fixačním krokem je provedeno odstředění při 200 × g (8 min). Po posledním odstředění (8 min, 200 × g) je odstraněn téměř všechnen supernatant s výjimkou cca 1 ml nad peletou, ve kterém je buněčná peleta resuspendována.

Ve finální fázi je suspenze nakapána na dvě vychlazená, navlhčená, vodorovně uložená podložní skla a ponechána přes noc při laboratorní teplotě. Následující den jsou vzorky obarveny 5% roztokem Giemsa-Romanowski po dobu 10 minut, opláchnuty pod tekoucí vodou a následně demineralizovanou vodou a po oschnutí uloženy do boxu na mikroskopické preparáty. Další skladování je možné v boxech při laboratorní teplotě.

**Podložní skla** jsou před použitím ponořena minimálně 24 hodin do chromsírové směsi (dichroman draselný a koncentrovaná kyselina sírová). Po vynětí jsou třikrát opláchnuta pod tekoucí vodou a další dvě hodiny ponechána v proudu tekoucí vody. Následuje trojitý oplach demineralizovanou vodou. V čisté demineralizované vodě jsou skla ponechána do druhého dne. Po vynětí jsou vyleštěna látkou nepouštějící vlákna, uložena do boxu na mikroskopické preparáty a uchována při –18 °C do doby použití.

**Analýza vzorků** je prováděna pomocí světelného mikroskopu při 400násobném zvětšení. V případě hodnocení cytostatického potenciálu je hodnoceno nejméně 500 buněk. Při hodnocení genotoxického potenciálu je analyzováno 1000 binukleárních buněk (BNC). K počítání BNC je použit ruční čítač.

Při hodnocení **cytostatického potenciálu** jsou využívány hladiny (n) mononukleárních (MONOC), binukleárních (BNC), trinukleárních (TRINC) a tetranukleárních (TETRC) buněk pro následující výpočty:

$$CBPI = \frac{nMONOC + 2 * nBNC + 3 * (nTRINC + nTETRC)}{\text{(celkový počet buněk)}}$$

$$R = \frac{\frac{nBNC + 2 * (nTRINC + nTETRC)}{\text{(celkový počet buněk)}} T}{\frac{nBNC + 2 * (nTRINC + nTETRC)}{\text{(celkový počet buněk)}} K}$$

$$NDI = \frac{(nMONOC + 2 * nBNC + 3 * nTRINC + 4 * nTETRC)}{\text{(celkový počet buněk)}}$$

T se vztahuje ke kulturám, které jsou exponovány testovaným NM; K se vztahuje ke kontrolní kultuře bez expozice (kultura pouze v kultivačním médiu).

Procento cytostázy (% cytostasis) je pak vypočteno dle vzorce:

$$\% \text{ cytostasis} = 100 - 100 * \frac{(CBPI) T}{(CBPI) K}$$

K hodnocení genotoxického potenciálu jsou používána skórovací kritéria dle Fenecha modifikována dle AHEM (2003).<sup>3,4</sup>

## Použitelnost metodiky pro testování NM

Výhodou CBMN (ve srovnání s jinými testy detekujícími poškození DNA) je: (1) CBMN umožňuje hodnotit jakoukoli populaci buněk bez ohledu na karyotyp, (2) konečný výsledek je jednoduše identifikovatelný (dvojjaderná buňka), (3) odpověď může být zjišťována i po delší době od expozice, (4) je možné detekovat i látky, které poškozují mikrotubuly dělicího vřeténka (aneugenní látky) a (5) bazální frekvence MN je obvykle stabilní.<sup>5</sup>

Vlastní provedení expozice NM se neliší od provedení u jiných testů. Mezi další výhody CBMN patří relativní jednoduchost provedení, finanční nenáročnost, statistická síla, možnost získání řady parametrů z jednoho vzorku (velká výtěžnost) a nenáročnost na laboratorní vybavení. Není například nutné fluorescenční barvení a zobrazení. V současnosti je výhodnější manuální analýza, která umožňuje detekci všech devíti biomarkerů. Automatická analýza zatím umožňuje pouze detekci BNC s MN. Při manuální analýze je také redukováno riziko záměny klastru NM a MN.

Mezi nevýhody testu patří například výskyt pseudomikrojader a při použití Cytochalasinu B možnost ovlivnění internalizace NM buňkou v důsledku inhibice aktinu.<sup>5,6</sup> Mezi další nevýhody patří riziko záměny klastru NM za MN, nutnost používání (pouze) dělicích se buněk a velká náročnost na laboratorní čas a lidskou práci při manuální analýze. Riziko ovlivnění internalizace lze snížit přidáním Cytochalasinu B až po ukončení expozice buněk (protokoly „delayed co-treatment“ či „post-treatment“).<sup>6</sup> Při dodržení postupů „delay co-treatment“ či „post-treatment“ jsme nezaznamenali interakce s použitými NM.

Rizikovější (z hlediska výpovědní hodnoty) může být kombinace fluorescenčního barvení a automatické analýzy. Důvodem je (1) zhášení fluorescence (bylo popsáno u některých NM) a (2) záměna shluku NM za MN.

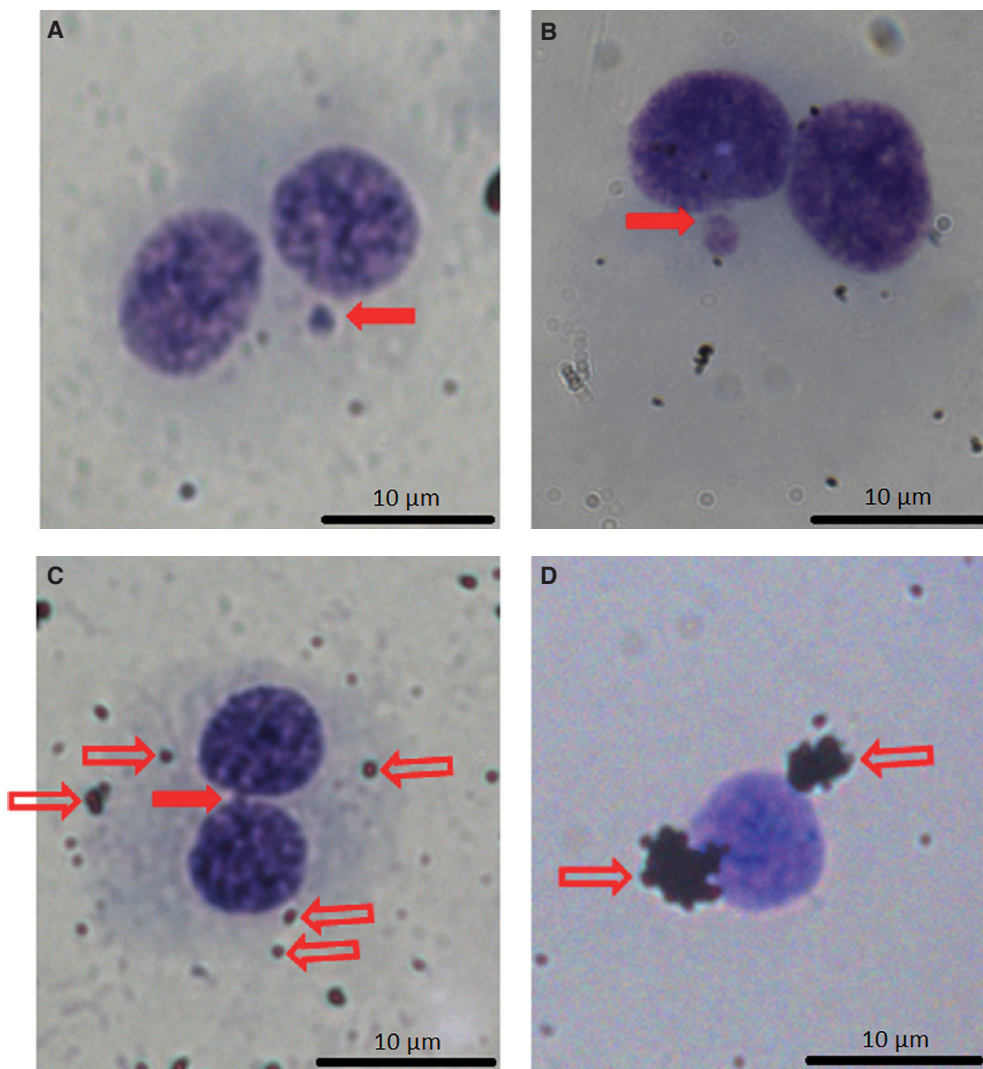
## Souhrn nejzajímavějších výsledků

Při testování toxicity dvou typů grafenů (GP1 a GP2; koncentrace 60, 30 a 5 µg/ml; délka expozice 40 hodin) vůči buněčné línii THP-1 jsme metodou CBMN nezaznamenali významný cytostatický potenciál ani jednoho z nich. Ve všech případech se parametry cytostatického potenciálu pohybovaly do 20 % negativní kontroly.<sup>7</sup>

Měření cytostatického potenciálu se zdá být citlivější než klasické metody hodnocení cytotoxického efektu NM, založené na detekci poškození buněčné membrány (například test LDH nebo test trypanové modři) či na metabolické aktivitě buněk (například WST-1 nebo MTT). V případě detekce cytostatického (antiproliferačního) potenciálu jsou buňky živé, mají

intaktní buněčnou membránu a jsou metabolicky aktivní. Nejsou však schopné efektivního jaderného (buněčného) dělení, případně dochází i k prodloužení buněčného cyklu (což může být způsobeno i nutností reparace poškozené DNA). Buňky také mohou být poškozeny méně závažným způsobem a k jejich smrti dojde až v delším časovém horizontu.

Akumulace NM, zejména pokud se jedná o NM nebiodegradabilní, může významně narušovat normální mitotický proces. Při stejném experimentu (GP1, GP2 viz výše) byl zaznamenán na dávce závislý nárůst poškození DNA, zejména nárůst počtu BNC s MN, NBUD



**Obrázek 38.** Příklady poškození DNA; (A) binukleární buňka (BNC) s mikrojádem (plná šipka); (B) BNC s jaderným pupenem (NBUD) spojeným s hlavním jádrem tenkou stopkou (plná šipka); (C) BNC s nukleoplasmatickým můstkem (NPB; plná šipka) a malými agregáty GP v cytoplasmě (na buněčném povrchu; prázdné šipky); (D) jádro bez cytoplasmy během CBMN obklopené shluky GP (prázdné šipky)

i NPB, který již dosahoval statistické významnosti. Bazální poškození DNA buněčné linie (vhodné pro testování genotoxického potenciálu) by se mělo pohybovat do 2 %.<sup>7</sup> V našem případě se počet BNC s MN pohyboval v průměru kolem 0,6 % (v maximu kolem 0,9 %). Můžeme tedy předpokládat, že námi použitá THP-1 buněčná linie je vhodná pro testování genotoxicity NP. Nejnižší koncentrace s pozorovaným genotoxickým potenciálem (*lowest observed genotoxic effect level*; LOGEL) byla pro GP1 nad 5 µg/ml a pro GP2 30 µg/ml.

V případě testovaných GP1 a GP2 se domníváme, že mezi mechanismy poškození DNA může být zařazena přímá interakce GP s jaderným materiálem (odkrytým během buněčného dělení), narušení jaderného dělení vlivem epigenetických mechanismů a/nebo účinek na cytoskelet buňky a mitotický aparát. Interakce s jaderným materiálem či cytoskeletem buňky vede ke zvýšení počtu BNC s NBDU; interakce s jaderným materiálem zase přispívá k nárůstu počtu BNC s NPB.

Nevýznamně vyšší počty sledovaných genotoxických parametrů byly zaznamenány v případě GP1 (menší částice). Lze se domnívat, že genotoxicita u testovaných GP bude záviset jak na dávce, tak i na velikosti částic.

Příklady hodnocených nálezů poškození DNA zobrazuje Obrázek 38. V popisovaném experimentu (GP1 a GP2) jsme pozorovali, že jádra bez cytoplazmy jsou častěji obklopena shluky GP než jádra s cytoplazmou (Obrázky 38c a 38d). Je otázkou, zda shluky GP kolem jaderné membrány jsou příčinou, či naopak následkem ztráty cytoplazmy.

## KOMETOVÝ TEST (TEST GENOTOXICITY)

### Teoretický základ metodiky

Kometový test (*comet assay*, CA, *single cell gel electrophoresis*) je metoda používaná k detekci poškození (zlomů) DNA v jádrech.<sup>9</sup> Jedná se o všestranně využitelnou, relativně jednoduchou a citlivou metodu, která je (v závislosti na své variantě) schopná detekovat jednořetězcové i dvouřetězcové zlomy DNA, „alkali“ labilní (apurinová/apyrimidinová) místa DNA, nekompletní reparaci DNA, oxidované purinové či pyrimidinové báze, „cross-link“ vazby a apoptické buňky.<sup>8,9</sup>

Po lýze buněčné a jaderné membrány v solném roztoku dochází vlivem elektroforetického procesu k migraci fragmentů DNA z jádra („hlavy“) do pytlovitého útvaru za jádrem („ohonu“). Po vizualizaci vhodným barvivem vznikne typický obraz komety (čím více je DNA fragmentovaná, tím je „ohon“ mohutnější). Při neutrálním pH lze detekovat pouze dvouřetězcové zlomy DNA, při vyšším („alkalickém“) pH jsou detekovány i zlomy jednořetězcové.<sup>8,9</sup>

CA umožňuje detekovat jemnější poškození DNA než CBMN, je ovšem nutno brát v úvahu, že poškození DNA je většinou rychle reparováno bez patologických následků pro buňku. V případě neúspěšné reparace dochází ke vzniku permanentní mutace nebo ke spuštění apoptotických mechanismů vedoucích ke smrti buňky.

### Podrobnější popis metodiky

Expozice buněk vybraným NM probíhala obdobně jako u CBMN. Byly zvoleny tři koncentrace NM bez významného cytotoxického účinku. Pro každou testovanou koncentraci

(a pozitivní kontrolu) byly kultury nasazeny v duplikátech, pro negativní kontrolu v tetraplikátech. Experiment byl opakován třikrát.

Příprava podložních skel zahrnovala jejich vyvaření po dobu 30 minut ve směsi peroxidu vodíku a vody (1:10). Po oschnutí ve svislé pozici (po dobu nejméně 3 hodin) byla na 10 vteřin ponořena do podkladové agarózy (1% roztok standardní agarózy v třikrát destilované vodě) o teplotě 95 °C. Přebytek agarózy ze spodní strany skla byl ořen a skla byla uložena na vodorovnou podložku na dosušení (60 °C po dobu 60 minut).

Po zchladnutí (nejlépe druhý den od dosušení) skla rozložíme na chladicí podložku, aplikujeme 85 µl agarózy s vysokou teplotou tání (1% roztok agarózy v PBS) a ihned přikryjeme krycím sklíčkem. Krycí sklíčko odstraníme po úplném ztuhnutí agarózy (neklade odpor při snímání). Takto připravená potažená podložní skla lze skladovat v chladu (v boxu na mikroskopické preparáty) po dobu maximálně jednoho měsíce.

Ke zpracování vzorků je třeba připravit řadu roztoků. Jedná se o PBS pufr skládající se z 8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 2,9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . Po navážení jednotlivých složek se přidá 800 ml vody, pH se upraví na 7,4 a voda doplní do 1000 ml. Lyzační roztok se připraví z 146,0 g NaCl; 29,2 g EDTA; 1,2g Tris a vody. Následně se pH upraví na 10 a doplní se do 1000 ml vodou. V den pokusu se přidá na 100 ml lyzačního roztoku 1 ml Tritonu X-100. Elektroforetický roztok se skládá z 24 g NaOH a 4 ml 0,5M EDTA doplněných do 2000 ml dvakrát destilovanou vodou. Neutralizační roztok se připraví ze 48,5 g Tris a vody. Po úpravě pH na 7,5 se doplní vodou do 1000 ml vodou. Barvicí roztok ethidium bromidu se připravuje z 250 µl zásobního roztoku (2 mg ethidium bromidu v 5 ml vody) a 6 ml vody. Ve všech roztocích, pokud není vedeno jinak, se používá pouze třikrát destilovaná voda (roztoky jsou uchovávány v chladu).

Po skončení expozice v délce trvání 1,5 až 2 buněčných cyklů jsou buňky odstředěny (300 × g, 5 min), spočítány pomocí Bürkerovy komůrky a naředěny na koncentraci  $8 \times 10^5$  buněk/ml. Objem 35 µl této buněčné suspenze je smíchán s 85 µl agarózy s nízkou teplotou tání (1% roztok agarózy v PBS) při teplotě 38 °C a následně je 85 µl této směsi aplikováno na předem připravená podložní skla potažená agarózami (skla jsou položena na vodorovné chladicí podložce). Kapku agarózy s buňkami ihned přiklopíme krycím sklíčkem (sklíčka opatrně sejmeme po ztuhnutí agarózy – nekladou odpor při pokusu o sejmutí). Tento a následující kroky doporučujeme provádět v zatemněné místnosti při žlutém či oranžovém světle k minimalizaci arteficiálního poškození DNA.

Skla s aplikovanou buněčnou suspenzí v agaróze umístíme do skleněných barvicích kyvet typ Hellendahl, do kterých nalijeme 100 ml lyzačního roztoku s 1 ml Tritonu X-100 (přidáním těsně před nalitím do kyvet), a necháme 60 minut lyzovat v chladu. Po dokončení lýzy roztok vylijeme, podložní skla s buněčnou suspenzí v agaróze přemístíme do elektroforetického tanku (umístěného v chladu), naplněného chlazeným elektroforetickým roztokem (sklíčka na okraji lze přimáčknout skleněnou tyčinkou, aby „neplavala“). Následně po dobu 40 minut necháme „rozplétat“ DNA; po ukončení rozplétání proběhne elektroforéza (25 V, 300 mA, 30 min).

Po dokončení elektroforézy sklíčka vyjmeme z elektroforetického tanku, umístíme do kyvet typ Hellendahl, nalijeme 100 ml chlazeného neutralizačního roztoku a necháme reagovat po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Tento (neutralizační) krok opakujeme třikrát. Následně skla opláchneme při laboratorní teplotě v třikrát destilované vodě (vždy po dobu 5 minut). Nakonec skla rozložíme na filtrační papír agarózou nahoru a necháme uschnout při laboratorní teplotě (nejlépe do druhého dne). Před analýzou je nutno provést rehydrataci



skel v třikrát destilované vodě (v kyvetě typ Hellendahl, 60 min) a aplikovat na jejich povrch 20 µl barvicího roztoku ethidium bromidu (preparát nakonec přikryjeme krycím sklíčkem). Mikroskopická analýza se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu s CCD kamerou (200násobné zvětšení s použitím zeleného excitačního filtru, excitace 510–550 nm, emise 590 nm) a softwaru MetaSystems CometImager.

Výsledky analýzy jsou vyjádřeny jako průměrný procentuální obsah DNA v ohonu komety (% tail DNA; % tDNA; 50 hodnocených komet v každém vzorku). Hodnota udává, kolik procent DNA migrovalo z „hlavy“ komety do „ohonu“. Parametr je považován za velmi užitečný pro kvantitativní hodnocení poškození DNA (nabývá hodnot 0–100 %) a vyznačuje se nízkou variabilitou výsledků v různých studiích.<sup>10,11</sup>

## Použitelnost metodiky pro testování NM

Poškození DNA lze pomocí CA detekovat v suspenzi kvasnic, protozoálních, rostlinných i živočišných buněk (bezobratlí i obratlovci), a to jak dělicích se, tak i nedělicích se buněk.<sup>8,12</sup> Z uvedeného plyne velká univerzálnost metodiky a možnost testovat i účinky NM na buněčné kultury (*in vitro*) a buňky tkání (*in vivo*).

Pravděpodobně nejvhodnější je vyjádření výsledku analýzy v podobě mediánu nebo aritmetického průměru celého vzorku, který by měl být hodnocen v duplikátu.<sup>10</sup> Automatické či semiautomatické systémy analýzy obrazu obvykle udávají parametry, jako jsou délka ohonu (*tail length*; µm) a moment ohonu (*tail moment*; součin % DNA migrované v ohonu a vzdálenosti DNA migrace v ohonu).<sup>11</sup> Pojem délka ohonu je ovšem poněkud zavádějící, protože tato hodnota je ovlivněna jak podmínkami elektroforézy, tak i místem, odkud je měřena (jako výchozí bod se používá jak střed hlavy, tak i místo přechodu hlavy v ohon).<sup>10,13</sup>

CA je metoda finančně nenáročná. V porovnání s CBMN a testem chromozomálních aberací (ABC) je však náročnější na laboratorní vybavení (fluorescenční mikroskop, CCD kamera a speciální SW pro vyhodnocení) a na množství laboratorní práce. Metoda je citlivá na čistotu materiálu a kvalitu vody (ve většině kroků je zapotřebí třikrát destilované vody). Vliv na kvalitu výsledků má i stáří podložních skel (neměla by být starší než dva roky od data výroby). DNA bez jaderného obalu a buněčných komponent (po lyzačním kroku) je citlivá k arteficiálnímu poškození modrou složkou denního světla a bílým zářivkovým světlem.<sup>12</sup> Z tohoto důvodu je nutné metodu provádět v zatemněné (a nejlépe i chlazené) místnosti při osvětlení žlutooranžovým světlem (při červeném světle se zhoršuje přesnost laboratorní manipulace).

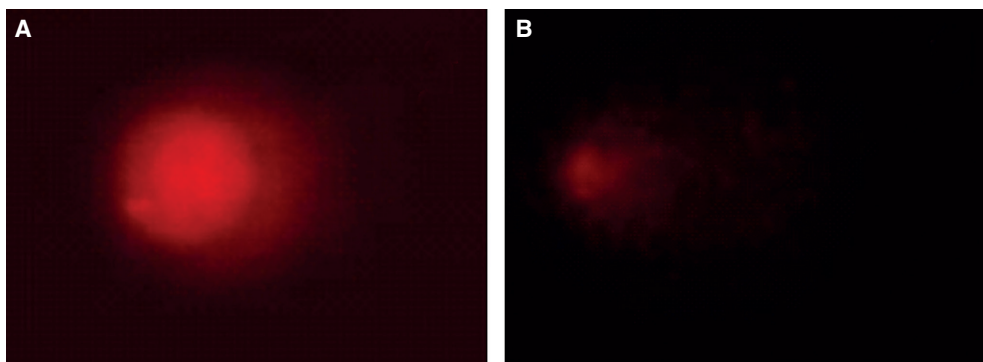
Metodou nelze určit velikost fragmentů DNA, nicméně lze předpokládat, že větší fragmenty by měly migrovat dále od hlavy komety.<sup>8</sup> Problémem může být replikace buněk během elektroforézy. Za alkalických podmínek se replikační vidlice chovají jako jednořetězcové zlomy, což zvyšuje množství DNA v ohonu komety. Za neutrálních podmínek dochází naopak k snížení migrace DNA do ohonu.<sup>8</sup> U buněk s velmi dobře strukturovanou cytoplazmou (epiteliální buňky) se může projevit snížená efektivita lýzy. V těchto případech je pro lýzu nutné použít proteáz, které však na druhou stranu mohou ovlivňovat výsledek testu.<sup>14</sup>

Zatím nebyl uspokojivě popsán vztah mezi rozsahem poškození DNA (sledovaného v CA) a jeho biologickým dopadem.<sup>8</sup> Omezení metody představuje i klesající senzitivita testu při nárůstu počtu zlomů DNA nad 10 000 na diploidní savčí buňku.<sup>8</sup>

Použití automatické analýzy snižuje pravděpodobnost lidských chyb, na druhou stranu však může být zdrojem chyb dalších. Jedná se například o situace, kdy shluky NM imitují buňky. Rovněž jev zhášení fluorescence některými NM může při použití automatické analýzy vést ke zkreslení výsledků. Tato rizika lze snižovat semiautomatickou analýzou vzorků. Závěrem je nutno zmínit dosud neúspěšnou standardizaci metody (různé laboratoře používají její různé modifikace), což vede ke značné interlaboratorní variabilitě výsledků a nemožnosti jejich přímého porovnání.<sup>14</sup>

## Souhrn nejzajímavějších výsledků

Obrázek 39 zachycuje nálezy CA z experimentů s grafenem. Z výsledků vyplývá, že test by mohl být použitelný pro hodnocení genotoxického potenciálu NM vůči THP-1 buněčné linii. Protože jsme si vědomi nejistot souvisejících s možností zhášení fluorescence grafenovými plátky, byly souběžně s expozicí grafenu provedeny i expozice třem formám nanočástic oxidu titaničitého. Výsledky expozic THP-1 oxidu titaničitému potvrdily závěry z expozic THP-1 grafenu týkajících se použitelnosti testu CA pro hodnocení genotoxických účinků NM.

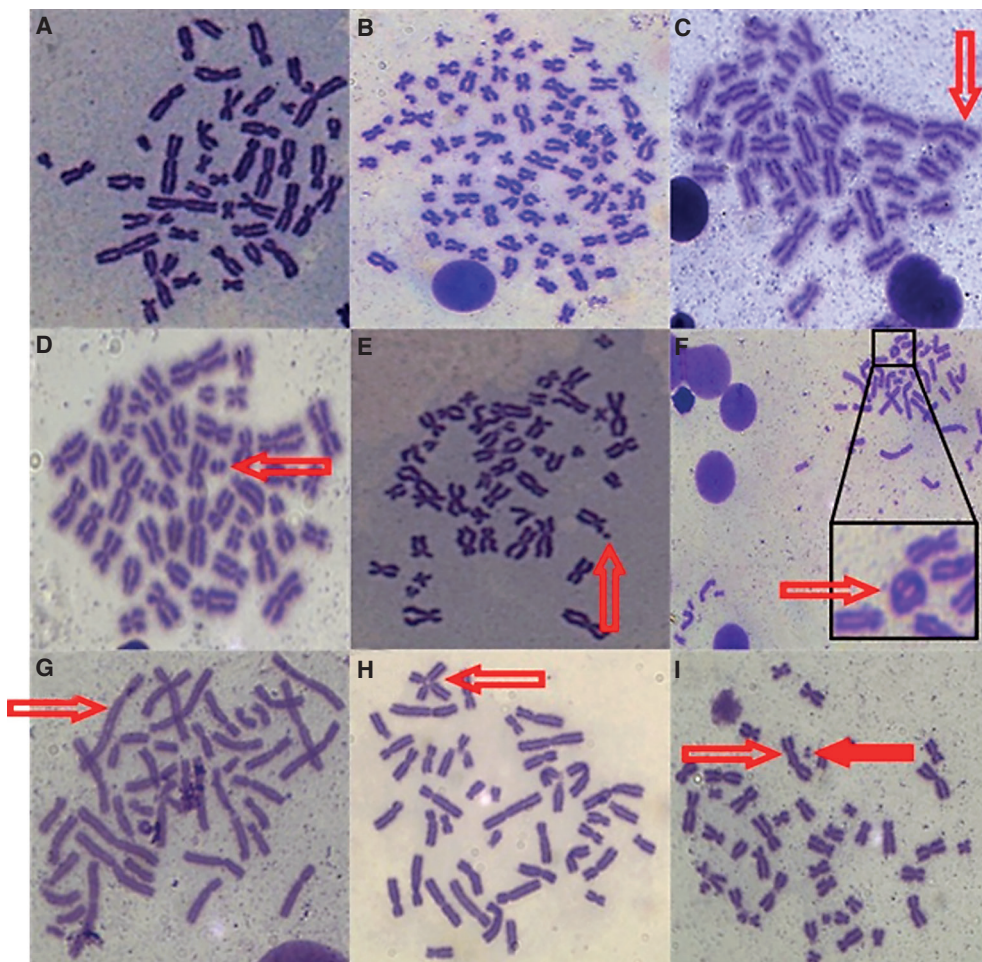


**Obrázek 39.** Příklady výstupů kometového testu: (A) buněčné jádro (nukleotid) s 10 % jaderného obsahu uvolněného do „ohonu“; (B) nukleotid se 40 % jaderného obsahu uvolněného do „ohonu“

## TEST CHROMOZOMÁLNÍCH ABERACÍ (TEST GENOTOXICITY)

### Teoretický základ metodiky

Jako chromozomální aberace (ABC) jsou označovány změny struktury a/nebo počtu chromozomů. Mohou se objevovat spontánně nebo být indukovány expozicí chemickým či fyzikálním faktorům.<sup>15</sup> ABC lze pozorovat v dělicích se buňkách. Dělení je v této fázi cyklu (metafáze) zastaveno pomocí mitotického jedu colcemidu, který naruší dělicí vřeténko.<sup>16</sup> Po obarvení preparátů roztokem Giemsa-Romanowski lze analyzovat stav chromozomů a studovat jejich strukturální aberace, jako jsou zlomy, gapy, acentrické fragmenty, dicentrické chromozomy či výměny a rovněž numerické aberace, tedy změny v počtu chromozomů.<sup>17</sup> Na



**Obrázek 40.** Ukázky aberací chromozomů lidských monocytů po expozici látkám s genotoxickým účinkem; (A) normální mitotická buňka, (B) polyploidní buňka, (C) zlom (označen šipkou), (D) dvojitý fragment (označen šipkou), (E) minute (označeno šipkou), (F) prstenčitý (ring) chromozom (označen šipkou), (G) translokace (označeno šipkou), (H) mezichromozomová výměna (označeno šipkou), (I) dicentrický chromozom (označeno prázdnou šipkou) a dvojitý fragment (označeno plnou šipkou)

Obrázku 40 jsou ukázky aberovaných chromozomů lidských monocytů po expozici látkám s genotoxickým účinkem.

## Podrobnější popis metodiky

Expozice buněk vybraným NM probíhá jako v případě CBMN. Rovněž je nutné volit alespoň tři koncentrace NM bez významného cytotoxického účinku. Pro každou testovanou koncentraci a pozitivní kontrolu by kultury měly být nasazeny v duplikátu, pro negativní kontrolu

v tetraplikátu. Experiment je vhodné opakovat třikrát. Podložní skla před aplikací vzorku jsou připravována identickým způsobem jako v případě CBMN.

Po ukončení primární expozice (kultivace) NM je k buňkám přidán roztok colcemidu o koncentraci 0,24 µg/ml kultury a kultivace pokračuje další 1,5 až 3 hodiny v závislosti na délce buněčného cyklu použité buněčné kultury (u THP-1 po dobu dalších 2 hodin). Před aplikací colcemidu lze zařadit vymývací krok k odstranění NM obdobně jako u CBMN. Po ukončení kultivace jsou buňky odstředovány (300 × g; 3 min), supernatant je odstraněn a buňky jsou ve třech krocích fixovány (v digestoři). Mezi každým fixačním krokem se provádí odstředění (300 × g; 3 min) a odstranění supernatantu. V prvním fixačním kroku je použito 92 ml demineralizované vody, 3 ml metanolu a 5 ml ledové kyseliny octové.

V druhém fixačním kroku je použit pouze metanol a ve třetím roztok metanolu a ledové kyseliny octové (3:1). Roztoky obsahující metanol a ledovou kyselinu octovou je nutné po přípravě uchovávat v lednici. Roztoky jsou připravovány těsně před zahájením zpracování vzorků. Po třetím fixačním kroku následuje opět odstředění (300 × g; 3 min) a odstranění supernatantu s výjimkou cca 1 ml nad peletou, ve kterém je buněčná peleta resuspendována. Následně je suspenze nakapána na dvě vychlazená, navlhčená, vodorovně uložená podložní skla a ponechána uschnout přes noc při laboratorní teplotě. Následující den jsou vzorky obarveny 5% roztokem Giemsa-Romanowski (po dobu 5 minut), opláchnuty pod tekoucí vodou a v demineralizované vodě a po uschnutí uloženy do boxu na mikroskopické preparáty. Skladování preparátů je možné při laboratorní teplotě.

Analýza ABC je prováděna pomocí světelného mikroskopu s použitím imerzního oleje (100násobné zvětšení). Je hodnoceno 100 dobře rozestoupených mitotických metafázických buněk. K hodnocení jsou používána skórovací kritéria AHEM 2007.<sup>16</sup>

## Použitelnost metodiky pro testování NM

Analýza ABC je metoda poměrně levná a její materiální a přístrojová náročnost je srovnatelná s CBNM. Výhodou je standardizace provedení testu, využitelnost v epidemiologických studiích s použitím periferních lymfocytů a rovněž standardizace bazální hladiny poškození DNA periferních lymfocytů v české populaci.<sup>16,18</sup>

Analýza ABC je náročná na laboratorní práci, čas, a zejména zkušenosti hodnotitele. Z tohoto důvodu se ustupuje od vyjádření výsledků analýzy ve formě konkrétních poškození (například počtu zlomů, fragmentů a dicentrických chromozomů na 100 buněk) a upřednostňuje se vyjádření počtu aberovaných buněk na 100 metafázických buněk bez bližší specifikace.<sup>19</sup> Gapy se do celkového počtu aberovaných buněk nezahrnují, ale lze je prezentovat jako samostatnou kategorii na 100 metafázických buněk.<sup>16</sup> Při detekci numerických aberací je standardní verze testu vhodná pouze pro hodnocení polyploidii. Při analýze aneuploidii může docházet k nadhodnocení v důsledku arteficiální ztráty chromozomů při zpracování.<sup>19</sup>

Automatické vyhodnocování preparátů je komplikované a může být zatíženo značnou chybou. Vhodnějším se zdá být semiautomatické vyhodnocení pomocí vyhledávače metafázických buněk a dicentrických chromozomů.<sup>15</sup> Analýza ABC je ve srovnání s jinými metodami detekce poškození DNA poměrně málo citlivá, nicméně je stále používána při hodnocení akutních (nárazových) expozic (například radiační nehody) nebo rizikových subchronických a chronických expozic, zahrnujících dlouhodobé pracovní vystavení karcinogenům a/ nebo ionizujícímu záření.<sup>20,21</sup> Nevýhodou analýzy ABC je její neuniverzálnost, zejména pro

buněčné linie s variabilním počtem chromozomů. Použití analýzy ABC pro testování genotoxického potenciálu NM komplikuje možnost překrytí metafazických chromozomů shluky NM (zejména při použití vyšších koncentrací). Problémem může rovněž být záměna malých shluků NM za minutu (Obrázek 40). Analýzu ABC nepovažujeme za vhodnou pro testování genotoxického potenciálu uvedených NM na použitých buněčných liniích, protože obě linie vykazovaly vysoký bazální počet aberovaných buněk (přes 50 %).

V jedné metafazické buňce buněčné linie THP-1 bylo nalezeno maximálně 48 chromozomů (centromer). THP-1 buněčná linie je považována v současnosti za téměř diploidní buněčnou linii s 49 chromozomy, ale původně byla popsána jako diploidní linie s karyotypem 46 XY.<sup>22,23</sup> Někteří autoři uvádějí, že linie získané z různých zdrojů se mohou mírně odlišovat.<sup>24</sup> THP-1 buněčná linie tedy není vhodná pro hodnocení numerických aberací, kvůli nestabilnímu počet chromozomů, ani pro hodnocení strukturálních aberací, kvůli přítomnosti minimálně jednoho zlomu v každé druhé hodnocené metafazické buňce. Linie by byla použitelná, pokud by se výsledek udával jako počet zlomů a dalších nálezu na 100 hodnocených metafazických buněk. Od tohoto hodnocení se však obecně upouští pro velkou variabilitu i mezi zkušenými hodnotiteli.<sup>19</sup> Z obdobných důvodů není ABC vhodný pro A549 buněčnou linii, která je hypotriploidní (počet chromozomů se pohybuje kolem 66) a vykazuje vysoký bazální počet mutací.<sup>25</sup>

## Souhrn nejzajímavějších výsledků

ABC se ukázal být nevhodným pro použití na buněčné linii THP-1. Nejčtenější počet centromer (chromozomů) v jedné metafazické buňce byl u námi použité linie 48. THP-1 buněčná linie je považována v současnosti za téměř diploidní buněčnou linii s 49 chromozomy, ale původně byla popsána jako diploidní linie s karyotypem 46 XY.<sup>22,23</sup> Rovněž se dochází k závěru, že se linie získaná z různých zdrojů mírně odlišuje.<sup>24</sup> U námi použité linie jsme zachytili vysoký bazální počet aberovaných buněk (přes 50 %). Proto bylo rozhodnuto, že ABC je nevhodný test pro THP-1 buněčnou linii. Z obdobných důvodů není ABC vhodný pro A549 buněčnou linii, která je hypotriploidní (počet chromozomů se pohybuje kolem 66) a vykazuje rovněž vysoký bazální počet mutací.<sup>25</sup> ABC zůstává však významným testem s použitím periferních lymfocytů, zejména pak v epidemiologických studiích, společně s CBMN a CA.

## LITERATURA

1. Sabharwal R, Verma P, Syed MA et al. Emergence of Micronuclei as a Genomic Biomarker. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2015;36(4):212–218. doi:10.4103/0971-5851.171541.
2. Ruiz-Ruiz B, Arellano-García ME, Radilla-Chávez P et al. Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Human Lymphocytes as a Sensitive Tool for Cytotoxicity/Genotoxicity Evaluation of AgNPs. *ACS Omega.* 2020;5(21):12005–12015. doi:10.1021/acsomega.0c00149.
3. Fenech M. Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay. *Nat Protoc.* 2007;2(5):1084–1104. doi:10.1038/nprot.2007.77.
4. Komárek L. Standardní operační postupy pro biologické monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí. *Acta Hyg Epidemiol Microbiol.* Praha, Česká republika: Státní zdravotní ústav; 2003. 190 s. ISBN: 0862-5956.

5. Hayashi M. The Micronucleus Test Most Widely Used In Vivo Genotoxicity Test. *Genes Environ.* 2016;38:18. doi:10.1186/s41021-016-0044-x.
6. Gonzalez L, Sanderson BJ, Kirsch-Volders M. Adaptations of the In Vitro MN Assay for the Genotoxicity Assessment of Nanomaterials. *Mutagenesis.* 2011;26(1):185–191. doi:10.1093/mutage/geq088.
7. Burgum MJ, Clift MJD, Evans SJ et al. Few-Layer Graphene Induces Both Primary and Secondary Genotoxicity in Epithelial Barrier Models In Vitro. *J Nanobiotechnology.* 2021;19(1):24. doi:10.1186/s12951-021-00769-9.
8. Olive PL, Banáth JP. The Comet Assay: A Method to Measure DNA Damage in Individual Cells. *Nat Protoc.* 2006;1(1):23–29. doi:10.1038/nprot.2006.5.
9. OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. 2023. doi:10.1787/9789264264861-en.
10. Møller P. Assessment of Reference Values for DNA Damage Detected by the Comet Assay in Human Blood Cell DNA. *Mutat Res.* 2006;612(2):84–104. doi:10.1016/j.mrrev.2005.10.001.
11. Collins A, Koppen G, Valdiglesias V et al. The Comet Assay as a Tool for Human Biomonitoring Studies: The ComNet Project. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2014;759:27–39. doi:10.1016/j.mrrev.2013.10.001.
12. Dvořák M, Matejovičová M. Principy a využití kometové analýzy při detekci poškození DNA. *Chem Listy.* 2008;102:977–983.
13. Dusínská M, Collins AR. The Comet Assay in Human Biomonitoring: Gene-Environment Interactions. *Mutagenesis.* 2008;23(3):191–205. doi:10.1093/mutage/gen007.
14. Afanasieva K, Sivolob A. Physical Principles and New Applications of Comet Assay. *Biophys Chem.* 2018;238:1–7. doi:10.1016/j.bpc.2018.04.003.
15. Mateuca RA, Decordier I, Kirsch-Volders M. Cytogenetic Methods in Human Biomonitoring: Principles and Uses. *Methods Mol Biol.* 2012;817:305–334. doi:10.1007/978-1-61779-421-6\_15.
16. Rössner P, Bavorová H, Očadlíková D. Metody biologického monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí: Cytogenetická analýza periferních lymfocytů: Aktualizace platné standardní metodiky (Příloha AHEM 20/89). *Acta Hyg Epidemiol Microbiol.* Praha, Česká republika: Státní zdravotní ústav; 2000. 27 s.
17. Grujičić D, Radović M, Arsenijević S, Milošević-Djordjević O. Cytogenetic Biomarkers in Detection of Genotoxic Effects of Gestagens in Peripheral Blood Lymphocytes In Vitro and In Vivo. *Eur J Med Genet.* 2016;59(12):624–633. doi:10.1016/j.ejmg.2016.10.009.
18. Cerná M, Krsková A, Cejchanová M, Spěváčková V. Human Biomonitoring in the Czech Republic: An Overview. *Int J Hyg Environ Health.* 2012;215(2):109–119. doi:10.1016/j.ijheh.2011.09.007.
19. Registre M, Proudlock R. The In Vitro Chromosome Aberration Test. In: *Genetic Toxicology Testing: A Laboratory Manual.* Boston, MA: Academic Press; 2016:207–267. doi:10.1016/B978-0-12-800764-8.00007-0.
20. Natarajan AT. Chromosome Aberrations: Past, Present and Future. *Mutat Res.* 2002;504(1–2):3–16. doi:10.1016/s0027-5107(02)00075-1.
21. Tichy A, Kabacik S, O'Brien G et al. The First In Vivo Multiparametric Comparison of Different Radiation Exposure Biomarkers In Human Blood. *PLoS One.* 2018;13(2):e0193412. doi:10.1371/journal.pone.0193412.
22. Odero MD, Zeleznik-Le NJ, Chinwalla V, Rowley JD. Cytogenetic and Molecular Analysis of the Acute Monocytic Leukemia Cell Line THP-1 with an MLL-AF9 Translocation. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000;29(4):333–338. doi:10.1002/1098-2264(2000)9999:9999::AID-GCC1040>3.0.CO;2-Z.
23. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and Characterization of a Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line (THP-1). *Int J Cancer.* 1980;26(2):171–176. doi:10.1002/ijc.2910260208.

24. Adati N, Huang MC, Suzuki T, Suzuki H, Kojima T. High-Resolution Analysis of Aberrant Regions in Autosomal Chromosomes in Human Leukemia THP-1 Cell Line. *BMC Res Notes*. 2009;2:153. doi:10.1186/1756-0500-2-153.
25. Peng KJ, Wang JH, Su WT, Wang XC, Yang FT, Nie WH. Characterization of Two Human Lung Adenocarcinoma Cell Lines by Reciprocal Chromosome Painting. *Dongwuxue Yanjiu*. 2010;31(2):113–121. doi:10.3724/SP.J.1141.2010.02113.
26. Svadlakova T, Hubatka F, Turanek Knotigova P et al. Proinflammatory Effect of Carbon-Based Nanomaterials: In Vitro Study on Stimulation of Inflammasome NLRP3 via Destabilisation of Lysosomes. *Nanomaterials*. 2020;10(3):418. doi:10.3390/nano10030418.
27. Svadlakova T, Kolackova M, Vankova R et al. Carbon-Based Nanomaterials Increase Reactivity of Primary Monocytes towards Various Bacteria and Modulate Their Differentiation into Macrophages. *Nanomaterials*. 2021;11(10):2510. doi:10.3390/nano11102510.
28. Svadlakova T, Hubatka F, Masek J et al. Activation of NLRP3 inflammasome as a Key Indicator of Carbon Nanotubes Proinflammatory Potential. *Eur J Immunol*. 2019;49:601.

# ZKRATKY

16HBE	lidská bronchiální epiteliální buněčná linie ( <i>human bronchial epithelial cells</i> )
3HFWC	hyper-harmonizovaný vodní komplex hydroxylovaného fullerenu C <sub>60</sub>
A549	alveolární epiteliální buňky A549 ( <i>adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells</i> )
ABCA-1	<i>ATP-binding cassette transporter</i>
ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
ARPE-19	imortalizované lidské retinální buňky
AST	aspartátaminotransferáza
BAL	bronchoalveolární laváž
BEAS-2B	imortalizovaná a nenádorová linie lidských plicních epiteliálních buněk ( <i>bronchial epithelial cells</i> )
BMEC	mozkové mikrovaskulární endoteliální buňky ( <i>bone marrow microvascular endothelial cells</i> )
BSA	bovinní sérový albumin
BUN	<i>blood urea nitrogen</i>
C <sub>60</sub>	fulleren
CaCo2	buněčná linie lidského kolorektálního adenokarcinomu ( <i>human colon adenocarcinoma cell line</i> )
Caco-2	imortalizované lidské buňky kolorektálního adenokarcinomu
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAT	kataláza
CB	saze ( <i>carbon black</i> )
CD	uhlíkové tečky ( <i>carbon dots</i> )
CDH1	kadherin 1
CFU	kolonie tvořící jednotku
CHCE-T	lidské rohovkové epitelové buňky
CNF	uhlíková nanovláknina ( <i>carbon nanofibres</i> )
CNH	uhlíkové nanorohy ( <i>carbon nanohorns</i> )
CNM	uhlíkové nanomateriály ( <i>carbon nanomaterials</i> )
CNP	uhlíkové destičky ( <i>carbon platelets</i> )
CNS	centrální nervová soustava
CNT	uhlíkové nanotrubicice ( <i>carbon nanotubes</i> )
CPPED1	<i>calcineurin-like phosphoesterase domain containing 1</i>
CT	počítačová tomografie
CVD	chemická depozice z plynné fáze



DAMP	<i>damage/danger-associated molecular patterns</i>
DWCNT	dvoustěnné uhlíkové nanotrubičky ( <i>double-walled carbon nanotubes</i> )
EC <sub>50</sub>	polovina maximální účinné koncentrace
EEG	elektroencefalografie
EKG	elektrokardiografie
EPC	endoteliální progenitorové buňky
EPO	eozinofilní peroxidáza
FBN1	fibrilin 1
FBS	fetální bovinní sérum
FDT	fotodynamická terapie
FLG	vícevrstvý grafen ( <i>few layer graphene</i> )
FLGO	několikvrstvý grafen oxid ( <i>few-layer graphene oxide</i> )
FN1	fibronektin
FSF1	fibroblasty z kůže lidského obličeje
FSH	folikuly stimulující hormon
FTT	fototermální terapie
GGT	$\gamma$ -glutamyltransferáza
GIT	gastrointestinální trakt
GNP	grafenové nanodestičky ( <i>graphene nanoplatelets</i> )
GO	oxid grafenu ( <i>graphen oxide</i> )
GO-DOTA	oxid grafenu funkcionalizovaný kyselinou 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctovou
GO-QD	kvantové tečky oxidu grafenu ( <i>graphene oxide quantum dots</i> )
GP	grafenové plátky
GPCR	receptor spřažený s G proteinem ( <i>G protein-coupled receptors</i> )
GQD	grafenové kvantové tečky ( <i>graphene quantum dots</i> )
H2AFX	<i>histone family member X</i>
H9c2	kardiomyoblasty
HaCaT	imortalizované keratinocyty
HASMC	buňky hladké svaloviny aorty ( <i>human aortic smooth muscle cells</i> )
HBEC-3KT	nenádorové buňky lidského bronchiálního epitelu
hConECs	lidské epitelové spojivkové buňky
hCorECs	lidské epitelové buňky rohovky
HEB	hematoencefalická bariéra
HEK-293T	lidské embryonální ledvinné buňky
HepG2	buňky hepatocelulárního karcinomu
HK-2	dospělé lidské buňky proximální tubulárního epitelu
HLF	lidské plicní fibroblasty ( <i>human lung fibroblasts</i> )
HNEpC	primární buňky lidského nosního epitelu
hpf	hodin po fertilizaci
HSC 2012	Hazard Communication Standard
Hsp90	<i>heat shock protein 90</i>
HT29	buňky lidského kolorektálního adenokarcinomu s epiteliální morfologií
HUVEC	endoteliální buňky lidské pupečnickové žíly ( <i>human umbilical vein endothelial cells</i> )
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICAM-1	solubilní intercelulární adhezni molekuly 1 ( <i>intercellular adhesion molecules</i> )
IL	interleukin
LLC-PK1	prasečí buňky proximálního ledvinného tubulu
LOX-1	<i>lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor</i>
LPS	lipopolysacharid

MAMP	<i>microbe-associated molecular patterns</i>
MPO	myeloperoxidáza
MWCNT	vícetěnné uhlíkové nanotrubičky ( <i>multi-walled carbon nanotubes</i> )
MWCNT-PVP	mnohovrstvé uhlíkové nanotrubičky funkcionalizované polyvinylpyrrolidonem
MWCNT-TEPA	MWCNT funkcionalizované tetraetylenpentaminem
NCI-H322	nemalobuněčný bronchoalveolární karcinom
NCM460	epitelové buňky tlustého střeva
ND	nanodiamanty
NET	extracelulární neutrofilové pasti ( <i>neutrofil extracellular traps</i> )
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NHBE	normální lidské bronchiální epitelové buňky
NHDF	lidské dermální fibroblasty
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health
NIR	blízké infračervené záření
NKR-52E	kryší epitelové buňky ledvin
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NLRP3	<i>NOD-like receptor family pyrin domain containing 3</i>
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
Ox-MWCNT	oxidované MWCNT
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PEG	polyethylenglykol
PEG-MWCNT	polyethylenglykolované MWCNT
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PTEN	homolog fosfatázy a TENSinu ( <i>phosphatase and TENsin homolog</i> )
RES	retikuloendoteliální systém
rGO	redukovaný GO
RhE	SkinEthic™ model rekonstruované lidské epidemirs
ROS	volné kyslíkové radikály ( <i>reactive oxygen species</i> )
RPE	retinální pigmentový epitel
RTG	rentgenové záření
SAEC	epitelové buňky nižších etází dýchacích cest ( <i>small airway epithelial cells</i> )
sFLG	malý vícevrstevný grafen ( <i>small few-layer graphene</i> )
SLGO	jednovrstvý grafen oxid ( <i>single-layer graphene oxide</i> )
SOD1	superoxiddismutáza
SWCNT	jednovrstvé uhlíkové nanotrubičky ( <i>single-wall carbon nanotubes</i> )
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TGFB1	transformující růstový faktor $\beta$ ( <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
T-MWCNT	dispergované Tweenem-80
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
VCAM-1	solubilní vaskulární buněčné adhezni molekuly 1 ( <i>vascular cell adhesion molecule</i> )
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor
Vero	buněčná linie epitelialních buněk ledvin z afrického kočkodana zeleného
ZO-1	zonula occludens-1