Metodický manuál projektu NANOBIO

Zdeněk Fiala, Ctirad Andrýs a kol.: 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)



EVROPSKÁ UNIE Evropské strukturální a investiční fondy Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



Úvod

Optimalizace testů toxicity nanočástic/nanomateriálů byla jedním z významných cílů projektu Nanobio. Do projektu byly zapojeny výzkumné týmy Hradecko-pardubického regionu (z Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové, z Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice a z Centra materiálů a nanotechnologií (CEMNAT) Univerzity Pardubice). Vedle uvedených organizací se na výsledcích projektu významně podíleli též kolegové z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v. v. i. Brno (VÚVL) a z "Molecular & Translational Medicine, Trinity College, Dublin" (TCD).

Dále uvedené optimalizované metodiky jsou výsledkem práce kolegyň a kolegů z Hradce Králové, Brna a Dublinu. Na jejich optimalizaci pracovali (v abecedním pořadí): Ctirad Andrýs, Hana Bavorová, Aleš Bezrouk, Lenka Borská, Pavel Borský, Dana Čížková, Zdeněk Fiala, Petra Hajzlerová, Drahomíra Holmannová, František Hubatka, Jana Chvátalová, Adam Karas, Monika Kinclová, Martina Koláčková, Zora Komárková, Věra Králová, Pavel Kulich, Iva Malířová, Andrea Málková, Josef Mašek, Jaroslav Mokrý, Rishikaysh Pisal, Emil Rudolf, Ilona Sejkorová, Ladislava Schröterová, Ondřej Souček, Adriele Prina-Mello, Blanka Šestáková, Jindra Šmejkalová, Tereza Švadláková, Jaroslav Turánek, Pavlína Turánek Knötigová, Radka Vaňková, Petra Vicherková, Magda Voborníková, Yuri Volkov, a Martina Zemanová.

Obsah

M	etodiky Ústavu lékařské biologie a genetiky	6
	Test metabolické aktivity alamarBlue (test cytotoxicity)	6
	Teoretický základ metodiky	6
	Podrobnější popis metodiky	6
	Použitelnost metodiky pro testování nanočástic	6
	Souhrn nejzajímavějších výsledků	7
	Test záchytu neutrální červeně (Neutral red uptake – NRU; test cytotoxicity)	8
	Teoretický základ metodiky	8
	Podrobnější popis metodiky	8
	Použitelnost metodiky pro testování nanočástic	9
	Souhrn nejzajímavějších výsledků	9
	Počítání buněk pomocí obrazového cytometru metodou barvení jader DAPI (test cytotoxicity)	. 10
	Teoretický základ metodiky	. 10
	Podrobnější popis metodiky	. 10
	Použitelnost metodiky pro testování nanočástic	. 11
	Souhrn nejzajímavějších výsledků	. 11
	Dlouhodobé sledování buněčné proliferace pomocí kumulovaného počtu populačních zdvojení	
	(test cytotoxicity)	. 13
	Teoretický základ metodiky	. 13
	Podrobnější popis metodiky	. 13
	Použitelnost metodiky pro testování nanočástic	. 14
	Souhrn nejzajímavějších výsledků	. 15
	Test metabolické aktivity WST-1 (test cytotoxicity)	. 16
	Teoretický základ metodiky	. 16
	Podrobnější popis metodiky	. 16
	Použitelnost metodiky pro testování nanočástic	. 17
	Souhrn nejzajímavějších výsledků	. 17
	Literatura:	. 20
М	etodiky Ústavu klinické imunologie a alergologie	. 21
	Příprava suspenze nanomateriálů/nanočástic pro testování imunotoxicity (ve spolupráci s VÚVel	L
	Brno)	. 21
	Testování biologické kontaminace	. 23
	Buněčná esej – TLR	. 23
	Hodnocení imunotoxicity	. 25

Hodnocení cytokinů jako mediátorů zánětu	25
ELISA	25
Buněčná esej	27
Hodnocení aktivace NLRP3	30
LDH esej	33
Literatura	35
Metodiky Ústavu preventivního lékařství	36
Mikronukleus test (test genotoxicity a cytotoxicity)	36
Teoretický základ metodiky	36
Podrobnější popis metodiky	36
Použitelnost metodiky pro testovány nanočástic	39
Souhrn nejzajímavějších výsledků	40
Kometový test (test genotoxicity)	43
Teoretický základ metodiky	43
Podrobnější popis metodiky	44
Použitelnost metodiky pro testování nanočástic	45
Souhrn nejzajímavějších výsledků	47
Test chromozomálních aberací (test genotoxicity)	48
Teoretický základ metodiky	48
Podrobnější popis metodiky	50
Použitelnost metodiky pro testování nanočástic	52
Souhrn nejzajímavějších výsledků	52
Literatura:	54
Metodiky Ústavu histologie a embryologie	58
Histologická analýza	58
Teoretický základ metodiky	58
Podrobnější popis metodiky	58
Použitelnost metodiky pro testování nanočástic a souhrn nejzajímavějších výsledků	59
LDH test (test cytotoxicity)	61
Teoretický základ metodiky	61
Podrobnější popis metodiky	61
Použitelnost metodiky pro testování nanočástic a souhrn nejzajímavějších výsledků	62
MTT test (test cytotoxicity)	63
Teoretický základ metodiky	63

Podrobnější popis metodiky	63
Použitelnost metodiky pro testování nanočástic a souhrn nejzajímavějších výsledků	64
Genová kvantifikace prostřednictvím RT-qPCR (molekulární biologie, histologie)	64
Teoretický základ metodiky	64
Podrobnější popis metodiky	65
Použitelnost metodiky pro testování nanočástic a souhrn nejzajímavějších výsledků	66
WST-1 test (test cytotoxicity)	67
Teoretický základ metodiky	67
Podrobnější popis metodiky	67
Použitelnost metodiky pro testování nanočástic a souhrn nejzajímavějších výsledků	68
xCELLigence (buněčná proliferace, adheze, viabilita, morfologie)	69
Teoretický základ metodiky	69
Podrobnější popis metodiky	69
Použitelnost metodiky pro testování nanočástic a souhrn nejzajímavějších výsledků	70
Transmisní elektronová mikroskopie	72
Teoretický základ metodiky	72
Podrobnější popis metodiky	72
Použitelnost metodiky pro testování nanočástic	73
Souhrn nejzajímavějších výsledků	73
Literatura:	75

Metodiky Ústavu lékařské biologie a genetiky

(odpovědnými osobami za níže uvedené metodiky jsou Ladislava Schröterová, Věra Králová a Blanka Šestáková)

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 αMEM bez fenolové červeně s 10% FSB, 1% antibiotiky (penicilin, streptomycin), 10mM Hepes, 1mM pyruvát sodný a 2mM L-glutamin. 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 medium vymění za medium s nanomateriálem (NM). Vždy 100 µl/jamku. Inkubace s NM dle potřeby 1–72 h.

Roztoky: zásobní roztok alamarBlue: Termofischer Scientific DAL1100

Postup:

1) Přidejte 11 μ l roztoku alamarBlue do každé jamky. (Lze použít i druhou variantu, kdy po inkubaci s nanomateriálem je veškeré medium z jamek odsáto, ev. jamky 1x propláchnuty PBS bez iontů a nahrazeno novým mediem alamarBlue v poměru 1:10 – postup č. 2)

2) Proměřte fluorescenci v čase 0 hod ex. 560 nm/em. 590 nm

3) Inkubujte 1 nebo 2 hodiny v termostatu -37 °C, 5 % CO₂

4) Změřte fluorescenci

5) Nejprve vypočtěte rozdíl absorbancí v čase 1 h (ev. 2 h) a 0 h. Od naměřených absorbancí odečtěte blank. Naměřené hodnoty lze vyjádřit jako % kontroly.

Použitelnost metodiky pro testování nanočástic

Metoda je rychlá, citlivá, ale je nutno počítat s možností zhášení fluorescence, která, pokud se vhodně změří v čase nula jako background, by neměla významně ovlivnit výsledné sledování cytotoxicity NM (viz níže).

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 h v koncentracích (5, 15 a 30 µg/ml). Se zvyšující se koncentrací G1 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 background, od kterého se bude sledovat nárůst fluorescence způsobený metabolickou činností buněk. Přesto musíme počítat s mírným poklesem fluorescence v průběhu měření (Tab. 1). Tento pokles bude falešně snižovat výsledné hodnoty testu cytotoxicity. Tomuto poklesu lze částečně předejít, když po přidání roztoku alamarBlue bude následovat pětiminutová pauza a teprve poté bude měřen čas 0 h. Výsledky zhášení fluorescence jsou zachyceny v Obr. 1. Interference grafenu byla publikována v práci Šestáková, B. et al. 2022.





	К	5 µg/ml	15 μg/m	30 µg/ml		
0 h	100	100	100	100		
1 h	100,5	100,0	96,4	94,3		
2 h	101,3	100,4	95,6	92,5		

Tab.	1 Hodnoty	z grafu vyjádřeny	v procentech	času 0 h – GF	י1
	_	- 8	1 procenteeon	00000000	_

Test záchytu neutrální červeně (Neutral red uptake – NRU; test cytotoxicity)

Teoretický základ metodiky

Princip metody je založen na schopnosti živých buněk hromadit neutrální červeň v lysozomech. Příjem neutrální červeně (supravitální barvivo) (3-amino-7-dimethylamino-2methylphenazine hydrochloride – Cat.No. N2889 Merck) buňkami do lysozomů závisí na schopnosti buňky tvořit ATP a vytvářet pH gradient. Při fyziologickém pH prochází neutrální červeň plazmatickou membránou difúzí. Pokud je buňka mrtvá dochází k vyplavení barviva. Živé buňky po vychytání barviva do lysozomů jsou lyzovány a uvolněné barvivo měřeno pomocí spektrometrie jako míra absorbance při vlnové délce 540 nm.

Podrobnější popis metodiky

Kultivace:

Buňky se kultivují v α MEM bez fenolové červeně s 10% FSB, 1% antibiotiky (penicilin, streptomycin), 10mM Hepes, 1mM pyruvát sodný a 2mM L-glutamin. 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 medium vymění za medium s nanomateriálem (NM). Vždy 100 µl/jamku. Inkubace s NM dle potřeby 1 h–72 h

Roztoky:

- Fixační roztok: 1 g/100ml CaCl2 v 0,5% formaldehydu
- Lyzační roztok: 1% CH3COOH v 50% EtOH
- Zásobní roztok: neutrální červeně (0,33 %–3,3 g/l)
- Pracovní roztok Neutrální červeň 80 μg/ml v médiu

Postup:

1) Odsajte 100 µl média z jamek

2) Přidejte 100 μl roztoku neutrální červeně (80 $\mu g/m l)$ do každé jamky (konečné koncentrace neutrální červeně je 40 $\mu g/m l)$

3) Inkubujte 3 hodiny v termostatu - 37 °C, 5 % CO₂

- 4) Vše odsajte a přidejte 100 µl fixačního roztoku
- 5) Inkubujte 15 minut při pokojové teplotě
- 6) Opláchněte buňky dvakrát 100 μl PBS bez iontů
- 7) Přidejte 200 µl lyzačního roztoku
- 8) Inkubujte 15 minut při pokojové teplotě
- 9) Destičky protřepávejte na třepačce dalších 15 minut
- 10) změřte destičku fotometrem SPEKTRAFluor Plus, Tecan (Salzburg, Rakousko) při 540 nm.

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

Použitelnost metodiky pro testování nanočástic

Jelikož metoda záchytu neutrální červeně je založena na schopnosti buněk přijímat neutrální červeň, tak v případě, že buňky jsou aktivovány k vyšší absorpci, může dojít k falešně pozitivním výsledkům. Právě některé nanomateriály způsobují tuto aktivaci, a proto je NRU jako metoda stanovení cytotoxicity u některých nanomateriálů nevhodná.

Souhrn nejzajímavějších výsledků

Testovali jsme dva druhy grafenu – GP1 Plasmachem a GP2 Trinity College. Oba grafeny byly inkubovány s buněčnými liniemi po dobu 24 h v koncentracích (3,06; 6,125; 12,5; 25 a 50 μg/ml).

Z výsledků (Obr. 1) rozhodně nelze GP1 a GP2 považovat za toxický, neboť hodnoty dosahují více než 200 % kontroly. Ve skutečnosti se počty buněk po expozici grafenům nemění, naopak nejvyšší koncentrace testovaného grafenu může snižovat metabolickou aktivitu. Je zde také patrný rozdíl mezi jednotlivými grafeny, které mají stejné chemické složení, ale jiné fyzikální hodnoty.

Výsledky prezentovány na XXX. Xenobiochemickém sympóziu 15.–17.5.2019, Pezinok – Schröterová et al. Testování biokompatibility nanomateriálů-Grafen.



NRU A549



Obr. 1 Test záchytu neutrální červeně po inkubaci dvou grafenů GP1 a GP2 se dvěma buněčnými liniemi A549 a HaCaT

Počítání buněk pomocí obrazového cytometru metodou barvení jader DAPI (test cytotoxicity)

Teoretický základ metodiky

Jednoduchý způsob, jak kvantifikovat cytotoxicitu, je prosté počítání buněk. U většiny jaderných buněk odpovídá přímá úměra, kolik jader, tolik buněk. Jádra fixovaných buněk lze nabarvit fluorescenčním barvivem DAPI. Fluorochrom DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) se váže do dvouřetězce DNA v oblasti AT bází. Po vazbě do DNA se intenzita jeho fluorescence přibližně zdvacetinásobí. Monitorujeme fluorescenci při emisním maximu 461 nm (excitační maximum 358 nm)

Podrobnější popis metodiky

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

Postup:

- 1. Po inkubaci s nanomateriálem (NM) 1x proplach v PBS bez iontů; 200 ul/jamku
- Fixace 5 min 70 % EtOH; 100 ul/jamku nebo 15 min při -24°C ice-cold methanol (typické pro imunofluorescenci http://www.cellsignal.com/contents/resources-protocols/immunofluorescence-protocol-with-methanol-fixation-(if-methanol-fixed)/if-methanol-fixation)

- 3. Vyklepnout, nechat odpařit nebo 1x proplach PBS + 100 ul PBS a dát do lednice
- 4. Barvení DAPI 1000x ředěný zásobní roztok v redestilované vodě; 5 min; 100 ul/jamku (ideálně ten samý den jako je měření fluorescence)
- 5. Vyklepnout a 2x propláchnout v PBS bez iontů 200 ul/jamku
- 6. Proměřit na přístroji ImageXpress
- 7. Vyhodnotit počty a vztáhnout na kontrolu

Použitelnost metodiky pro testování nanočástic

Jedná se o přímou metodu pro měření cytotoxicity, kdy nedochází k zatížení výsledků falešným zvýšením hodnot jako u testů založených na metabolické přeměně substrátu. Počty buněk lze stanovit různými způsoby – trypanová modř, počítání v Bürkerově komůrce anebo s využitím vysokokapacitního zobrazovacího cytometru. Počítání v komůrce je časově náročné, test trypanové modři zase nemusí být vhodný – např. buňky s akumulovaným grafenem jsou problematicky rozlišitelné pro optické stanovení metodou trypanové modři. V případě zobrazovacího cytometru musíme vzít v úvahu možnost stínění nebo zhášení fluorescence testovaným nanomateriálem. V případě grafenu (Plasmachem) byly vhodné koncentrace pro testování cytotoxicity do 30 µg/ml. Vyšší koncentrace grafenu vyžadují vyšší expozici. 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, je zase kontrola přeexponovaná. Je třeba hledat vhodnou expozici k zachycení většiny jamek – viz obr. 1.

Souhrn nejzajímavějších výsledků

Kultivovali jsme lidské dermální fibroblasty HDF s grafenem o koncentracích 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 μg/ml 48 h. Po expozici grafenem jsme obarvili jádra DAPI dle výše zmíněného protokolu. Byla sledována změna fluorescence v závislosti na rostoucí koncentraci grafenu (Obr. 1) a změna fluorescence v závislosti na rostoucí expozici při stejné koncentraci grafenu 100 μg/ml i kontroly (Obr. 2).

Při expozici vhodné pro grafen se vysoce exponovaná jádra u kontrol slévají a analýza obrazu je řádně nerozpoznává. Jednotlivé koncentrace lze nasnímat zvlášť při různých expozicích a také analyzována po každé expozicí zvlášť, není to ale potom vhodný postup pro automatické zpracování. Metoda je vhodná v případě nižších koncentrací nanomateriálů a u materiálů, které by opticky nestínily.



Obr.1 Expozice 50 ms nastavená podle kontroly, grafen HK v rostoucích koncentracích



Obr. 2 Grafen HK 100 µg/ml při postupně se zvyšujících expozicích (stejné snímané pole) včetně jamky s kontrolou

Dlouhodobé sledování buněčné proliferace pomocí kumulovaného počtu populačních zdvojení (test cytotoxicity)

Teoretický základ metodiky

Kumulovaný počet populačních zdvojení (Population Doubling Level-PDL) označuje, kolikrát se populace buněk zdvojila 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 (Greenwood, S.K. 2004).

Podrobnější popis metodiky

PDL se počítá podle následujícího vzorce:

 $PDL_{(n)} = 3.32 (log C_f - log C_i) + PDL_{(n-1)}$

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 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 konfulence.

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 přídavkem 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 GP1 byly zakoupeny od firmy PlasmaChem GmbH (Berlin, Germany, Cat. No. PL-P-G750), grafenové nanočástice GP2 byly laskavě darovány institutem CRANN (Trinity College Dublin, Irsko). Zásobní roztok byl

připraven v koncentraci 250 µg/ml grafenových nanočástic v 0,02% vodném roztoku cholátu sodného, sonikován a skladován při pokojové teplotě (Svadlakova 2020).

• 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:

- V pondělí jsme nasadili buňky do 25 cm² kultivační lahve. Počáteční koncentrace byla 1 x 10⁵ buněk na lahev, v 10 ml kultivačního média.
- Ve středu jsme médium vyměnili za 10 ml čerstvého média v případě kontrolních vzorků, nebo za 10 ml kultivačního média obsahujícího 10 μg/ml GP1 nebo GP2. Všechny varianty jsme testovali v triplikátech.
- 3. Buňky jsme nechali proliferovat do příštího pondělí.
- 4. V pondělí, týden po nasazení, jsme buňky sklidili:
 - 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% CO₂) na 3 min.
 - c. Uvolněné buňky jsme opatrně resuspendovali ve 3 ml trypsin-neutralizačního roztoku přenesli do 50 ml centrifugační zkumavky.
 - d. Buňky jsme centrifugovali 5 min při 500 rpm, poté jsme slili trypsinneutralizační 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. Po 10 μl výsledné buněčné suspenze jsme napipetovali do každé poloviny počítací komůrky a spočítali počet buněk v 1 ml suspenze.
- 6. Spočítali jsme celkový počet buněk ve 3 ml suspenze a získali tak hodnotu Cf.
- 7. Stanovili jsme hodnotu PDL podle výše uvedeného vzorce.
- 8. Buněčnou suspenzi obsahující 1 x 10⁵ 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% CO₂).
- 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 nanočástic

Primární buněčné linie, jako normální fibroblasty, jsou geneticky stabilní a uchovávají si své vlastnosti po mnoho pasáží. 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 chronického experimentu. Navíc je možné monitorovat buňky až do stadia senescence a zkoumat vliv testovaných látek na její nástup a charakteristický buněčný fenotyp. Výhodou metody je jednoduchost, počítání koncentrace buněk v počítací komůrce je relativně ekonomický, a přitom velice přesný způsob monitorování buněčné proliferace. Nevýhodou je pracnost a časová náročnost. Komůrku lze nahradit automatickým počítačem buněk, je však třeba ověřit, zda poskytuje přesné výsledky i při nízkých koncentracích buněk. Nevýhodou metody je nutnost mít k dispozici velká množství testovaných nanomateriálů, což není vždy možné a může být ekonomicky náročné.

Je třeba také mít na paměti, že jak se proliferace buněk zpomaluje, zbývá stále méně buněk pro nasazení do dalších pasáží. Pokud by výzkumník měl v úmyslu podrobit buňky na konci experimentu například testům genové exprese a podobně, musí včas rozpěstovat buňky do paralelních vzorků, což dále zvyšuje nároky na množství testovaného nanomateriálu a časovou náročnost experimentů. Nanomateriály při chronickém ovlivnění však mohou vykazovat toxicitu i v koncentracích, které jsou zcela biokompatibilní při krátkodobých experimentech (např. námi zvolená koncentrace grafenových nanočástic 10 µg/ml nevykazovala u buněk HDFn v krátkodobých, 48hodinových testech metabolické aktivity žádnou toxicitu). Je proto jen vhodné zařadit také chronické *in vitro* testy do portfolia testů cytotoxicity nanomateriálů.

Souhrn nejzajímavějších výsledků

Grafenové nanočástice obou typů během šestitýdenní chronické expozice významně snížily proliferaci buněk stanovenou jako kumulativní počet populačních zdvojení (Obr. 1). Výsledky byly publikovány v práci Šestáková et al. (2022)

Poznámka: Směrodatné odchylky byly 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.



Obr. 1 Vývoj kumulativního počtu populačních zdvojení (PDL) během chronické expozice normálních kožních fibroblastů nanočásticím grafenu.

Test metabolické aktivity WST-1 (test cytotoxicity)

Teoretický základ metodiky

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

Podrobnější popis metodiky

Kultivace:

Buňky se kultivují v αMEM bez fenolové červeně s 10% FSB, 1% antibiotiky (penicilin, streptomycin), 10mM Hepes, 1mM pyruvát sodný a 2mM L-glutamin.

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 medium vymění za medium s nanomateriálem (NM). Vždy 100 µl/jamku.

Inkubace a NM dle potřeby 1 h–72 h

Zásobní roztok WST: Roche 1 644 807

- Přidejte 5 μl roztoku WST-1 do každé jamky. (Lze použít i druhou variantu, kdy po inkubaci s nanomateriálem je veškeré medium z jamek odsáto, ev. jamky 1x propláchnuty PBS bez iontů a nahrazeno novým mediem s WST-1 v poměru 1:20 – postup č. 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 % CO₂

Nejprve se vypočtěte rozdíl absorbancí v čase 1 h (ev. 2 h) a 0 h. Od naměřených absorbancí odečtěte blank, Naměřené hodnoty lze vyjádřit jako % kontroly.

Použitelnost metodiky pro testování nanočástic

Metoda je rychlá, reprodukovatelná. Je ale nutno zvážit, jakou variantu přídavku WST-1 provedete (přidání pouze 5 µl do jamky s testovaným NM nebo vyměníte celý obsah media v jamce) a s tím souvisí i složení media – s a bez FBS (fetální bovinní sérum) viz výsledky níže. U 2. postupu předpokládáme vyšší zátěž buněk v porovnání s 1. postupem, ale v některých případech je to vhodnější způsob provedení testu, protože je potřeba odstranit testovaný materiál, který může interferovat se samotným měřením absorbance.

Někteří vědci používají ke kultivaci medium bez FBS (z různých důvodů např. FBS, který obalí NM a pak vykazuje jiné biologické vlastnosti), u NM bychom pečlivě zvážili, zda je opravdu nutné medium bez FBS používat, neboť FBS je důležité pro kultivaci buněk a zároveň zlepšuje disperzi nanomateriálů v médiu. U NM jako je grafen dochází také ke zvyšování pozadí absorbance, které, pokud ho vhodně změříme, lze odečíst beze změny výsledného hodnocení NM viz níže.

Souhrn nejzajímavějších výsledků

Porovnávali jsme dvě provedení metody WST-1 lišící se ve způsobu přidání substrátu, a to buď přidání 5 µl roztoku WST-1 do každé jamky po kultivaci buněk s NM (1. postup), nebo odsátím media s NM z každé jamky a nahrazení novým s roztokem WST-1 v poměru 1:20 (2. postup). Testovali jsme TiO₂ (Plasmachem) v koncentracích 1, 10 a 100 µg/ml s buněčnou linií A549 (5 tis bb/ml) v mediu bez FBS. Inkubace buněčné linie s NM byla 4 a 24 h (Tab. 1). Na obr. 1 jsou zobrazeny výsledky rozdílu použití obou metod ve dvou inkubačních časech. Při použití 2. postupu dochází v mediu bez FBS ke zvýšení metabolické aktivity buněk exponovaných TiO₂. Z této skutečnosti lze usuzovat na zátěž buněk mediem bez FBS a zároveň výměnou media při provedení testu WST-1.

	4 h			24 h
	1. postup 2. postup		1. postup	2. postup
К	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

Tab.1 Hodnoty z grafu vyjádřeny v procentech kontroly – TiO₂



WST-1 24 h inkubace v mediu bez FBS



 TiO_2 [µg/ml]



Dále jsme porovnávali vliv media na výsledky testování vlivu NM na buněčnou linii. Testovali jsme TiO₂ (Plasmachem) v koncentracích 1, 10, 100 a 200 µg/ml s buněčnou linií A549 (5 tis. buněk/ml) v mediu s /bez FBS. Inkubace buněčné linie s NM byla 1, 4, 24 a 48 h. Na obr. 2 jsou zobrazeny výsledky rozdílu použití různých medií (rozdíl pouze v přídavku FBS) při použití jedné metody (2. postup). Na rozdíl od media bez FBS v mediu s FBS nedochází k významným změnám metabolické aktivity u testované buněčné linie exponované TiO₂ v porovnání s kontrolou. Účinek různého provedení testu WST-1 a způsobu kultivace je také publikován v odborném článku: Jana Báčová et al. (2022)





Z důvodu potřeby ověřit možnost ovlivnění pozadí při měření absorbance jsme testovali grafen GP1 (Plasmachem). Grafen byl inkubován pouze s roztokem WST-1 po metabolické aktivaci bez buněk po dobu 1 a 2 h v koncentracích (5, 15 a 30 µg/ml). Výsledky jsou shrnuty v tab. 2 a obr. 3.

Tab. 2 Hodnoty obrázku 3 vyjádřeny v procentech kontroly – GP1

	К	5 µg/ml	15 μg/m	30 µg/ml
1 h	100	100,6	104,6	110,6
1 h-	100	99,1	99,2	99,7
background				
2 h-	100	98,7	99,2	99,0
background				



Obr. 3 Interference grafenu s absorbancí u metody WST-1 v acelulární pokusu, kde jako pozadí jsou příslušné koncentrace grafenu v roztoku.

Literatura:

Šestáková, B.; Schröterová, L.; Bezrouk, A.; Čížková, D.; Elkalaf, M.; Havelek, R.; Rudolf, E.; Králová, V. The Effect of Chronic Exposure of Graphene Nanoplates on the Viability and Motility of A549 Cells. Nanomaterials 2022, 12, 2074. https://doi.org/10.3390/nano12122074

Jana Báčová et al.: Evaluating the Use of TiO₂ Nanoparticles for Toxicity Testing in Pulmonary A549 Cells. International Journal of Nanomedicine 2022

Svadlakova, T et al. Proinflammatory Effect of Carbon-Based Nanomaterials: In Vitro Study on Stimulation of Inflammasome NLRP3 via Destabilisation of Lysosomes. Nanomaterials (Basel, Switzerland), 2020, 10(3), 418. https://doi.org/10.3390/nano10030418

Schröterová, L., Šestáková, B, Rudolf, E., Bezrouk, A.; Čížková, D.; Švadláková, T. Hubatka, F. Králová, V. el al. Testování biokompatibility nanomateriálů-Grafen. XXX. Xenobiochemnické sympózium 15.-17.5.2019, Pezinok – sborník str. 40

Greenwood, S. K., Hill, R. B., Sun, J. T., Armstrong, M. J., Johnson, T. E., Gara, J. P., & Galloway, S. M. (2004). 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. Environmental and molecular mutagenesis, 43(1), 36–44. https://doi.org/10.1002/em.10207

Metodiky Ústavu klinické imunologie a alergologie

(odpovědnými osobami za níže uvedené metodiky jsou Ctirad Andrýs, Tereza Švadláková a Martina Koláčková)

Příprava suspenze nanomateriálů/nanočástic pro testování

imunotoxicity (ve spolupráci s VÚVeL Brno)

Před vlastním testováním biologických účinků musí být veškeré nanomateriály (NMs) a nanočástice (NPs) řádně charakterizovány a převedeny do takové suspenze, aby nedocházelo k nadmíře agregace a samotné suspenzní médium neovlivňovalo viabilitu a aktivační stav modelových buněk. Ideální je suspenze ve vodě, nebo biokompatibilním pufru, např. PBS. V případě hydrofobních NMs je nutné přistoupit ke stabilizaci různými detergenty (ideálně, které se neváží kovalentně, např. sodná sůl kyseliny cholové), případně proteiny. Je proto vhodné, aby příprava suspenze vycházela ze spolupráce s materiálovými fyziky a chemiky, kteří zajišťují i správnou fyzikálně-chemickou charakterizaci a hodnocení stability NMs a NPs v zásobních suspenzích. Detailní postup přípravy a charakterizace nemodifikovaných grafenových plátků (GPs) a karbonových nanotrubic (MWCNTs) lze najít v naší publikaci (Svadlakova et al. 2020).

Příklad:

<u>Ukázka úvodní optimalizace suspenze nemodifikovaných GPs</u> (Plasmachem) – úvodní měření, porovnání hodnot. Hodnocení stability suspenze probíhalo na základě hodnot hydrodynamického průměru (Z-average) a hodnot polydisperzního indexu (PdI) získaných na základě měření dynamického rozptylu světla (DLS) a dále hodnot Zeta-potenciálu (ζ). Výsledky Z-average byly porovnávány s transmisní elektronovou mikroskopií (hodnoty získané pomocí DLS v případě planárních částic bývají spíše orientační).

Grafenové plátky (Plasmachem):

Velikost (laterální dimenze): ≤ 2 µm

Tloušťka: 1–4 nm

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

- 1. Navážení, cca 200 μg /ml 0,25 % cholát sodný v destilované vodě
- 2. Sonikace 30 min, pulzy 1s on/ 1s off amplituda 75 %, tyčový sonikátor
- 3. Rozdělení do vialek, každá ředěna jiným solventem, měření DLS

Z-average						
0,25% cholát	186,5_PdI 0,203	-	-	25°C		
				Teplota		
Ředěno do:	0 h	20 h	96 h	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:

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

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

Okometricky pozorovatelné agregáty rychle klesající ke dnu, zejména následující den, proto vybráno 0,02 %

Měření ζ-potenciálu, porovnání různých solventů:

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

Suspenze GP, 250 μg/ml ve:	Z-average (nm)	ζ-potenciál (mV)
H2O bez cholátu	942,5	-31
0,25% chol, dále 5x ředěné	-	-30,4
0,25% chol, dále 3x centrifugace 20000g 5min, 5x ředěné	119,9	-27,3
5mM fosfátu	800,3	-31,9
5mM fosfátu, dále centrifugace 1000g 10 min, supernatant	486,6	-35,8
5mM fosfátu + 0,125 % cholátu, dále 10x ředěné fosfátem	166,6	-40,7
5mM fosfátu + 0,125 % cholátu, dále ředěné kys. pH 2,5	-	-5,49
5mM fosfátu + 0,02% Triton X 100, dále ředěno 10x fosfátem	320,2	-37,7
0,125% chol +0,1% BSA, dále centrifugace Air-fuge 3x 30 min, peleta	212,5	-33,3
0,02% chol, dále ředěno 2x čistým RPMI bez FBS	754,6	-30,3
0,02% chol, dále ředěno 2x plným RPMI bez FBS	1012	-23,8
ředěno 2x plným RPMI bez FBS ale s 0,1% BSA	768,1	-23,5
0,02% chol, dále ředěno 2x plným RPMI + 10 % FBS	226,3	-10,8

Suspenze grafenu pro následující testování buněk:

- 1. Příprava 250 µg GP na 1 ml 0,02% cholátu.
- 2. Sonikace, pulzy 1s on/ 1s off amplituda 65 %, tyčový sonikátor
- 3. Autoklávování, 121°C, 20 min (dle měření nemá vliv)
- 4. Naředění 1:1 s plným RPMI + 10% FBS
- 5. Měření

	Z-average	ζ-potenciál
Suspenze GP	(nm)	(mV)
v 0,02% cholátu, dále 2x ředěno H2O	175,5	-33,3
v 0,02% cholátu, dále ředěno 1:1 pln. RPMI + 10 % FBS	212,8	-9,35
po expozici (50 μg/ml)	196,5	-6,95

Testování biologické kontaminace

Hodnocení kontaminace zásobní suspenze nanomateriálů nebo nanočástic 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 např. lipopolysacharid (LPS), který patří mezi nejběžnější kontaminace výzkumných laboratoří. Jeho přítomnost prokazatelně ovlivňuje, jak pohlcování nanočástic např. makrofágy, tak výslednou imunitní odpověď. Logicky tak dochází ke zkreslení a chybnému vyhodnocení 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 např. oxidované karbonové NMs adsorbují přítomný zymogen, což vede k aktivaci koagulace i v nepřítomnosti LPS. Jiná alternativa navržena (Mukherjee et al. 2016) je založena na nepřímém průkazu LPS pomocí detekce TNF-α produkovaného primárními lidskými makrofágy v přítomnosti nebo nepřítomnosti polymyxinu B, inhibitoru LPS. Tento test je však omezen cytotoxickým potenciálem testovaných nanomateriálů. Podobně vhodnou 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), který je navázán na signální dráhu NF-κB, 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 se detekuje detekčním médiem, které v přítomnosti AP modrá. Výsledná absorbance je přímo úměrná hladině agonisty (LPS, peptidoglykanů, atd.)

Příklad:

Postup stanovení LPS v suspenzích nanomateriálů

- HEK-Blue[™]-4 (150 µl, Invivogen) se v bezfenolovém médiu (DMEM, <u>10 % FBS s nízkým obsahem endotoxinu</u>, 2 mM glutamin, ATB) nasadí do 96jamkové kultivační destičky (5×10⁴ buněk/jamka) a inkubují se 20-24 h při 37 °C a 5 % CO2 s 50 µl vzorků GP, MWCNTs, TiO2 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 média), buňky kultivované s ultra čistým lipopolysacharidem (LPS_{up}, 100 ng/ml) slouží jako kontroly.
- 2. Destička se stočí při 1000 g, 10 min a 20 μl supernatantů se přenese do nové 96jamkové destičky
- 3. K supernatantům se přidá 180 μl detekčního média a destička se nechá 30 min 3 h (průběžně kontrolujeme zbarvení) inkubovat při 37 °C a 5 % CO2.
- 4. Výsledná absorbance se měří na destičkovém readeru při vlnové délce 630 nm proti referenční vlnové délce 750 nm, která se odečítá

Podobně jako u LAL eseje je nutné kontrolovat možné interference, zároveň je nutné, aby dané NMs 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), kdy hranice detekce bývá nižší než u zmíněné LAL eseje. 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[™]-4 lze metodu i kvantifikovat pomocí koncentrační řady standardního LPS. Pomocí HEK-Blue[™]-4 a HEK-Blue[™]-2 (Invivogen) byla průběžně kontrolována sterilita všech dostupných suspenzí nanomateriálů. Pomocí buněk byla pozitivní odpověď nalezena pouze u SiO2 nanovláken, které byly na základě toho z testování imunotoxicity na monocytech a makrofázích vyřazeny.

Výsledek testování suspenzí NMs a NPs:

Hodnocení aktivace HEK-Blue™-4; Data jsou prezentována jako medián s 95 % CI; *** p <0,001; ** p <0,01 zdůrazňují statistickou významnost ve srovnání s neexponovanou kontrolou (DMEM).

Hodnocení imunotoxicity

Imunotoxicita představuje negativní (toxický) vliv daného faktoru nebo částice 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 patří cytokiny a zejména interleukiny (IL), signální molekuly (obvykle polypeptidy a proteiny) produkované imunokompetentními ale např. i epitelovými či endoteliálními buňkami.

Na základě stanovení jejich hladiny plazmě a séru, potažmo v supernatantech lze hodnotit prozánětlivý nebo protizánětlivý stav. Klíčovými buňkami ve zpracování a eliminace NMs a NPs jsou profesionální fagocyty, tedy monocyty, které cirkulují v krvi, a z nich diferencované makrofágy a tkáňové (rezidentní) makrofágy. Z toho důvodu je vhodné používat jako buněčný model právě tyto buňky, případně jejich varianty. Při použití nádorových linií je vhodné doplnit měření na více typech, nebo lépe na primárních buňkách.

ELISA

Enzymová imunosorbční analýza ELISA (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 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 ELISY je pak výsledná absorbance barevného produktu přímo úměrná koncentraci testovaného cytokinu.

Příklad:

<u>Postup stanovení hladiny IL-10 v supernatantu metodou sendvičové ELISY</u> (Quantikine, Biotechne) u primárních monocytů exponovaných karbonovým NMs a následně teplem usmrceným bakteriím – sledování modulačního účinku NMs na reaktivitu vůči bakteriím

- Sebrané supernatanty je nutné stočit při 300 g, 5 min, aby se odstranily buňky (v našem případě i nepohlcené 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 g, 10 min.
- Výsledné supernatanty lze rovnou použít nebo případně uschovat zamrazením při 80 °C (IL-10 lze ponechat i při 4 °C cca po dobu tří týdnů)

Následný postup vychází z protokolu výrobce:

- 3. Všechny reagencie včetně dodané 96jamkové destičky se dle pokynů nahřejí na pokojovou teplotu (21 °C) případně připraví dle pokynů.
- Do čistých polypropylenových vialek se připraví kalibrační řada standardu postupným (dvojkovým) ředěním. Poslední (8.) vialka obsahující pouze pufr/rozpouštědlo slouží jako standard o koncentraci 0.
- 5. Testované vzorky se předem pětkrát naředí pomocí ředícího pufru.
- Připravené standardy a testované ředěné vzorky se po 200 μl přenesou do přichystané 96jamkové destičky, která se zalepí přiloženou fólií a nechá se inkubovat 2 h v pokojové teplotě.
- Všechny jamky se odsají a třikrát promyjí (300 μl) promývacím pufrem pomocí promývačky, případně multikanálové pipety. Po posledním promytí se destička důkladně ale krátce vyklepe proti buničině (nesmí zcela vyschnout).
- 8. Do všech jamek se nepipetuje 200 μl konjugátu a destička zalepená novou fólií se nechá 1 h inkubovat.
- 9. Promytí jako v bodě 7.
- Do všech jamek se nepipetuje 200 μl substrátu a destička zalepená novou fólií se nechá inkubovat ve tmě, kdy se příležitostně kontroluje vznikající modré zbarvení, max 30 min.
- 11. Do všech jamek se přidá STOP roztok po 50 μl.
- 12. Výsledná absorbance se odečítá pomocí readru při 450 nm proti 570 nm jako referenční vlnové délce
- 13. Koncentrace se vypočítá pomocí hodnot kalibrační řady standardu

Ukázka výstupu měření:

Kalibrační křivka, vzorky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
А	2,405	2,45	2,436	2,643	0,81	0,888	1,022						Delta
В	1,251	1,571	1,516	1,792	0,503	0,473	0,487						Delta
С	0,617	2,105	2,39	2,499	0,828	0,576	0,778						Delta
D	0,327	1,208	1,411	1,122	0,282	0,281	0,395						Delta
E	0,173	2,133	2,126	2,22	0,025	0,024	0,025						Delta
F	0,094	1,628	1,202	1,427	0,026	0,024	0,026						Delta
G	0,05	1,853	1,896	1,904	0,027	0,027	0,028						Delta
Н	0,02	1,256	1,495	1,274	0,022	0,022	0,023						Delta

Kalibrační křivka-graf



ELISA je nejvíce využívanou metodou ke stanovení hladiny cytokinů v supernatantech. Výhodami jsou vysoká citlivost a kvantifikace výsledku, dále možnost automatizace a rozmanitý výběr v testovaných antigenech. Většina esejí nevyžaduje složitou přípravu vzorku, nicméně zejména sendvičová úprava může být časově náročná v kontextu navázání na předchozí experiment, což limituje použití čerstvých supernatantů. V závislosti na typu sledovaného analytu může během uchovávání v mrazáku docházet k degradaci vzorku, což snižuje kvalitu výsledku. Při velkém množství vzorků, např. u *in vitro* testování nanočástic na buněčných liniích, kdy se testuje několik koncentrací, případně typů NMs/NPs, dochází též k významné finanční zátěži. Problémem u testování imunotoxicity nanočástic může být i interference, pokud NMs/NPs zůstanou přítomné ve vzorku, nicméně vzhledem k několika promývacím krokům dochází během testu k jejich odstranění.

Na druhou stranu, některé NMs/NPs mohou měřené cytokiny vyvazovat, čímž v důsledku dochází k falešně negativnímu výsledku. Z tohoto důvodu je nutné provádět test interference, kdy se vzorek s definovanou koncentrací cytokinu (např. se standardem) nebo vzorek získaný z buněk předem stimulovaných definovaným stimulantem inkubuje s NMs/NPs a následně se vzorek porovnává s totožnými vzorky bez NMs/NPs. V případě prokázané interference je nutné přistoupit k alternativním metodám detekce proteinu a molekulárním metodám. V našem případě testování nemodifikovaných karbonových nanomateriálů k významné interferenci nedocházelo.

Buněčná esej

Alternativou hodnocení cytokinů je buněčná esej založená na reportérových buňkách, u nás konkrétně systému HEK-Blue™ (Invivogen). Princip spočívá ve vnesení genu pro sekretovanou alkalickou fosfatázu (AP), který je navázán na signální dráhu NF-κB, která je spojena s povrchovým receptorem specifickým pro konkrétní cytokin. Po navázání cytokinu dochází k aktivaci této dráhy a následně k produkci AP, která se detekuje v supernatantu pomocí detekčního média obsahujícího substrát a dochází k barevné změně. Výsledná absorbance je přímo úměrná koncentraci původního cytokinu.

Příklad:

<u>Postup stanovení hladiny IL-10 v supernatantu metodou HEK-Blue™ IL-10</u> u primárních monocytů exponovaných karbonovým nanomateriálům a následně teplem usmrceným bakteriím – hodnocení modulačního účinku

- Sterilně sebrané supernatanty je nutné stočit při 300 g, 5 min, aby se odstranily buňky (v našem případě i nepohlcené bakterie) a přenést do nových zkumavek/destičky. Pokud jsou stále přítomné nanočástice, které by mohly interferovat s metodou, je nutné je znovu stočit při 10 000 g, 10 min.
- Výsledné supernatanty lze rovnou použít nebo případně uschovat zamrazením při 80 °C (IL-10 lze ponechat i při 4 °C cca po dobu tří týdnů).

Následný 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 se po 20 μl přenesou (v triplikátech) do 96jamkové kultivační destičky.
- 4. Ke všem vzorkům se přidá 180 µl buněčné suspenze (0,28×10⁶ buněk/ml) v kultivačním bezfenolovém médiu (bez selekčních antibiotik) a buňky se nechají 20-24 h inkubovat při 37 °C a 5 % CO2.
- 5. 20 µl supernatantů ze vzorků a kontrol se přenese do nové 96jamkové destičky.
- 6. Přidá se 180 μ l detekčního média (předem připraveno smícháním 1 ml reagentu, 1 ml pufru s 98 ml destilované vody) a nechá se inkubovat 30 min 3 h.
- 7. Výsledná absorbance se měří na readeru při vlnové délce 630 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
А													630
В		1,387	1,359	1,42	1,426	1,432	1,404	0,6	0,654	0,643			630
С		0,961	0,892	1,07	1,019	0,878	1,024	0,311	0,293	0,325			630
D		1,172	1,21	1,311	1,193	1,21	1,241	0,596	0,354	0,473			630
E		0,956	1,017	0,959	1,096	1,1	1,121	0,233	0,262	0,256			630
F		0,137	0,159	0,149	0,158	0,144	0,17	0,15	0,146	0,112			630
G		0,105	0,147	0,106									630
Н													630

Ukázka výstupu měření:

Buněčné eseje jsou původní metodou testování cytokinů. Na rozdíl od ELISY nejsou kvantitativní a mívají nižší citlivost. Součástí je i udržování buněčných linií a práce s nimi. Naproti tomu je výhodou specifické detekování pouze bioaktivních forem cytokinů, což není u některých ELIS zajištěno, případně není jasně uvedeno, co se konkrétně testuje. V rámci testování vysokého počtu vzorků je buněčná esej ideální jako screeningová, a navíc významně levnější metoda pro porovnání různých koncentrací stimulantů, NMs/NPs. Vlastní nasazení supernatantů k buňkám trvá obvykle do 30 min. (sendvičová ELISA trvá obvykle 4–6 h), tudíž

je to také vhodná metoda pro testování rychle degradujících cytokinů a několika cytokinů zároveň.

Během našeho testování IL-1β docházelo k jeho snížení v zamrazovaných vzorcích, tudíž byla zvolena metoda detekce formou buněčné eseje, kdy se supernatanty ihned přenášely do nové destičky a nechaly inkubovat s reportérovými buňkami. Takto mohly být jednou osobou současně prováděny další analýzy, např. detekce LDH (viz viabilita) ve zbylých supernatantech. Podobně jako u ELISA metody je zde nutné kontrolovat interference, případně je nezbytné, aby testované supernatanty neobsahovaly cytotoxické koncentrace stimulantů, což se v případě nanočástic řeší jejich stočením na 10 000 g, viz postup.

Během naší práce byly využívány obě metodiky detekce cytokinů zejména pro ověřování výsledků u hodnocení modulace imunitních účinků jak GPs, karbonových nanotrubic (MWCNTs), tak nanočástic TiO2. Používání buněčných esejí nám pak umožnilo současný screening několika pro- i protizánětlivých cytokinů. Část výsledků a detailní postup lze najít v publikaci (Svadlakova et al. 2021).

Porovnání ELISA a buněčné eseje v rámci měření hladiny IL-10 při testování modulačních účinků nemodifikovaných karbonových NMs na prozánětlivou odpověď monocytů vůči bakteriím:

Produkce IL-10 u izolovaných monocytů stimulovaných GPs (60 μg/ml), MWCNTs (30 μg/ml) a bakteriemi HKEB, HKSA a HKPA (1×10⁷); Data jsou prezentována jako krabicový graf od minima do maxima se všemi body. Hodnoty ** p <0,01 a * p <0,05 značí statistickou významnost ve srovnání s odpovídající kontrolou (RPMI); ns – nesignifikantní.



ELISA:

Buněčná esej:



Hodnocení aktivace NLRP3

V rámci testování mediátorů zánětu u sledování imunotoxických účinků nanomateriálů se za nejvýznamnější cytokin považuje prozánětlivý cytokin IL-1β jakožto produkt aktivace intracelulárního makromolekulárního komplexu – inflamazomu. Konkrétně NLRP3 inflamazom je klíčovým zprostředkovatelem imunotoxicity NMs/NPs. Důvodem je jeho "univerzálnost" a široké spektrum možných aktivátorů, které mají charakter PAMPS/MAMPS, tedy vzory spojené s mikrobiální kontaminací, ale i DAMPs, vzory spojené s poškozením buněk. Hodnocení aktivace NLRP3 odhalí sterilní zánět, ke kterému často vlivem NMs/NPs dochází.

Nejjednodušším způsobem detekce aktivace NLRP3 je měření cytokinu IL-1β. 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. Alternativou jsou nádorové linie, které však nemusí stoprocentně odpovídat odpovědi nepozměněných buněk. V tomto případě jsou ideální geneticky modifikované (transfekované) linie specificky určené k hodnocení daného mechanismu. Během naší práce byly z těchto důvodů zvoleny modifikované lidské monocyty THP1-null a THP1-deff, které byly navrženy tak, aby byla specificky monitorována aktivita NLRP3. Práce s těmito liniemi je analogická s prací s klasickými THP-1 (bezfenolové RPMI1640, 10 % FBS, 2 nM glutamin, 10 mM HEPES) s výjimkou použití selekčních antibiotik v kultivačním médiu, které zajišťují požadovaný genotyp. Jako všechny imunitní buňky je vhodné, aby použité FBS bylo inaktivované a s certifikovaným nízkým obsahem endotoxinu, aby nedocházelo k nechtěným předaktivacím buněk a násobení reakcí. Postup hodnocení vychází z doporučení dodavatele buněk.

Příklad:

Postup stanovení kanonické aktivace NLRP3 po expozici karbonovým nanomateriálům

 THP1-null/deff (Invivogen) se v koncentraci 3,6×10⁵ buněk/jamka/200 μl nasadí do 96jamkové kultivační destičky

- Ke všem buňkám včetně negativní kontroly se přidá ultračisté LPS ve výsledné koncentraci 1 μg/ml a buňky se nechají 3 h inkubovat při 37 °C a 5 % CO2 ("priming" – nezbytný 1. signál předcházející kanonickou aktivaci, který ale k samotné aktivaci nevede).
- 3. Ze všech jamek se opatrně odsaje médium s LPS a přidá se 200 μl čerstvého média s různými koncentracemi nanomateriálů. K negativní kontrole se přidá pouze čerstvé médium. Jako pozitivní kontrola může sloužit ATP, krystaly kyseliny močové, nebo nanočástice SiO2. Buňky se nechají 24 h inkubovat při 37 °C a 5 % CO2.
- Supernatanty se dle potřeby stočí (viz zpracování supernatantů výše) a přenesou se po 50 µl do nové 96jamkové destičky, do které se přidá po 150 µl suspenze HEK-Blue™ IL-1β (0,33×10⁶ buněk/ml).
- 5. Další postup analogický se stanovením IL-10, viz výše. Při slabé odpovědi lze nechat buňky inkubovat 48 h.

Postup zahrnující využití modifikovaných THP1 buněk s následnou detekcí IL-1β pomocí buněčné eseje byl využit i v případě hodnocení TiO2 nanočástic. V průběhu hodnocení nebyla prokázána žádná interference testovaných nanomateriálů a nanočástic s esejemi. Problém by mohl nastat u částic, které jsou výrazně cytotoxické, kdy je nutné optimalizovat testovanou koncentraci, a dále v případě vyvazování, viz výše. Možnou nevýhodou této metody je vyšší pořizovací cena modifikovaných buněk, nicméně dané buňky lze namnožit a uchovávat téměř neomezeně v parách dusíku nebo kapalném dusíku, kdy při častém opakování testů se vstupní investice velice rychle navrátí. Je možné využívat i základní linii THP-1, nicméně je nutná větší optimalizace. Deficientní buňky lze nahradit použitím specifického inhibitoru MCC950. Samotná metoda pak není náročná na přístrojové vybavení, kdy je nutné vlastnit pouze destičkový spektrofotometr s monochromátorem, případňe s filtry pro dané vlnové délky.

Výsledek hodnocení kanonické aktivace NLRP3, detailní výsledky shrnující prozánětlivý potenciál karbonových nanomateriálů lze najít v publikaci (Svadlakova et al. 2020). THP1-null: Produkce IL-18 po expozici GP1, GP2 a MWCNTs; CH – cholát sodný; Data jsou prezentována jako podíl produkce IL-18 exponovaných buněk a neexponované kontroly (RPMI) a zobrazena jako průměr ± standardní odchylka; ** p <0,01 a *** p <0,001 zdůrazňují statistickou významnost ve srovnání s RPMI.



CNMs (µg/ml)

THP1-deff – ověření specifity pomocí deficientních buněk: Produkce IL-18 u THP1-defNLRP3 a THP1-defASC po expozici GP1, GP2 a MWCNTs. Data jsou prezentována jako podíl produkce IL-18 exponovaných buněk a neexponované kontroly (RPMI) a zobrazena jako průměr ± standardní odchylka



Zásadní význam hodnocení IL-1 β se potvrdil během porovnávání několika různě modifikovaných MWCNTs. Zatímco cytokiny neasociované s inflamazomem jako jsou IL-6 nebo TNF- α byly produkovány pouze v jednom případě, IL-1 β byl produkován vždy, tudíž pouze na základě IL-1 β byl potvrzen prozánětlivý efekt u všech typů MWCNTs. Z toho vyplývá,

že hladina IL-1β by měla být hodnocena vždy při testování imunotoxických účinků. Výsledky byly prezentovány formou plakátového sdělení na mezinárodní konferenci IUIS2019 v Číně. Abstrakt vyšel v konferenčním sborníku s ISBN (Svadlakova et al. 2019).

Hodnocení viability

Nezbytnou součástí sledování imunotoxicity je hodnocení viability buněk. Vedle sledování intracelulární distribuce je nutné sledovat, zda danou cytokinovou odpověď nedoprovází i zvýšená úmrtnost, zejména pyroptóza, která je nefyziologickou součástí aktivace NLRP3 a bývá součástí chronického zánětu.

LDH esej

Měření laktátdehydrogenázy (LDH) v supernatantu exponovaných buněk patří mezi klasické metody hodnocení cytotoxicity. LDH se za fyziologických podmínek nachází v cytoplazmě všech buněk a po poškození buněčné membrány se dostává do okolního média, kde může být detekována pomocí spřažené enzymatické reakce. LDH katalyzuje přeměnu laktátu na pyruvát pomocí redukce NAD+ na NADH. Následná oxidace NADH vede k redukci tetrazoliové soli na červený formazanový produkt, který lze měřit spektrofotometricky při 490 nm. Hladina formazanu (míra absorbance) je přímo úměrná množství uvolněného LDH do média, a tedy cytotoxicitě.

Příklad:

Postup měření LDH v supernatantu u primárních monocytů exponovaných karbonovým nanomateriálům

- Monocyty se v koncentraci 2×10⁵ buněk/jamka/100 μl média nasadí do 96jamkové kultivační destičky – koncentrace buněk závisí na buněčném modelu, kdy je vhodné předem udělat optimalizační pokus s lyzáty, viz postup výrobce.
- 2. K buňkám se přidá po 100 μl bezfenolového kultivačního média s požadovanými koncentracemi nanomateriálů (triplikáty). Ke dvěma dalším triplikátům se přidá pouze bezfenolové kultivační médium (negativní kontrola a později lyzát) a buňky se nechají inkubovat 24, 48 nebo 72 h při 37 °C a 5 % CO2.
- 45 min před koncem inkubace se do triplikátu pro lyzát přidá 20 µl lyzačního pufru (10× koncentrovaný, obvykle součástí kitu (CyQUANT[™], Invitrogen), případně lze buňky stočit na 15 000 g, 10 min, aby došlo k narušení bb membrán)
- 4. Sebrané supernatanty, je nutné stočit při 300 g, 5 min, aby se odstranily buňky a přenést do nových zkumavek. Pokud jsou stále přítomné nanočástice, které by mohly interferovat s metodou, je nutné je znovu stočit při 10 000 g, 10 min.
- 5. Výsledné supernatanty včetně lyzátů se po 50 μl přenesou do nové 96jamkové destičky, do třech volných jamek se napipetuje po 50 μl kultivační médium blank
- 6. K supernatantům, lyzátům a blanku se přidá 50 μl LDH mixu, předem připraveného dle pokynů výrobce a nechá se 30 min inkubovat v pokojové teplotě ve tmě.
- Do všech jamek se přidá po 50 μl STOP roztok a destička se změří pomocí readeru při 490 nm proti 680 nm jako referenční vlnové délce
- 8. % cytotoxicity se vypočítají z hodnot absorbance po odečtení blanku (A₄₉₀ A₆₈₀) pomocí následující rovnice

$$\% cytotoxicity = \frac{(test. vzorek - negativní kontrola)}{(lyzát - negativní kontrola)} \times 100$$

LDH esej je poměrně často využívanou metodou pro stanovení míry cytotoxicity vyvolané zejména karbonovými NMs. Výhodou je možné "párování" s detekcí IL-1β, 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 nanomateriálů, představuje jednu z mála robustních cytotoxických metod, při které nedochází k interferencím. Nicméně je nutné předem NMs odstranit, jelikož mohou vyvazovat formazan a bránit tak barevné změně. Z toho důvodu byl jako jeden z klasických cytotoxických testů vyřazen test MTT. U WST-1 byly výsledky variabilní v závislosti na použitých buňkách. Nevýhodou LDH eseje je nízká citlivost, kdy nedochází k odhalení metabolických změn ani prvních fází apoptózy.

Naopak výhodou je možnost zakoupení předpřipraveného kitu, kdy vlastní postup je velmi jednoduchý a časově nenáročný. LDH esej byla využívána v testování všech buněčných modelů a všech dostupných NMs a NPs (GPs, MWCNTs, TiO2, SiO2). Esej byla využita i pro stanovení pyroptózy, kdy její spolehlivost byla ověřena pomocí reportérových buněk THP1-HMGB1-Lucia™ (Invivogen). V rámci testované cytotoxicity TiO2 byla metoda doplněna hodnocením WST-1, viz cytotoxicita). Obě metodiky prokázaly mírnou cytotoxicitu pouze u nejvyšších koncentrací (u monocytů a makrofágů)



24 h

Výsledek hodnocení cytotoxicity nemodifikovaných grafenových plátků (GPs) a karbonových nanotrubic (MWCNTs), detailní výsledky shrnující cytotoxický potenciál karbonových nanomateriálů lze najít v publikaci (Svadlakova et al. 2020).

Viabilita primárních monocytů hodnocená jako %únik LDH po 24 h expozice GP1, GP2 a MWCNTs; CH – cholát sodný; Data jsou zobrazena jako průměr ± standardní odchylka; *** p <0,001 zdůrazňuje statistickou významnost ve srovnání s neexponovanou kontrolou (RPMI).

Literatura

Mukherjee, S. P., N. Lozano, M. Kucki, A. E. Del Rio-Castillo, L. Newman, E. Vázquez, K. Kostarelos, P. Wick, and B. Fadeel. 2016. 'Detection of Endotoxin Contamination of Graphene Based Materials Using the TNF-α Expression Test and Guidelines for Endotoxin-Free Graphene Oxide Production', *PLoS One*, 11: e0166816

Mukherjee, S. P., N. Lozano, M. Kucki, A. E. Del Rio-Castillo, L. Newman, E. Vázquez, K. Kostarelos, P. Wick, and B. Fadeel. 2016. 'Detection of Endotoxin Contamination of Graphene Based Materials Using the TNF-α Expression Test and Guidelines for Endotoxin-Free Graphene Oxide Production', *PLoS One*, 11: e0166816

Svadlakova, T., F. Hubatka, J. Masek, P. Kulich, M. Ledvina, A. Malkova, Z. Fiala, L. Borska, and J. Turanek. 2019. 'Activation of NLRP3 inflammasome as a key indicator of carbon nanotubes proinflammatory potential', *European Journal of Immunology*, 49: 601-01.

Svadlakova, Tereza, Frantisek Hubatka, Pavlina Turanek Knotigova, Pavel Kulich, Josef Masek, Jan Kotoucek, Jan Macak, Martin Motola, Martin Kalbac, Martina Kolackova, Radka Vankova, Petra Vicherkova, Andrea Malkova, Pavlina Simeckova, Yuri Volkov, Adriele Prina-Mello, Irena Kratochvilova, Zdenek Fiala, Milan Raska, Jan Krejsek, and Jaroslav Turanek. 2020. 'Proinflammatory Effect of Carbon-Based Nanomaterials: In Vitro Study on Stimulation of Inflammasome NLRP3 via Destabilisation of Lysosomes', *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 10: 418.

Svadlakova, Tereza, Martina Kolackova, Radka Vankova, Rumeysa Karakale, Andrea Malkova, Pavel Kulich, Frantisek Hubatka, Pavlina Turanek-Knotigova, Irena Kratochvilova, Milan Raska, Jan Krejsek, and Jaroslav Turanek. 2021. 'Carbon-Based Nanomaterials Increase Reactivity of Primary Monocytes towards Various Bacteria and Modulate Their Differentiation into Macrophages', *Nanomaterials*, 11: 2510.

Metodiky Ústavu preventivního lékařství

(odpovědnými osobami za níže uvedené metodiky jsou Andrea Málková, Jindra Šmejkalová a Martina Zemanová)

Mikronukleus test (test genotoxicity a cytotoxicity)

Teoretický základ metodiky

Mikronukleus test s blokací cytokineze (Cytokinesis Block Micronucleus Test; CBMN) pomocí Cytochalasinu B představuje jednu z nejrobustnějších, levných, rychlých a senzitivních metod pro hodnocení cytotoxického či cytostatického a genotoxického potenciálu chemických látek i NPs v podmínkách *in vitro* i *in vivo* či při expozici osob v rámci biomonitoringu (Sabharwal et al. 2015, Ruiz-Ruiz et al. 2020).

Metoda je založena na detekci až devíti biomarkerů cytotoxického a genotoxického účinku testovaného materiálu v cytoplasmě interfazických buněk. V případě hodnocení cytotoxického potenciálu se konkrétně jedná o cytokinesis-block proliferation index (CBPI), replikační index (RI), index dělení jader (nuclear division index; NDI), a s nimi asociované procento cytostázy (% cytostasis), dále pak 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 (Fenech 2007).

Biomarkery používané k hodnocení cytotoxického potenciálu odrážejí počet jaderných dělení (a tím možných buněčných dělení) realizovaných po přidání Cytochalasinu B, který blokuje dělení buňky, nikoli však jádra. Například přítomnost BNC značí proběhlé jedno jaderné (buněčné) dělení a přítomnost tří- či čtyřjaderné buňky proběhlá dvě jaderná (buněčná) dělení. Porovnáním počtu BNC, tří- a čtyřjaderných buněk mezi exponovanou a kontrolní buněčnou populací umožňuje určit cytostatický potenciál testované NP.

Počet MN v BNC umožňuje hodnocení jak poškození DNA ve smyslu indukce chromozomových zlomů (klastogenního potenciálu), tak narušení migrace chromozomů během dělení (aneugenního potenciálu) případně i epigenetické mechanismy narušující správné dělení buněk, jako je hypomethylace opakujících se sekvencí DNA v pericentromerické oblasti vedoucí k nesprávnému napojení dělícího vřeténka a další. Počet NPB v BNC odráží především indukci chromozomových zlomů, tedy zejména klastogenní potenciál testované NP, ale mohou indikovat i například poruchy v oblasti telomer (Fenech et al. 2011, Mateuca et al. 2012). Počet NBUD v BNC může odrážet změny osmolarity v buňce, poruchu syntézy jaderné membrány (Utani et al. 2011) či aktivní proces eliminace nadpočetného jaderného materiálu (Fenech et al. 2011).

Podrobnější popis metodiky

Expoziční scénář vychází z doporučení OECD (2016). CBMN je prováděn podle metody popsané Fenechem (Fenech 2007) s drobnými modifikacemi.
Buněčná linie (v našem případě THP-1) je v objemu 2,5 ml a koncentraci buněk 2 x 10⁵ buněk/ml nasazena do 6jamkové destičky a exponována zvolené koncentraci NPs (k dosažení je smícháno 1,25 ml buněčné kultury o dvounásobné koncentraci (tedy 4 x 10⁵ buněk/ml) a 1,25 ml suspenze NPs s rovněž dvounásobnou koncentrací, než je konečná testovaná koncentrace NPs). 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 NPs je zvolena na 1,5 až 2násobek délky buněčného cyklu, aby byl zajištěn i kontakt NPs s jaderným obsahem a mitotickým aparátem buňky během dělení. Dobu expozice je tedy nutné vždy upravit dle použité linie. V našem případě THP-1 buněčné linie je doba expozice 40 h.

Kultivace buněk probíhá v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% koncentraci CO₂. Po skončení expozice jsou buňky stočeny na 300 x g po dobu 5 min a celkově dvakrát opláchnuty PBS za sterilních podmínek. Médium je vyměněno za čerstvé, je přidán Cytochalasin B v konečné koncentraci 5 µg/ml do všech kultur a kultivace pokračuje po dobu potřebnou k přítomnosti alespoň 60 % BNC ze všech buněk (v případě THP-1 po dobu dalších 30 h). Následně jsou kultury přemístěny do konických zkumavek, centrifugovány po dobu 8 min při 200 x g a fixovány v prvním kroku 8 ml roztoku methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 3:1 s přídavkem 225 µL 36–38% formaldehydu a v dalších dvou krocích v 8 ml roztoku methanol a ledové kyseliny octové v poměru 3:1 pro každý vzorek (při přípravě těsně před zpracováním je vhodné jeho uchování v lednici). Mezi každým fixačním krokem probíhá centrifugace po dobu 8 min při 200 x g. Po opětovné centrifugaci (8 min, 200 x g) je odstraněn téměř všechen supernatant 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 schnout přes noc při pokojové teplotě. Fixaci vzorků je vhodné provádět v digestoři vzhledem k dráždivým a toxickým účinkům použitých roztoků a s použitím základních osobních ochranných pracovních prostředků (pracovní oděv, rukavice, ochranné brýle). Následující den jsou vzorky obarveny 5% Giemsa-Romanowski roztokem ve vodě po dobu 10 min, opláchnuty pod tekoucí vodou a na závěr v demineralizované vodě a po uschnutí uloženy do boxu na mikroskopické preparáty (OOPP je vhodné při barvení doplnit o gumovou zástěru). Další skladování je možné v boxech při pokojové teplotě.

Podložní skla jsou předem myta speciálním způsobem. Podložní skla jsou po dobu minimálně 24 h ponořena do chromsírové směsi v kádince, následně přemístěna do kbelíku s kohoutkovou vodou, kde jsou třikrát propláchnuta a ponechána minimálně 2 h pod tekoucí vodou. Následně jsou podložní skla opláchnuta třikrát v aqua demineralisata a ponechána v čisté aqua demineralisata do druhého dne, kdy jsou z vody vyjmuta, vyleštěna látkou nepouštějící vlákna, uložena do boxu na mikroskopické preparáty a uchována v mrazničce do použití.

Analýza vzorků je prováděna pomocí světelného mikroskopu při 400násobném zvětšení. V případě hodnocení cytostatického potenciálu je hodnoceno nejméně 500 buněk. Při hodnocení genotoxického potenciál je analyzováno 1 000 BNC. K počítání BNC je použit ruční čítač.

Při hodnocení **cytostatického potenciálu** jsou využity počty mononukleárních (MONOC), binukleárních (BNC), trinukleárních (TRINC) a tetranukleárních (TETRC) buněk a následně vypočteny parametry dle následujících vzorců:

$$CBPI = \frac{nMONOC + 2 * nBNC + 3 * (nTRINC + nTETRC)}{(celkový počet buněk)}$$
$$RI = \frac{\left(\frac{nBNC + 2 * (nTRINC + nTETRC)}{(celkový počet buněk)}\right)T}{\left(\frac{nBNC + 2 * (nTRINC + nTETRC)}{(celkový počet buněk)}\right)K}$$
$$NDI = \frac{(nMONOC + 2 * nBNC + 3 * nTRINC + 4 * nTETRC)}{(celkový počet buněk)}$$

T se vztahuje ke kulturám exponované testované NP a K se vztahuje ke kontrolní kultuře bez expozice (kultura pouze v kultivačním médiu).

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

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

K hodnocení genotoxického potenciálu jsou použita skórovací kritéria dle Fenech (2007) mírně modifikována dle AHEM (2003).

BNC, vzniklé v důsledku cytokinetického bloku po aplikaci Cytochalasinu B, vhodné pro analýzu přítomnosti MN, NBUD a NPB musí splňovat následující kritéria:

- Obě jádra v BNC mají intaktní jadernou membránu a jsou umístěna v cytoplasmě stejné buňky ohraničené buněčnou membránou.
- Obě jádra ve BNC mají přibližně stejnou velikost, strukturu a barvitelnost.
- Jádra mohou být spojena chromatinovým můstkem, který ovšem nesmí být širší než 1/4 průměru jádra.
- Obě jádra se nedotýkají. Při doteku nelze hodnotit přítomnost NPB.
- Cytoplasmatická membrána BNC je intaktní a buňka je jasně odlišitelná od sousedních buněk.

MN mají shodnou morfologii s hlavními jádry, ale jsou menší než hlavní jádra, a musí splňovat následující kritéria:

- Průměr MN se pohybuje mezi 1/3 až 1/16 průměru jednoho hlavního jádra, což odpovídá 1/9 až 1/256 plochy jednoho hlavního jádra BNC.
- MN nejsou refrakterní a mohou být, proto odlišena od artefaktů jako jsou partikule barviva či NPs.
- MN nejsou spojena s hlavním jádrem.
- MN se mohou dotýkat, ale nesmí se překrývat s hlavními jádry. Hranice MN musí být jasně odlišitelná od hranice hlavních jader.

- MN mají obvykle stejnou barvitelnost jako hlavní jádro, ale občas mohou být více i méně barvitelná.
- V jedné BNC může být maximálně šest MN

NPB je nepřerušovaná struktura obsahující DNA, která spojuje hlavní jádra ve BNC. Musí splňovat následující kritéria:

- Šířka NPB nepřesahuje 1/4 průměru jader.
- NPB má obvykle stejnou barvitelnost jako jádra.
- Vzácně se mohou vyskytovat dva a více NPB v jedné BNC.
- V BNC s NPB se může vyskytovat jedno nebo více MN.
- Ve BNC s jedním nebo více NPB se nemusí vyskytovat žádné MN.

NBUD musí splňovat následující kritéria:

- NBUD vypadá obdobně jako MN, ale je spojen s jedním z hlavních jader pomocí můstku, který je užší, než je průměr NBUD až velmi jemný v závislosti na stádiu procesu extruze (pučení).
- NBD má obvykle stejnou barvitelnost jako MN.
- Příležitostně se může zdát, že je NBUD umístěn ve vakuole přiléhající k hlavnímu jádru.

Doporučuje se testovat nejméně tři koncentrace testované NP, přičemž cytotoxicita (cytostatický potenciál) nejvyšší použité koncentrace by měla být do 55±5 %.

Všechny testované koncentrace a pozitivní kontroly by měly být realizovány minimálně v duplikátu a negativní kontrola v tetraplikátu v průběhu jednoho experimentu. V případě negativního výsledku (NP nevykazuje cytostatický ani genotoxický potenciál) jsou nutná minimálně dvě opakování pokusu. Při pozitivním výsledku (NP vykazuje cytostatická a/nebo genotoxický potenciál) jsou nutná minimálně tři opakování pokusu.

Použitelnost metodiky pro testovány nanočástic

Výhodou CBMN (ve srovnání s jinými testy detekujícími poškození DNA) je: (1) CBMN umožňuje hodnotit jakoukoli populaci buněk bez ohledu na karyotyp, (2) konečný bod je jednoduše identifikovatelný (dvoujaderná buňka), což poskytuje poměrně přesná data, (3) odpověď může být zjišťována po delší době, (4) je možné detekovat i látky, které poškozují mikrotubuly dělícího vřeténka (aneugenní látky) a (5) bazální frekvence MN je obvykle stabilní (Hayashi 2016).

Vlastní provedení expozice 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 NPs a MN.

Mezi nevýhody testu patří výskyt pseudo-mikrojader (Hayashi 2016), při použití Cytochalasinu B ovlivnění uptake NPs buňkou vlivem inhibice aktinu(Gonzalez et al. 2011), záměna klastru NPs za MN, nutnost použít pouze dělící se buňky a náročnost na laboratorní čas a lidskou práci při manuální analýze. Riziko ovlivnění uptake lze minimalizovat přidáním Cytochalasinu B až po ukončení expozice buněk NPs *in vitro* (protokol "delayed co-treatment" či "post-treatment")(Gonzalez et al. 2011).

Při dodržení tohoto postupu ("delay co-treatment" či "post-treatment") jsme nezaznamenali žádnou interakci s použitými NPs a ani nebyla interakce dosud popsána v literatuře. Rizikové z hlediska výpovědní hodnoty může být zejména kombinace fluorescenčního barvení s automatickou analýzou, kdy je riziko zhášení fluorescence popsané u některých NPs a záměna shluku NPs za MN.

Souhrn nejzajímavějších výsledků

Při testování dvou typů grafenových plátků (GP 1 a GP 2) ve třech koncentracích (60; 30 a 5 μg/ml) na THP-1 buněčné linii, době expozice 40 h, jsme při hodnocení pomocí CBMN nezaznamenali významný cytostatický potenciál ani jednoho z nich (Obr. 1). Ve všech případech se parametry cytostatického potenciálu pohybovaly do 20 % negativní kontroly, což však není považováno za významný cytotoxický efekt (Burgum et al. 2021). V žádném parametru pokles nedosáhl statistické významnosti. Detaily v Malkova et al. (2021).

Přesto měření cytostatického potenciálu se zdá být citlivější než klasické metody hodnocení cytotoxického efektu NPs založené na detekci poškození buněčné membrány (LDH, trypanová modř a další) či na metabolické aktivitě buněk (WST-1, MTT a další). V případě detekce cytostatického (antiproliferačního) potenciálu jsou buňky živé, mají intaktní buněčnou membránu a jsou metabolicky aktivní, avšak neschopné 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 xenogenních NPs, zejména pokud nejsou biodegradabilní, může narušit normální mitotický proces. Při stejném testování jsme zaznamenali na dávce závislý nárůst poškození DNA, zejména nárůst počtu BNC s MN, NBUD i NPB, který již dosahoval statistické významnosti (Obr. 2). Ukázky hodnocených parametrů lze nalézt na Obrázku 3. Detaily v Malkova et al. (2021).

Bazální poškození DNA buněčné linie vhodné pro testování genotoxického potenciálu by se mělo pohybovat do 2 % (Burgum et al. 2021). 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 NPs.

Nejnižší koncentrace s pozorovaným genotoxickým potenciálem (the lowest observed genotoxic effect level; LOGEL) byla pro GP 1 nad 5 μg/ml a pro GP 2 30 μg/ml.



Obr. 1 zobrazuje výsledky hodnocených parametrů cytostatického potenciálu dvou typů grafenových plátků (GP 1 a GP 2) po 40 h expozice THP-1 buněčné linie třem koncentracím (5– 60 µg/ml) pomocí CBMN. Hodnocení **a**) Cytokinesis-Block Proliferation Index (CBPI); **b**) Index dělení jader (nuclear division index; NDI); **c**) Replikační index (RI) a **d**) Odhad cytostázy (% cytostasis). Data jsou prezentována krabicovými grafy s mediánem a kvartilovým rozpětím či sloupcovými grafy s průměrem ± standardní odchylka. CH – cholát sodný (v koncentraci odpovídající v 60 µg/ml GP); H₂O (v koncentraci odpovídající v 60 µg/ml GP); AraC 5 či 20 – Cytosin arabinosid (v koncentraci 5 či 20 ng/ml)

V případě námi použitých GP předpokládáme, že možným mechanismem poškození DNA je přímá interakce GP s jaderným materiálem odkrytým během buněčného dělení, narušení jaderného dělení vlivem epigenetických mechanismů či vliv na cytoskelet buňky a mitotický aparát. Všechny tyto interakce mohou být spojeny s nárůstem počtu BNC s MN. Interakce s jaderným materiálem či cytoskeletem buňky může vést ke zvýšení počtu BNC s NBUD. Interakce s jaderným materiálem přispívá k nárustu počtu BNC s NPB.

Nesignifikantně vyšší počty sledovaných genotoxických parametrů byly zaznamenány v případě menšího GP 1. Pro některé NPs se tedy může objevovat nejen dávkově ale i velikostně podmíněná genotoxicita.



Obr. 2 zobrazuje výsledky hodnocených parametrů genotoxického potenciálu dvou typů grafenových plátků (GP 1 a GP 2) po 40 h expozice THP-1 buněčné linie třem koncentracím (5–60 µg/ml) pomocí CBMN. Hodnocení počtu **a**) Binukleárních buněk (BNC) s mikrojádrem (MN); **b**) BNC s jaderným pupenem (NBUD) a **c**) BNC s nukleoplasmatickým můstkem (NPB). Data jsou prezentována krabicovými grafy s mediánem a kvartilovým rozpětím. CH – cholát sodný (v koncentraci odpovídající v 60 µg/ml GP); H₂O (v koncentraci odpovídající v 60 µg/mL GP); AraC 5 či 20 – Cytosin arabinosid (v koncentraci 5 či 20 ng/ml)

Rovněž jsme pozorovali, že jádra bez cytoplasmy jsou častěji obklopena shluky GP než jádra s cytoplasmou (Obr. 3c a 3d). Je otázkou, zda tyto shluky GP kolem jaderné membrány jsou příčinou či následkem ztráty cytoplasmy.



Obr. 3 ukazuje příklady hodnocených parametrů poškození DNA. **a**) Binukleární buňka (BNC) s mikrojádrem (plná šipka); **b**) BNC s jaderným pupenem spojeným s hlavním jádrem tenkou stopkou (plná šipka); **c**) BNC s nukleoplasmatickým můstkem (plná šipka) a malými agregáty GP v cytoplasmě (na buněčném povrchu; prázdné šipky); **d**) Jádro bez cytoplasmy během CBMN obklopené shluky GP (prázdné šipky)

Kometový test (test genotoxicity)

Teoretický základ metodiky

Kometový test (Comet assay, CA, single cell gel electrophoresis) je metoda používaná k detekci zlomů DNA v jádrech(OECD 2016). Jedná se o všestranně využitelnou, relativně jednoduchou a citlivou metodu, která je v závislosti na variantě schopná detekovat jedno- i dvouřetězcové zlomy DNA, alkali labilní místa (apurinová/apyrimidinová místa) či inkompletní reparaci DNA, ale i oxidované purinové či pyrimidinové báze, cross-link vazby či apoptické buňky(Olive and Banath 2006, OECD 2016).

Během CA jsou buňky umístěny v agarózovém gelu. Po lýze buněčné a jaderné membrány v solném roztoku dochází vlivem elektroforézy k vycestování fragmentů DNA z jádra, přesněji řečeno z nukleoidu, ("hlavy") do "ohonu", čímž po vizualizaci vhodným barvivem vzniká typický obraz komety, který celé metodě dal své jméno. Čím více je DNA fragmentovaná, tím je "ohon" větší a delší (Dusinska and Collins 2008, OECD 2016). Fragmentovaná DNA díky svému negativnímu náboji putuje směrem k anodě (AHEM 2003). V závislosti na pH elektroforetického roztoku dochází při nižším ("neutrálním") pH k detekci pouze dvouřetězcových zlomů bez zaznamenání jednořetězcových zlomů DNA, zatímco při vyšším pH ("alkalickém") jsou detekovány zlomy jednořetězcové. Při použití enzymů endonukleáz lze detekovat poškozené báze(Olive and Banath 2006).

Jednořetězcové zlomy se objevují asi 25krát častěji než zlomy dvouřetezcové (Osipov et al. 2014), ale změny chromozomů vznikají na podkladě dvouřetězcových zlomů(Olive and Banath 2006), které jsou navíc reparovány více než 6-krát pomaleji než zlomy jednořetězcové (Rapp and Greulich 2004). Jednořetězcové zlomy a alkali labilní místa perzistují pouze několik hodin(Faust et al. 2004). CA tedy umožňuje detekovat menší poškození DNA než CBMN, ale toto poškození může být velmi rychle reparováno a být pro buňku bez následků a nemusí být tedy přeneseno do dceřiných buněk, stejně tak ale při neúspěšné reparaci může vést ke vzniku permanentní mutace či i smrti buňky.

Podrobnější popis metodiky

Expozice buněk vybraným NPs proběhla identicky jako v případě CBMN. Rovněž byly voleny tři koncentrace NPs bez významného cytotoxického účinku. Pro každou testovanou koncentraci a pozitivní kontrolu byly kultury nasazeny v duplikátu, pro negativní kontrolu v tetraplikátu. Celkem byla provedena tři opakování pokusu.

Příprava podložních skel zahrnuje jejich vyvaření po dobu 30 min ve směsi peroxidu vodíku a vody (1:10), po oschnutí ve svislé pozici po dobu nejméně 3 h ponoření do podkladové agarózy (1% roztok standardní agarózy v tridestilované vodě) o teplotě 95 °C na asi 10 vteřin, otření přebytku agarózy ze spodní strany skla, uložení na vodorovnou podložku, zaschnutí a dosušení při 60 °C po dobu 60 min. Po zchladnutí (nejlépe druhý den od dosušení) skla rozložíme na chladící 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 boxu na mikroskopické preparáty v lednici po dobu maximálně jeden měsíc.

Ke zpracování vzorků je potřeba připravit řada roztoků. Jedná se o PBS pufr skládající se z 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH₂PO₄ a 2,898 g Na₂HPO₄.12H₂O. 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, pH se 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 za neustálého míchání. Elektroforetický roztok se skládá z 24 g NaOH a 4 ml 0,5 M EDTA doplnit do 2000 ml didestilovanou vodou. Neutralizační roztok se připraví z 48,456 g Tris a vody. Po úpravě pH na 7,5 se doplní do 1000 ml vodou. Barvící 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 tridestilovaná voda a výsledný roztok se uchovává v lednici.

Po skončení expozice v délce trvání 1,5 až 2 buněčné cykly jsou buňky centrifugovány (300 x g, 5 min), spočítány pomocí Bürkerovy komůrky, naředěny na koncentraci 8 x 10⁵ buněk/ml a 35 µl této buněčné suspenze je smícháno s 85 µl agarózy s nízkou teplotou tání (1% roztok agarózy v PBS) o teplotě 38 °C a následně je aplikováno 85 µl této směsi na předem připravená podložní skla potažená agarózami, položená na vodorovnou chladící podložku a ihned přiklopeno krycím sklíčkem, krycí skla 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 barvících kyvet typ Hellendahl, do kterých nalijeme 100 ml lyzačního roztoku s 1 ml Tritonu X-100 přidaným těsně před nalitím do kyvet, a necháme 60 min lyzovat v lednici. Po dokončení lýzy roztok vylijeme, podložní skla s buněčnou suspenzí v agaróze přemístíme do elektroforetického tanku umístěného v lednici a naplněného chlazeným elektroforetickým roztokem (roztok má pH kolem 13, nutné pracovat v rukavicích, sklíčka na okraji lze přimáčknout skleněnou tyčinkou, aby neplavala) a necháme po dobu 40 min rozplétat DNA. Po skončení rozplétání DNA probíhá elektroforéza (25 V, 300 mA, 30 min).

Po skončení elektroforézy sklíčka vyjmeme z elektroforetického tanku, umístíme do kyvet typ Hellendahl, nalijeme 100 ml chlazeného neutralizačního roztoku a necháme po dobu 5 min neutralizovat při pokojové teplotě. Neutralizační krok opakujeme třikrát (3x 5 min). Následně skla opláchneme v tridestilované vodě po dobu 5 min při pokojové teplotě, skla rozložíme na filtrační papír a necháme uschnout při pokojové teplotě (nejlépe do druhého dne). Analýza probíhá po rehydrataci skel v tridestilované vodě v kyvetě typ Hellendahl po dobu 60 min, aplikaci 20 µl barvícího roztoku ethidium bromidu a přikrytí krycím sklíčkem pomocí fluorescenčního mikroskopu s CCD kamerou při 200násobném zvětšení s použitím zeleného excitačního filtru (excitace 510–550 nm a emise 590 nm) a softwaru MetaSystems CometImager.

Výsledky analýzy jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota parametru procenta DNA v ohonu (% tail DNA; %tDNA) z 50 hodnocených komet pomocí softwaru pro každý vzorek. Tento parametr udává, kolik procent DNA vycestovalo z "hlavy" do "ohonu". Je považováno za nejvíce obecně užitečný parametr pro kvantitativní hodnocení poškození (nabývá hodnot 0-100 %) a je nejméně variabilní v různých studiích a rovněž lineárně narůstá s dávkou ionizujícího záření (v intervalu 0 až 10 Gy). Z těchto všech důvodů je %tDNA považováno za preferovaný parametr hodnocení rozsahu poškození DNA pomocí CA (Møller 2006, Collins et al. 2014).

Použitelnost metodiky pro testování nanočástic

Poškození DNA lze pomocí CA detekovat v suspenzi kvasnic, protozoálních, rostlinných i živočišných buněk (bezobratlí i obratlovci) (Olive and Banath 2006), a to jak dělících se tak i nedělících se buněk (Dvořák and Matejovičová 2008). Z toho plyne velká univerzálnost a možnost testovat účinky NPs na teoreticky jakoukoli tkáň či organismus. Jak bylo zmíněno v úvodu, metoda je velmi citlivá na detekci méně závažného poškození DNA jako jsou jednořetězcové zlomy DNA, alkali labilní místa (apurinová/apyrimidinová místa), ale i oxidované purinové či pyrimidinové báze a cross-link vazby a další (Olive and Banath 2006,

OECD 2016). Tyto změny indukované testovanými NPs mohou být v průběhu zpracování vzorků opraveny, a proto je potřeba vzorky během zpracování udržovat za snížené teploty.

Nejvhodnější je vyjádření výsledku analýzy CA jako medián či aritmetický průměr vybraného parametru pro celý vzorek, který by měl být hodnocen v duplikátu (Møller 2006). Automatické či semiautomatické systémy analýzy obrazu obvykle udávají parametry jako je délka ohonu (tail leght; µm) a moment ohonu (tail moment; součin % DNA migrované v ohonu a vzdálenosti DNA migrace v ohonu)(Collins et al. 2014). Délka ohonu, je ovšem poněkud problematická. Její hodnota je ovlivněna nejen podmínkami elektroforézy (Dusinska and Collins 2008), ale i místem odkud se měří (jako výchozí bod se používá jak střed "hlavy", tak i místo přechodu "hlavy" v ohon)(Møller 2006).

Rovněž je možné vizuální skórování komet do kategorií 0–4 (kdy 0 znamená veškerou DNA v "hlavě", tedy kometa bez ohonu, a 4 naopak veškerou DNA v ohonu). Po vyhodnocení 100 komet na vzorek je pak výsledek udáván jako součet v intervalu 0–400 arbitrárních jednotek. Skóre při vizuálním hodnocení velmi dobře koreluje s %tDNA (Dusinska and Collins 2008). Každý stupeň ve vizuálním hodnocení odpovídá asi zóně 20 % poškození DNA v hodnocení pomocí %tDNA (Collins et al. 2014).

CA je metoda relativně finančně nenáročná a jednoduchá na provedení. V porovnání s CBMN a testem chromozomálních aberací (ABC) je náročnější na laboratorní vybavení (fluorescenční mikroskop, CCD kamera, speciální software pro hodnocení). Použití hodnotícího SW snižuje lidskou chybu a subjektivní hodnocení, ale v některých případech může snižovat i citlivost metody v závislosti na jeho nastavení. Metoda CA je relativně náročná na laboratorní práci. Je velmi citlivá na kvalitu vody (je potřeba tridestilovaná voda), případně i na stáří podložních skel (neměla by být starší něž 2 roky od data výroby). DNA bez jaderného obalu a buněčných komponent (po lyzačním kroku) je velmi citlivá na arteficiální poškození modrou složkou světla (denního i bílého zářivkového světla)(Dvořák and Matejovičová 2008), proto je nutné metodu provádět v zatemněné (a nejlépe i chlazené) místnosti za osvětlení žlutooranžovým světlem (při červeném světle se zhoršuje přesnost laboratorní manipulace). Mezi možné limitace metody patří i nemožnost určit velikost fragmentů DNA. Větší fragmenty by však teoreticky měly putovat dále od hlavy komety (Olive and Banath 2006).

Dalším problémem může být replikace buněk během elektroforézy. Za alkalických podmínek se replikační vidlice chovají jako jednořetězcové zlomy, což zvyšuje množství DNA v ohonu komety, zatímco za neutrálních podmínek dochází naopak k snížení migrace DNA do ohonu (Olive and Banath 2006). Problémem může být také účinnost lýzy u buněk s velmi dobře strukturovanou cytoplasmou (např. epiteliální buňky), které vyžadují k úspěšné lýze použití proteáz, které však mohou ovlivňovat výsledek analýzy (Afanasieva and Sivolob 2018). Rovněž interpretace výsledků analýzy bývá nesnadná, protože není dostatečně popsaný vztah mezi rozsahem poškození DNA a jeho biologickým dopadem (pravděpodobnost reparace poškození pokud by buňka byla vystavena NPs *in vivo*)(Olive and Banath 2006). Limitaci může představovat i klesající senzitivita při nárůstu počtu zlomů nad 10 000 zlomů DNA na diploidní savčí buňku (Olive and Banath 2006). Rizikové je počítání buněk po expozici pomocí automatických počítaček buněk, kde shluky NPs mohou imitovat buňky a vést k použití nedostatečné koncentrace buněk pro analýzu. Popsaný jev zhášení fluorescence některými NPs může při použití automatické analýzy vést ke zkreslení výsledků. Toto riziko lze minimalizovat semiautomatickou či plně manuální analýzou vzorků.

Dále může problém představovat i dosud neúspěšná standardizace metody, kdy stále různé laboratoře používají různé složení lyzačních roztoků, různou dobu lýzy (několik hodin ale i dnů) či inkubace v alkalickém prostředí a elektroforézy (v rozmezí 20 až 60 min), což vede ke značné inter-laboratorní variabilitě výsledků a nemožnosti jejich přímého porovnání (Afanasieva and Sivolob 2018).

Souhrn nejzajímavějších výsledků

Při testování tří typů TiO₂ NPs (TiO₂ 1-3) ve třech koncentracích (120; 60 a 30 μ g/ml) na THP-1 buněčné linii, době expozice 40 h, jsme při hodnocení pomocí CA zaznamenali signifikantní genotoxický potenciál všech tří testovaných TiO₂ NPs (Obr. 4). TiO₂ 1 a TiO₂ 2 jsou NPs označované jako P25 od dvou různých výrobců, tedy by se mělo jednat o NPs s velikostí částic kolem 25 nm. V případě TiO₂ 3 by se velikost částic měla pohybovat v rozmezí 4 až 8 nm dle výrobce. Obr. 5 zobrazuje příklady hodnocených nálezů.



Obr. 4 zobrazuje výsledky násobku % DNA vycestované do "ohonu" komety (%tDNA) hodnocené pomocí kometového testu po expozici třem typům TiO₂ NPs (TiO₂ 1–3) po 40 h expozice THP-1 buněčné linie třem koncentracím (30–120 µg/ml) v porovnání s negativní kontrolou (0). Data jsou prezentována krabicovými grafy s aritmetickým průměrem, kvartilovým rozmezím a minimem a maximem. H₂O (v koncentraci odpovídající v 120 µg/ml TiO₂ NPs); AraC 20 – Cytosin arabinosid (v koncentraci 20 ng/ml)



Obr. 5 zobrazuje příklady hodnocených nálezů během CA: a) Buněčné jádro (nukleotid) s vycestovanými asi 10 % jaderné DNA do "ohonu"; b) Nukleotid s vycestovanými asi 40 % jaderného obsahu do "ohonu"

V případě TiO₂ 1 byl signifikantní genotoxický potenciál zaznamenán pouze pro nejvyšší testovanou koncentraci a u TiO₂ 2 pro koncentraci 120 a 60 µg/ml. TiO₂ 3 vykázal signifikantní potenciál ve všech třech testovaných koncentracích. Tento genotoxický potenciál navíc ukazuje zřetelnou závislost na dávce. Hraniční dávková závislost byla pozorována rovněž pro TiO₂ 2. LOGEL pro TiO₂ 1 se tedy pohybuje kolem 120 µg/ml, pro TiO₂ 2 pod 60 µg/ml a pro TiO₂ 3 pod 30 µg/ml (publikace v přípravě).

Poněkud rozdílné výsledky chování TiO₂ NPs mohou být způsobeny rozdílnou velikostí jednotlivých TiO₂ NPs či rozdílným poměrem anatasu a rutilu (krystalické typy TiO₂). TiO₂ 1 by dle výrobce měl obsahovat pouze krystalický typ TiO₂ anatas, zatímco TiO₂ 2 obsahuje dle provedené analýzy 9 % rutilu krystalického typu. Nižší toxicita anatase typ při vyloučení expozice UV záření byla pozorována i v dalších studiích (Numano et al. 2014, Yu et al. 2017). TiO₂ 3, který má nejmenší rozměr krystalů a je tvořen pouze "anatasem" krystalickým typem (dle provedené analýzy), vykazoval nejvýraznější genotoxický potenciál. Můžeme se tedy domnívat, že rovněž v případě TiO₂ hraje v indukci poškození DNA svou roli také velikost částic.

Test chromozomálních aberací (test genotoxicity)

Teoretický základ metodiky

Jako chromozomální aberace (ChA) jsou označovány změny struktury či počtu chromozomů. Mohou se objevovat spontánně či být indukovány působením chemických látek či radiace (Mateuca et al. 2012).

ChA jsou hodnoceny v metafazických buňkách, tedy buňkách právě prodělávajících dělení. V této fázi buněčného cyklu jsou zastaveny pomocí mitotického jedu colcemidu, který naruší dělicí vřeténko (AHEM 2007). Při použití barvení testu chromozomálních aberací (ABC) pomocí roztoku Giemsa-Romanowski lze detekovat zlomy, gapy, acentrické fragmenty, dicentrické chromozomy či výměny (Grujicic et al. 2016).

Obecně se rozlišují strukturální a numerické chromozomální aberace.

Registre and Proudlock (2016) rozlišují dvě hlavní skupiny strukturálních aberací: (a) zlomy (včetně delecí), které vznikají v důsledku neopravených dvouřetězcových zlomů DNA a (b) výměny, které vznikají chybnou opravou či spojením dvou a více dvouřetězcových zlomů v průběhu jednoho ("intravýměny" – "intrachange") či mezi dvěma a více chromozomy ("intervýměny" – "interchange").

Dále se strukturální aberace dělí na chromozomové, kde dochází k poškození obou chromatid, a chromatidové, kde je poškozena pouze jedna chromatida daného chromozomu (Mateuca et al. 2012). Celkově tak rozlišujeme čtyři základní kategorie strukturálních aberací seřazené dle obvyklé četnosti: (a) chromatidové zlomy, (b) chromozomové zlomy, (c) chromatidové výměny a (d) chromozomové výměny. Rovněž lze zaznamenávat tzv. gapy, které se ovšem nezapočítávají do celkového počtu aberovaných buněk (Sram et al. 2004, Danford 2012). Mezi chromatidové a chromozomové zlomy lze řadit i tzv. "minute a double minute", které vznikají odlomením malých koncových částí chromatid (Danford 2012). Dále lze pozorovat komplexní strukturální změny, jako jsou pulverizace (fragmentace chromozomu, která může vznikat i v důsledku předčasné kondenzace chromozomu nejen poškozením chromozomu) či mnohočetné aberace (více než pět aberací v jedné buňce)(Registre and Proudlock 2016).

Hlavní příčinou vzniku strukturálních ChA je poškození obou řetězců DNA, které může být způsobeno přímo, ale častěji vzniká nepřímo jako následek chyby v replikaci či reparaci DNA. V případě indukce léze pouze jednoho řetězce DNA může docházet během reparace k přeměně na zlom obou řetězců DNA za vzniku chromatidového zlomu. Pokud pak zůstane chromatidový zlom neopravený, může být během syntézy DNA replikován za vzniku chromozomového zlomu (Registre and Proudlock 2016). Aberace se obvykle objevují až během dalšího cyklu, a proto je pravděpodobné, že k jejich vzniku je právě potřeba, aby proběhla S fáze buněčného cyklu (Natarajan and Palitti 2008).

Při zlomech obou vláken DNA se objevují tzv. "lepivé" konce, které se mohou vzájemně spojovat. Pokud je v buňce přítomen pouze jeden zlom může buď zůstat nespojený a je detekovatelný jako chromatidový zlom či delece, nebo se spojí bez detekovatelné aberace. Pokud se v buňce objeví více dvouřetězcových zlomů a je v ní tedy i dvakrát více "lepivých" konců než zlomů, mohou se tyto "lepivé" konce vzájemně náhodně spojovat za vzniku výměn pozorovatelných v mikroskopu (Danford 2012).

Některé chromozomy jsou více citlivé na poškození, a proto nemusí být distribuce poškození DNA v genomu náhodná. Frekvence a typ a aberací jsou dány fází buněčného cyklu, kdy dochází k poškození, dynamikou chromatinu, a genetickou či epigenetickou alterací (Venkatesan et al. 2015).

V případě, že jsou zlomy DNA opraveny chybně či zůstanou neopraveny, jsou pozorovatelné jako strukturální aberace v metafazických buňkách. Buňky obsahující nestabilní aberace, jako jsou např. dicentrické a prstenčité (ring) chromozomy či fragmenty, obvykle vedou k p53 dependentní cestě indukce apoptózy. Buňky se stabilními strukturálními aberacemi, jako jsou např. balancované translokace, méně efektivně navozují apoptózu, a proto mohou vést k poškození organismu (Mateuca et al. 2012).

Jako numerické aberace se označují změny v počtu chromozomů, které vznikají v důsledku abnormální segregace chromozomů. Mohou vznikat i spontánně nebo v důsledku působení aneugenů (Mateuca et al. 2006). Ve standardní verzi ABC nemusí být nutně

způsobeny genotoxickým působením agens, ale mohou vznikat artificiálně během zpracování materiálu. Normální lidské diploidní buňky obsahují 22 párů autozomů a jeden pár gonozomů (Registre and Proudlock 2016).

Rozlišujeme dvě hlavní skupiny numerických aberací: (a) polyploidie (změny v počtu celých chromozomových sad), které se dále dělí na jednoduché polyploidie a endoreduplikace a (b) aneuploidie (změny v počtu jednotlivých chromozomů), které se dělí na hyperploidie (přebývání chromozomu/ů) a hypoploidie (chybění chromozomu/ů)(Danford 2012).

Po působení NPs se mohou objevovat i další nálezy, které ovšem nejsou zahrnovány mezi aberace, jako jsou rozestup centromer, tedy disociace sesterských chromatid, která může značit cytostatický či cytotoxický účinek, či endoreduplikace, tedy stav, kdy homologní chromozomy leží těsně vedle sebe a je jich tetraploidní počet (AHEM 2007, Registre and Proudlock 2016).

Podrobnější popis metodiky

Expozice buněk vybraným NPs probíhá identicky jako v případě CBMN. Rovněž je nutné volit alespoň tři koncentrace NPs bez významného cytotoxického účinku. Pro každou testovanou koncentraci a pozitivní kontrolu by kultury měly být nasazeny v duplikátu, pro negativní kontrolu v tetraplikátu. Celkem je vhodné provést tři opakování pokusu. Podložní skla před aplikací zpracovaného vzorku jsou připravena identickým způsobem jako v případě CBMN.

Po ukončení expozice NPs je k buňkám přidán roztok colcemidu ve finální koncentraci 0,241 µg/ml kultury a kultivace pokračuje po dobu dalších 1,5 až 3 h v závislosti na použité buněčné kultuře, respektive délce jejího buněčného cyklu (u THP-1 po dobu 2 h). Před aplikací colcemidu lze zařadit odmývací krok k odstranění NPs obdobně jako u CBMN. Po ukončení kultivace jsou buňky zpracovány centrifugací (300 x g; 3 min), je odstraněn supernatant, a postupně fixovány pomocí tří fixačních kroků. Mezi každým fixačním krokem probíhá centrifugace (300 x g; 3 min) a odstranění supernatantu. K přípravě roztoku prvního fixačního kroku je použito 92 ml aqua demineralisata, 3 ml methanolu a 5 ml ledové kyseliny octové.

V druhém fixačním kroku je použit pouze methanol a ve třetím fixačním kroku je použit roztok methanolu a ledové kyseliny octové (3:1). Roztoky obsahující methanol a ledovou kyselinu octovou je vhodné po přípravě uchovávat v lednici. Roztoky jsou připraveny těsně před zahájením zpracování vzorků. Po třetím fixačním kroku proběhne opět centrifugace (300 x g; 3 min) a je odstraněn supernatant 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 pokojové teplotě. Fixaci vzorků je vhodné provádět v digestoři vzhledem k dráždivým a toxickým účinkům použitých roztoků a s použitím základních osobních ochranných pracovních prostředků (pracovní oděv, rukavice, ochranné brýle). Následující den jsou vzorky obarveny 5% Giemsa-Romanowski roztokem v demineralizované vodě po dobu 5 min, opláchnuty pod tekoucí vodou a na závěr v demineralizované vodě a po uschnutí uloženy do boxu na mikroskopické preparáty (OOPP je vhodné při barvení doplnit o gumovou zástěru). Další skladování je možné v boxech při pokojové teplotě.

Analýza vzorků je provedena pomocí světelného mikroskopu s použitím imerzního oleje při 1000násobném zvětšení. Je hodnoceno 100 dobře rozestoupených mitotických metafazických buněk. K hodnocení jsou používána skórovací kritéria dle (AHEM 2007):

- Zlom je narušení kontinuity jedné nebo obou chromatid, přičemž platí alespoň jedno:
 - Mezera v přerušení chromatidy je větší než šířka chromatidy
 - Fragment je dislokovaný mimo osu chromatidy
 - Jedna chromatida je znatelně kratší (delece)
- Fragment (zlom) je část chromozomu bez centromery. Může být jednoduchý (poškození pouze jedné chromatidy = chromatidový zlom) nebo dvojitý (poškození obou chromatid = chromozomový zlom)
- Minute je kulovitá část chromatidy, jejíž průměr je menší, než je šířka chromatidy
- Kruhový fragment je kruhovitá část chromatidy bez centromery o průměru stejném nebo větším, než je šířka chromatidy
- Chromozomové výměny jsou výměny části chromozomů (jedné nebo obou chromatid):
 - Dicentrický chromozom je charakterizován přítomnosti dvou centromer a případně 0 až 2 dvojitými fragmenty
 - Translokace je charakterizována připojením chromatidových fragmentů k jinému než originálnímu chromozomu. Při translokaci jsou přítomny buď dva chromozomy s translokací či jeden chromozom s translokací a jeden dvojitý fragment
 - Prsténčitý chromozom (ring) je kruhový útvar s přítomností centromery
- Polyploidní buňka je buňka s počtem centromer vyšším než tří- a vícenásobek haploidní sady (pro lidské buňky s 23 chromozomy tedy více než 69 centromer)
- Aneuploidní buňka je buňka v metafázi s více či méně než dvěma haploidními sadami chromozomů (více či méně než 46 centromer pro normální lidské buňky)
- Gap je porušení kontinuity jedné nebo obou chromatid, pokud je mezera v přerušení chromatidy stejná nebo menší, než je šířka dané chromatidy
- Endoreduplikace je stav, kdy homologní chromozomy leží těsně u sebe
- Neanalyzují se metafáze:
 - o nedostatečně nebo nestejnoměrně obarvené a přebarvené
 - o s nedostatečně oddělenými chromatidami
 - o s prometafázickými chromozomy
 - o pozdní (s od sebe oddělenými chromatidami v centromeře)
 - o nedostatečně rozprostřené (chromozomy se překrývají)
 - splývající (dvě metafazické buňky blízko sebe, kdy nelze odlišit který chromozom patří do které metafáze)
 - s mechanickým poškozením chromozomů (vzniklým artificiálně při zpracování nebo poškrábáním nátěru)
 - (s jiným počtem centromer než 46 ± 2 platí pro normální lidské buňky)

Použitelnost metodiky pro testování nanočástic

ABC je metoda relativně levná. Její materiální i přístrojová náročnost je srovnatelná s CBNM. Výhodou je standardizace provedení testu a využitelnost v epidemiologických studiích s použitím zejména periferních lymfocytů včetně standardizace bazální hladiny poškození DNA v české populaci (AHEM 2007, Cerna et al. 2012).

ABC je metoda náročná na laboratorní práci, čas a zejména na zkušenosti hodnotitele. Při hodnocení ABC se výrazně uplatňuje i subjektivní komponenta hodnotitele, kdy i zkušení hodnotitelé se liší v interpretaci stejné metafazické buňky. Z tohoto důvodu se ustupuje od vyjádření výsledku analýzy jako konkrétní ChA (zlomy, fragmenty, dicentrické chromozomy a další na 100 buněk) a upřednostňuje se vyjádření v počtu aberovaných buněk na 100 metafazických buněk bez bližší specifikace(Registre and Proudlock 2016). Gapy se do celkového počtu aberovaných buněk nezahrnují, ale lze je prezentovat jako samostatnou kategorii na 100 metafazických buněk (AHEM 2007). Při detekci numerických aberací je ABC provedený ve standardní verzi vhodný pouze pro hodnocení polyploidií. Při analýze aneuploidií může docházet k nadhodnocení vlivem arteficiální ztráty chromozomu/ů v důsledku zpracování(Registre and Proudlock 2016). Rovněž při standardním provedení nelze detekovat balancované translokace(Clare 2012).

Dosud se nepodařilo vytvořit metodu automatického hodnocení. Je možné pouze semiautomatické hodnocení pomocí vyhledávače metafazických buněk a dicentrických chromozomů (Mateuca et al. 2012). Navíc je ABC relativně málo citlivý ve srovnání s jinými metodami detekce poškození DNA. Díky tomu všemu se stává stále méně populární a používaný (Sram et al. 2004). Dosud se ovšem s úspěchem používá zejména při odhadu absorbované dávky při radiačních nehodách (Natarajan 2002, Tichy et al. 2018). Další nevýhodu spatřujeme v neuniverzálnosti metody, zejména pro buněčné linie s variabilním počtem chromozomů. Při použití s NPs je riziko překrytí metafazických chromozomů shluky NPs, zejména při testování vyšších koncentrací. Tomuto problému se dá částečně předejít zařazením odmývacího kroku mezi kultivace. Riziková je rovněž záměna malých shluků NPs za minute, což je ovšem obvykle odlišitelné na základě rozdílné barvy a refrakce.

Souhrn nejzajímavějších výsledků

ABC se ukázal být nevhodným pro použití na buněčné linii THP-1. Nejčetnější počet centromer (chromozomů) v jedné metafazické buňce byl u námi použité linie 48. THP-1 buněčná linie je považována v současnosti ze téměř diploidní buněčnou linii s 49 chromozomy (Odero et al. 2000), ale původně byla popsána jako diploidní linie s karyotypem 46 XY (Tsuchiya et al. 1980). Rovněž se dochází k závěru, že se linie získaná z různých zdrojů mírně odlišuje (Adati et al. 2009). 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 (Peng et al. 2010). ABC zůstává však významným testem s použitím periferních lymfocytů, zejména pak v epidemiologických studiích, společně s CBMN a CA. Obr. 6 ilustruje

nejčastěji hodnocené nálezy na lidských monocytech po expozici *in vivo* různým škodlivinám. Slouží pouze pro orientaci v možných nálezech.



Obr. 6 Příklady skórovaných nálezů: **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)

Literatura:

Adati, N., M.-C. Huang, T. Suzuki, H. Suzuki and T. Kojima (2009). "High-resolution analysis of aberrant regions in autosomal chromosomes in human leukemia THP-1 cell line." BMC research notes 2: 153-153.

Afanasieva, K. and A. Sivolob (2018). "Physical principles and new applications of comet assay." Biophys Chem 238: 1-7.

AHEM (2003). "Standardní operační postupy pro biologické monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí "Acta Hygienica, Epidemiologica et Microbiologica 3.

AHEM (2007). "Metody biologického monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí. Cytogenetická analýza periferních lymfocytů." Acta Hygienica, Epidemiologica et Microbiologica 1.

Burgum, M. J., M. J. D. Clift, S. J. Evans, N. Hondow, A. Tarat, G. J. Jenkins and S. H. Doak (2021). "Few-layer graphene induces both primary and secondary genotoxicity in epithelial barrier models in vitro." Journal of Nanobiotechnology 19(1): 24.

Cerna, M., A. Krskova, M. Cejchanova and V. Spevackova (2012). "Human biomonitoring in the Czech Republic: an overview." Int J Hyg Environ Health 215(2): 109-119.

Clare, G. (2012). The In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test. Genetic Toxicology: Principles and Methods. J. M. Parry and E. M. Parry. New York, NY, Springer New York: 69-91.

Collins, A., G. Koppen, V. Valdiglesias, M. Dusinska, M. Kruszewski, P. Møller, E. Rojas, A. Dhawan, I. Benzie, E. Coskun, M. Moretti, G. Speit and S. Bonassi (2014). "The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project." Mutation Research/Reviews in Mutation Research 759(0): 27-39.

Danford, N. (2012). "The interpretation and analysis of cytogenetic data." Methods Mol Biol 817: 93-120.

Dusinska, M. and A. R. Collins (2008). "The comet assay in human biomonitoring: geneenvironment interactions." Mutagenesis 23(3): 191-205.

Dvořák, M. and M. Matejovičová (2008). "PRINCIPY A VYUŽITÍ KOMETOVÉ ANALÝZY PŘI DETEKCI POŠKOZENÍ DNA." Chem. Listy 102: 877-883.

Faust, F., F. Kassie, S. Knasmüller, R. H. Boedecker, M. Mann and V. Mersch-Sundermann (2004). "The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies." Mutation Research/Reviews in Mutation Research 566(3): 209-229.

Fenech, M. (2007). "Cytokinesis-block micronucleus cytome assay." Nat Protoc 2(5): 1084-1104.

Fenech, M., M. Kirsch-Volders, A. T. Natarajan, J. Surralles, J. W. Crott, J. Parry, H. Norppa, D. A. Eastmond, J. D. Tucker and P. Thomas (2011). "Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells." Mutagenesis 26(1): 125-132.

Gonzalez, L., B. J. Sanderson and M. Kirsch-Volders (2011). "Adaptations of the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials." Mutagenesis 26(1): 185-191.

Grujicic, D., M. Radovic, S. Arsenijevic and O. Milosevic-Djordjevic (2016). "Cytogenetic biomarkers in detection of genotoxic effects of gestagens in peripheral blood lymphocytes in vitro and in vivo." Eur J Med Genet 59(12): 624-633.

Hayashi, M. (2016). "The micronucleus test-most widely used in vivo genotoxicity test." Genes Environ 38: 18.

Malkova, A., T. Svadlakova, A. Singh, M. Kolackova, R. Vankova, P. Borsky, D. Holmannova, A. Karas, L. Borska and Z. Fiala (2021). "In Vitro Assessment of the Genotoxic Potential of Pristine Graphene Platelets." Nanomaterials (Basel) 11(9).

Mateuca, R., N. Lombaert, P. V. Aka, I. Decordier and M. Kirsch-Volders (2006). "Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring." Biochimie 88(11): 1515-1531.

Mateuca, R. A., I. Decordier and M. Kirsch-Volders (2012). "Cytogenetic methods in human biomonitoring: principles and uses." Methods Mol Biol 817: 305-334.

Møller, P. (2006). "Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA." Mutation Research/Reviews in Mutation Research 612(2): 84-104.

Natarajan, A. T. (2002). "Chromosome aberrations: past, present and future." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 504(1): 3-16.

Natarajan, A. T. and F. Palitti (2008). "DNA repair and chromosomal alterations." Mutat Res 657(1): 3-7.

Numano, T., J. Xu, M. Futakuchi, K. Fukamachi, D. B. Alexander, F. Furukawa, J. Kanno, A. Hirose, H. Tsuda and M. Suzui (2014). "Comparative study of toxic effects of anatase and rutile type nanosized titanium dioxide particles in vivo and in vitro." Asian Pac J Cancer Prev 15(2): 929-935.

Odero, M. D., N. J. Zeleznik-Le, V. Chinwalla and J. D. Rowley (2000). "Cytogenetic and molecular analysis of the acute monocytic leukemia cell line THP-1 with an MLL-AF9 translocation." Genes Chromosomes Cancer 29(4): 333-338.

OECD (2016). Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Publishing, Paris.

OECD (2016). Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay, OECD Publishing, Paris.

Olive, P. L. and J. P. Banath (2006). "The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells." Nat Protoc 1(1): 23-29.

Osipov, A. N., N. M. Smetanina, M. V. Pustovalova, E. Arkhangelskaya and D. Klokov (2014). "The formation of DNA single-strand breaks and alkali-labile sites in human blood lymphocytes exposed to 365-nm UVA radiation." Free Radic Biol Med 73: 34-40.

Peng, K. J., J. H. Wang, W. T. Su, X. C. Wang, F. T. Yang and W. H. Nie (2010). "Characterization of two human lung adenocarcinoma cell lines by reciprocal chromosome painting." Dongwuxue Yanjiu 31(2): 113-121.

Rapp, A. and K. O. Greulich (2004). "After double-strand break induction by UV-A, homologous recombination and nonhomologous end joining cooperate at the same DSB if both systems are available." J Cell Sci 117(Pt 21): 4935-4945.

Registre, M. and R. Proudlock (2016). Chapter 7 - The In Vitro Chromosome Aberration Test. Genetic Toxicology Testing. Boston, Academic Press: 207-267.

Ruiz-Ruiz, B., M. E. Arellano-García, P. Radilla-Chávez, D. S. Salas-Vargas, Y. Toledano-Magaña, F. Casillas-Figueroa, R. Luna Vazquez-Gomez, A. Pestryakov, J. C. García-Ramos and N. Bogdanchikova (2020). "Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Human Lymphocytes as a Sensitive Tool for Cytotoxicity/Genotoxicity Evaluation of AgNPs." ACS Omega 5(21): 12005-12015.

Sabharwal, R., P. Verma, M. A. Syed, T. Sharma, S. K. Subudhi, S. Mohanty and S. Gupta (2015). "Emergence of micronuclei as a genomic biomarker." Indian J Med Paediatr Oncol 36(4): 212-218.

Sram, R. J., P. Rossner and Z. Smerhovsky (2004). "Cytogenetic analysis and occupational health in the Czech Republic." Mutat Res 566(1): 21-48.

Tichy, A., S. Kabacik, G. O'Brien, J. Pejchal, Z. Sinkorova, A. Kmochova, I. Sirak, A. Malkova, C. G. Beltran, J. R. Gonzalez, J. Grepl, M. Majewski, E. Ainsbury, L. Zarybnicka, J. Vachelova, A. Zavrelova, M. Davidkova, M. Markova Stastna, M. Abend, E. Pernot, E. Cardis and C. Badie (2018). "The first in vivo multiparametric comparison of different radiation exposure biomarkers in human blood." PLoS One 13(2): e0193412.

Tsuchiya, S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno and K. Tada (1980). "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)." Int J Cancer 26(2): 171-176. Utani, K., A. Okamoto and N. Shimizu (2011). "Generation of micronuclei during interphase by coupling between cytoplasmic membrane blebbing and nuclear budding." PLoS One 6(11): e27233.

Venkatesan, S., A. T. Natarajan and M. P. Hande (2015). "Chromosomal instability-mechanisms and consequences." Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen 793: 176-184.

Yu, Q., H. Wang, Q. Peng, Y. Li, Z. Liu and M. Li (2017). "Different toxicity of anatase and rutile TiO2 nanoparticles on macrophages: Involvement of difference in affinity to proteins and phospholipids." Journal of Hazardous Materials 335: 125-134.

Metodiky Ústavu histologie a embryologie

(odpovědnými osobami za níže uvedené metodiky jsou Hana Bavorová, Aleš Bezrouk, Dana Čížková, Petra Hajzlerová, Jana Chvátalová, Zora Komárková, Magda Voborníková, Jaroslav Mokrý, Rishikaysh Pisal)

Histologická analýza

Teoretický základ metodiky

Techniky histologické analýzy se používají pro sledování mikroskopické morfologie tkání a orgánů, které mohou být zcela fyziologické nebo se v nich projevovat vlivy exo- nebo endogenních faktorů, které vedou ke změně prostorového uspořádání tkáně nebo orgánu. Vyšetřovaný orgán či tkáň mohou být odebrány z živého (biopsie) či neživého (nekropsie) organismu.

Peroperační biopsie se provádí během chirurgického výkonu a odebraný vzorek je rychle zfixován, aby nedošlo k iniciaci autolytických procesů, a následně zpracován do podoby zmrazeného řezu. Takto připravený řez je připraven k okamžitému zhodnocení a je možné tak sdělit operátorovi během výkonu, zda je vzorek fyziologický či obsahuje patologické změny.

Podrobnější popis metodiky

Postup zpracování orgánů po vystavení myši C57BI/6 vlivu grafenových částic (PlasmaChem):

- Poté, co byla myš usmrcena prostřednictvím letální dávky isofluranu, jsou odebrány požadované orgány (plíce, srdce, žaludek, tenké střevo, játra, ledviny) a ty jsou fixovány prostřednictvím 10% formalínu (tímto procesem dochází k denaturaci bílkovin, která inhibuje aktivitu autolytických enzymů, které by v případě aktivace mohly poškodit morfologii orgánu či tkáně).
- 2. Orgány jsou fixovány po dobu 3-4 dnů (délka fixace je úměrná velikosti a komplexnosti orgánu).
- Poté jsou orgány zpracovány prostřednictvím tkáňového automatu (autotechnikonu), který orgány nejprve odvodní vzestupnou alkoholovou řadou (60–100% etanol) a poté se prosytí xylenem, který zlepšuje prostup parafínu orgánem.
- Orgán se pak zalije do parafínového bločku, zchladí se a následně se nakrájí na 5 μm řezy na mikrotomu. Tyto řezy jsou přeneseny na podložní sklo potažené želatinou, která usnadní přilnutí řezu na povrch skla.
- 5. Řezy se před obarvením musí zbavit parafínu a poté zavodnit, a to prostřednictvím roztoku Ottix plus (2x 7 minut), poté Ottix shaper (2x 7 minut). Pak se řezy oplachují destilovanou vodou a pokračují do hematoxylinu, který obarví bazofilní struktury orgánu (jádra, drsné endoplazmatické retikulum atd.). V hematoxylinu jsou řezy 3–10 minut (délka barvení závisí na čerstvosti a typu hematoxylinu). Poté jsou řezy oplachovány po dobu 10 minut v tekoucí vodě. Dobarvení eosinofilních struktur (cytoplazma, mitochondrie) probíhá díky eosinu, kde jsou řezy barveny po dobu 3–5 minut (doba barvení se odvíjí od čerstvosti eosinu). Poté jdou řezy opět do Ottix shaper a Ottix plus. Posledním krokem je zamontování syntetickými montovadly (DPX), které

umožní dlouhodobé uchovávání preparátů. Preparát je tak opatřen na povrchu krycím sklem.

Použitelnost metodiky pro testování nanočástic a souhrn nejzajímavějších výsledků

Histologické zpracování je rutinní záležitostí, které je používáno ve všech histologických laboratořích a jedná se o časem prověřenou metodu, která doznává změn pouze v roztocích, které se používají pro přípravu preparátů. Připravené preparáty mohou být zpracovány imunohistochemicky, což umožňuje vyhodnocovat přítomnost antigenů přítomných na buněčných površích (Kolesová et al. 2021). Výhodou parafínových řezů je dlouhodobé skladování, barvení širokou škálou metod, zachování morfologie orgánů. Nicméně u nešetrné fixace může dojít k porušení antigenních epitopů, což může znesnadňovat jejich analýzu prostřednictvím imunohistochemie. Alkoholová řada slouží k odvodnění, což může mít za následek svraštění tkáně, což vede k tvorbě artefaktů.

Histologickou analýzu jsme použili pro zhodnocení vlivu grafenových nanočástic (firma PlasmaChem) na živý organismus, konkrétně na myši kmene C57Bl/6. Zvířata byla vystavena vlivu grafenových částic dvěma cestami vstupu: intratracheálně a perorálně. V obou případech jsme využili dvě různé koncentrace grafenu (5 a 50 µg/ml), a to buď v akutní expozici (jedna dávka) nebo chronické (expozice grafenu každý pracovní den). Orgány byly zvířatům odebrány v různých časových intervalech (1, 7 nebo 21 dní).

Akutní expozice se nijak neprojevila na morfologii odebraných orgánů, ať už u intratracheální nebo perorální expozice. V případě chronické expozice jsme pozorovali ztluštění alveolární stěny a vylití erytrocytů do intersticiální plicní tkáně (Obr. 1, 2). Nedošlo k akumulaci grafenových nanočástic v plicní tkáni, tak jak se popisuje v literatuře (Gao et al. 2021, Kim et al. 2016), nicméně v našem *in vivo* experimentu došlo k vytvoření zánětlivé reakce, která vyústila ve zesílení alveolárních sept. V srdci došlo částečně k akumulaci malých depozit grafenových částic ve vazivu endokardu.

Perorální expozice při akutní a chronické expozici nedoznala žádných změn v morfologii. Změny morfologie byly popsány v literatuře (Shin et al. 2015), ovšem v našem experimentu bylo použita nižší koncentrace nanočástic, což mělo za následek přijetí nanomateriálu do organismu bez vyvolání zánětlivých či morfologických změn na srdeční tkáni. Výsledky *in vivo* studie jsou publikovány v článku "The dose- and time-dependent cytotoxic effect of graphene nanoplatelets: in vitro and in vivo study".



Obr. 1 Histopatologický efekt grafenových nanočástic na plicní tkáň po chronické expozici (21 dní). A) znázorňuje kontrolní vzorek bez morfologických změn; **B)** šipkami označuje místa alveolárního ztluštění; **C)** hvězdičkami ilustruje místo vyplavení erytrocytů do intersticia plic. Měřítko je 50 μm, barveno hematoxylin-eosinem.



Obr. 2 Histopatologický efekt grafenových nanočástic na srdeční tkáň po chronické expozici (21 dní). **A)** znázorňuje kontrolní vzorek bez morfologických změn; **B)** šipkami označuje místa akumulace grafenových nanočástic ve vazivu endokardu. Měřítko je 50 μm (A) a 20 μm (B), barveno hematoxylin-eosinem.

LDH test (test cytotoxicity)

Teoretický základ metodiky

Jedná se o kolorimetrickou metodu, 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. Uniklý enzym LDH je konvertován na pyruvát prostřednictvím NAD⁺ redukce na NADH, která je následně redukována na tetrazoliovou sůl, jejíž množství koreluje s množstvím LDH uniklého v kultivačním médiu. LDH assay bývá poměrně často používáno pro stanovení vlivu exo- či endogenních agens na buněčnou populaci s jasně definovanými vlastnostmi (proliferační aktivita, diferenciační potenciál atd.).

Podrobnější popis metodiky

Postup CyQUANT[™] LDH (ThermoFisher) cytotoxické analýzy pro zjištění vlivu grafenu firmy PlasmaChem na adherentní linii myoblastů C2C12.

- Nasazení C2C12 myoblastů na 96jamkovou destičku (0,5–2x10⁴ buněk/jamka) ve 100 μl 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 denzita buněk se může projevovat falešnou pozitivitou ve smyslu vyšší cytotoxicity. Buněčné médium musí obsahovat sérum = endogenní aktivita LDH v séru může způsobovat falešnou pozitivitu. Na destičce je nutné si vyčlenit dvě skupiny buněk, které slouží jako kontrola (spontánní LDH reakce (SLR), maximální LDH aktivita (MLA).
- 2. Inkubovat buňky po dobu 24 h při 37 °C a 5% CO₂.
- Odsátí média tak abychom neporušili adherovaný monolayer buněk a následné přidání grafenu rozpuštěného v bezfenolovém kultivačním médiu v požadované koncentraci (5– 100 μg/ml; triplikát). Inkubace následujících 24–48 hodin.
- 4. Do jamek, kde je triplikát pro SLR se aplikuje 10 μl sterilní, ultra-čisté vody. Do jamek s MLA se aplikuje 10 μl lysis buffer (10x). Obě reagencie se inkubují 45 minut při 37 °C a 5% CO₂.
- 5. Odsátí 50 μl média z každé jamky, transfer do jiné 96jamkové destičky (i SLR, MLA) a přidání 50 μl reaction mixture. Reaction mixture se připraví dopředu a obsahuje Substrate mix (vznikne smícháním 11,4 ml k Substrate mix, která je v podobě prášku) a Assay Buffer (600 μl), které se smíchají a vytvoří tak Reaction mixture, která vystačí přibližně na dvě 96jamkové destičky. Tento mix vydrží při -20 °C přibližně 3–4 týdny. Centrifugační zkumavku s tímto mixem je potřeba chránit před světlem (zabalení do alobalu).
- 6. Inkubování buněk s Reaction mixture po dobu 30 minut při laboratorní teplotě bez dosahu světla (zabalit do alobalu).
- 7. Přidání 50 µl Stop solution
- 8. Promíchat po dobu 1 minuty na shakeru.
- 9. Měření absorbance při 490 nm na spektrofotometru; referenční vlnová délka by neměla být vyšší než 680 nm.

10. Výpočet pro stanovení cytotoxicity: $\frac{absorbance ošetřených buněk - SLR}{MLA - SLR} * 100.$ Takto vychází cytotoxicita v procentech.

Použitelnost metodiky pro testování nanočástic a souhrn nejzajímavějších výsledků

LDH analýza je poměrně často využívanou metodou pro stanovení míry cytotoxicity buněčných populací vyvolané prostřednictvím nanočástic. 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 (Wörle-Knirsch et al. 2006). Navíc tato metoda není náročná na přístrojové vybavení, ale ve standartně vybavené laboratoři ji lze snadno praktikovat. S výhodou je možné provést jak LDH, tak WST-1 analýzu najednou. U LDH assay se spotřebovává pouze část ovlivněného kultivačního média, naproti tomu u WST-1 se používají ovlivněné buňky. Tímto způsobem se ušetří čas pro analýzu dvou metod, sníží se počet buněk a je možné výsledky obou metod srovnat a vyhodnotit. Nevýhodou použití této metody může být užití bezfenolového média, které by mohlo způsobit falešnou pozitivitu; je zde tedy "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 standartně kultivují v bezsérových podmínkách. Toto jsme řešili u embryonálních kmenových buněk, které se začínají diferencovat v přítomnosti séra v kultivačním médiu (Balbasi et al. 2021); nicméně existují varianty séra, které nezpůsobují diferenciaci buněk, ale jejich pořizovací cena je mnohonásobně vyšší než u běžných kultivačních médií.

LDH analýzu jsme použili pro kvantitativní stanovení cytotoxicity různých buněčných populací (C2C12 myoblasty, myší embryonální fibroblasty, plicní alveolární epitelové buňky, embryonální kmenové buňky). Tyto buněčné linie jsme vystavili působení 3 druhů nanomateriálů = grafen firmy PlasmaChem, grafen TCD a komerčně dostupný TiO₂ firmy SigmaAldrich. Metoda byla snadno aplikovatelná pro naše účely a díky ní jsme prokázali snížení viability buněčných linií v případě, že byly vystaveny působení vyšších dávek grafenu (50 – 100 μ g/ml) a delší doby působení (48 hodin dlouhá expozice); viz níže uvedený graf (Obr. 3). Tyto výsledky jsou shrnuty v publikaci "The dose- and time-dependent cytotoxic effect of graphene nanoplatelets: *in vitro* and *in vivo* study". V případě TiO₂ jsme neprokázali škodlivý vliv nanomateriálu na buněčné linie ani při vyšších dávkách nebo delší době působení nanočástic. Podobné výsledky byly popsány v publikacích Li et al. 2012, Zhang et al. 2010.



Obr. 3 Cytotoxicita nanomateriálu analyzována metodou LDH. Procento poškozených buněk se zvyšovalo v závislosti na koncentraci a délce působení grafenových nanočástic (firma PlasmaChem). Data jsou prezentována v procentech. Kontrolní vzorek nebyl ošetřen grafenem. Data jsou znázorněna se směrodatnou odchylkou, * p-value < 0,05; *** p-value < 0,001; **** p-value < 0,0001.

MTT test (test cytotoxicity)

Teoretický základ metodiky

Jedná se o kolorimetrickou metodu, kterou lze kvantitativně analyzovat buněčnou viabilitu, proliferaci a cytotoxicitu. Tato metoda je založena na metabolické aktivitě zkoumaných buněk. Během analýzy dochází ke konverzi MTT, které je rozpustné ve vodě, prostřednictvím mitochondriálních dehydrogenáz na nerozpustný formazan. Schopnost přeměny MTT na formazan je vázáno na metabolicky aktivní buňky; čím více metabolicky aktivních buněk kultura obsahuje, tím větší množství formazanu je formováno. Krystaly formazanu jsou dále rozpuštěny v DMSO a pak je destička měřena na spektrofotometru. MTT se používá v testování cytotoxicity farmaceutik.

Podrobnější popis metodiky

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

- 1. Nasazení C2C12 myoblastů na 96jamkovou destičku (0,5–2x10⁴ buněk/jamka) v 100 μ l kultivačního média (DMEM, 10% FBS, 1% ATB).
- 2. Inkubovat buňky po dobu 24 h při 37 °C a 5% CO₂.
- Odsátí média tak abychom neporušili adherovaný monolayer buněk a následné přidání grafenu rozpuštěného v kultivačním médiu v požadované koncentraci (5–100 μg/ml; triplikát). Inkubace následujících 24–48 hodin.

- Do každé jamky se napipetuje 100 μl zásobního MTT roztoku (1 g tetrazoliové soli MTT + 200 ml PBS pufru). Hotový MTT roztok se přefiltruje a uchovává rozpipetovaný po 10 ml v mrazáku při -20°C; takto připravený roztok je možné skladovat po dobu 6 měsíců.
- 5. Inkubování buněk MTT roztoku s buňkami po dobu 4 hodin při 37°C a 5% CO₂.
- 6. Odebrání média a přidání 100 µl DMSO (rozpustí formazanové krystaly)
- 7. Promíchat po dobu 10 minut na shakeru.
- 8. Měření absorbance při 490 nm na spektrofotometru; referenční vlnová délka by neměla být vyšší než 680 nm.

Použitelnost metodiky pro testování nanočástic a souhrn nejzajímavějších výsledků

MTT analýza je poměrně často využívanou metodou pro kvantifikaci buněčné viability. Její výhodou je sensitivita, ale není srovnatelná s jinými metodami podobného principu (WST-1, WST-8, LDH). Nevýhodou je nízká stabilita formazanové soli, interference v případě použití metabolicky aktivních buněk (mají vyšší množství mitochondrií, tudíž je zde pravděpodobnost zvýšené přeměny MTT na formazan, a tím vyšší riziko falešně pozitivního výsledku), u buněk podléhajících apoptóze dochází k redukci MTT díky intaktním mitochondriím, některá farmaceutika mohou ovlivnit funkci mitochondrií, což se může odrazit na výsledné produkci formazanových krystalů (Grela et al. 2015). Je nutné mít tyto limity na paměti a správně zvolit užití MTT analýzy. Nicméně je tato metoda poměrně rychlá, jednoduchá a není náročná na přístrojové vybavení, ale ve standartně vybavené laboratoři ji lze snadno praktikovat.

MTT analýzu jsme zpočátku užívali pro kvantifikaci buněčné viability, ale výsledky nebyly validní v porovnání se stabilnějšími a sensitivnějšími metodami jako bylo LDH nebo WST-1. Proto jsme tuto metodu dále nevyužívali pro zhodnocení vlivu nanočástic na kmenové buňky.

Genová kvantifikace prostřednictvím RT-qPCR (molekulární biologie, histologie)

Teoretický základ metodiky

Informace potřebné k tvorbě funkčních proteinů jsou transferovány z DNA do RNA a následně do podoby aminokyselin. Přenos informace z DNA do RNA a z RNA do aminokyselin je nazýváno transkripcí a translací. Transkripce společně s translací patří mezi tzv. genovou expresi. Genová kvantifikace je možná díky kvantifikaci množství RNA. Samotná RNA nemůže být přímo stanovena, proto je nejprve transformována do podoby DNA reverzní transkriptázou. Takto vzniklá DNA se nazývá jako komplementární DNA (cDNA) a je amplifikována prostřednictvím genově specifických primerů v přítomnosti interkalačních barviv (SYBR green) nebo hybridizačních sond (Taqman). Generované množství fluorescenčního signálu koreluje s genovou expresí. Částečně kvantifikační metody genové kvantifikace jsou často využívány pro rychlé stanovení množství genové exprese. V těchto metodách je množství RNA stanoveno použitím předem charakterizovaných "housekeeping" genů, které tvoří vnitřní standard pro normalizaci hladiny genové exprese cílového genu. Real-time qPCR je výkonný a sensitivní nástroj pro studium malých změn v genové expresi. Díky

tomu se jedná o ideální metodu pro studium vlivu nanočástic na různé geny v různých buněčných liniích.

Podrobnější popis metodiky

RNA je získána lýzou buněk prostřednictvím TRI reagencie následovanou purifikací přes silica spin columns (Zymo research RNA isolation kit).

- 1. Lýza buněk prostřednictvím 500 μl TRI Reagent.
- 2. 500 µl čistého etanolu (bez přítomnosti nukleáz) je přidáno k lyzovanému vzorku.
- 3. Směs je přenesena na silica spin columns (ten zachytí vzorek) společně s eppendorfkou (pro zachycení odpadu) a je centrifugována při 16,000 x g po dobu 30 sekund.
- 4. Eppendorfka s odpadní části vzorku je odstraněna a silica spin column je opatřen novou eppendorfkou. Poté se přidá 400 μl RNA Wash buffer do silica spin column a centrifuguje se při 16,000 x g po dobu 30 sekund. Dále se přidá 75 μl DNA digestion buffer k 5 μl DNázy I, obě reagencie jsou promíchány a přidány do silica spin column. Natrávení DNA probíhá po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Tento krok napomáhá k odstranění genomické DNA, která by mohla při kvantifikaci vytvářet falešnou pozitivitu.
- 5. Do silica spin column se přidá 400 μ l Pre-wash buffer a centrifuguje se při 16,000 x g po dobu 30 sekund.
- 6. Poté je odstraněna eppendorfka s odpadním vzorkem a krok 5. je znovu opakován.
- Do silica spin column se přidá 700 μl RNA Wash bufferu, centrifuguje se po dobou 2 minut při 16,000 x g pro kompletní odstranění pufru. Odpadní vzorek je vyhozen a silica spin column je přenesen do eppendorfky, která je prostá nukleáz.
- 8. RNA je extrahováno prostřednictvím přidání 50 μ l ultračisté vody (bez přítomností nukleáz) a centrifugováno při 16,000 x g po dobu 30 sekund.
- 9. Poté se přistupuje k syntéze cDNA a zbylá RNA je uchovávána při -80 °C.

Syntéza cDNA

- 1. Izolovaná RNA je kvantifikována prostřednictvím spektrofotometru.
- 2. 500 ng celkové RNA je použito pro cDNA syntézu.
- 3. RNA je rozpuštěna v ultračisté vodě (bez přítomnosti nukleáz) a výsledný objem je 10 µl.
- 4. Komponenty a jejich množství pro syntézu cDNA enzym mixu je následující:

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

- 5. 0 µl cDNA enzym mixu je přidáno k 10 µl rozpuštěné RNA
- 6. 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.	8

Real-time qPCR

- 1. Volba zkoumaných genů závisí na experimentu, což je nutné si stanovit před začátkem analýzy genové exprese.
- Real-time qPCR je realizována prostřednictvím kitu firmy Roche (Roche LightCycler 480 SYBR Green I master mix) a to v přítomnosti primeru komplementárního ke zkoumanému genu v koncentraci 400 nM. Celkový objem roztoku je 15 μl.
- 3. Genová exprese je vztažena k referenčnímu genu β-aktinu.
- 4. 10 ng cDNA je použito pro kvantifikaci a data jsou prezentována jako směrodatná odchylka průměru (vzorky se analyzují v triplikátech).
- 5. Real-time qPCR je realizována 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	Křivka tání
					kroku; 40	(60 °C až 95
					cyklů	°C)
Čas	5 min. 10 sec.	10	20	30 sec.		Kontinuální
		zu sec.	(přírůstek)		přírůstek	

6. Výsledky jsou vyjádřeny prostřednictvím grafu, který koreluje s CT hodnotami každého genu ve vzorku.

Použitelnost metodiky pro testování nanočástic a souhrn nejzajímavějších výsledků

Použití RT-qPCR může být zatíženo chybou, která je založena na interferenci nanočástic s průběhem RT-qPCR, proto je nutné vždy ověřovat výsledné stanovení genové exprese. Některé referenční geny jsou v přítomnosti nanočástic nestabilní, proto je nutné toto zvážit před plánováním experimentu zahrnujícího RT-qPCR a najít stabilní referenční gen.

Během našeho výzkumu jsme izolovali neurální kmenové buňky z myších embryí, a to prostřednictvím malých molekulárních inhibitorů a LIF. Nicméně studium působení nanočástic na tuto buněčnou linii je v současné chvíli rozpracováno.

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 (Obr. 4). Tyto markery by mohly sloužit k analýze změn genové exprese po působení vlivu nanočástic.



Obr. 4 Analýza genové exprese různých buněk linie embryonálních myších buněk (ES) D3 linie. Výsledky prezentují rozdíl v genové expresi diferenciovaných ES D3 buněk a nediferencovaných ES D3 buněk. β-aktin byl použit jako referenční gen a výsledek je po 6 dnech od začátku buněčné diferenciace. Data jsou vyjádřena se směrodatnou odchylkou průměru. Toto bylo publikováno v článku "BMP inhibition in the presence of LIF differentiates murine embryonic stem cells to early neural stem cells".

WST-1 test (test cytotoxicity)

Teoretický základ metodiky

Jedná se o metodu, kterou lze kvantitativně analyzovat buněčnou proliferaci, viabilitu nebo cytotoxicitu. Její princip je založen na rozložení tetrazoliové soli na formazan prostřednictvím mitochondriální dehydrogenázy. Generované množství barviva je pak přímo úměrné množství živých buněk. WST-1 se hojně používá právě pro stanovení vlivu exo- či endogenních agens na buněčnou populaci s jasně definovanými vlastnostmi (proliferační aktivita, diferenciační potenciál atd.).

Podrobnější popis metodiky

Postup WST-1 analýzy pro zjištění cytotoxického vlivu grafenu firmy PlasmaChem na adherentní linii myoblastů C2C12.

 Nasazení C2C12 myoblastů na 96jamkovou destičku (0,5–2x10⁴ buněk/jamka) v 100 μl 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 denzita buněk se může projevovat falešnou pozitivitou ve smyslu vyšší cytotoxicity.

- 2. Inkubovat buňky po dobu 24 h při 37 °C a 5% CO₂.
- Odsátí média tak abychom neporušili adherovaný monolayer buněk a následné přidání grafenu rozpuštěného v bezfenolovém kultivačním médiu v požadované koncentraci (5– 100 μg/ml; triplikát). Inkubace následujících 24–48 hodin.
- 4. Přidání 10 μl WST-1 Cell Proliferation Reagent a inkubovat po dobu 4 hodin při 37 °C a 5% CO_2.
- 5. Promíchat po dobu 1 minuty na shakeru.
- 6. Měření absorbance v rozmezí 420–480 nm na spektrofotometru; vzorky měřit proti blanku. Referenční vlnová délka by měla být vyšší než 600 nm.

Použitelnost metodiky pro testování nanočástic a souhrn nejzajímavějších výsledků

WST-1 analýza je poměrně často využívanou metodou pro stanovení míry cytotoxicity buněčných populací vyvolané prostřednictvím nanočástic. Její výhodou je sensitivita, která je mnohem vyšší než u původně užívaných metod podobného principu (XTT, MTT). Také je stabilnější a rychlejší než zmíněné MTT nebo XTT. Navíc tato metoda není náročná na přístrojové vybavení, ale ve standartně vybavené laboratoři ji lze snadno praktikovat. Nevýhodou použití této metody může být užití bezfenolového média, které by mohlo způsobit falešnou pozitivitu; je zde tedy "vyšší" investice v podobě specifického typu kultivačního média.

WST-1 analýzu jsme použili pro kvantitativní stanovení cytotoxicity různých buněčných populací (C2C12 myoblasty, myší embryonální fibroblasty, plicní alveolární epitelové buňky, embryonální kmenové buňky). Tyto buněčné linie jsme vystavili působení 3 druhů nanomateriálů = grafen firmy PlasmaChem, grafen TCD a komerčně dostupný TiO₂ firmy SigmaAldrich. Metoda byla snadno aplikovatelná pro naše účely a díky ní jsme prokázali snížení viability buněčných linií v případě, že byly vystaveny působení vyšších dávek grafenu (50–100 μ g/ml) a delší doby působení (48 hodin dlouhá expozice); viz níže uvedený graf (Obr. 5). Tyto výsledky jsou shrnuty v publikaci "The dose- and time-dependent cytotoxic effect of graphene nanoplatelets: *in vitro* and *in vivo* study". V případě TiO₂ jsme neprokázali škodlivý vliv nanomateriálu na buněčné linie ani při vyšších dávkách nebo delší době působení nanočástic. Podobné výsledky byly popsány v publikacích Wang et al. 2011 a Chang et al. 2011.



Obr. 5 Cytotoxicita nanomateriálu analyzována prostřednictvím WST-1. Procento poškozených buněk se zvyšovalo v závislosti na dávce a délce inkubace s grafenem (firma Plasmachem). Data jsou prezentována v %, kdy kontrola nebyla ošetřena grafenem a jsou znázorněny se směrodatnou odchylkou. ** p-value < 0,01; *** p-value < 0,001.

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 a morfologii. Pro sledování tohoto "biologického statutu" buňky není zapotřebí žádného značení buněk, ale měří se změna elektrické impedance prostřednictvím zabudovaných mikroelektrod na dně speciálních destiček určených přímo pro tuto metodu. Sledování těchto změn v reálném čase je umožněno prostřednictvím speciálního softwaru, který uživateli poskytuje analyzovat data v průběhu experimentu. Jakmile buňky přisednou na dno jamek s mikroelektrodami, dojde ke změně tzv. cell indexu (CI). Jestliže buňky nepřisednou na dno jamek, hodnota CI je 0; jestliže dojde k adhezi, hodnota CI roste s množstvím adherovaných buněk. Změna tvaru, viability a proliferace se také promítá do celkové hodnoty CI. Tímto způsobem je možné evaluovat buněčnou proliferaci, cytotoxicitu, adhezi, viabilitu nebo kvantifikaci IC₅₀.

Podrobnější popis metodiky

Protokol pro RTCA DP systém xCELLigence pro zjištění vlivu grafenu firmy PlasmaChem na adherentní linii myoblastů C2C12

 Nejprve je nutné si předem připravit a promyslet rozložení destičky (layout). Každá destička má 16 jamek, která pojme až 200 µl kultivačního média s buňkami. Také je potřeba nastavit parametry experimentu (měření všech destiček najednou/separátně, kolik buněk bude v jedné jamce, koncentraci grafenu, jak dlouho se bude měřit, kdy se přidají nanočástice, počet sweeps za hodinu/minutu). Je nutno dopředu vědět za jakou dobu buňky dosáhnou fáze plató – v této fázi se obvykle přidávají nanočástice.

- Nasazení C2C12 myoblastů na destičku pro RTCA DP systém (100–1500 buněk/jamka) v 100 μl kultivačního média (DMEM, 10% FBS, 1% ATB).
- 3. Inkubovat buňky po dobu 24 h při 37 °C a 5% CO₂.
- 4. Příprava média s různými koncentracemi grafenu ((5–100 μg/ml; triplikát). Poté je 100 μl kultivačního média s rozpuštěným grafenem opatrně přidáno na destičku. Není doporučeno zcela odsát původní kultivační médium a přidat nové médium s nanočásticemi, protože dojde k porušení adherovaného monolayeru, což má za následek změnu CI. Inkubace následujících 24–48 hodin.
- 5. Vyhodnocení plotu a hodnot CI.

Použitelnost metodiky pro testování nanočástic a souhrn nejzajímavějších výsledků

xCELLigence není rozšířenou metodou pro sledování buněčné proliferace a cytotoxicity jako běžně dostupné testy (WST-1, LDH, XTT, MTT atd.), a to především díky vyšší investici do přístrojového vybavení a destiček s mikroelektrodami, které lze použít pouze jedenkrát. Nicméně tato metoda značně vyniká v zachycení změn v buněčné viabilitě, proliferaci, adhezi a morfologii v reálném čase a není tak omezena jako klasické end-point analýzy. Jestliže je dobře připraven celý experiment, tak data poskytují validní výsledky o poměrně široké škále buněčných vlastností.

Sledování viability a adheze buněk jsme používali pro vyhodnocení cytotoxického vlivu grafenu (PlasmaChem, TCD) a oxidu titaničitého na různé buněčné linie (C2C12 myoblasty, plicní alveolární epitelové buňky, embryonální kmenové buňky). Metoda byla snadno aplikovatelná pro naše účely a díky ní jsme prokázali snížení viability buněčné linie plicních alveolárních epitelových buněk v případě, že byly vystaveny působení vyšších dávek grafenu (50–100 µg/ml) a delší doby působení (48 hodin dlouhá expozice); viz níže uvedený graf (Obr. 6, 7). Tyto výsledky jsou shrnuty v publikaci "The dose- and time-dependent cytotoxic effect of graphene nanoplatelets: *in vitro* and *in vivo* study". V případě TiO₂ jsme neprokázali škodlivý vliv nanomateriálu na buněčné linie ani při vyšších dávkách nebo delší době působení nanočástic. Monitorování biologického statutu buněk bylo použito i v jiných studiích, které zkoumaly potenciálně toxický vliv nanočástic na buněčné kultury (Kvakova et al. 2021).



Obr. 6 Sledování CI plicních alveolárních epitelových buněk v reálném čase. Buňky byly vystaveny vlivu grafenových nanočástic po 24hodinové inkubaci a byly sledovány následujících 24 hodin. Legenda k obrázku: tmavě modrá (5 μg/ml), tmavě červená (10 μg/ml), zelená (20 μg/ml), fialová (50 μg/ml), tyrkysová (100 μg/ml).



Obr. 7 Sledování CI plicních alveolárních epitelových buněk v reálném čase. Buňky byly vystaveny vlivu grafenových nanočástic po 24hodinové inkubaci a byly sledovány následujících 48 hodin. Legenda k obrázku: tmavě červená (5 μg/ml), zelená (10 μg/ml), tmavě modrá (20 μg/ml), fialová (50 μg/ml), tyrkysová (100 μg/ml).

Transmisní elektronová mikroskopie

Teoretický základ metodiky

Transmisní elektronová mikroskopie představuje klíčovou metodu umožňující vizualizovat nanočástice a identifikovat jejich lokalizaci v buňkách kultivovaných *in vitro* nebo ve tkáních laboratorních zvířat vystavených působení nanočástic. Po fixaci a zalití kultivovaných buněk nebo vzorků tkání do pryskyřice se zhotoví nejprve polotenké řezy, které lze pozorovat ve světelném mikroskopu a slouží k vyhledání oblasti řezu vhodné pro vyšetření v transmisním elektronovém mikroskopu. Poté se zhotoví ultratenké řezy o tloušťce 50–60 nm, která je nutná pro průchod elektronů řezem. Transmisní elektronový mikroskop funguje na principu prozáření ultratenkého řezu svazkem urychlených elektronů, přičemž některé elektrony řezem procházejí bez ovlivnění a u jiných dochází k interakcím s atomy součástí buněk a k jejich rozptylu. Výsledný obraz vzniká na fluorescenčním stínítku. Zvětšení a rozlišení dosahovaná transmisním elektronovým mikroskopem poskytují možnost pozorovat částice o rozměru několika nanometrů.

Podrobnější popis metodiky

Postup zpracování buněčných kultur pro transmisní elektronovou mikroskopii a vyšetření v transmisním elektronovém mikroskopu:

1. Fixace buněk je chemická a probíhá ve dvou krocích. Nejprve se buňky fixují 3% glutaraldehydem v 0,1 M kakodylátovém pufru (pH 7,2; Sigma) po dobu 3 hodin při pokojové teplotě. Po oplachu v 0,1 M kakodylátovém pufru (pH 7,2) jsou buňky dofixovány 1% oxidem osmičelým v 0,1 M kakodylátovém pufru (pH 7,2; Sigma) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Následuje důkladný oplach v 0,1 M kakodylátovém pufru (pH 7,2). Fixace buněk je provedena přímo v kultivačních nádobkách.

2. Po fixaci jsou buňky dehydratovány vzestupnou alkoholovou 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 a pryskyřice polymeruje po dobu 3 dnů při 60 °C za vzniku tzv. bločku.

3. Na ultramikrotomu (Ultrotome Nova, LKB, Švédsko) se z bločků krájí ručně zhotoveným skleněným nožem polotenké řezy o tloušťce 0,5 nebo 1 µm, které jsou přeneseny na skleněné podložní sklíčko, barví 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 zkrojením, aby se zredukovala plocha řezu, přičemž oblast zájmu zůstává zachovaná.

4. Poté se na ultramikrotomu krájí diamantovým nožem ultratenké řezy o tloušťce 50 až 60 nm, které jsou přeneseny na speciální měděné nebo niklové síťky potažené "formvarovým"
filmem a naprášené uhlíkem. Pro zvýšení kontrastu se ultratenké řezy dobarvují, tzv. kontrastují, uranyl acetátem a citrátem olovnatým.

5. Ultratenké řezy jsou vyšetřeny v transmisním elektronovém mikroskopu JEOL JEM 1400Plus při 120 kV. Výsledné obrazy jsou nasnímány integrovanou 8Mpix CCD kamerou a zpracovány pomocí softwaru TEM Center (Ver. 1.7.3.1537, JEOL, Japan).

Použitelnost metodiky pro testování nanočástic

Transmisní elektronová mikroskopie má významnou úlohu při testování toxicity nanočástic, neboť umožňuje jejich identifikaci, charakterizaci tvaru a velikosti a potvrzení jejich internalizace v buňkách kultivovaných *in vitro*, popř. ve tkáních laboratorních zvířat po expozici nanočásticím. Je to jediná metoda, která poskytuje přesnou informaci o výskytu nativních, tzn. neznačených, nanočástic v jednotlivých buněčných kompartmentech, např. v cytosolu, mitochondriích, autofagosomech, jádře. Vhodná je především pro elektrondenzní anorganické nanočástice, jako je TiO₂, nicméně nanočástice grafenu dosahují dostatečného kontrastu nezbytného k jejich vizualizaci. Nevýhodou transmisní elektronové mikroskopie je časová i finanční náročnost a nezbytnost provedení na specializovaném pracovišti vyškolenými pracovníky.

Při zpracování buněčných kultur exponovaných nanočásticím pro transmisní elektronovou mikroskopii je diskutabilní použití diamantového nože ke krájení ultratenkých řezů a kontrastování ultratenkých řezů. Při krájení ultratenkých řezů, které obsahují buňky s internalizovanými nanočásticemi, dochází ve větší míře ke vzniku zubů na ostří diamantového nože. Vzhledem k tomu, že broušení diamantového nože je finančně velmi nákladné, nabízí se alternativa krájet ultratenké řezy ručně zhotoveným skleněným nožem. Řezy zhotovené skleněným nožem však mívají větší tloušťku, což vede k nižší kvalitě obrazu v transmisním elektronovém mikroskopu. Kontrastování ultratenkých řezů může zapříčinit vznik artefaktů, které by mohly být při pozorování v transmisním elektronovém mikroskopu chybně považované za nanočástice. Identifikace nanočástic TiO₂ je díky jejich charakteristickému tvaru a velikosti jednoznačná i na kontrastovaných ultratenkých řezech. Nanočástice grafenu se v buňkách obvykle částečně shlukují, přičemž zkušený odborník je schopný odlišit je od artefaktů způsobeních kontrastováním ultratenkých řezů. Při pochybnostech je možné kontrastování řezů vynechat, čímž sice dojde ke snížení kvality kontrastu obrazu v transmisním elektronovém mikroskopu, ale zabrání se chybnému vyhodnocení.

Souhrn nejzajímavějších výsledků

Transmisní elektronová mikroskopie potvrdila internalizace nanočástic TiO₂ (P25 disperze) buňkami linie A549 po expozici v kultivačním médiu s přídavkem fetálního bovinního séra a bez přídavku fetálního bovinního séra. Nanočástice TiO₂ se vyskytovaly v cytoplazmě buněk především ve váčcích tvořených biomembránou. Na volném povrchu

buněk, který byl v kontaktu s kultivačním mediem, se nacházely štíhlé cytoplazmatické výběžky, v jejichž blízkosti se nanočástice TiO₂ akumulovaly (Báčová et al., 2022) (Obr. 1).



Obr. 1 Buňky linie A549 exponované nanočásticím TiO₂ v kultivačním médiu s přídavkem fetálního bovinního séra (**A**, **B**) a bez přídavku fetálního bovinního séra (**C**, **D**). m, mitochondrie; ld, tuková kapénka; n, jádro. Měřítko A, B, D 1 μ m, C 5 μ m.

Transmisní elektronová mikroskopie prokázala internalizaci nanočástic grafenu ze dvou rozdílných zdrojů (z Trinity College Dublin, Irsko a od firmy PlasmaChem) po krátkodobé a dlouhodobé (8týdenní) kultivaci při 3 různých koncentracích nanočástic v kultivačním mediu do buněk linie A549. Většina buněk linie A549, které byly exponované nanočásticím grafenu (z firmy PlasmaChem) o koncentraci 30 µg/ml po dobu 48 h, tyto nanočástice internalizovala. Akumulovaly se ve váčcích tvořených biomembránou, ale menší shluky byly pozorovány i volně v cytoplazmě buněk.

Váčky s nanočásticemi se nejčastěji vyskytovaly v blízkosti volného povrchu buněk. Po dlouhodobé kultivaci, při zachování shodné koncentrace nanočástic, se nanočástice nacházely v buňkách výhradně ve váčcích tvořených biomembránou, které dosahovaly větších rozměrů než po krátkodobé kultivaci a vyskytovaly se ve všech oblastech cytoplazmy buněk (Šestáková et al., 2022) (Obr. 2).



Obr. 2 Buňky linie A549 exponované nanočásticím grafenu (z firmy PlasmaChem) po krátkodobé (**A**) a dlouhodobé (**B**) kultivaci. m, mitochondrie; n, jádro. Měřítko A, 1 μ m, B 2 μ m.

Literatura:

Balbasi E., Guven G., Cizmecioglu N.T. Mouse embryonic stem cell culture in serum-containing or 2i conditions. Methods in Molecular Biology. 2021: 275-294.

Gao H., Hammer T., Zhang X., He W., Xu G., Wang J. Quantifying respiratory tract deposition of airborne graphene nanoplatelets: the impact of plate-like shape and folded structure. Nanoimpact. 2021; 21:100292.

Grela E., Zabek 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.

Kim J. K., Shin J.H., Lee J.S., Hwang J.H., Lee J.H., Baek J.E., Kim T.G., Kim B.W., Kim J.S., Lee G.H. et al. 28-day inhalation toxicity of graphene nanoplatelets in Sprague-Dawley rats. Nanotoxicology. 2016; 10:891-901.

Chang Y., Yang S.T., Liu J.H., dong E., Wang Y., Cao A., Liu Y., Wang H. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. Toxicol Lett 2011; 200:201-210.

Kolesová H., Olejníčková V, Kvasilová A., Gregorovičová M., Sedmera D. Tissue clearing and imaging methods for cardiovascular development. iScience. 2021; 24(4): 102387.

Kvakova M., Stroffekova K., Stofilova J., Girman V., Bomba A., Antalik M. Toxicological evaluation of fluorescent 11-mercaptoundecanoic gold nanoclusters as promising label-free bioimaging probes in different cancer cells lines. Toxicol In Vitro. 2021; 73: 105140.

Li Y., Liu Y., Fu Y., Wei T., Le guyader L., Gao C., Liu R.S., Chang Y.Z., Chen Ch. The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF-beta signaling pathways. Biomaterials. 2012; 33:402-411.

Shin J.H., Han S.G., Kim J.K., Kim B.W., Hwang J.H., Lee J.S., Baek J.E., Kim T.G., Kim K.S. et al. 5-day repeated inhalation and 28-day post-exposure study of graphene. Nanotoxicology. 2015; 9:1023-1031.

Wang K., Ruan J., Song H., Zhang J., Wo Y., Guo S., Cui D. Biocompatibility of graphene oxide. Nanoscale Res Lett. 2011; 6, 8.

Wörle-Knirsch J.M., Pulskamp K., Krug H.F. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. Nano Lett 2006; 6: 1261-1268.

Zhang Y, Ali S.F., Dervishi E., Xu Y., Li Z., Casciano D., Biris A.S. Cytotoxic effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural phaeochromocytoma-derived PC12 cells. ACS Nano. 2010; 4:3181-3186.

Bacova J., Knotek P., Kopecka K., Hromadko L., Capek J., Majtnerova P., Bruckova L., Schröterova L., Sestakova B., Palarcik J., Motola M., Cizkova D., Bezrouk A., Handl J., Fiala Z., Rudolf E., Bilkova Z., Macak J., Rousar T. Evaluating the Use of TiO2 Nanoparticles for Toxicity Testing in Pulmonary A549 Cells. International Journal of Nanomedicine. In Press 2022

Šestáková B., Schröterová L., Bezrouk A., Čížková D., Elkalaf M., Havelek R., Rudolf E., Králová V. The Effect of Chronic Exposure of Graphene Nanoplates on the Viability and Motility of A549 Cells. Nanomaterials. 2022; 12(12):2074. https://doi.org/10.3390/nano12122074