

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



**UNIVERZITA KARLOVA**  
1. lékařská fakulta

**Mgr. Marcela Filipová**

Studium buněčné toxicity vybraných nanočástic v tkáňových kulturách

Study of Cellular Toxicity of Representative Nanoparticles in Tissue Cultures

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce: doc. Ing. Karel Holada, Ph.D.

Praha, 2019

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 12.11.2019

Marcela Filipová

Podpis

**Identifikační záznam:**

FILIPOVÁ, Marcela. *Studium buněčné toxicity vybraných nanočástic v tkáňových kulturách. [Study of Cellular Toxicity of Representative Nanoparticles in Tissue Cultures]*. Praha, 2019. 109 s., 3 přílohy. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav imunologie a mikrobiologie. Vedoucí práce Holada, Karel.

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli doc. Ing. Karlovi Holadovi, Ph.D. za velkou trpělivost, cenné rady a odborné vedení během celého studia.

Mgr. Adamovi Schröfelovi, Ph.D. a RNDr. Dušanovi Cmarkovi, Ph.D. z Ústavu biologie a lékařské genetiky, 1. LF UK a VFN v Praze za pomoc a odbornou asistenci při provedení transmisní elektronové mikroskopie.

Děkuji také dr. Janu Simakovi, Ph.D. z „Laboratory of Cellular Hematology, Center for Biologics Evaluation and Research, U.S. Food and Drug Administration“ v Rockvillu, MD, USA a všem členům této laboratoře, zejména pak Silvii H. De Paoli, Ph.D. a Tseday Z. Tegegn, za velkou pomoc při společné mezilaboratorní spolupráci a při mé zahraniční stáži v USA.

V neposlední řadě patří mé poděkování Mgr. Olze Šebestové Janouškové, Ph.D. za trpělivost a podporu zejména v období dokončování disertační práce a dále všem bývalým i současným kolegům z Ústavu imunologie a mikrobiologie, 1. LF UK a VFN v Praze a z Ústavu makromolekulární chemie, AV ČR za spolupráci.

*Práce vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (grant LH12014) a za sponzorství nadace „Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových“.*

## Obsah

<b>Abstrakt.....</b>	<b>8</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>10</b>
<b>Seznam zkratek.....</b>	<b>12</b>
<b>1 Úvod.....</b>	<b>16</b>
1.1 Nanočástice.....	16
1.1.1 Klasifikace NMs a NPs.....	17
1.1.2 Křemíkové NPs.....	18
1.1.3 SPIONs .....	20
1.1.4 CNTs.....	22
1.2 Cytotoxicita NPs a typy buněčné smrti .....	26
1.2.1 Apoptóza.....	26
1.2.2 Autofágie.....	28
1.2.3 Nekróza .....	30
1.3 Mechanizmy cytotoxicity NPs.....	32
1.3.1 Cytotoxicita na úrovni vstupu NPs do buněk .....	32
1.3.2 Vnitrobuněčné cytotoxické působení NPs .....	34
1.3.3 Narušení degradace a odstraňování NPs z buněk .....	37
<b>2 Hypotézy a cíle práce .....</b>	<b>38</b>
<b>3 Materiál a metody .....</b>	<b>40</b>
3.1 NMs .....	40
3.2 Pufry a roztoky .....	40
3.3 Funkcionalizace MWCNTs .....	40
3.3.1 Karboxylace MWCNTs .....	40
3.3.2 Adsorpce proteinů na povrch CNTCOOHs .....	41
3.4 Charakterizace NPs.....	41
3.4.1 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM).....	41
3.4.2 Fluorescenčně aktivovaná průtoková cytometrie.....	41

3.4.3	Separace funkcionalizovaných CNTs na sacharózovém gradientu .....	42
3.4.4	Dynamický rozptyl světla (DLS) .....	42
3.4.5	Zeta potenciál .....	43
3.4.6	Spektroskopická analýza .....	43
3.5	Kultivace a uchování buněk .....	43
3.6	Screeningová esej pro ohodnocení cytotoxicity a typu buněčné smrti .....	44
3.6.1	Příprava buněk pro esej .....	44
3.6.2	Aplikace testovaných látek a příslušných kontrol .....	44
3.6.3	Ohodnocení nekrotického působení .....	44
3.6.4	Ohodnocení životaschopnosti buněk .....	45
3.6.5	Stanovení intaktních jader a apoptotických tělísek .....	46
3.7	Interference CNTCOOHs s LDH esejí .....	46
3.8	Intracelulární působení fCNTs .....	47
3.8.1	Fluorescenční značení CNTCOOHs .....	47
3.8.2	Konfokální laserová rastrovací mikroskopie .....	47
3.8.3	TEM .....	48
3.9	Detekce proteinů pomocí SDS-PAGE a Western blotu .....	48
3.10	Statistika .....	50
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>51</b>
4.1	Charakterizace NPs .....	51
4.1.1	Tvar, velikost, náboj a aglomerace NPs .....	51
4.1.2	Charakterizace fCNTs odlišnými proteinovými koronami .....	55
4.2	Stanovení cytotoxicity NPs <i>in vitro</i> .....	60
4.2.1	Vývoj CDS eseje .....	60
4.2.2	Ověření funkčnosti CDS eseje .....	64
4.2.3	Cytotoxicita SiNPs, SPIONs a CNTCOOHs stanovená pomocí CDS eseje .....	69

4.2.4	Interference CNTCOOHs s LDH esejí .....	73
4.3	Modulace cytotoxicity CNTCOOHs .....	75
4.3.1	Intracelulární lokalizace fCNTs .....	75
4.3.2	Vliv proteinové korony na cytotoxicitu CNTCOOHs .....	78
4.3.3	Proteinová korona z IgG a HSA ovlivňuje míru apoptotického a nekrotického působení vyvolaných vlivem CNTCOOHs.....	80
4.3.4	Proteinová korona z IgG a HSA snižuje akumulaci autofagických vezikulů vyvolanou působením CNTCOOHs .....	84
4.3.5	Snížení cytotoxicity CNTCOOHs prostřednictvím stimulace autofagického toku.....	85
<b>5</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>87</b>
5.1	CDS esej ke stanovení cytotoxicity NPs a ohodnocení typu buněčné smrti .....	87
5.2	Stanovení cytotoxicity SPIONs, SiNPs a CNTCOOHs pomocí CDS eseje.....	88
5.3	Rozšířený výzkum typů a mechanismů buněčné smrti vyvolaných působením CNTCOOHs .....	89
5.4	Modulace cytotoxicity CNTCOOHs prostřednictvím specifické proteinové korony a farmakologického působení.....	91
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>Seznam příloh .....</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>Použitá literatura.....</b>	<b>98</b>

## Abstrakt

Bezpečnostní rizika, která vyplývají z cytotoxického působení nanočástic (NPs) v komplexním biologickém prostředí, zůstávají hlavním problémem, který limituje využití NPs v biomedicíně. V této studii byla vyšetřována cytotoxicita NPs odlišného složení, tvaru a velikosti, jmenovitě SiO<sub>2</sub> NPs (SiNPs, 7-14 nm), superparamagnetických NPs oxidů železa (SPIONs, 8 nm) a karboxylovaných mnohovrstevných uhlíkových nanotub (CNTCOOHs, průměr: 60-100 nm, délka: 1-2 μm). Cytotoxicita byla vyhodnocena pomocí nově navržené screeningové eseye schopné současně stanovit aktivitu buněčných dehydrogenáz, aktivitu laktát dehydrogenázy (LDH) uvolněné z buněk do okolí a počet intaktních buněčných jader a apoptotických tělísek v kultuře lidských endotelových buněk izolovaných z pupečnickové žíly (HUVEC) rostoucích v jedné jamce 96-jamkové destičky. Zmíněné znaky byly následně využity k získání informace o životaschopnosti buněk a nekrotických a apoptotických aspektech buněčné smrti. Výsledky z této “tři v jednom” screeningové eseye buněčné smrti (CDS) ukázaly, že SiNPs a CNTCOOHs vyvolávaly výrazné cytotoxické působení projevující se poklesem životaschopnosti buněk a rozvojem tvorby apoptotických tělísek. Naproti tomu SPIONs navozovaly pouze mírnou cytotoxicitu. SiNPs navíc narušovaly buněčnou membránu vedoucí ke zvýšenému uvolňování LDH (nekrotický typ působení) mírně pozorovanému také po aplikaci SPIONs. V případě CNTCOOHs nemohly být tyto nekrotické změny stanoveny kvůli pozoruhodně silné interferenci CNTCOOHs s komponentami LDH eseye jako vnitřní součástí CDS eseye. V navazujícím výzkumu jsme se soustředili na vliv složení proteinového obalu (tzv. proteinové korony) na buněčnou toxicitu CNTCOOHs. Výsledky z CDS eseye naznačily, že předem formovaný proteinový obal z imunoglobulinu G (IgG) podporoval cytotoxické působení CNTCOOHs navozující sníženou aktivitu buněčných dehydrogenáz, zatímco proteinový obal z lidského sérového albuminu (HSA) měl spíše protektivní účinky projevující se zvýšenou přítomností intaktních buněčných jader a zároveň sníženou tvorbou apoptotických tělísek. Cytotoxické působení CNTCOOHs bez proteinové korony vedoucí k akumulaci autofagických vezikulů u buněk HUVEC bylo také významně zmírněno, a to stimulací autofagického toku  $\leq 1$  nM makrolidovým antibiotikem bafilomycinem A1. Ve shrnutí naše výsledky naznačují, že použití vhodné proteinové korony v kombinaci s farmakologickou stimulací autofagického toku by v budoucnu mohlo být jedním ze slibných přístupů umožňujících minimalizaci cytotoxického působení alespoň některých druhů NPs.



**Klíčová slova:** uhlíkové nanotuby, křemíkové nanočástice, superparamagnetické nanočástice oxidů železa, apoptóza, nekróza, autofágie, cytotoxicita, nanočástice, proteinová korona, lidský sérový albumin, imunoglobulin G, bafilomycin A1

## Abstract

Safety concerns arising from cytotoxic behavior of nanoparticles (NPs) in complex biological environment remain the main problem limiting NPs application in biomedicine. In this study, we have investigated cytotoxicity of NPs with different composition, shape and size, namely SiO<sub>2</sub> NPs (SiNPs, 7-14 nm), superparamagnetic iron oxide NPs (SPIONs, 8 nm) and carboxylated multiwalled carbon nanotubes (CNTCOOHs, diameter: 60-100 nm, length: 1-2 μm). Cytotoxicity was evaluated with newly designed screening assay capable to simultaneously assess activity of cell dehydrogenases, activity of lactate dehydrogenase (LDH) released from cells into environment and number of intact cell nuclei and apoptotic bodies in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) culture growing in the very same well of the 96-well plate. Aforementioned attributes were subsequently utilized to obtain information about cell viability and necrotic and apoptotic aspects of cell death. Results from this „three-in-one“ cell death screening (CDS) assay showed that SiNPs and CNTCOOHs evoked pronounced cytotoxic effect demonstrated as decrease of cell viability and development of apoptotic bodies formation. In contrast to this, SPIONs induced only mild cytotoxicity. Moreover, SiNPs impaired cell membrane leading to increased LDH release (necrotic type of activity) slightly visible also after application of SPIONs. In the case of CNTCOOHs, necrotic changes could not be evaluated due to remarkably strong interference of CNTCOOHs with components of LDH assay as an intern compound of CDS assay. In the subsequent investigation, we have focused on influence of protein coating (so called protein corona) composition on cell toxicity of CNTCOOHs. Results from CDS assay implied that preformed protein coating from immunoglobulin G (IgG) supported cytotoxic effect of CNTCOOHs which induced decrease in cell dehydrogenases activity, while coating with human serum albumin (HSA) had rather protective effects manifesting as increase in intact cell nuclei alongside with decrease in apoptotic bodies formation. Cytotoxic influence of CNTCOOHs without protein corona leading to accumulation of autophagic vesicles in HUVEC cells was also significantly attenuated specifically by stimulation of autophagic flux with  $\leq 1$  nM macrolide antibiotics bafilomycin A1. In summary, our results suggest that using of appropriate protein corona in combination with pharmacological stimulation of autophagic flux could be in the future one of the promising approaches enabling to minimize the cytotoxic impact of at least some types of NPs.

**Keywords:** carbon nanotubes, silica nanoparticles, superparamagnetic iron oxide nanoparticles, apoptosis, necrosis, autophagy, cytotoxicity, nanoparticles, protein corona, human serum albumin, immunoglobulin G, bafilomycin A1

## Seznam zkratek

ANOVA	analýza rozptylu (analysis of variance)
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1
Atg	autophagy-related
BCA	2,2'-bichinolin-4,4'-dikarboxylová kyselina (2,2'-Biquinoline-4,4'-dicarboxylic acid)
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitro-tetrazoliová modř (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium)
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BECLIN 1	coiled-coil myosin-like Bcl-2-interacting protein
CCD	zařízení s vázanými náboji (charge-coupled device)
CCK-8	kit-8 pro počítání buněk (cell counting kit-8)
CDS	screening buněčné smrti (cell death screening)
CNT	uhlíková nanotuba (carbon nanotube)
CNTCOOH	karboxylovaná uhlíková nanotuba (carboxylated carbon nanotube)
CPT	kamptotecin (camptothecin)
CQ	chlorochin (chloroquine)
D <sub>H</sub>	hydrodynamický průměr
DISC	death-inducing signaling complex
DLS	dynamický rozptyl světla (dynamic light scattering)
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DR3	death receptor 3
DTT	dithiotreitol
EDAC	1-etyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimide, hydrochloride)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (ethylenediaminetetraacetic acid)
EGM-2	endoteliální buněčné růstové médium-2 (endothelial cell growth medium-2)
EMA	Evropská léková agentura (European Medicines Agency)
ER	endoplazmatické retikulum

FACS	fluorescenčně aktivovaná průtoková cytometrie (fluorescence-activated cell sorting)
FADD	Fas-associated protein with death domain
FBS	fetální hovězí sérum (fetal bovine serum)
fCNT	funkcionalizovaná uhlíková nanotuba (functionalized carbon nanotube)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FSC	přímý rozptyl (forward scatter)
FSC-A	přímý rozptyl – plocha (forward scatter – area)
GTP	guanosintrifosfát (guanosinetriphosphate)
hEGF	lidský rekombinantní epidermální růstový faktor (human recombinant epidermal growth factor)
HEPES	2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl) ethansulfonová kyselina
hFGF-B	lidský růstový faktor fibroblastů – základní s heparinem (human fibroblast growth factor – basic with heparin)
HSA	lidský sérový albumin (human serum albumin)
HSA –CNTCOOH	karboxylovaná uhlíková nanotuba s adsorbovaným lidským sérovým albuminem
Hsc70	heat shock cognate protein 70
HUVEC	lidská endotelová buňka izolovaná z pupečnickové žíly (human umbilical vein endothelial cell)
IgG	imunoglobulin G
IgG-CNTCOOH	karboxylovaná uhlíková nanotuba s adsorbovaným imunoglobulinem G
IONP	nanočástice oxidů železa (iron oxide nanoparticle)
LC3	microtubule-associated protein 1 light chain 3
LC3B	microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta
LC <sub>50</sub>	letální koncentrace, 50% (lethal concentration, 50%)
LDH	laktát dehydrogenáza
MES	hemisodná sůl kyseliny 2-(N-morfolino)ethansulfonová (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid hemisodium salt)
MLKL	mixed lineage kinase domain like pseudokinase
mSiNP	mezoporézní křemíková nanočástice (mesoporous silica nanoparticle)
MWCNT	mnohvrstevná uhlíková nanotuba (multi-walled carbon nanotube)
NH <sub>2</sub> -PS	aminem modifikovaný polystyren
NHS	N-hydroxysukcinimid

NIR	blízká infračervená oblast (near-infrared)
NLS	jaderná lokalizační sekvence (nuclear localization sequence)
NM	nanomateriál (nanomaterial)
NP	nanočástice (nanoparticle)
NPC	komplex jaderného póru (nuclear pore complex)
PARP	poly(ADP-ribose) polymerase
PARP-1	poly(ADP-ribose) polymerase-1
PB	fosfátový pufr (phosphate buffer)
PBS	fosfátem pufovaný solný roztok (phosphate buffered saline)
PDI	polydisperzní index
PE	fosfatidylethanolamin (phosphatidylethanolamine)
PFA	paraformaldehyd
R3-IGF-1	rekombinantní dlouhý R3 inzulínu podobný růstový faktor-1 (recombinant long R3 insulin like growth factor-1)
RES	retikuloendoteliální systém
RIP1	receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
RIP3	receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SDS	dodecylsírán sodný (sodium dodecyl sulphate)
SDS-PAGE	proteinová akrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS (SDS-protein acrylamide gel electrophoresis)
SEM	střední chyba průměru (standard error of the mean)
SiNP	křemíková nanočástice (silica nanoparticle)
SNARE	soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor
sSiNP	neporézní křemíková nanočástice (solid silica nanoparticle)
SPION	superparamagnetická nanočástice oxidů železa (superparamagnetic iron oxide nanoparticle)
SSC	boční rozptyl (side scatter)
SSC-A	boční rozptyl – plocha (side scatter – area)
ST	staurosporin
SWCNT	jednovrstevná uhlíková nanotuba (single-walled carbon nanotube)
TBS	solný roztok pufovaný Trisem (Tris buffered saline)
TBS-T	solný roztok pufovaný Trisem s 0,05% Tweenem 20 (Tris buffered saline with 0,05% Tween 20)

TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TEOS	tetraethylortosilikát
TNF	tumor necrosis factor
TNF-R1	tumor necrosis factor-receptor 1
Tn X-100	Triton X-100
TRAIL-R2	TNF-related apoptosis inducing ligand–receptor 2
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
ULK1	Unc-51 like autophagy activating kinase 1
UPR	odpověď na nesbalené proteiny (unfolded protein response)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
VPS34	vacuolar protein sorting 34
WST-8	1-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(2,4-disulfofenyl)-5-(4-nitrofenyl)formazan, hydrát disodné soli

# 1 Úvod

## 1.1 Nanočástice

Nanočástice (nanoparticles - NPs) jsou definovány jako (nano)objekty, jejichž tři vnější rozměry dosahují nanometrového rozsahu, tj. velikosti 1-100 nm (Boverhof D. R. et al., 2015). Vzhledem k široké rozmanitosti tvarů různých typů NPs, některé typy, např. uhlíkové nanotuby (carbon nanotubes - CNTs) trubicovitého tvaru, nespĺňují tuto definici a spadají tak spíše do kategorie „nanomateriály“. Nanomateriály (NMs - nanomaterials) jsou pak definovány jako materiály, které disponují vnějším rozměrem, vnitřní strukturou nebo povrchovou strukturou, nanometrového rozsahu (Boverhof D. R. et al., 2015). Nanometrové rozměry a velký poměr povrchu k objemu v kombinaci s dalšími vlastnostmi, jakými jsou např. tepelná vodivost (CNTs), optické (zlaté NPs) nebo magnetické vlastnosti (superparamagnetické nanočástice oxidů železa - superparamagnetic iron oxide nanoparticles - SPIONs), propůjčují NPs unikátní fyzikálně-chemické charakteristiky, které mohou být využity v biologii a medicíně (Capjak I. et al., 2017; Jianwei C. et al., 2000; Murali K. et al., 2018; Wahajuddin a Arora S., 2012). Široké spektrum biomedicínských aplikací NPs a NMs zahrnuje např. vývoj fototermiální terapie, kontrastních agens pro magnetickou rezonanci nebo vývoj biologických fluorescenčních značek (Salata O., 2004). NMs mohou být uplatněny také v tkáňovém inženýrství, při detekci proteinů nebo při vývoji systémů pro cílenou dopravu genů a léků (Murali K. et al., 2018; Salata O., 2004).

Pro správnou interakci NPs s biologickým materiálem (případně v biologickém systému) je často nezbytné opatřit NPs molekulárním obalem, který vytvoří vhodné biologicko-anorganické rozhraní. Molekulární obal může přidatně obsahovat fluorescenční značku, protilátku, biopolymer (např. kolagen) nebo protektivní vrstvu, která umožní dosažení žádoucích vlastností (Salata O., 2004). Vhodně zvolená povrchová vrstva může ovlivnit také rychlost biodegradace a tím i dobu cirkulace NPs v oběhové soustavě (Stepien G. et al., 2018). Při interakci NPs s biologickými tekutinami může navíc docházet k adsorpci látek (iontů, proteinů, lipidů, nukleových kyselin atd.) z okolního prostředí na povrch NPs. Prominentní úlohu zde mají především plazmatické proteiny, které opsonizují NPs a podílejí se na formování tzv. proteinové korony. Proteinová korona ovlivňuje výsledné fyzikálně-chemické vlastnosti NPs a do velké míry určuje chování NMs a NPs v biologických systémech (Capjak I. et al., 2017).



Rozmanité spektrum modifikací „šitých na míru“, které na jedné straně umožňují vývoj NPs přesně navržených k daným účelům, může mít na straně druhé výrazný vliv na biologické prostředí (Sukhanova A. et al., 2018). Interakce NPs s biologickými tekutinami může i pozměnit jejich vlastnosti a vést k odlišnému chování *in vitro* a *in vivo*. Detailní výzkum mechanismů toxicity NPs v *in vitro* systémech je tak nebytným krokem k základní charakterizaci jejich chování před použitím *in vivo*. Zároveň může vést k hlubšímu pochopení obecných principů nanocytotoxicity a v konečném důsledku také k návržení méně toxických NMs a NPs.

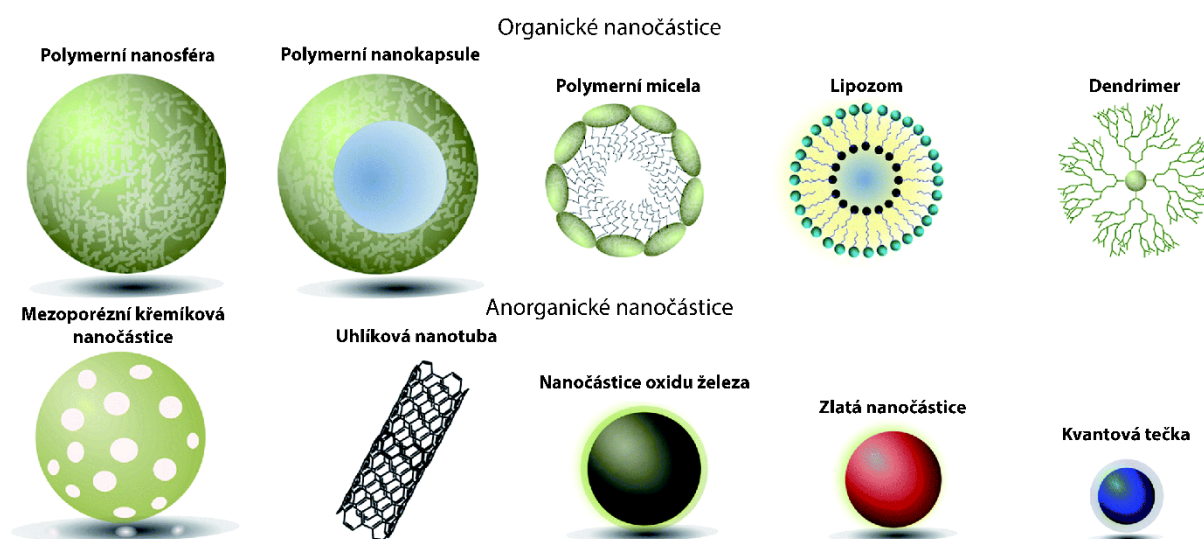
### 1.1.1 Klasifikace NMs a NPs

NMs mohou být rozděleny několika způsoby. První možností je klasifikace na základě prostorového uspořádání, tj. na bezrozměrné (0D), jednorozměrné (1D), dvojrozměrné (2D) a trojrozměrné (3D). U 0D NMs je elektron zachycen v bezrozměrném prostoru, ve kterém nemůže cestovat podél osy x, y nebo z, jako je tomu v případě 1D, 2D a 3D NMs (Jeevanandam J. et al., 2018). Do této kategorie spadají soubory uniformních (kvantové tečky) nebo heterogenních částic (duté sféry, nanočočky ad.) (Tiwari J. N. et al., 2012). Skupina jednorozměrných NMs (NPs) zahrnuje tenké filmy, monovrstvy nebo průmyslově vyráběné povrchy (nanovrstvy) využitelné např. v elektronice, chemii nebo inženýrství (chemické a biologické senzory, optické systémy ad.) (Pal S. L. et al., 2011). 2D NMs (NPs) specifické geometrie mohou vykazovat tvarově závislé charakteristiky využitelné při studiu mechanismů syntetického růstu a při jeho aplikaci pro výrobu senzorů, nanoreaktorů nebo templátů pro tvorbu 2D struktur některých dalších typů materiálů. Dvojrozměrné NMs zahrnují větvené struktury, nanopláty nebo nanotrubičky včetně jednovrstevných (single-walled carbon nanotubes - SWCNTs) a mnohovrstevných (multi-walled carbon nanotubes - MWCNTs) CNTs. Poslední skupinou jsou 3D NMs (NPs), jejichž hlavní vlastností ve srovnání s ostatními skupinami je větší povrchová plocha, která umožňuje adsorpci velkého množství molekul na malém prostoru. Mezi typické zástupce patří dendrimery, fulereny, nanosmyčky ad. (Pal S. L. et al., 2011; Tiwari J. N. et al., 2012).

Další možností klasifikace je obecnější rozdělení NMs (NPs) na organické a anorganické (Obrázek č. 1) (Richards D. A. et al., 2017). Na rozhraní obou skupin se vyskytují hybridní organicko-anorganické NMs (nanokompozity), které jsou složeny jak z organických, tak anorganických složek (Sanchez C. et al., 2005). Mezi samotné organické NPs řadíme polymerní nanosystémy (zahrnující nanosféry, nanokapsule a micely), dendrimery a lipozómy.

Hlavní výhodou těchto NPs je nízká až nulová toxicita, biokompatibilita, prodloužená cirkulace v oběhu a biodegradabilita (Masood F., 2016). Některé typy NPs, jako lipozomy nebo micely, mají vnitřní dutinu, tzv. nanokapsuli, která umožňuje obalení a ukrytí léčiva. Navíc mohou být (podobně jako některé další typy NPs) teplotně a elektromagneticky senzitivní, což lze využít při cíleném uvolnění léčiva ve specifickém místě. Díky těmto vlastnostem patří mezi hlavní kandidáty pro vývoj nanosystémů určených k cílené dopravě léčiv (Anu Mary E. a Saravanakumar M. P., 2017).

Mezi anorganické NPs řadíme NPs na bázi kovů (např. měděné, zlaté, stříbrné) a dalších materiálů, jako je křemík, které nejsou organického původu (Obrázek č. 1) (Anu Mary E. a Saravanakumar M. P., 2017; Richards D. A. et al., 2017). Někteří autoři do této skupiny zahrnují i NPs na bázi uhlíku (CNTs ad.) (Richards D. A. et al., 2017), které ale mohou stát samostatně, spolu s dalšími uhlíkovými NPs (fulereny, grafénové pláty ad.), jako nezávislá skupina (Anu Mary E. a Saravanakumar M. P., 2017).



**Obrázek č. 1:** Schématický obrázek některých typů NPs využitelných v biomedicině (převzato a upraveno z: Richards D. A. et al., 2017).

### 1.1.2 Křemíkové NPs

Křemíkové NPs (silica nanoparticles - SiNPs) studované pro lékařské účely můžeme rozdělit na dva hlavní typy: neporézní (solid silica nanoparticles - sSiNPs) a mezoporézní (mesoporous silica nanoparticles - mSiNPs) SiNPs. Hlavní výhodou těchto NPs je především

relativně snadná funkcionalizace jejich povrchu díky fyzikálně-chemickým vlastnostem křemíku jako základního stavebního prvku SiNPs.

sSiNPs mohou mít velikost 20 nm – 2 μm v závislosti na zvolené metodě přípravy. Úpravou reakčních podmínek vznikají spíše monodisperzní sSiNPs sférického tvaru o specifické velikosti (Vivero-Escoto J. L. a Huang Y. T., 2011). Zavedení funkčních skupin do povrchu sSiNPs může ovlivnit jejich rozpustnost ve vodném prostředí a také umožnit konjugaci s dalšími molekulami, jako jsou protilátky, DNA ad. (Shirshahi V. a Soltani M., 2015). Funkční molekuly mohou být také zachyceny v matrix sSiNPs během syntézy. Jejich vlivem dochází k modulaci (zdokonalení) vnitřních vlastností sSiNPs, ovlivnění rychlosti uvolňování zachycené látky (léčiva, fluoroforu apod.) a zároveň do určité míry k ochraně obsahu před vlivy okolního prostředí (Vivero-Escoto J. L. et al., 2012). Všechny tyto kontrolovatelné vlastnosti cíleně zvyšují chemickou a fyzikální všestrannost sSiNPs (Vivero-Escoto J. L. a Huang Y. T., 2011).

Na rozdíl od sSiNPs křemíková kostra mSiNPs obsahuje mezopóry o velikosti 2-50 nm (Richards D. A. et al., 2017). Strukturní uspořádání a velikost výsledných pórů závisí především na výběru prekurzorů, použitém surfaktantu a zvolených reakčních podmínkách. Dochází tak ke vzniku mSiNPs o hexagonální, krychlové nebo lamelární struktuře (Narayan R. et al., 2018). Povrch mSiNPs umožňuje funkcionalizaci širokým spektrem molekul, které moduluji povrchové vlastnosti a zvyšují tak univerzálnost a biologickou rozpoznatelnost NPs (Bharti C. et al., 2015; Slowing I. I. et al., 2010). Funkční molekuly mohou být zavedeny do vnitřního (na vstupu do pórů, stěny pórů) nebo vnějšího povrchu mSiNPs (Slowing I. I. et al., 2010). V důsledku kontrolovatelné syntézy může být mezoporézní struktura vhodně upravena podle typu a velikosti uvažovaného nákladu (léčiva). V kombinaci s funkcionalizací vykazují mSiNPs vysokou kapacitu pro inkorporaci nákladu a jeho kontrolované uvolňování v cílovém místě (Bharti C. et al., 2015).

Mezi hlavní metody syntézy SiNPs patří především sol-gel syntéza a syntéza pomocí mikroemulzní metody (Vivero-Escoto J. L. a Huang Y. T., 2011). Sol-gel syntéza (nazývána též Stöberova metoda) byla navržena v 60. letech Stöberem et al. jako metoda kontrolované tvorby sférických SiNPs uniformní velikosti (Stöber W. et al., 1968). Zahrnuje hydrolýzu a kondenzaci křemíkového prekurzoru (křemíkové alkoxidy jako např. tetraetylortosilikát - TEOS) v prostředí tvořeném směsí ethanolu a hydroxidu amonného (Shirshahi V. a Soltani M., 2015; Stöber W. et al., 1968). Velikost výsledných SiNPs se pohybuje v rozmezí 30 nm – 1 μm a může být modulována nastavením reakčních podmínek (Wang X. D. et al., 2010). Mikroemulzní metoda je naproti tomu založena na tvorbě mikroemulzí, tj. homogenních

systémů složených ze směsi vody, oleje a amfifilní látky (surfaktantu), které vytvářejí opticky izotropní a termodynamicky stabilní tekutý roztok (Danielsson I. a Lindman B., 1981) umožňující formování SiNPs.

Díky některým vlastnostem, jako je rozsáhlý povrch nebo možnost funkcionalizace řadou molekul, mohou být SiNPs využity v biomedicině jako nosiče léků. Vazba ligandu (např. kyseliny listové), který se specificky váže na receptor (folátový receptor) hojně produkovaný v cílovém místě (nádorové buňky), umožňuje místně specifickou dopravu léčiva (AbouAitah K. et al., 2018; Samanta S. et al., 2018). Konjugace protinádorové látky s cíleně zaměřenými NPs zároveň snižuje toxický vliv léčiva na zdravou tkáň, čímž dochází k redukci nežádoucích účinků (Chen W.-H. et al., 2016). Modifikované SiNPs mohou být dále využity jako adsorbenti nežádoucích látek (lanthanoidů, aktinoidů, iontů kovů ad.) (Gao J. et al., 2017; Shiri-Yekta Z. et al., 2013), senzory (Chu B. et al., 2016; Tan S. Y. et al., 2017) nebo při vývoji zobrazovacích metod (He X. et al., 2012; Lee J. E. et al., 2010; Wang X. et al., 2011). Pro účely biologického zobrazování je nezbytné obohatit SiNPs o další materiál (fluorofory, superparamagnetické látky), který dodá potřebné optické/kontrastní vlastnosti a umožní využití SiNPs pro fluorescenční zobrazování (He X. et al., 2012; Wang X. et al., 2011) nebo magnetickou rezonanci (Lee J. E. et al., 2010).

### 1.1.3 SPIONs

SPIONs patří v současnosti mezi intenzivně studované NPs zejména díky svému vysokému potenciálu pro diagnostickou a teranostickou (tj. propojující terapii s diagnostikou) aplikaci. SPIONs jsou obvykle tvořeny magnetitem ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nebo jeho oxidovanou formou maghemitem ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Na základě své velikosti mohou být rozděleny do několika základních kategorií: „oral SPIONs“ o rozměrech 300 nm – 3,5  $\mu\text{m}$ , standardních SPIONs o velikosti 50 – 150 nm a ultramalých SPIONs, které jsou menší než 50 nm (Elias A. a Tsourkas A., 2009).

Mezi význačné charakteristiky SPIONs patří především jejich magnetické vlastnosti a relativně nízká cytotoxicita (Adkinson N. F. et al., 2018; Gholami L. et al., 2018). Obecně magnetické NPs obsahující jednu magnetickou doménu (tzv. monodoménu) vykazují při pokojové teplotě tzv. superparamagnetické vlastnosti (Dunlop D. J. a Özdemir Ö., 1997). Přejít z vícedoménového do jednodoménového stavu závisí na rozměrech magnetických NPs a je určen tzv. kritickou velikostí, pod jejíž hodnotou se NPs stávají superparamagnetickými. Ta byla např. pro krychlové SPIONs z  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  stanovena teoreticky a experimentálně na ~76 nm (Butler R. F. a Banerjee S. K., 1975; Li Q. et al., 2017). Magnetický moment u

monodoménových NPs není stálý, ale díky teplotním fluktuacím permanentně osciluje mezi různými orientacemi. Po aplikaci vnějšího magnetického pole dochází k částečnému uspořádání těchto momentů a následné magnetizaci NPs, což může být využito pro cílené navádění SPIONs do příslušného místa (Price D. N. et al., 2017).

Mezi nejvýraznější komplikace v klinické aplikaci SPIONs patří zejména jejich tendence k agregaci a relativně rychlé odstranění z oběhu buňkami retikuloendoteliálního systému (RES) (Feng Q. et al., 2018; Okon E. et al., 1994; Unterweger H. et al., 2017). Agregace pramení především z vyšší povrchové energie SPIONs, která vzniká jako důsledek vysokého poměru povrchu k objemu NPs malých rozměrů. U neobalených SPIONs se agregace odvíjí jak od jejich výsledné koncentrace, tak od složení okolního prostředí (Chekli L. et al., 2013). Vyšší stability a tím i nižší míry agregace může být dosaženo pokrytím SPIONs vhodným obalem (Kurzahls S. et al., 2017), který ale může výrazně ovlivnit magnetické vlastnosti SPIONs (Köseoğlu Y., 2006). Molekuly obalu navíc propůjčují SPIONs náboj, který určuje výsledné složení proteinové korony a výrazně tak ovlivňuje biodistribuci, délku cirkulace a míru cytotoxicity těchto NPs (Feng Q. et al., 2018; Malvindi M. A. et al., 2014; Sakulku U. et al., 2014).

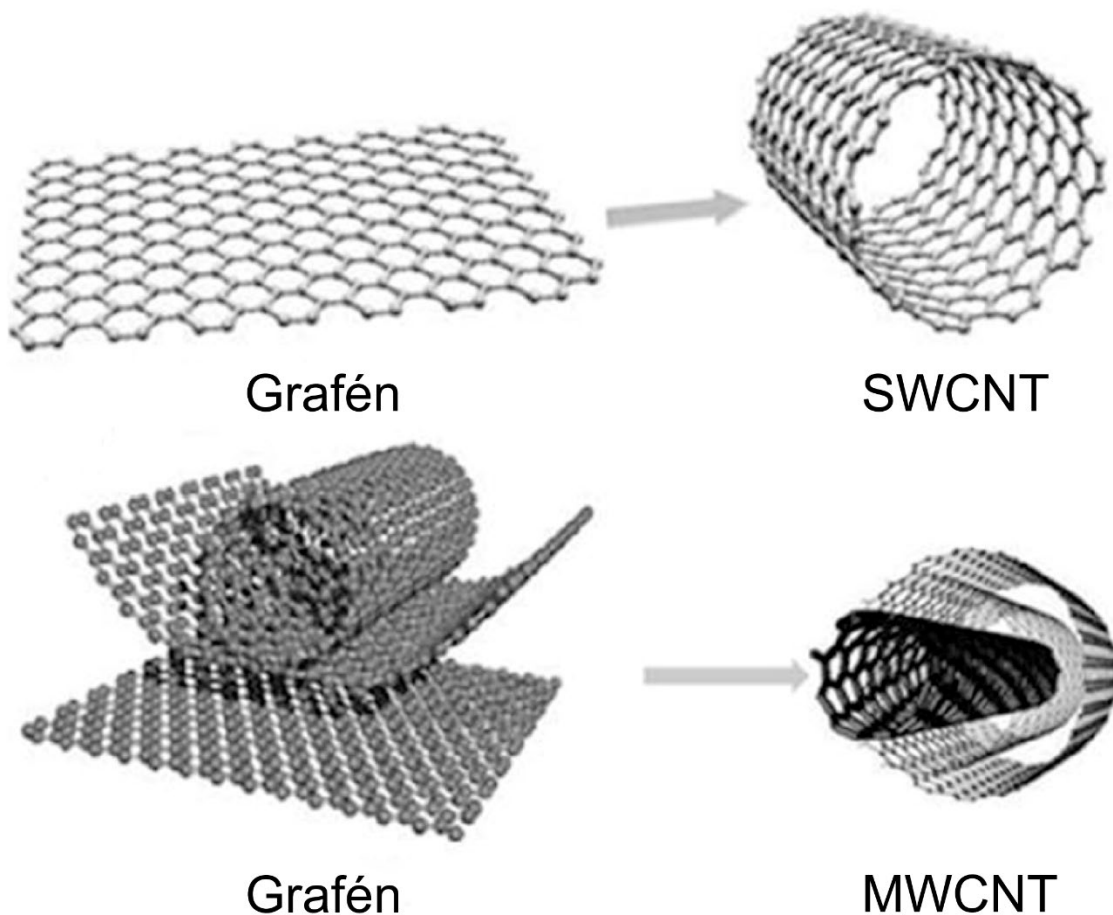
V rámci aplikace SPIONs *in vivo* dochází k jejich výrazné akumulaci ve slezině a játrech a následné internalizaci buňkami RES (Briley-Saebo K. et al., 2004; Pouliquen D. et al., 1991). Ty degradují SPIONs na železo obsahující produkty, které mohou být asociovány s příslušnými proteiny. Železo obsahující produkty jsou pak uloženy ve slezině a játrech a ve zvýšené míře cirkulují v krevním oběhu. Toto přechodné zvýšení různých forem železa znamená pro organismus přídatnou zátěž, se kterou jsou zdraví jedinci schopni se vyrovnat během relativně krátké doby (Gu L. et al., 2012). Avšak pro pacienty s narušenou funkcí jater mohou představovat vyšší dávky SPIONs určité bezpečnostní riziko (Wei Y. et al., 2016), především z důvodu cytotoxického působení  $Fe^0/Fe^{2+}$  iontů, které se mohou uvolňovat z magnetitového jádra při kontaktu NPs s okolním prostředím (Auffan M. et al., 2008). Bylo ukázáno, že  $Fe^0/Fe^{2+}$  ionty indukují oxidativní stres, který může vést až k apoptotické a nekrotické formě buněčné smrti (Auffan M. et al., 2008; Malvindi M. A. et al., 2014).

I přes výše zmíněné komplikace jsou v současné době některé typy SPIONs ve státech Evropské unie (European Medicines Agency - EMA) a USA (Food and Drug Administration - FDA) již schváleny pro lékařské účely. Jedná se zejména o nanopřípravky pro léčbu anémie u pacientů s chronickým onemocněním ledvin (Ventola C. L., 2017) a kontrastní agens pro MRI (EMA, 2008, [online]). Ačkoli bylo v průběhu posledních let uvolněno na trh několik dalších léčebných a diagnostických preparátů na bázi SPIONs (Ventola C. L., 2017), problémy s jejich

toxicitou navozující hypersensitivitu a anafylaktické reakce (FDA, 2015 [online]; Wang C. et al., 2015) vedly spolu s ekonomickými důvody k jejich částečnému stažení (Ventola C. L., 2017). Další potenciální aplikace SPIONs v biomedicíně zahrnuje především magnetickou dopravu léčiv do cílových oblastí (Huang L. et al., 2015; Matuszak J. et al., 2018), indukci hypertermie při léčbě nádorů (Kossatz S. et al., 2015; Ludwig R. et al., 2017), využití SPIONs jako transfekčních agens (Balcells L. et al., 2019), chelatátorů těžkých kovů při intoxikaci organismu (Inbaraj B. S. a Chen B. H., 2012) nebo magneto-akustických senzorů např. při zobrazení nádorů (Mariappan L. et al., 2016).

#### **1.1.4 CNTs**

CNTs jako strukturně nový typ NPs na bázi uhlíku byly poprvé připraveny a popsány Iijimou v roce 1991 (Iijima S., 1991). Patří do skupiny NPs, jejichž základem je tzv. grafén. Grafénový plát může být uspořádán do cylindrické formy buď o jedné vrstvě za vzniku SWCNTs (Obrázek č. 2A), nebo o více vrstvách za vzniku MWCNTs (Obrázek č. 2B) (Vidu R. et al., 2014).



**Obrázek č. 2:** Struktura a prostorové uspořádání jednovrstevných (SWCNTs) a mnohovrstevných (MWCNTs) uhlíkových nanotub (převzato a upraveno z: Vidu R. et al., 2014).

SWCNTs mají dutý tubulární tvar o průměru 0,3 – 10 nm (Ma J. et al., 2009; Zhai J. P. et al., 2009) a délce několika  $\mu\text{m}$  (Ema M. et al., 2017). Tato délka může být vhodnou metodou prodloužena dokonce až na několik cm (Wang X. et al., 2009). Díky těmto výrazně rozdílným rozměrům vykazují vysoký poměr délky k průměru, což umožňuje potenciální adsorpci velkého množství molekul. Strukturně jsou SWCNTs tvořeny hexagonální mřížkou, která může být v prostoru uspořádána třemi způsoby. Dochází tak ke vzniku SWCNTs s konfigurací cik-cak (zig-zag), židlička (armchair) nebo chirální (chiral) (Dresselhaus M. S. et al., 1992; Saito R. et al., 1998). Kombinací chiralit s vhodným průměrem tubulárního vlákna mohou SWCNTs nabývat buď polovodičových, nebo kovových vlastností (Saito R. et al., 1992).

Na rozdíl od SWCNTs jsou MWCNTs tvořeny dvěma a více koncentricky uspořádanými grafénovými tubuly (Iijima S., 1991). Vzdálenost mezi jednotlivými vrstvami grafénu může kolísat v rozmezí 0,27 až 0,42 nm (nejčastěji však 0,32 – 0,35 nm) (Kharissova O. V. a Kharisov B. I., 2014). Vnitřní průměr se typicky pohybuje v rozmezí 1 – 3 nm, zatímco vnější průměr v rozmezí 2 – 100 nm. Délka může nabývat hodnot přibližně od 0,6  $\mu\text{m}$  až do několika  $\mu\text{m}$  (Bekyarova E. et al., 2005; Sweeney S. et al., 2014). Struktura MWCNTs bývá popisována pomocí dvou základních modelů. V tzv. modelu ruské panenky jsou jednotlivé nanotuby uspořádány dle svého průměru v pořadí od největší po nejmenší, zatímco v tzv. pergamenovém modelu je celistvý list grafénu opakovaně stáčen za vzniku kontinuální cylindrické nanotuby (Eatemadi A. et al., 2014).

Původní metodou přípravy MWCNTs je tzv. syntéza v obloukovém výboji, která byla použita pro přípravu úplně prvních nanotub. Dochází při ní k vaporizaci uhlíkového prekursoru za relativně vysokých teplot, který následně kondenzuje na záporně nabitě elektrodě za vzniku CNTs (Iijima S., 1991). Výsledným produktem bývají kromě CNTs také další molekuly jako fulereny, uhlíkové nečistoty nebo pozůstatky kovových katalyzátorů (Ge C. et al., 2011; Singh K. K. et al., 2017), které je možné odstranit purifikací např. pomocí koncentrovaných kyselin ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$  ad.), vysokých teplot nebo oxidací na vzduchu (Huang L. et al., 2011; Singh K. K. et al., 2017; Stancu M. et al., 2011).

Díky svému složení, struktuře a velikosti vykazují CNTs výjimečné vlastnosti, které mohou být využity při navrhování a vývoji systémů aplikovatelných v biomedicíně. Optické a tepelné vlastnosti umožňují jejich využití při eliminaci nádorů metodou fototermální ablace (fototermální terapie) (Moon H. K. et al., 2009). Po ozáření CNTs pomocí světla v blízké infračervené oblasti (near-infrared -NIR) dochází k produkci tepla, které vede k usmrcení cílených nádorových buněk (Chakravarty P. et al., 2008). Elektrické a adsorpční vlastnosti se mohou uplatnit při aplikaci CNTs jako senzorů pro detekci glukózy, neurotransmiterů,  $\text{H}_2\text{O}_2$  a dalších molekul (Iverson N. M. et al., 2013; Lin Y. et al., 2004; Sansuk S. et al., 2013; Xu S. et al., 2011). Mechanická odolnost a vysoká kapacita v tahu mohou být potenciálně využity při konstrukci podpůrných systémů (lešení) při reparaci silně zatížených a namáhaných tkání, jakými je např. kost (Rajesh R. et al., 2016), nebo společně s využitím vodivých vlastností také při reparaci srdce (Pok S. et al., 2014).

Ačkoli CNTs vykazují mnohé unikátní vlastnosti potenciálně využitelné v biomedicíně, jejich tyčinkovitý tvar připomínající azbestová vlákna (Palomäki J. et al., 2011), omezená možnost biodegradace (Hou J. et al., 2016) nebo schopnost adsorbovat řadu esenciálních molekul (Guo L. et al., 2008), patří mezi významné zdroje jejich toxicity. Detailní výzkum



cytotoxických mechanismů a vývoj přístupů zaměřených na omezení, případně úplnou eliminaci škodlivých účinků, by tak mohl přispět k využití tohoto typu NPs pro lékařské účely.

## 1.2 Cytotoxicita NPs a typy buněčné smrti

Cytotoxicitu NPs lze popsat jako „interakci NPs s buňkami o takovém rozsahu, který vede k rozrušení buněčných struktur a/nebo procesů nezbytných pro buněčné přežívání a proliferaci“ (Lewinski N. A., 2012). Pokud je míra cytotoxicity natolik vysoká, že kompenzační a opravné mechanismy v buňce již nejsou schopny zajistit základní funkční procesy, dochází ke smrti buňky. Obecně je za smrt buňky považováno dosažení takového bodu, ze kterého již není návratu (Galluzzi L. et al., 2018). Tento bod (nebo skupina bodů) může být určen na základě morfologických, biochemických nebo funkčních charakteristik, které se mohou do určité míry, v rámci jednotlivých typů buněčné smrti, překrývat (Galluzzi L. et al., 2018; Kroemer G. et al., 2009). Z morfologického hlediska můžeme rozlišit tři základní typy buněčné smrti: apoptózu (typ I), autofágii (typ II) a nekrózu (typ III) (Galluzzi L. et al., 2018; Schweichel J. U. a Merker H. J., 1973). Apoptóza a autofágie jsou považovány za formy programované buněčné smrti, jejichž aktivací dochází k vykonání vysoce organizovaného programu sestávajícího ze sekvence vzájemně provázaných kroků (Ojha R. et al., 2015). Naproti tomu, nekróza spadá do kategorie neprogramované buněčné smrti, a je vyvolána náhodným působením silně poškozujícího, nefyziologického podnětu (Janko C. et al., 2013). Alternativním typem nekrózy může být její regulovaná (programovaná) forma, tzv. nekroptóza, která obsahuje některé prvky nekrózy, apoptózy a autofágie (Degterev A. et al., 2005). Mezi další specifické typy buněčné smrti patří např. mitotická katastrofa, pyroptóza, entóza ad. (Kroemer G. et al., 2009).

### 1.2.1 Apoptóza

Apoptóza je důležitý fyziologický proces vedoucí k smrti buňky, jehož průběh je realizován sekvenčně prostřednictvím několika konzervativních mechanismů (Kaczanowski S., 2016). Během vývoje mnohobuněčného organismu přispívá ke zdárnému průběhu embryogeneze (např. při vývoji embryonálního mozku) (Thomaidou D. et al., 1997), k udržování tkáňové homeostáze (Henson P. M. a Hume D. A., 2006) nebo v dospělosti k úspěšnému hojení ran (Brown D. L. et al., 1997). Morfologicky lze apoptózu identifikovat na základě charakteristických rysů zahrnujících kondenzaci chromatinu, fragmentaci DNA, degradaci strukturních a regulačních proteinů (Kroemer G. et al., 2009; Seo M. Y. a Rhee K., 2018; Widmann C. et al., 1998) a proteinů extracelulární matrix (Cowan K. N. et al., 2005). Během apoptózy také dochází ke změnám ve složení plazmatické membrány (mezi typické

patří translokace fosfatidylserinu z vnitřní do vnější části fosfolipidové dvojvrstvy) a ke vzniku membránových výčnělků vedoucích k postupnému zmenšování buněk a formování apoptotických tělísek (Catchpoole D. R. a Stewart B. W., 1995; Mills J. C. et al., 1998). Klíčovými molekulami v řízení a realizaci apoptózy jsou cysteinové proteázy zvané kaspázy (Li J. a Yuan J., 2008). Díky výrazné regulaci celého apoptotického procesu si v rámci jeho průběhu umírající buňky zachovávají velkou míru celistvosti. K tomu aktivně produkují látky, které na jedné straně inhibují produkci prozánětlivých cytokinů a na straně druhé podporují produkci protizánětlivých cytokinů (Freire-de-Lima C. G. et al., 2006; Mora J. et al., 2016). Kombinací těchto a dalších faktorů dochází k „tichému“ a „čistému“ odstranění mrtvých buněk makrofágy přítomnými v okolní tkáni (Roberts A. W. et al., 2017).

V savčích buňkách jsou popisovány dvě základní dráhy apoptózy. Vnitřní, mitochondriemi zprostředkovaná a vnější, receptorem zprostředkovaná apoptotická dráha. K těmto dvěma klasickým se nověji přiřazuje také dráha spojená s endoplazmatickým retikulem (ER) (Mohammadinejad R. et al., 2019). Všechny dráhy zahrnují aktivaci neaktivních prokaspáz (zymogenů), které se proteolyticky štěpí na aktivní formy. Dráhy kaspáz fungují jako signalizační kaskády, na jejichž začátku se nacházejí iniciační kaspázy (kaspáza 2, 8, 9 a 10), které jsou zodpovědné za aktivaci efektorových (výkonných) kaspáz (kaspáza 3, 6, 7) (MacKenzie S. H. a Clark A. C., 2012). Efektorové kaspázy štěpí příslušný substrát (laminy, PARP ad.) (Kaufmann S. H. et al., 1993; Kivinen K. et al., 2005) a společně s dalšími molekulami se podílejí na provedení morfologických a biochemických změn vedoucích k apoptotické smrti.

Vnitřní apoptotická dráha může být indukována řadou fyzikálních a chemických stimulů zahrnujících např. hypoxii, UV záření, poškození DNA nebo právě působení NPs (Jiao Y. et al., 2016; Kavithaa K. et al., 2016; Sitailo L. A. et al., 2002; Weinmann M. et al., 2004). V první fázi dochází ke změně v propustnosti mitochondriální membrány (Kluck R. M. et al., 1997; Narita M. et al., 1998; Vander Heiden M. G. et al., 1997), která může vést ke ztrátě mitochondriálního membránového potenciálu, nabobtnání mitochondrií, prasknutí vnější části mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu c z mezimembránového prostoru do cytozolu (Narita M. et al., 1998; Vander Heiden M. G. et al., 1997). Propustnost membrány a následné uvolnění cytochromu c ovlivňuje také pro-apoptotický protein Bax (Jürgensmeier J. M. et al., 1998). Ten spadá do rodiny Bcl-2 proteinů, které se významně uplatňují v regulaci apoptózy (Shamas-Din A. et al., 2013). Dle svého působení mohou být rozděleny na pro-apoptotické (Bax, Bak) (Eskes R. et al., 1998; Narita M. et al., 1998) a anti-apoptotické (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>) (Finucane D. M. et al., 1999; Shimizu S. et al., 1998). Cytochrom c po uvolnění interaguje

s Apaf-1 za tvorby komplexu zvaného apoptozóm (Acehan D. et al., 2002; Zou H. et al., 1999). Apoptozóm váže a aktivuje iniciační prokaspázu 9 (Zou H. et al., 1999), která spouští kaskádu efektorových kaspáz zahrnujících štěpení a aktivaci prokaspázy 3, 6 a 7 (Li P. et al., 1997; Slee E. A. et al., 2001).

Vnější nebo také receptorem zprostředkovaná apoptotická dráha je založena na vazbě a interakci receptoru smrti s příslušným ligandem smrti (Guicciardi M. E. a Gores G. J., 2009). Receptory smrti se řadí do „tumor necrosis factor“ (TNF) rodiny receptorů zahrnující např. „tumor necrosis factor-receptor 1“ (TNF-R1), „death receptor 3“ (DR3), Fas nebo „TNF-related apoptosis inducing ligand–receptor 2“ (TRAIL-R2) (Kalimuthu S. a Se-Kwon K., 2013). Tyto receptory patří mezi transmembránové proteiny s extracelulární doménou umožňující vazbu příslušného ligandu smrti (Henkler F. et al., 2005; Orlinick J. R. et al., 1997) a intracelulární (cytoplazmatickou) doménou, tzv. doménou smrti. Po vazbě ligandu na receptor dochází k oligomerizaci a shlukování, které vede k přiblížení a slabé protein-proteinové interakci mezi doménou smrti a adaptorovým proteinem „Fas-associated protein with death domain“ (FADD) (Scott F. L. et al., 2009). FADD interaguje s prokaspázou 8 (Carrington P. E. et al., 2006) za vzniku multiproteinového komplexu „death-inducing signaling complex“ (DISC) (Dickens L. S. et al., 2012). V tomto komplexu dochází k autokatalytickému štěpení a aktivaci kaspázy 8 (Bellail A. C. et al., 2010; Dickens L. S. et al., 2012), která obratem štěpí prokaspázu 3 na její aktivní variantu (Stennicke H. R. et al., 1998) štěpící příslušné substráty (Slee E. A. et al., 2001).

Další forma apoptotické dráhy bývá spojována se stresem ER (Ryoo H. D., 2016). V případě vysokého zatížení ER špatně sbalenými proteiny dochází k aktivaci signální kaskády nazývané „odpověď na nesbalené proteiny“ (unfolded protein response - UPR). Ta by měla zajistit obnovu správného sbalování proteinů a homeostázi ER (Sano R. a Reed J. C., 2013). Pokud k tomu však nedojde, UPR pravděpodobně zprostředkuje aktivaci kaspázy 3 a kaspázy 4 vedoucí k vyvolání apoptózy (Hitomi J. et al., 2004; Kim S. J. et al., 2006).

## 1.2.2 Autofágie

Autofágie je proces, který se pravděpodobně podílí na buněčném přežívání (Ogata M. et al., 2006). Nicméně často končí buněčnou smrtí, která má podobně jako apoptóza programovaný průběh (Ojha R. et al., 2015). Během autofágie dochází k transportu cytoplazmatického materiálu (organel, proteinových agregátů atd.) do prostředí lyzozómů, uvnitř kterých dochází k degradaci na jednotlivé komponenty. Rozlišujeme tři typy autofágie: makroautofágie, mikroautofágie a chaperonem zprostředkovanou autofágie (Das G. et al., 2012).

Zatímco během makroautofágie dochází k tvorbě autofagozómu a jeho fúzi s lyzozómem za vzniku autolyzozómu, při mikroautofágii je cytoplazmatický materiál transportován do lyzozómu přímo, invaginací lyzozomální membrány. U chaperonem zprostředkované autofágie jsou proteiny určené k degradaci, označené KFERQ podobnou sekvencí, vázány do komplexu s chaperony, zejména „heat shock cognate protein 70“ (Hsc70), které zprostředkovávají jeho transport do lyzozómu (Kaushik S. a Cuervo A. M., 2012). Vzhledem k uplatnění makroautofágie při odstraňování toxického materiálu, buněčném přežívání a buněčné smrti (Das G. et al., 2012), bude termín „autofágie“ v dalším textu používán ve významu makroautofágie.

Autofágie začíná formováním „nové“ membrány – fagoforu, jejímž zdrojem je pravděpodobně přechodný kompartment ER a Golgiho aparátu (Ge L. a Schekman R., 2014). Postupným růstem fagoforu dochází k obalování cytoplazmatického materiálu za vzniku struktury z dvojité membrány – autofagozómu (Tooze S. A. a Yoshimori T., 2010). Při tvorbě autofagozómu dochází k využití proteinů z rodiny Atg, které mají rozdílné funkce v určitých fázích autofagozomální maturace. Savčí ULK1 komplex (u kvasinek Atg1) zodpovídá za fosforylaci proteinu BECLIN 1, která vede k aktivaci VPS34 komplexu a iniciaci autofágie vyvolané nedostatkem aminokyselin (buněčné hladovění) (Russell R. C. et al., 2013). Pro tvorbu autofagozómu je nezbytný také ATG5-ATG12 komplex, který v kombinaci s ATG16 katalyzuje konjugační reakci proteinů s lipidy (Kuma A. et al., 2002). Ukazuje se, že tento komplex, má zřejmě podobnou funkci jako E3 ligáza v procesu ubikvitinylace (tzv. E3 podobný enzym) a zodpovídá u kvasinek za lipidaci Atg8 proteinu fosfatidylethanolaminem (phosphatidylethanolamine – PE) (Fujita N. et al., 2008; Hanada T. et al., 2007). Přesná funkce Atg8-PE není zcela jednoznačně vyřešena. Podle některých autorů se Atg-PE uplatňuje při růstu fagoforu (Xie Z. et al., 2008), zatímco podle jiných (*in vitro* studie) je zodpovědný za hemifúzi váček, která je důležitá při růstu autofagozomální membrány během procesu formování autofagozómu (Nakatogawa H. et al., 2007). V případě savčích buněk je homologem Atg8 proteinu protein LC3, který se vyskytuje ve dvou formách: cytozolické (LC3-I) a membránově vázané (LC3-II) (Kabeya Y. et al., 2000). Membránově vázaná LC3-II forma může být, podobně jako Atg8, konjugována s PE (Kabeya Y. et al., 2004) a je součástí vnitřní nebo vnější membrány autofagozómů (Kabeya Y. et al., 2000). Díky výskytu LC3-II v membránách autofagozómů je tento protein často využíván jako marker pro detekci autofágie (Kabeya Y. et al., 2000; Schläfli A. M. et al., 2015).

Během autofágie také dochází k propojení autofagozomální a endocytické dráhy, při kterém autofagozomy fúzí s pozdními endozomy (multivezikulárními tělísky) za tvorby

přechodného kompartmentu – amfizómu (Berg T. O. et al., 1998). Amfizóm/autofagozóm dále fúzuje s lyzozómy za vzniku tzv. autolyzozómu (Majumder P. a Chakrabarti O., 2015). Pro úspěšnou fúzi je zřejmě důležité umístění lyzozómů v perinukleární oblasti (Korolchuk V. I. et al., 2011) a přítomnost dalších proteinů, mezi které patří některé Rab GTPázy (enzymy štěpící hydrolyticky GTP, guanosintrifosfát – guanosinetriphosphate – GTP) (Fujita N. et al., 2017; Jäger S. et al., 2004), SNARE proteiny (Dodson M. et al., 2018; Matsui T. et al., 2018) a další přidružené proteiny uplatňující se např. při vzájemném propojení vakuolárních membrán (Jiang P. et al., 2014; Zick M. a Wickner W., 2013). V poslední, terminální fázi autofágie jsou autolyzozómy využity k tvorbě nových (recyklovaných) lyzozómů procesem zvaným autofagická reformace lyzozómů (Yu L. et al., 2010). Tato znovuoobnova lyzozómů je důležitá pro zajištění lyzozomální homeostáze (Rong Y. et al., 2012).

### 1.2.3 Nekróza

Nekróza je charakteristická výraznými morfologickými změnami, které začínají deformací plazmatické membrány za vzniku výčnělků oddělujících se do okolního prostředí. Během tohoto procesu současně dochází ke zvětšování buněčného objemu, který v pozdějších fázích vede k prasknutí plazmatické mebrány a vyelití vnitrobuněčného obsahu do okolí buněk (Rello S. et al., 2005). Uvolnění cytoplazmatického materiálu vede *in vivo* k aktivaci akutní zánětlivé odpovědi (Iyer S. S. et al., 2009). *In vitro* jsou některé z těchto intracelulárních komponent (např. laktát dehydrogenáza - LDH) výhodně využívány jako markery pro detekci nekrotické formy buněčné smrti (Chan F. K. et al., 2013).

Ačkoli je nekróza po velmi dlouhou dobu popisována jako „náhodný“ (neprogramovaný) proces, který vzniká v důsledku terminální reakce buňky na příliš silný (poškozující) podnět, tzv. primární nekróza (Sachet M. et al., 2017; Walker N. I., 1988), jedná se pouze o jednu z forem nekrózy. Dále rozlišujeme tzv. sekundární nekrózu, ke které dochází po kompletním dokončení apoptotického procesu v nepřítomnosti nebo při selhání fagocytujících buněk (např. jako následek silného zánětu) (Robertson A. M. G. et al., 1978; Rydell-Törmänen K. et al., 2006). Dagterev et al. poukázali navíc na existenci programované (regulované) formy nekrotické smrti, tzv. nekroptózy (viz výše). Nekroptóza morfologicky připomíná nekrózu, ale zahrnuje signalizační dráhu spojenou s receptorem obsahujícím doménu smrti (Degterev A. et al., 2005), kterým může být např. TNF $\alpha$  (Goossens V. et al., 1999; Chang Y. J. et al., 2015). V nepřítomnosti aktivity některých kaspáz (kaspáza-8) (Günther C. et al., 2011; Sawai H., 2013) dochází k vytvoření pro-nekrotického komplexu, který obsahuje sdruženou RIP1 a RIP3

kinázu (Cho Y. S. et al., 2009). Aktivovaná RIP3 kináza fosforyluje cílovou MLKL pseudokinázu, která pravděpodobně umožňuje vytvoření pórů uvnitř plazmatické membrány působících její dezintegraci (Wang H. et al., 2014).

### 1.3 Mechanizmy cytotoxicity NPs

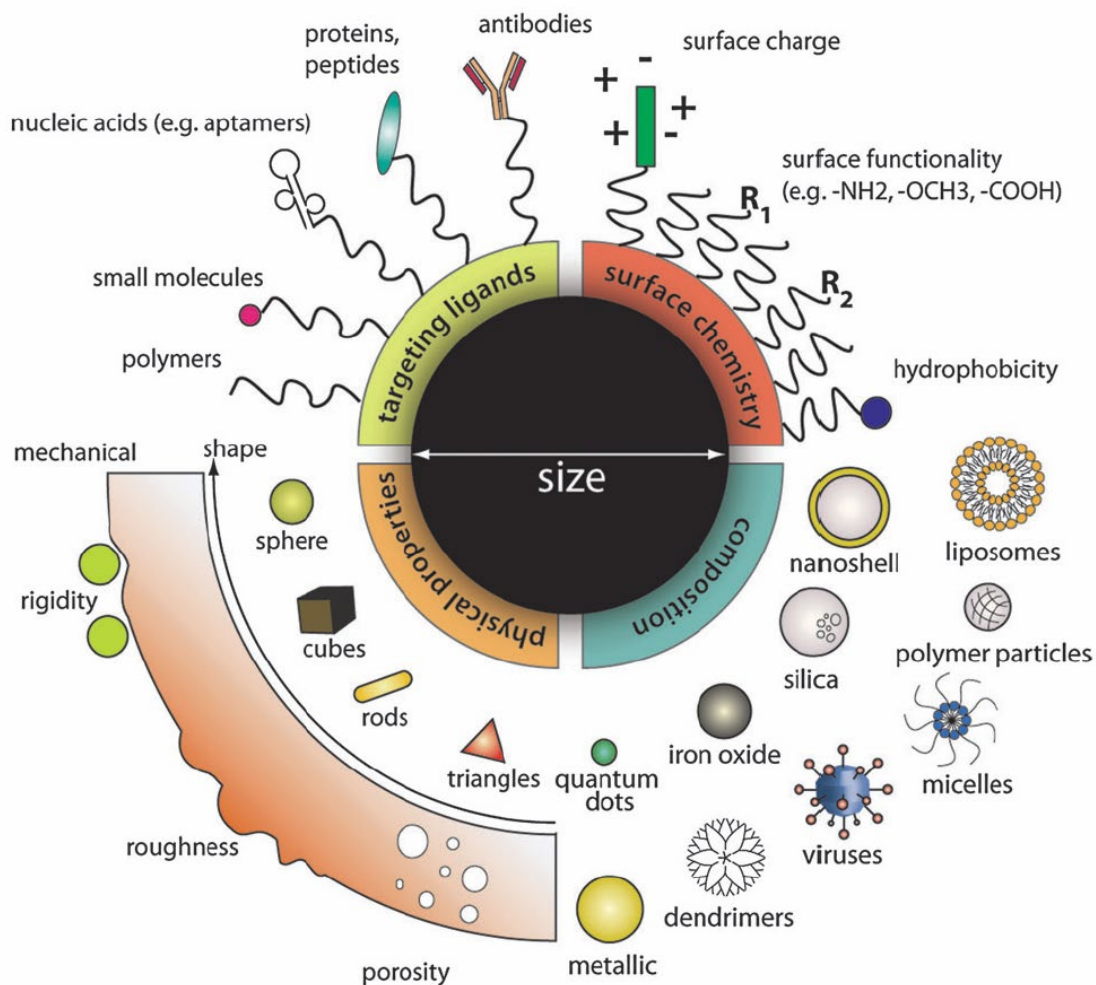
K toxickému působení NPs na buňky může docházet buď přímou cestou zahrnující interakci NPs s buněčnými komponentami (Mansouri A. et al., 2018), organelami (Schütz I. et al., 2016) nebo procesy (Braydich-Stolle L. K. et al., 2010), nebo nepřímou cestou, která vede ke změnám v okolním prostředí vyvolaných působením NPs, např. adsorpcí důležitých živin na jejich povrch (Guo L. et al., 2008). Všechny tyto změny mohou vést ke snížení životaschopnosti buněk a v konečném důsledku až k buněčné smrti. V dalším textu budou popisovány především cytotoxické mechanizmy přímého působení NPs.

#### 1.3.1 Cytotoxicita na úrovni vstupu NPs do buněk

Interakce NPs s buňkami začíná jejich kontaktem s plazmatickou membránou. Transport NPs může probíhat buď pasivně, difúzí (Bhardwaj V. et al., 2015), nebo aktivně, endocytózou (Kim J.-S. et al., 2006). Ačkoli je prostá difúze energeticky nezávislý proces, který je v souvislosti s NPs studován v různých typech modelových systémů (Bedrov D. et al., 2008; Tiwari A. et al., 2018), zdá se, že v buňkách k němu dochází spíše méně (Bhardwaj V. et al., 2015). Druhým, pravděpodobně častějším transportním mechanismem NPs do buněk, je endocytóza (Kuhn D. A. et al., 2014; Xie X. et al., 2017). Endocytóza je energeticky závislý proces (Weigel P. H. a Oka J. A., 1981), během kterého dochází k adhezi NPs k povrchu membrány, jejich internalizaci a transportu prostřednictvím endocytických váčků do příslušných organel (Decuzzi P. a Ferrari M., 2007; Zhang J. et al., 2017). Existuje řada typů endocytických drah, které jsou využívány během vstupu NPs do buněk. Mezi nejčastější patří fagocytóza (Antonelli A. et al., 2010), makropinocytóza (Cui X. et al., 2017), na klatrinu závislá endocytóza (Ng C. T. et al., 2015) nebo kaveolinem zprostředkovaná endocytóza (Cui X. et al., 2017).

Konkrétní mechanismus vstupu jednotlivých druhů NPs je ovlivněn typem buněk (I-Lun Hsiao A. M. G. R. J. M. S. M. G. a Andrea H., 2014), tvarem (Xie X. et al., 2017), rozměry (Antonelli A. et al., 2010) a povrchovými vlastnostmi NPs (Obrázek č. 3)(Chou L. Y. et al., 2011; Wang F. et al., 2013).





**Obrázek č. 3:** Faktory ovlivňující vstup NPs do buněk a jejich cytotoxicitu (převzato z: Chou L. Y. et al., 2011).

Vliv velikosti na způsob, jakým NPs vstupují do buněk, byl ukázán např. u fagocytujících buněk - makrofágů. SWCNTs konjugované s fosfolipidy do velikosti 400 nm procházely do buněk difúzí, zatímco částice větší než 400 nm byly internalizovány fagocytózou (Antonelli A. et al., 2010). Podobně může být např. v závislosti na tvaru NPs určen i konkrétní typ endocytózy. Xie et al. ukázali, že zlaté NPs hvězdicovitého tvaru vstupovaly do buněk na klatrinu závislou endocytózou, zatímco stejné NPs tyčinkovitého tvaru procházely do buněk jak na klatrinu, tak na caveolinu závislou endocytózou. Trojúhelníkovité zlaté NPs využívaly různé typy endocytických drah, což vedlo k jejich nejefektivnější inernalizaci (Xie X. et al., 2017). Dalším příkladem mohou být dlouhé CNTs vykazující azbestovým vláknům podobné toxické chování, které je způsobeno tzv. nekompletní nebo též frustrovanou fagocytózou (Poland C. A. et al., 2008). Buňka při ní rozpoznává zakulacený nebo uzavřený konec

cylindrického vlákna CNTs a mylně ho určuje jako částici kulovitěho tvaru. Dochází k receptorem zprostředkované endocytóze a k natočení vlákna elastickým tahem plazmatické membrány do vstupního úhlu blízcímu se 90° (Shi X. et al., 2011). Dlouhé vlákno však nemůže být zcela endocytováno, což vede k cytotoxickým efektům (Boyles M. S. et al., 2015).

Za velmi důležité komunikační rozhraní mezi NPs a buňkami, které rozhoduje spolu s výše zmíněnými faktory o typu a průběhu vstupu do buněk, je považován i povrch NPs (Lunov O. et al., 2011). Ten může být inertní nebo funkcionalizovaný pomocí různých funkčních skupin (-NH<sub>2</sub>, -COOH ad.) (Pillai S. K. et al., 2011; Takada T. et al., 2010). Při pohybu NPs v okolí buněk dochází k rychlé interakci mezi jejich povrchem a komponentami obsaženými v biologických tekutinách (např. plazmě nebo kultivačním médiu) (Casals E. et al., 2010; Tenzer S. et al., 2013). Proteiny, lipidy a další složky pokrývají povrch NPs za vzniku tzv. proteinové korony (Casals E. et al., 2010). Její první vrstva, tzv. tvrdá proteinová korona, pevně přiléhá k povrchu NPs (Milani S. et al., 2012) a bývá např. u polystyrenových NPs nebo SiNPs formována do 30 sekund od interakce s proteiny (Tenzer S. et al., 2013). Na ni přiléhá druhá vrstva, tzv. měkká proteinová korona, jejíž složení není stálé a reverzibilně se mění pravděpodobně v závislosti na koncentraci a vazebné afinitě okolních proteinů (Milani S. et al., 2012; Tenzer S. et al., 2013; Winzen S. et al., 2015). Formování proteinové korony by mohlo být také kontrolováno prostřednictvím tzv. Vromanova efektu, při kterém dochází k počáteční vazbě více nabohacených proteinů postupně nahrazovaných proteiny s vyšší afinitou (Jung S. Y. et al., 2003). Konečné složení proteinové korony může ovlivňovat vstup NPs do buněk (Tenzer S. et al., 2013) a modulovat jejich cytotoxicitu (Peng Q. et al., 2013).

### **1.3.2 Vnitrobuněčné cytotoxické působení NPs**

V závislosti na mechanismu vstupu (Zhou F. et al., 2010), fyzikálně chemických vlastnostech NPs (Kang B. et al., 2010) a buněčném typu (Zhou F. et al., 2010) dochází k vnitrobuněčnému transportu NPs a jejich interakci s příslušnými organelami. Cytotoxicita je do značné míry ovlivněna lokalizací NPs v konkrétním buněčném kompartmentu. Mezi studované orgány spojené s toxickým působením NPs patří především ER, Golgiho komplex, lyzozomy, jádro, mitochondrie a cytozol.

*Endoplazmatické retikulum, Golgiho komplex a lyzozomy*

Po vstupu NPs do buněk endocytózou dochází k tvorbě endozómů, které umožňují jejich transport do příslušných organel (Huefner A. et al., 2016; Chai G. H. et al., 2016; Kim C. S. et al., 2015). Endocyticky přijatý náklad bývá uvnitř buňky transportován prostřednictvím raných endozómů (Foroozandeh P. a Aziz A. A., 2018). Část z nich může přecházet v tzv. recyklující endozómy, které exportují náklad exocytózou ven na buněčný povrch (Takahashi S. et al., 2012). Další část může nastoupit degradativní dráhu, při které rané endozómy dozrávají v pozdní endozómy (multivezikulární tělísko) a následně fúzí s lyzozómem za vzniku endolyzozomálních váček (Huefner A. et al., 2016; Venkatachalam K. et al., 2015). Během tohoto vezikulárního transportu může u některých typů NPs docházet k tzv. úniku z endozómů (Chu Z. et al., 2015). Ten byl popsán např. pro MWCNTs, které penetrací přes stěny váček unikaly do cytozolu (Mu Q. et al., 2009). NPs mohou procházet také přes ER a Golgiho aparát v rámci transcytózy, např. u epiteliálních buněk, která umožňuje další exocytózu NPs (Cartiera M. S. et al., 2009; Chai G. H. et al., 2016).

Toxický vliv NPs na Golgiho komplex je v současnosti předmětem zkoumání. Ačkoli byly některé NPs (SiNPs, lipidové NPs ad.) detekovány uvnitř Golgiho aparátu (Cao Z. et al., 2017; Cartiera M. S. et al., 2009; Silva E. et al., 2017), přímý cytotoxický vliv nebyl zatím prokázán. V případě ER navozují některé typy NPs jeho zvýšený stres (Yang X. et al., 2015). Jednou z příčin může být interakce NPs s proteiny, která vede ke konformačním změnám proteinů (Deng Z. J. et al., 2011). Akumulace a agregace špatně sbalených proteinů indukuje UPR (viz kapitola 1.2.1 Apoptóza) (Simard J. C. et al., 2016). V případě malých dlouhodobých dávek NPs si některé buňky mohou regulovat jejich vnitrobuněčnou koncentraci inhibicí makropinocytózy (Gunduz N. et al., 2017). Tím dochází k určité adaptaci na stres ER vyvolaný NPs. Selhání UPR navozené např. intenzivní akumulací špatně sbalených proteinů po působení NPs (Simard J. C. et al., 2016) nebo příliš silný stres ER může vést k apoptotické formě buněčné smrti (Simard J. C. et al., 2016; Yang X. et al., 2015). Bylo také ukázáno, že akumulace SiNPs uvnitř ER indukuje autofágii (Wei F. et al., 2017).

Výrazný toxický vliv spojený s interakcí s lyzozómy je popsán např. pro magnetické nanočástice oxidů železa (iron oxide nanoparticles – IONPs) nebo pro aminem modifikované polystyrenové (NH<sub>2</sub>-PS) NPs (Domenech M. et al., 2013; Wang F. et al., 2018). Akumulací NPs (např. NH<sub>2</sub>-PS NPs) nebo NPs-indukovanou produkcí reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species - ROS) dochází k morfologickým změnám a permeabilizaci lyzozomální membrány vedoucí ke zvětšení objemu lyzozómů (Gao W. et al., 2014; Wang F. et al., 2018; Xia T. et al., 2008). Tento proces může vést až k prasknutí membrány a uvolnění vnitrolyzozomálního obsahu, zejména proteolytických enzymů jako je katepsin B nebo D, do

okolního prostředí (Domenech M. et al., 2013; Wang F. et al., 2018). Silné poškození lyzozómů NPs obvykle vede k apoptotické smrti buňky (Gao W. et al., 2014; Wang F. et al., 2018).

### *Jádro a mitochondrie*

Transport NPs prostřednictvím endocytózy a jejich lokalizace v blízkosti nebo uvnitř ER a Golgiho aparátu je zřejmě příčinou častého hromadění NPs v perinukleární oblasti (Efeoglu E. et al., 2015; Chakraborty A. a Jana N. R., 2015; Yaron P. N. et al., 2011). Pohyb NPs v okolí jádra by teoreticky mohl zvyšovat pravděpodobnost jejich vstupu do této organely. Nicméně přenos molekul přes dvouvrstvou jadernou membránu je realizován prostřednictvím komplexu vázaného na jaderný pór (nuclear pore complex - NPC). Pro průchod molekul větších než ~40 kDa vyžaduje NPC přítomnost specifických transportních receptorů a jaderných lokalizačních sekvencí (nuclear localization sequences – NLSs) (Terry L. J. et al., 2007). Navíc je maximální průměrná velikost nákladu limitována (z důvodu rozměrů centrálního kanálu NPC) na ~37 – 39 nm (Eibauer M. et al., 2015; Pante N. a Kann M., 2002). Kombinace těchto omezení ve velkém množství případů účinně brání vstupu NPs do jádra (Haniu H. et al., 2011; Lacerda L. et al., 2012; Lamprecht C. et al., 2012; Mazzaglia A. et al., 2018). V souladu se zmíněným velikostním limitem bylo potvrzeno, že některé NPs menší než 30 nm mohou procházet do jádra (Boyoglu C. et al., 2012) a působit zde genotoxicky (AshaRani P. V. et al., 2009). Nicméně Nagai et al. ukázali, že tyčinkovitý tvar MWCNTs umožňuje vstup i NPs o průměru ~50 nm. To je zřejmě způsobeno přímým propíchnutím jaderné membrány, které zajistí vstup některých typů NPs, které jsou větší než velikost jaderného póru (Nagai H. et al., 2011).

Další organelou vnímavou k působení NPs jsou mitochondrie. Akumulace NPs uvnitř mitochondrií vykazuje některé podobné charakteristiky jako v případě lyzozómů, včetně morfologických změn, nabobtnání mitochondrií, jejich prasknutí či generace ROS (Sun L. et al., 2011). Příkladem mohou být SiNPs, jejichž působením dochází k narušení integrity mitochondriální membrány, změnám v její propustnosti a ztrátě mitochondriálního membránového potenciálu (Xue Y. et al., 2014; Yang Y. et al., 2017). Tyto změny mohou vést ke zvětšení objemu (bobtnání) a následnému prasknutí mitochondrií (Sun L. et al., 2011). Vylití cytochromu c do okolní cytoplazmy spustí další reakce, které v konečném důsledku indukují aktivaci vnitřní apoptotické dráhy vedoucí k buněčné smrti (Yang Y. et al., 2017). Interakce NPs, např. CNTs s mitochondriálními komponentami (cytochromem c), může navíc narušit

přenos elektronů v rámci elektron transportního řetězce a vést tak k funkčnímu poškození mitochondrií (Ma X. et al., 2012).

### 1.3.3 Narušení degradace a odstraňování NPs z buněk

NPs, které vstupují do buněk endocyticky a stávají se součástí endozóm-lyzozomální dráhy, mohou být exportovány ven z buňky pomocí váčků. Tyto váčky se shlukují v blízkosti plazmatické membrány, fúzí s ní a sekretují svůj obsah ven z buňky (Donovan K. W. a Bretscher A., 2015; Chithrani B. D. a Chan W. C., 2007). Intenzita exocytózy závisí na velikosti NPs a jejich tvaru (Cui X. et al., 2017; Chithrani B. D. a Chan W. C., 2007). Menší NPs bývají exocytovány rychleji a ve větším měřítku (Chithrani B. D. a Chan W. C., 2007) podobně jako krátké tyčinkovité NPs (SWCNTs), u nichž byla popsána snažší exkrece než u jejich delších variant (Cui X. et al., 2017).

NPs, které uniknou z endozomálního systému (výše zmíněným „únikem z endozómů“) nebo takové, které se do cytoplazmy dostanou pasivním způsobem, např. v důsledku přímé penetrace plazmatické membrány (MWCNTs) (Mu Q. et al., 2009), mohou být z cytoplazmy odstraněny pomocí autofágie (Remaut K. et al., 2014). Volně přítomné NPs jsou zachyceny prostřednictvím autofagozomu, který následně fúzuje s lyzozómem (Remaut K. et al., 2014). Toxické působení NPs v rámci autofágie se projevuje buď její aktivací (Yu Y. et al., 2014), nebo její blokadou (Landry M. J. et al., 2018). Blokace autofágie obvykle souvisí s narušením interakce mezi autofagozomy a lyzozómy a vede k zastavení autofagického toku a následnému hromadění autofagozómů (Ma X. et al., 2011; Wang J. et al., 2017). Některé, např. zlaté NPs alkalizují pH uvnitř lyzozómů (Ma X. et al., 2011), což může výrazně ovlivnit aktivitu lyzozomálních enzymů (Baltazar G. C. et al., 2012; Xu H. a Ren D., 2015) a vést tak k narušení fúze autofagozómů s lyzozómy. Změny v pH mohou navíc spustit uvolnění iontů kovů obsažených v NPs (Sabella S. et al., 2014) a vést tak k další cytotoxicitě (He W. L. et al., 2008; Wataha J. C. et al., 2000).

## 2 Hypotézy a cíle práce

Při použití NPs v klinické praxi je jedním z možných způsobů jejich aplikace také intravenózní podání. Při něm dochází k interakci NPs s komponentami krevní plazmy za současného formování proteinové korony, která může výrazně pozměnit výsledné vlastnosti NPs (viz kapitola 1.3.1 Cytotoxicita na úrovni vstupu NPs do buněk). Cirkulace NPs v oběhové soustavě pak může vést ke zvýšenému cytotoxickému působení NPs na opakovaně exponované endotelové buňky cév. Ovlivnění této cytotoxicity je tudíž klíčovým aspektem v rámci využití NPs pro lékařské účely.

I přes intenzivní výzkum a snahu o minimalizaci zdrojů variability sjednocováním a optimalizováním výzkumných postupů stále dochází k relativně vysoké heterogenitě v získaných výsledcích. Ta limituje jednoznačné stanovení cytotoxického působení různých typů NPs omezující tak potenciální využití jejich unikátních fyzikálně-chemických vlastností.

Na základě literatury stanovené předpoklady:

1. Cytotoxicitu NPs lze přesněji ohodnotit kombinací různých metod v rámci jedné detekční esej provedené na stejné populaci buněk.
2. Cytotoxicitu NPs lze ovlivnit preformováním proteinové korony na jejich povrchu.
3. Cytotoxicitu NPs lze modulovat farmakologickým působením zaměřeným na ovlivnění buněčných procesů.

Výchozím cílem této práce bylo sestavit screeningovou esej pro základní stanovení cytotoxicity a ohodnocení typu buněčné smrti různých druhů NPs u endotelových buněk HUVEC. Navazujícím cílem bylo modulovat (snížit) cytotoxicitu výrazně toxických CNTCOOHs k buňkám HUVEC a umožnit tak v budoucnu jejich potenciální aplikaci *in vivo*.

Jednotlivé cíle práce:

1. Připravit karboxylované MWCNTs (CNTCOOHs).

2. Charakterizovat připravené CNTCOOHs a další typy NPs zahrnující SiNPs a SPIONs.
3. Sestavit screeningovou esej pro stanovení cytotoxicity NPs *in vitro*.
4. Stanovit cytotoxicitu CNTCOOHs, SiNPs a SPIONs u primárních endotelových buněk HUVEC pomocí sestavené screeningové eseje.
5. Studovat vliv proteinové korony na cytotoxicitu CNTCOOHs u buněk HUVEC.
6. Studovat vliv farmakologické modulace autofágie jako homeostatického procesu umožňujícího přežití buněk na cytotoxicitu CNTCOOHs vzhledem k buňkám HUVEC.

### 3 Materiál a metody

#### 3.1 NMs

SiNPs: hydrofilní SiO<sub>2</sub> NPs (rozměry: 7 – 14 nm, lyofilizované, PlasmaChem, Německo).

SPIONs: superparamagnetické Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs (rozměry: 8 ± 3 nm, 3% vodná suspenze bez organických stabilizátorů, PlasmaChem, Německo).

MWCNTs: mnohvrstevné uhlíkové nanotuby (vnější průměr: 60 nm, délka: 1 – 2 μm, čistota: > 95%, lyofilizované, SES Research, TX, USA).

#### 3.2 Pufry a roztoky

1 M HEPES pufr, pH 7,4: HEPES (Sigma-Aldrich, MO, USA).

0.1 M fosfátový pufr, pH 7,4 (phosphate buffer - PB): 75,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 24,6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, MO, USA).

10xPBS, pH 7,4: 80,9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 14,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, MO, USA), 26,8 mM KCl a 1,37 M NaCl (Penta, Česká republika).

Lyzační pufr: 50 mM Tris-HCl, pH 7,0, 2 mM EDTA, 1% SDS a 0,25 U/μl benzonáza (Sigma-Aldrich, MO, USA), 10% glycerol (Penta, Česká republika), směs inhibitorů proteáz Complete (Roche, Švýcarsko).

Vzorkovací pufr: 50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 100 mM dithiotreitol (DTT) a 0,005% bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, MO, USA), 10% glycerol (Penta, Česká republika).

#### 3.3 Funkcionalizace MWCNTs

##### 3.3.1 Karboxylace MWCNTs

Karboxylace MWCNTs byla provedena ve směsi koncentrované kyseliny sírové (96%, Penta, Česká republika) a kyseliny dusičné (65%, Penta, Česká republika) v poměru 3:1 (v/v) při teplotě 70°C po 24 hodin za průběžného míchání magnetickým míchadlem (250 rpm). Karboxylované uhlíkové nanotuby (carboxylated carbon nanotubes - CNTCOOHs) byly následně třikrát promyty MilliQ vodou na teflonovém filtru (velikost pórů: 0,1 μm; Omnipore Membrane Filter, Merck, NJ, USA) a poté dialyzovány v dialyzačním střevu (limit molekulové



hmotnosti: 1 kDa; Spectra/Por 7 Dialysis Membrane, Carl Roth, Německo) proti 5 litrům MilliQ vody. Výměna vody byla prováděna ve 12-ti hodinových intervalech, a to celkem třikrát. Vodná suspenze CNTCOOHs byla rozplněna do zkumavek (Eppendorf) a lyofilizována. Suché karboxylované CNTCOOHs byly zváženy a uloženy při pokojové teplotě.

### **3.3.2 Adsorpce proteinů na povrch CNTCOOHs**

CNTCOOHs suspendované v MilliQ vodě na koncentraci 4 mg/ml byly sonikovány 3x 20s na ledu s 60-ti sekundovým časovým odstupem mezi jednotlivými sonikačními pulzy (30% intenzita sonikace; Dynatech Sonic Dismembrator, model 300, ARTEK, NY, USA). Sonikovaná suspenze byla následně smíchána v poměru 1:1 (v/v) s roztokem imunoglobulinu G (IgG, Kiovig 100 mg/ml, infuzní roztok, Baxalta Belgium Manufacturing, Belgie) nebo lidského sérového albuminu (human serum albumin - HSA, Human Albumin Grifols, 20% infuzní roztok, Instituto Grifols, Španělsko) předředěnými v MilliQ vodě na koncentraci 2 mg/ml. Směs CNTCOOHs a příslušných proteinů (CNTCOOHs s adsorbovaným IgG - IgG-CNTCOOHs a CNTCOOHs s adsorbovaným HSA - HSA-CNTCOOHs) byla vortexována 1 hodinu při laboratorní teplotě.

## **3.4 Charakterizace NPs**

### **3.4.1 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)**

SiNPs, SPIONs, CNTCOOHs, IgG-CNTCOOHs a HSA-CNTCOOHs byly zředěny v MilliQ vodě na koncentraci 10 µg/ml, sonikovány (SiNPs, SPIONs a CNTCOOHs) a v jedné kapce (3 µl) aplikovány na niklovou nebo měděnou mřížku pokrytou formvar-uhlíkovou membránou. Mřížky s NPs byly vysušeny na vzduchu při pokojové teplotě. Struktura a aglomerace připravených NPs byla sledována bez přítomnosti jakéhokoli barvení při 80 kV pomocí transmisního elektronového mikroskopu FEI Morgagni 268 (FEI Company, OR, USA) se zabudovanou CCDkamerou MegaView III (Olympus, Japonsko).

### **3.4.2 Fluorescenčně aktivovaná průtoková cytometrie**

CNTCOOHs, IgG-CNTCOOHs a HSA-CNTCOOHs byly suspendovány v 20 mM HEPES pufru, pH 7,4 nebo v 20 mM PB, pH 7,4 na koncentraci 1 µg/ml. Alikvóty takto připravených suspenzí byly analyzovány bez jakéhokoli barvení pomocí fluorescenčně aktivované průtokové cytometrie (fluorescence-activated cell sorting - FACS) na přístroji BD FACSCanto II (BD Biosciences, CA, USA) využívající přímý rozptyl (forward scatter - FSC) a boční rozptyl (side scatter - SSC) světla zobrazený v logaritmské stupnici. Průtoková rychlost byla stanovena pomocí CS&T výzkumných kuliček (BD FACSuite™, BD Biosciences, CA, USA) a počet událostí byl měřen 20 sekund při střední rychlosti průtoku.

### **3.4.3 Separace funkcionalizovaných CNTs na sacharózovém gradientu**

Separace funkcionalizovaných CNTs (functionalized carbon nanotubes – fCNTs: CNTCOOHs, IgG-CNTCOOHs a HSA-CNTCOOHs) dle jejich velikosti byla provedena pomocí centrifugace v hustotním sacharózovém gradientu. Do každé zkumavky bylo navrstveno 500 µl roztoku sacharózy (Penta, Česká republika) rozpuštěné v MilliQ vodě na koncentraci 10, 20, 30, 40, 50 a 60% (w/v). 500 µl suspenze CNTCOOHs, IgG-CNTCOOHs a HSA-CNTCOOHs o koncentraci 100 µg/ml bylo aplikováno na vrch sacharózového gradientu a poté byly jednotlivé zkumavky centrifugovány v ultracentrifuze vybavené úhlovým rotorem SW 40-Ti (Beckman Coulter, IN, USA) rychlostí 32 000g, při 4°C, 1 hodinu.

### **3.4.4 Dynamický rozptyl světla (DLS)**

SiNPs, SPIONs a CNTCOOHs byly suspendovány na koncentraci 10 µg/ml v MilliQ vodě nebo endoteliálním buněčném růstovém médiu 2 (endothelial cell growth medium-2 - EGM) obsahujícím 2% fetální hovězí sérum (fetal bovine serum - FBS) a další supplemety zahrnující: lidský rekombinantní epidermální růstový faktor (human recombinant epidermal growth factor - hEGF), lidský růstový faktor fibroblastů – základní s heparinem (human fibroblast growth factor – basic with heparin- hFGF-B), vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor - VEGF), kyselinu askorbovou, hydrokortizon, rekombinantní dlouhý R3 inzulinu podobný růstový faktor-1 (recombinant longR3 insulin like growth factor-1 - R3-IGF-1), heparin, gentamicin, amfotericin (EGM-2 Bullet Kit, Lonza Group Ltd, Švýcarsko). Hydrodynamické průměry NPs, měřené v čase 0 a po 24 hodinách inkubace v MilliQ vodě nebo médiu, byly změřeny na základě intenzity rozptýleného světla

(úhel pozorování  $\theta = 173^\circ$ , vlnová délka laseru 632,8 nm) pomocí přístroje Nano-ZS instrument (ZEN3600, Malvern, UK) a programu DTS (Nano). Výsledné hodnoty hydrodynamických průměrů NPs byly stanoveny jako aritmetické průměry alespoň čtyř nezávislých měření.

### 3.4.5 Zeta potenciál

NPs byly zředěny na koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  v MilliQ vodě (SiNPs, SPIONs, CNTCOOHs), v 20 mM HEPES pufru, pH 7,4 nebo v 20 mM PB, pH 7,4 (CNTCOOHs, IgG-CNTCOOHs, HSA-CNTCOOHs). Hodnoty zeta potenciálu ( $\zeta$ ) byly změřeny prostřednictvím přístroje Nano-ZS Zetasizer (Malvern Instruments, Malvern, UK) a vypočteny na základě elektroforetických mobilit NPs za využití Henryovy rovnice se Smoluchowského aproximací:  $\mu = \varepsilon \zeta / \eta$ , kde  $\mu$  je elektroforetická mobilita,  $\varepsilon$  je dielektrická konstanta rozpouštědla a  $\eta$  je viskozita rozpouštědla. Výsledné hodnoty byly stanoveny jako průměry tří měření složených z 15-100 opakování.

### 3.4.6 Spektroskopická analýza

Absorpční spektra SiNPs, SPIONs a CNTCOOHs zředěných v MilliQ vodě na koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  byla změřena v rozmezí vlnových délek 250 – 800 nm pomocí spektrofotometru BioSpectrometer<sup>®</sup> (Eppendorf, Německo).

## 3.5 Kultivace a uchování buněk

Lidské endotelové buňky izolované z pupečnickové žíly (human umbilical vein endothelial cells – HUVEC, #C2519A, Lonza Group Ltd, Švýcarsko) byly rozmrazeny do kompletního kultivačního média EGM-2 (viz kapitola 3.4.4 Dynamický rozptyl světla (DLS)) a pěstovány jako adherentní kultury na Petriho miskách (Techno Plastic Products, Švýcarsko) v atmosféře z 5%  $\text{CO}_2$  při teplotě 37°C. Po dosažení ~80 % konfluence byly buňky sklizeny pomocí roztoku trypsin/EDTA (Lonza Group Ltd, Švýcarsko), centrifugovány při 220g 5 minut a resuspendovány v zamrazovacím médiu složeném z EGM-2, 10% FBS (certifikované FBS Gibco, US, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) a 10% dimethylsulfoxidu (DMSO, Sigma-Aldrich, MO, USA). Buněčná suspenze byla rozdělena po 1 ml ( $0,25 \times 10^6$  buněk) do zamrazovacích zkumavek (Simport, Kanada) a uložena do -20°C v boxu

s vychlazeným isopropylalkoholem (Penta, Česká republika) na 2 hodiny. Poté byly jednotlivé alikvóty ponechány přes noc v -80°C a následně přeneseny do tekutého dusíku.

### **3.6 Screeningová esej pro ohodnocení cytotoxicity a typu buněčné smrti**

#### **3.6.1 Příprava buněk pro esej**

Připravené buněčné alikvóty byly rozmrazeny do 6 ml čerstvého média a stočeny při 220g 5 minut. Po odstranění supernatantu obsahujícího DMSO byly buňky resuspendovány v 10 ml čerstvého média a pěstovány na 10 mm Petriho misce (Techno Plastic Products, Švýcarsko). Narostlé buňky byly sklizeny (trypsin/EDTA) a vysazeny v koncentraci 5000 buněk/jamku/100 µl média (v případě experimentů s bafilomycinem A1 v koncentraci 3000 buněk/jamku/100 µl média) na 96-jamkovou destičku (Techno Plastic Products, Švýcarsko). Kultivace probíhala 48 hodin za standardních podmínek (5% CO<sub>2</sub>, teplota 37°C). Maximální pasáž buněk použitých pro experimenty nepřesáhla čtvrtou pasáž. Všechny tři části screeningové eseje pro ohodnocení buněčné smrti (tzv. cell death screening – CDS) byly provedeny na výchozí 96-jamkové destičce a tudíž i na stejné populaci pěstovaných buněk.

#### **3.6.2 Aplikace testovaných látek a příslušných kontrol**

Po 48 hodinách kultivace na 96-jamkové destičce bylo z buněk odsáto médium a nahrazeno v 6-ti replikátech o objemu 200 µl a) médiem s příslušnou koncentrací kamptotecinu (camptothecin – CPT; (S)-(+)-kamptotecin, Sigma-Aldrich, MO, USA), staurosporinu (ST; Santa Cruz Biotechnology, Německo) nebo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Penta, Česká republika; pozitivní kontroly), b) čerstvým kultivačním médiem (negativní kontrola), c) suspenzí NPs zředěných v kultivačním médiu na příslušnou koncentraci. Při zjišťování cytotoxicity závislé na dávce testované látky byly buňky s NPs inkubovány 24 hodin, v případě časově závislého experimentu 0, 3, 6, 12 a 24 hodin při 37°C v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Vyšetřování vlivu bafilomycinu A1 na toxicitu CNTCOOHs zahrnovalo před samotnou aplikací NPs preinkubaci buněk s 0,1, 1, 10 a 100 nM bafilomycinem A1 (čistota ≥90%, Sigma-Aldrich, MO, USA).

#### **3.6.3 Ohodnocení nekrotického působení**

Po ukončení inkubace byla 96-jamková destička stočena při pokojové teplotě 3 minuty rychlostí 400g. Ze stočeného supernatantu byly odebrány 50 $\mu$ l alikvóty, které byly přeneseny do nové 96-jamkové destičky a smíseny se stejným množstvím (50  $\mu$ l) detekční směsi z LDH kitu (LDH Cytotoxicity Detection Kit, Takara, Japonsko). Nakonec byla destička inkubována při 37°C 30 minut. Míra nekrózy byla stanovena spektrofotometricky na základě absorbance změřené při vlnové délce 490 nm prostřednictvím mikrodestičkové čtečky předehřáté na 37°C (Victor<sup>3</sup> 1420-012 Multilabel Counter, Perkin Elmer, OH, USA). Pro odstranění možné falešné positivity, způsobené absorbcí NPs ve vlnové délce 490 nm, byla přídatně změřena absorbance také při 660 nm. V této vlnové délce je absorbance LDH eseje minimální a příspěvek samotných NPs je tak možné odečíst pomocí následujícího vzorce:

$$A(\text{LDH})^{490} = A^{490} - k \cdot A^{660}$$

$$k = \frac{A_{\text{bckg}}^{490}}{A_{\text{bckg}}^{660}}$$

$A^{490}$  a  $A^{660}$  – hodnoty absorbance změřené při 490 a 660 nm,  $k$  – koeficient vypočtený jako poměr absorbance NPs rozpuštěných v médiu a měřených při 490 nm a 660 nm pouze v přítomnosti LDH detekční směsi (bez buněk).

### 3.6.4 Ohodnocení životaschopnosti buněk

Životaschopnost buněk byla ohodnocena pomocí 1-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(2,4-disulfofenyl)-5-(4-nitrofenyl)formazanové hydrát disodné soli (WST-8) eseje, která byla součástí kitu-8 pro počítání buněk (cell counting kit-8 - CCK-8; Dojindo EU GmbH, Německo). Do původní 96-jamkové destičky s buňkami bylo z kitu přidáno 15  $\mu$ l reakční směsi (na 150  $\mu$ l zbylého objemu média). Destička byla inkubována při 37°C 3 hodiny v 5% CO<sub>2</sub> inkubátoru a následně stočena při 400g, 3 minuty. Z každé jamky bylo odebráno 100  $\mu$ l supernatantu, který byl přenesen do nové 96-jamkové destičky. Absorbance vyvinuté barvy byla změřena spektrofotometricky při vlnových délkách 450 nm a 660 nm na mikrodestičkové čtečce. Ze stejných důvodů, jako v případě LDH eseje, byla výsledná hodnota absorbance vypočtena dle vzorce:

$$A(\text{WST-8})^{450} = A^{450} - k \cdot A^{660}$$

$$k = \frac{A_{\text{bckg}}^{450}}{A_{\text{bckg}}^{660}}$$

$A^{450}$  a  $A^{660}$  – hodnoty absorbance změřené při 450 a 660 nm,  $k$  – koeficient vypočtený jako poměr absorbance NPs rozpuštěných v médiu a měřených při 450 nm a 660 nm pouze v přítomnosti WST-8 eseje (bez buněk).

### 3.6.5 Stanovení intaktních jader a apoptotických tělísek

Do výchozí 96-jamkové destičky s buňkami a zbylými 50  $\mu\text{l}$  média bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  fluorescenční barvy Hoechst 33342 (AAT Bioquest, CA, USA) rozpuštěné v PBS na koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$ . Destička byla inkubována při 37°C v 5%  $\text{CO}_2$  inkubátoru 30 minut. Fixace buněk byla provedena 2% paraformaldehydem (PFA; Sigma-Aldrich, MO, USA) a jednotlivé jamky snímány pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu Olympus IX70 (Olympus, Japonsko) vybaveného kamerou ProgRes MFcool (Jenoptik AG, Německo), při zvětšení 10 $\times$ 10, excitaci 350 nm a emisi 450 nm. K pořízení obrázků byl využit software NIS-Elements BR3.1 (Laboratory Imaging Ltd, Česká republika). Výsledný počet intaktních jader a apoptotických tělísek byl stanoven za využití nově napsaných maker (viz kapitola 4.2.1 Vývoj CDS eseje) „Counting\_of\_Nuclei” a “Counting\_of\_Apoptotic\_Bodies” v programu ImageJ 1.50b.

### 3.7 Interference CNTCOOHs s LDH esejí

Po 48 hodinách standardní kultivace byla k buňkám HUVEC přidána (v duplikátech) jednotlivá chemická agens, a to konkrétně: 5  $\mu\text{M}$  CPT, 1  $\mu\text{M}$  ST, 4 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 0,1% Triton X-100 (Tn X-100; Sigma-Aldrich, MO, USA). Zbylé dvě jamky byly použity jako negativní kontrola. Po 24 hodinách inkubace byly duplikáty supernatantů odebrány a přeneseny do centrifugačních zkumavek. Každý vzorek byl centrifugován (2000g, 5 minut, při pokojové teplotě) a čistý supernatant rozdělen po 1 ml do dvou zkumavek Eppendorf. Do první byly ze sonikované zásobní vodné suspenze přidány CNTCOOHs o konečné koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ , do druhé byl přidán adekvátní objem MilliQ vody bez NPs. Všechny vzorky byly inkubovány 1 hodinu při 37°C v inkubátoru s 5%  $\text{CO}_2$  a následně v duplikátech (50  $\mu\text{l}$ /jamku) aplikovány

na 96-jamkovou destičku. Ke každému replikátu bylo přidáno stejné množství (50  $\mu$ l/jamku) LDH detekční směsi (viz kapitola 3.6.3 Ohodnocení nekrotického působení) a destička byla inkubována 30 minut při 37°C v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Absorbance byla změřena spektrofotometricky na mikrodestičkové čtečce při vlnových délkách 490 a 660 nm.

### **3.8 Intracelulární působení fCNTs**

#### **3.8.1 Fluorescenční značení CNTCOOHs**

Lyofilizované CNTCOOHs byly rozpuštěny v 50 mM pufru hemisodné soli kyseliny 2-(N-morfolino)ethansulfonové (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid hemisodium salt - MES; Sigma-Aldrich, MO, USA), pH 5,0 na koncentraci 2 mg/ml. K této suspenzi byl přidán 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimide, hydrochloride - EDAC; Thermo Fisher Scientific, MA, USA) o výsledné koncentraci 2mM a N-hydroxysukcinimid (NHS; Sigma-Aldrich, MO, USA) o výsledné koncentraci 5mM. Směs byla inkubována za jemného vortexování při pokojové teplotě 15 minut. Aktivované CNTCOOHs byly odděleny od zbytku směsi pomocí centrifugačních filtrů (limit molekulové hmotnosti: 3 kDa, Amicon Ultra-0,5, Merck, NJ, USA) a rychlosti stáčení 4500 rpm, 20 minut při pokojové teplotě. Stočené a aktivované CNTCOOHs byly resuspendovány v 1 ml 50 mM MES pufru, pH 5,0 obsahujícím 1 mg fluorescenční barvy Alexa Fluor<sup>®</sup> kadaverin (AlexaFluor<sup>®</sup> 488 cadaverine, Life Technologies, CA, USA). Směs byla následně inkubována za jemného míchání při pokojové teplotě 4 hodiny. CNTCOOHs s navázanou Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (CNTCOOH-488) byly desetkrát promyty od volné fluorescenční barvy MilliQ vodou za využití výše zmíněných centrifugačních filtrů, při rychlosti stáčení 4500 rpm po dobu 20 minut při pokojové teplotě.

#### **3.8.2 Konfokální laserová rastrovací mikroskopie**

HUVEC (20 000 buněk/jamku) byly vysazeny na sklo s připevněnou komůrkou pro jejich kultivaci (Nunc<sup>™</sup> Lab-Tek<sup>™</sup> II Chamber Slide<sup>™</sup> System, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) a pěstovány 24 hodin při 37°C v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Následně bylo k buňkám přidáno 10, 50 nebo 100  $\mu$ g/ml fluorescenčně značených CNTCOOH-488 suspendovaných v EGM-2

médiu. Po 4 nebo 24 hodinách inkubace bylo médium s NPs odstraněno, buňky opláchnuty PBS a fixovány 30 minut vychlazeným 2% PFA. Fixované buňky byly třikrát opláchnuty PBS, permeabilizovány 0,1% Tritonem X-100 a znovu třikrát opláchnuty PBS. Blokování a barvení buněk bylo provedeno pomocí 30-ti minutové inkubace v blokovacím roztoku (Image-iT FX Signal Enhancer, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) a 20-ti minutové inkubace při pokojové teplotě s barvením pro vizualizaci aktinu (Alexa Fluor 555 Phalloidin, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) a DNA (TO-PRO<sup>®</sup>-3, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Po obarvení byly buňky opláchnuty PBS (4x5 minut) a montovány do montovacího média (ProLong Gold Antifade Mountant, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Skla byla snímána na konfokálním mikroskopu Zeiss 710 LSM (Zeiss, Oberkochen, Německo) za využití planachromatického objektivu s olejovou imerzí 40×1.4.

### **3.8.3 TEM**

Buňky HUVEC byly vysazeny na krycí skla pokrytá poly-L-lysinem (Sigma-Aldrich, MO, USA) a kultivovány 48 hodin. Poté bylo odstraněno staré médium a nahrazeno čerstvým obsahujícím sonikované CNTCOOHs, IgG-CNTCOOHs a HSA-CNTCOOHs o konečné koncentraci 10 µg/ml. Buňky byly inkubovány s fCNTs po 24 hodin a následně fixovány 4% PFA předchlazeným na 4°C po 30 minut. Po fixaci byly třikrát opláchnuty PBS, dehydratovány ethanolem a zality do LRWhite pryskyřice (Electron Microscopy Sciences, PA, USA). Vzorky byly polymerizovány při 60°C 2-3 dny. Po polymerizaci pryskyřice byly odděleny od krycího skla pomocí tekutého dusíku. Zalité buňky byly nařezány na ultratenké řezy o velikosti 60 nm ultramikrotomem s diamantovým nožem (Ultracat ultramicrotome, Leica, Německo). Řezy byly upevněny na měděnou mřížku pokrytou formvar-uhlíkovou membránou a kontrastované octanem uranylu a citrátem olovnatým. Poté byly zkoumány při 80 kV transmisním elektronovým mikroskopem FEI Morgagni 268 (FEI Company, OR, USA) se zabudovanou CCDkamerou MegaView III (Olympus, Japonsko).

### **3.9 Detekce proteinů pomocí SDS-PAGE a Western blotu**

Buňky HUVEC byly vysazeny na 6-jamkovou destičku (50 000 buněk/jamku) a kultivovány do ~80 % konfluence. Poté bylo staré médium nahrazeno čerstvým se suspendovanými CNTCOOHs, IgG-CNTCOOHs nebo HSA-CNTCOOHs o koncentraci 50 µg/ml. Délka inkubace byla 0,5, 1, 2 a 6 hodin. Následně byl roztok s NPs odstraněn, buňky



opláchnuty vychlazeným PBS, sklizeny pomocí roztoku trypsin/EDTA a centrifugovány 400g 3 minuty. Pelety byly lyzovány pomocí vychlazeného lyzačního roztoku (viz kapitola 3.2 Pufry a roztoky) 30 minut na ledu. Koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích byla stanovena prostřednictvím eseje 2,2'-bichinolin-4,4'-dikarboxylové kyseliny (2,2'-Biquinoline-4,4'-dicarboxylic acid - BCA; Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). 10 - 20 µg proteinů z každého vzorku bylo smíseno s redukujícím vzorkovým pufrem (viz kapitola 3.2 Pufry a roztoky) a zahříváno při 95°C 5 minut. Vzorky byly nanесeny na 12% separovací gel, elektroforeticky separovány a blotovány na 0,45µm nitrocelulóзовou membránu (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) při konstantním proudu 0,4 A/gel 1 hodinu. Následně byla membrána blokována 30 minut v 5% roztoku mléka (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) rozpuštěného v solném roztoku pufovaném Trisem s 0,05% Tweenem 20 (TBS-T; Tris buffered saline with 0,05% Tween 20, Sigma-Aldrich, MO, USA) a poté inkubovánav roztoku 1% mléka a primární protilátky příslušného ředění (viz Tabulka č. 1) při laboratorní teplotě 2 hodiny. Membrána byla od protilátek 4x opláchnuta v TBS-T, znovu blokována v 5% roztoku mléka 5 minut a inkubována se sekundární protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou (polyklonální oslí protilátka proti králičímu IgG, ředění 1:2000, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., PA, USA) při pokojové teplotě 1 hodinu. Membrána byla od sekundární protilátky 5x promyta solným roztokem pufovaným Trisem (Tris buffered saline - TBS) a aktivita alkalické fosfatázy zobrazena pomocí chromogenního substrátu 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitro-tetrazoliové modři (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium- BCIP/NBT; Merck, NJ, USA). Pro kvantifikaci množství nanášky proteinů bylo využito barvení Ponceau S (Sigma-Aldrich, MO, USA). Membrány byly nasnímány pomocí transluminátoru PXi Access Touch s programem GeneSys verze 1.6.6 (Syngene, Cambridge, UK). Intenzity proužků studovaných proteinů byly vypočteny pomocí programu GeneTools verze 4.3.8.0 (Syngene, Cambridge, UK), normalizovány na množství nanesených proteinů vizualizovaných barvením Ponceau S a vyjádřeny jako procento exprese daného proteinu v příslušné kontrole.

**Tabulka č. 1: Seznam primárních protilátek použitých k detekci specifických proteinů metodou Western blot.**

Antigen	Typ protilátky	Ředění	Výrobce
---------	----------------	--------	---------

<b>Kaspáza-3</b>	Králičí polyklonální IgG	1:500	Santa Cruz Biotechnology (TX, USA)
<b>LC3B</b>	Králičí polyklonální IgG	1:2000	Sigma-Aldrich (MO, USA)
<b>PARP-1</b>	Králičí polyklonální IgG	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (TX, USA)

Zkratky: LC3B – microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta, PARP-1 – poly(ADP-ribose) polymerase-1.

### 3.10 Statistika

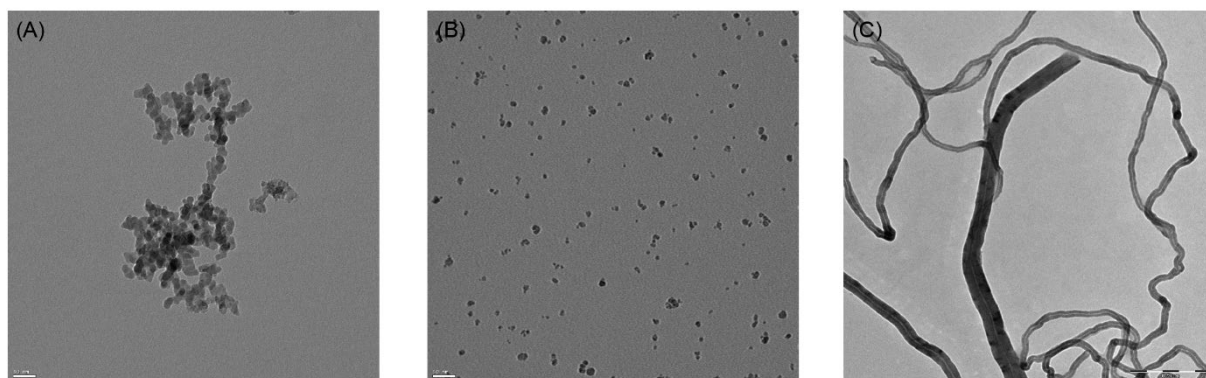
Výsledné hodnoty byly stanoveny jako aritmetické průměry  $\pm$  střední chyba průměru (standard error of the mean - SEM) dat získaných z nejméně tří experimentů. Statistická analýza byla provedena za využití jednorozměrné analýzy rozptylu (analysis of variance - ANOVA) s Dunnettovým post testem pomocí programu GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software, CA, USA). Statistická významnost byla určena na základě p-hodnot, kdy  $P < 0,05$  byla považována za statisticky signifikantní (\*),  $P < 0,01$  středně silně signifikantní (\*\*) a  $P < 0,001$  vysoce signifikantní (\*\*\*). Letální koncentrace, 50% (lethal concentration, 50% - LC<sub>50</sub>) byla stanovena Finneyho probitovou analýzou (Finney D. J., 1971) aplikovanou na program Microsoft® Excel® (Alpha Raj, M., 2016, [online]).

## 4 Výsledky

### 4.1 Charakterizace NPs

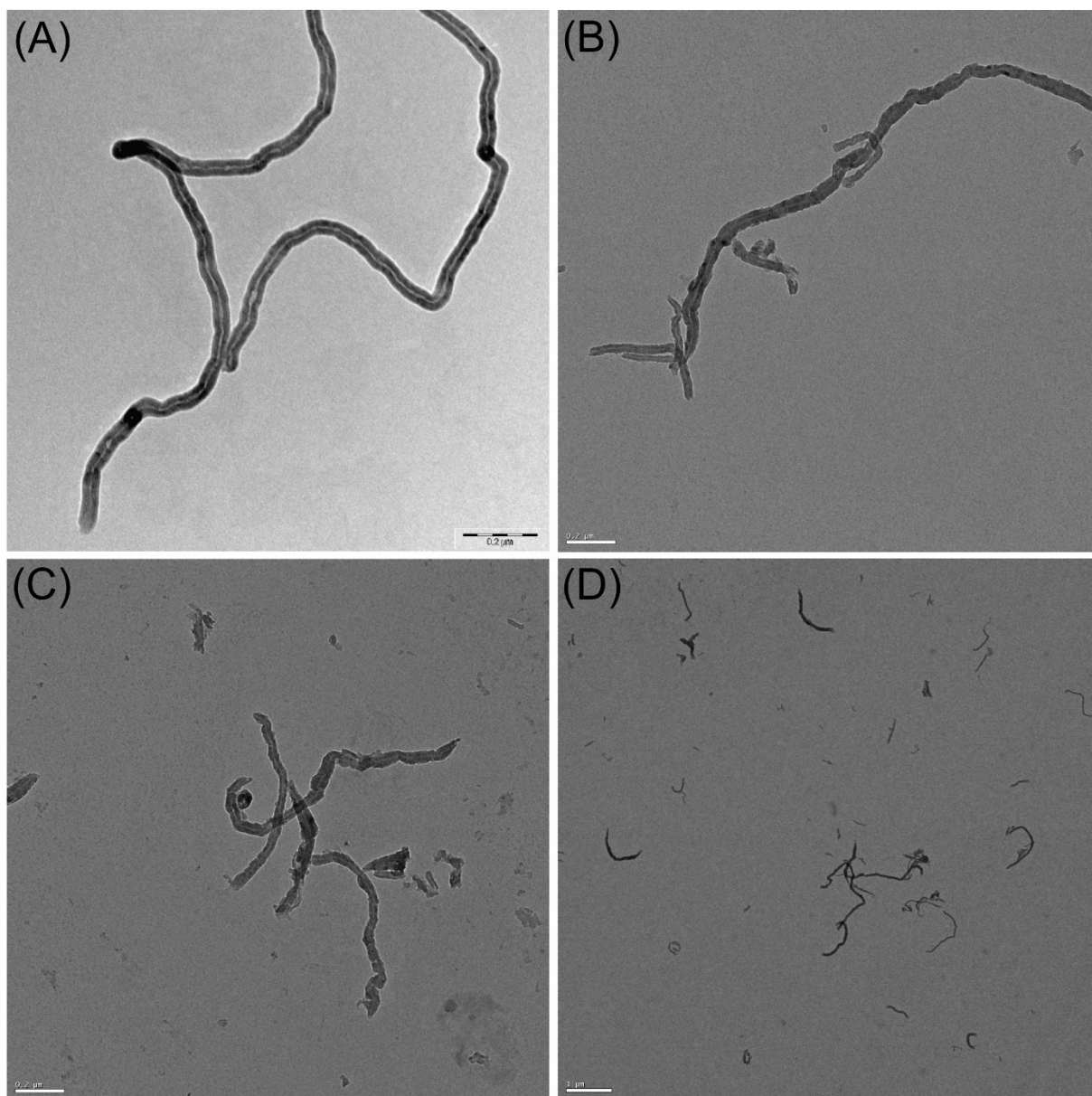
#### 4.1.1 Tvar, velikost, náboj a aglomerace NPs

Reprezentativní TEM obrázky nefunkcionalizovaných NPs v suchém stavu prokázaly sférický až elipsoidní tvar SiNPs s tendencí k aglomeraci do nepravidelných shluků (Obrázek č. 4A). SPIONs vykazovaly více kulovitou morfologii s téměř rovnoměrnou distribucí jednotlivých NPs či jejich menších shluků (Obrázek č. 4B). Struktura CNTs sestávala z vláknitého (tubulárního) tvaru s vnitřní dutinou (Obrázek č. 4C). Provazovitá vlákna jednotlivých CNTs byla vzájemně propletena mezi sebou a vykazovala patrné rozdíly v šířce.



**Obrázek č. 4:** TEM obrázky SiNPs (A), SPIONs (B) and CNTs (C). Měřítko: 50 nm (A-B), 0,5  $\mu\text{m}$  (C).

Vliv karboxylace pomocí směsi koncentrované kyseliny sírové a kyseliny dusičné na strukturu a defekty v povrchu CNTs byl sledován prostřednictvím TEM. Obrázek č. 5A naznačuje hladký povrch nekarboxylovaných CNTs s menší mírou nepravidelností ve srovnání s povrchem karboxylovaných CNTCOOHs (Obrázek č. 5B). Karboxylace navíc zvýšila celkovou heterogenitu materiálu reprezentovanou širší distribucí velikostí CNTCOOHs, množstvím krátkých úlomků a dalšími drobnými nečistotami (Obrázek č. 5C-D).



**Obrázek 5:** TEM obrázky vlivu karboxylace na strukturu a velikost CNTs. A) CNTs, B-D) CNTCOOHs. Měřítko: 0,2  $\mu\text{m}$  (A, B, C), 1  $\mu\text{m}$  (D).

Povrchový náboj a míra stability jednotlivých typů NPs byla určena na základě naměřených průměrných hodnot  $\zeta$ -potenciálů. Záporné hodnoty poukazují na negativní náboj u SiNPs ( $-28,4 \pm 1,9$  mV) a CNTCOOHs ( $-52,5 \pm 2,9$  mV, Tabulka č. 2), na rozdíl od pozitivně nabitých SPIONs s průměrnou kladnou hodnotou  $\zeta$ -potenciálu o velikosti  $25,5 \pm 2,1$  mV. Vyšší absolutní hodnota  $\zeta$ -potenciálu v případě CNTCOOHs naznačuje vysokou stabilitu těchto NPs v MilliQ vodě. Naopak nižší absolutní hodnoty u SiNPs a SPIONs poukazují na nižší míru stability s pravděpodobnou tendencí k mírné aglomeraci.

**Tabulka č. 2: Průměrné hodnoty elektroforetických mobilit a  $\zeta$ -potenciálů SiNPs, SPIONs a CNTCOOHs suspendovaných v MilliQ vodě.**

	<b>Elektroforetická mobilita</b> ( $\mu\text{m}\cdot\text{cm}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )	<b><math>\zeta</math>-potenciál</b> (mV)
<b>SiNPs</b>	$-2,225 \pm 0,1$	$-28,4 \pm 1,9$
<b>SPIONs</b>	$1,995 \pm 0,2$	$25,5 \pm 2,1$
<b>CNTCOOHs</b>	$-4,114 \pm 0,2$	$-52,5 \pm 2,9$

Data reprezentují průměrné hodnoty  $\pm$  SEM (n = 3).

Data byla publikována v naší předchozí práci (Filipova M. et al., 2018).

Změna velikosti NPs suspendovaných v kultivačním médiu ve srovnání s NPs suspendovanými v MilliQ vodě byla studována na základě změny velikosti hydrodynamických průměrů ( $D_H$ ) pomocí DLS. Ačkoli jsou rozměry jednotlivých typů NPs poskytnuté výrobcem (SiNPs: 7 – 14 nm, SPIONs:  $8 \pm 3$  nm, CNTs: průměr: 60 – 100 nm, délka: 1 – 2  $\mu\text{m}$ ) v přibližném souladu s daty získanými z TEM (Obrázek č. 4),  $D_H$  se výrazně liší. Průměrné hodnoty  $D_H$  zkoumaných NPs zobrazuje Tabulka č. 3.  $D_H$  naměřené v MilliQ vodě v čase 0 dosahují velikosti  $210 \pm 32,3$  nm pro SiNPs,  $44,2 \pm 4,7$  nm pro SPIONs a  $219 \pm 3,8$  nm pro CNTCOOHs. 24 hodinová inkubace NPs ve vodě vedla ke zvětšení velikosti  $D_H$  1,6x (SiNPs), 19,2x (SPIONs) a 1,3x (CNTCOOHs) ve srovnání s výchozí hodnotou (čas 0 h). Stejný trend můžeme pozorovat i v případě  $D_H$  NPs inkubovaných v kultivačním médiu. Po 24 hodinách se průměrná velikost zvýšila 7,5x (SiNPs), 9,3x (SPIONs) a 2,4x (CNTCOOHs) při porovnání s hodnotou  $D_H$  měřenou v čase 0. Polydisperzní index (PDI) NPs rozpuštěných v MilliQ vodě a kultivačním médiu dosahoval v čase 0 hodnot menších než 0,3. To naznačuje homogenní distribuci velikostí SiNPs, SPIONs a CNTCOOHs. Po 24 hodinách inkubace docházelo k nárůstu PDI poukazující na širší distribuci velikostí testovaných NPs.

**Tabulka č. 3: Průměrné hodnoty  $D_H$  SiNPs, SPIONs a CNTCOOHs stanovené pomocí DLS.**

	<b>MilliQ voda</b>		<b>Kultivační médium</b>	
	<b><math>D_H</math> (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b><math>D_H</math> (nm)</b>	<b>PDI</b>
<b>SiNPs (0 h)</b>	$210 \pm 32,3$	$0,18 \pm 0,04$	$153 \pm 23,1$	$0,31 \pm 0,03$
<b>SiNPs (24 h)</b>	$340 \pm 19,8$	$0,54 \pm 0,02$	$1140 \pm 105,1$	$0,60 \pm 0,03$

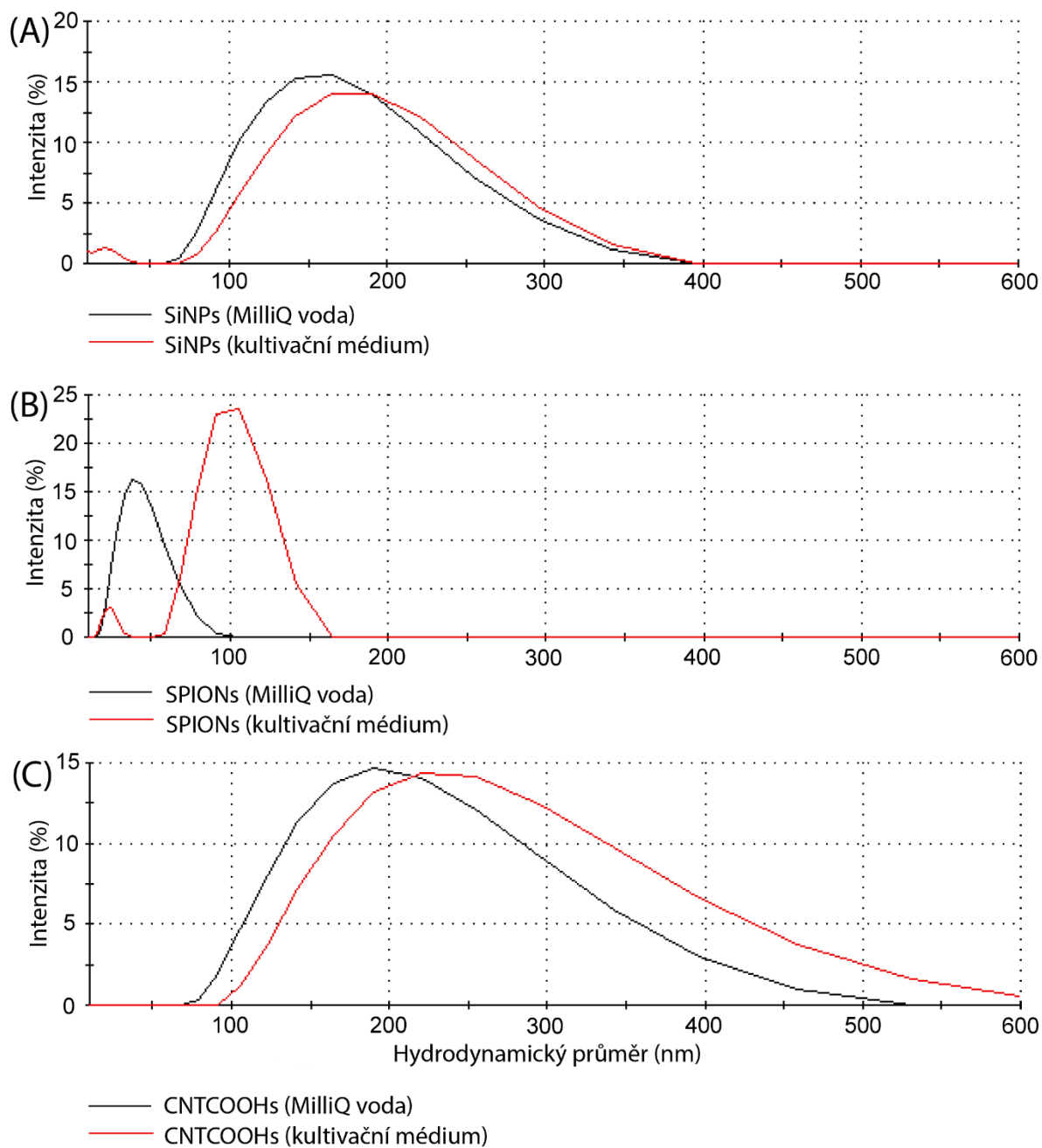
<b>SPIONs (0 h)</b>	44,2 ± 4,7	0,22 ± 0,05	116 ± 8,2	0,32 ± 0,03
<b>SPIONs (24 h)</b>	847 ± 44,3	0,48 ± 0,03	1081 ± 83,2	0,41 ± 0,06
<b>CNTCOOHs (0 h)</b>	219 ± 3,8	0,18 ± 0,01	261 ± 3,5	0,25 ± 0,01
<b>CNTCOOHs (24 h)</b>	295 ± 21,1	0,20 ± 0,01	634,2 ± 13,9	0,23 ± 0,02

Data reprezentují průměrné hodnoty ± SEM (n = 4).

Data byla publikována v naší předchozí práci (Filipova M. et al., 2018).

Zkratky:  $D_H$  – hydrodynamický průměr, PDI – polydisperzní index.

Reprezentativní DLS křivky distribuce velikostí SiNPs, SPIONs a CNTCOOHs zachycených v čase 0 zobrazuje Obrázek č. 6. DLS křivka SPIONs inkubovaných v MilliQ vodě vykazuje monomodální charakter, na rozdíl od inkubace v kultivačním médiu, která má bimodální průběh (Obrázek č. 6B). To naznačuje přítomnost dvou velikostních populací (agregátů) SPIONs s průměrem ~15 nm a ~100 nm. Podobně je tomu i v případě SiNPs suspendovaných v kultivačním médiu, jejichž bimodální křivka ukazuje dvě velikostní populace (Obrázek č. 6A). Širší DLS křivky u SiNPs a zejména u CNTCOOHs (Obrázek č. 6C) reprezentují širší škálu distribucí velikostí těchto NPs.



**Obrázek č. 6:** Reprezentativní křivky distribuce velikostí SiNPs, SPIONs a CNTCOOHs měřených pomocí DLS ( $t = 0$  h) v MilliQ vodě (černá křivka) a kultivačním médiu (červená křivka).

#### 4.1.2 Charakterizace fCNTs odlišnými proteinovými korunami

Vliv proteinového obalu na náboj a stabilitu fCNTs (CNTCOOHs, IgG-CNTCOOHs a HSA-CNTCOOHs) v přítomnosti 20 mM HEPES pufru nebo 20 mM PB byl sledován na

CNTCOOHs preinkubovaných ve vodném roztoku IgG nebo HSA (4 mg/ml CNTCOOHs : 2 mg/ml roztok IgG/HSA). Příslušné průměrné hodnoty elektroforetických mobilit a jednotlivých  $\zeta$ -potenciálů zobrazuje Tabulka č. 4. CNTCOOHs bez proteinové korony suspendované v HEPES nebo PB pufru vykazovaly záporný povrchový náboj a dobrou stabilitu v obou použitých pufrch. Proteinová korona z IgG nebo HSA neměla vliv na změnu povrchového náboje CNTCOOHs, který tak zůstal záporný u všech tří typů fCNTs. Nicméně proteinová korona z IgG výrazně pozměnila hodnotu  $\zeta$ -potenciálu, která klesla z původních  $-41,1 \pm 0,52/-46,3 \pm 0,70$  mV (HEPES/PB, CNTCOOHs) na  $-5,5 \pm 0,13/-4,2 \pm 0,19$  mV (IgG-CNTCOOHs). Proteinová korona z HSA tuto hodnotu snižovala mírně ( $-41,1 \pm 0,43/-46,3 \pm 0,70$  mV vs.  $-28,1 \pm 0,43/-37,7 \pm 0,51$  mV). Pokles průměrných absolutních hodnot  $\zeta$ -potenciálů vlivem proteinových korun poukazuje na snížení stability NPs a tendenci k tvorbě shluků.

**Tabulka č. 4: Stanovení povrchového náboje a míry stability fCNT pomocí  $\zeta$ -potenciálu.**

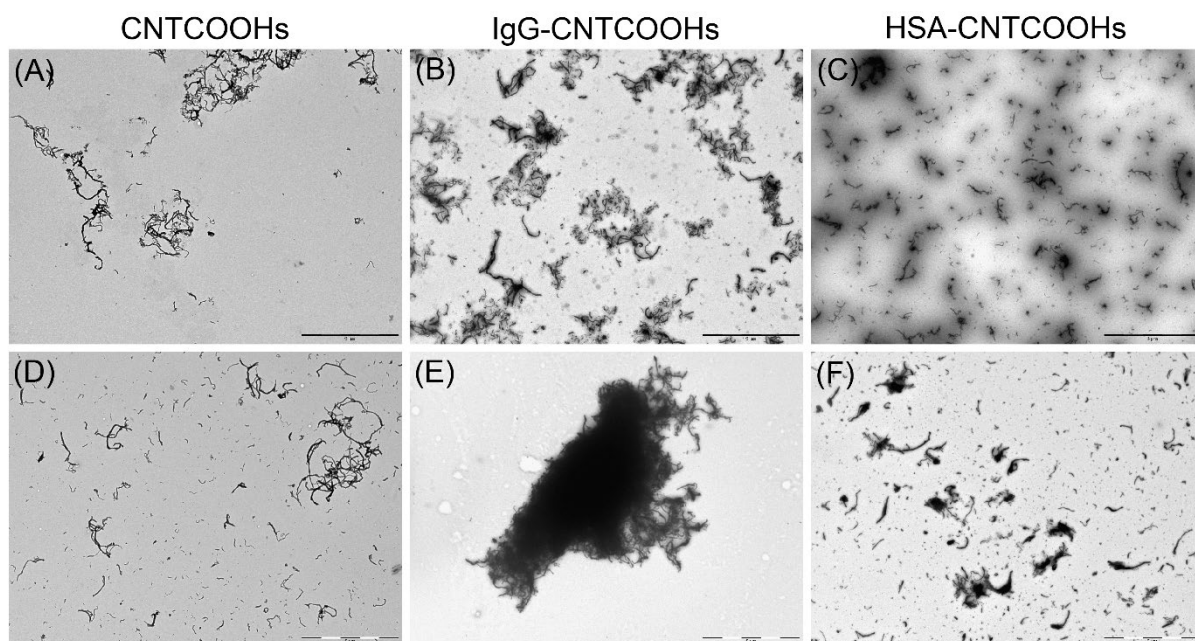
	Elektroforetická mobilita		$\zeta$ -potenciál	
	$(\mu\text{m}\cdot\text{cm}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$		(mV)	
	20mM HEPES pH 7.4	20mM PB pH 7.4	20mM HEPES pH 7.4	20mM PB pH 7.4
<b>CNTCOOHs</b>	$-3,222 \pm 0,04$	$-3,626 \pm 0,05$	$-41,1 \pm 0,52$	$-46,3 \pm 0,70$
<b>IgG-CNTCOOHs</b>	$-0,431 \pm 0,01$	$-0,328 \pm 0,01$	$-5,5 \pm 0,13$	$-4,2 \pm 0,19$
<b>HSA-CNTCOOHs</b>	$-2,203 \pm 0,03$	$-2,958 \pm 0,04$	$-28,1 \pm 0,43$	$-37,7 \pm 0,51$

Hodnoty  $\zeta$ -potenciálu byly měřeny pomocí laserové Dopplerovy elektroforézy. Data reprezentují průměrné hodnoty  $\pm$  SEM (n = 3).

Vliv proteinové korony na aglomeraci CNTCOOHs v přítomnosti 20 mM HEPES pufru nebo 20 mM PB byl sledován bez kontrastního barvení proteinů pomocí TEM (Obrázek č. 7). CNTCOOHs bez proteinové korony vytvářely v přítomnosti HEPES pufru výrazně větší shluky vzájemně propletených NPs (Obrázek č. 7A). Přítomnost solí v PB vedla k vyšší monodisperzitě CNTCOOHs s menším množstvím větších aglomerátů (Obrázek č. 7D). Vazba IgG, pozorovatelná jako tenká šedá vrstva okolo jednotlivých NPs (Obrázek č. 7B), indukovala v přítomnosti HEPES pufru výraznější shlukování IgG-CNTCOOHs. Toto shlukování bylo maximalizováno v PB, a to tak, že se všechny IgG-CNTCOOHs shlukly do několika velkých aglomerátů (obrázek č. 7E). Šedá mlha v okolí HSA-CNTCOOHs inkubovaných v prostředí HEPES pufru (Obrázek č. 7C) naznačuje silnou proteinovou koronu tvořenou albuminem. Ta



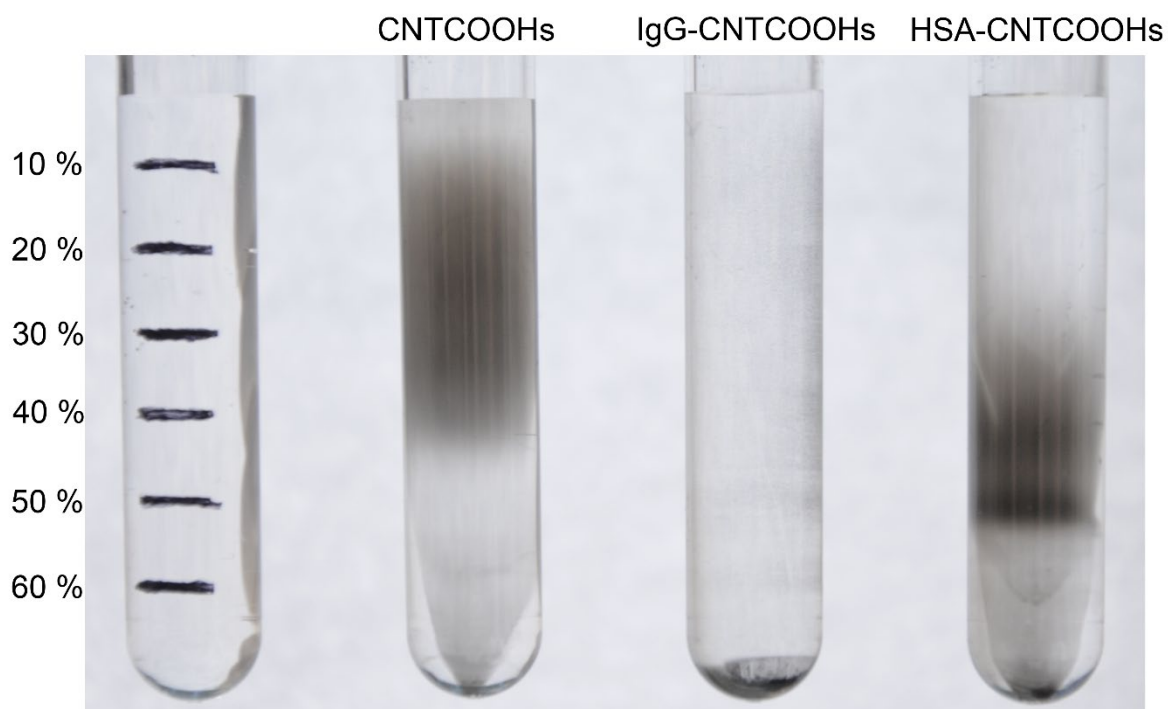
měla pravděpodobně výrazný vliv na vysokou monodisperzitu NPs s viditelně menším množstvím drobnějších aglomerátů ve srovnání s CNTCOOHs bez proteinové korony. V přítomnosti PB byla proteinová vrstva výrazně menší, nicméně HSA-CNTCOOHs (Obrázek č. 7F) si zachovaly podobný charakter aglomerace jako v případě proteiny neobalených CNTCOOHs (Obrázek č. 7D).



**Obrázek č. 7:** TEM obrázky zobrazující aglomeraci CNTCOOHs bez proteinové korony (A, D) a s proteinovou korunou z IgG (B, E) nebo z HSA (C, F) v přítomnosti 20 mM HEPES pufru (A – C) nebo 20 mM PB pufru (D – F). Měřítko: 5  $\mu$ m.

Aglomerální stav CNTCOOHs bez a s proteinovou korunou z IgG a HSA byl stanoven prostřednictvím centrifugace na sacharózovém gradientu. Tento druh zonální centrifugace umožňuje separovat NPs na základě jejich velikosti a denzity (Robertson J. D. et al., 2016). Po aplikaci CNTCOOHs, IgG-CNTCOOHs a HSA-CNTCOOHs na vrstvu gradientu a následné centrifugaci došlo k rovnoměrnému rozvrstvení CNTCOOHs bez proteinové korony v sacharózovém pásu o koncentraci 10 – 40% (Obrázek č. 8). Distribuce NPs byla v rozmezí těchto pásů přibližně rovnoměrná a naznačila tak širší distribuci velikostí CNTCOOHs. Velmi malé množství NPs bylo pozorováno i ve vyšších koncentracích gradientu zachycujících vzácněji se vyskytující větší shluky CNTCOOHs. Naproti tomu proteinová korona z IgG způsobila výraznou agregaci IgG-CNTCOOHs, které kompletně sedimentovaly na dně centrifugační zkušavky v podobě jednoho celistvého sedimentu. Proteinová korona z HSA

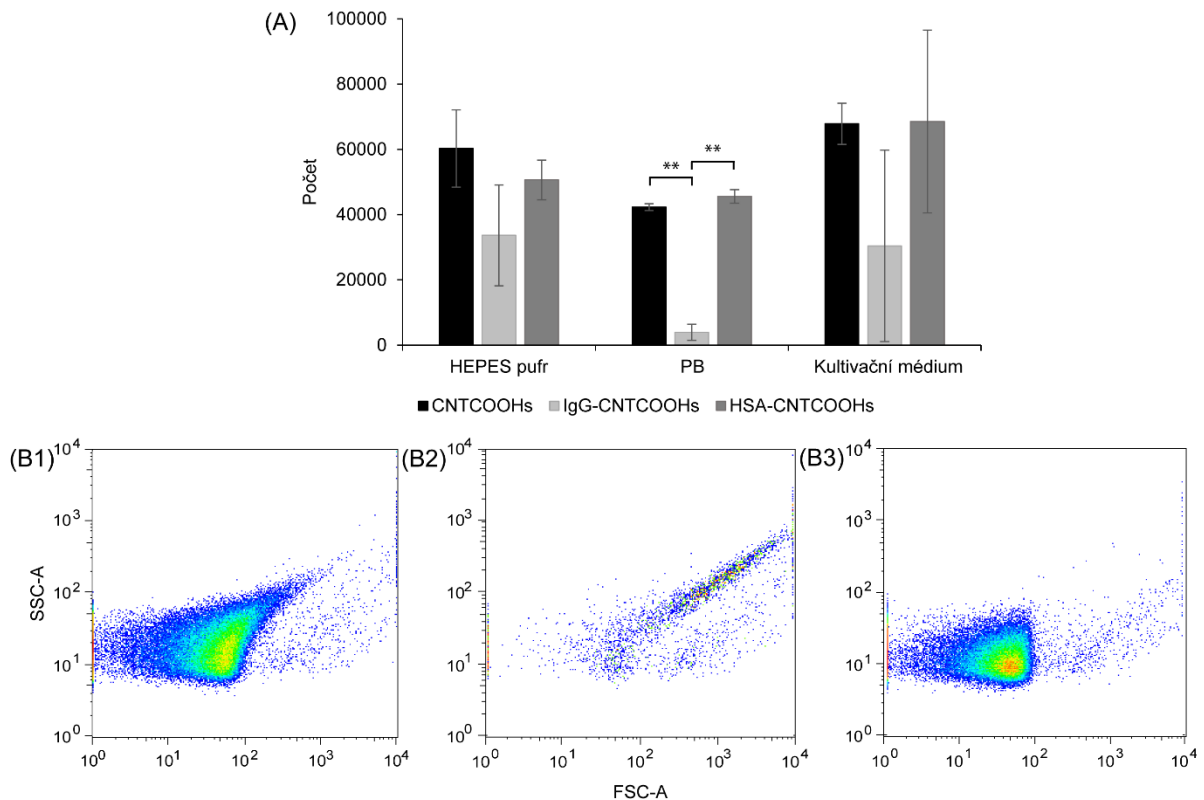
zúžila distribuci velikostí HSA-CNTCOOHs do dvou výraznějších proužků v pásu ~40 a ~50% a také do malého sedimentu viditelného na dně zkumavky. Další velikosti HSA-CNTCOOHs byly jemněji rozptýleny v oblasti 30 – 50%, což naznačuje menší zastoupení a širší distribuci dalších velikostních populací. Dle pozice fCNTs v sacharózovém gradientu je patrné, že proteinová korona zvyšuje velikost CNTCOOHs, tj. zvyšuje míru aglomerace, a to v pořadí IgG-CNTCOOHs > HSA-CNTCOOHs.



**Obrázek č. 8:** Separace fCNT prostřednictvím centrifugace v sacharózovém gradientu při rychlosti 32 000g 60 minut.

Míra aglomerace CNTCOOHs bez a s proteinovou korunou byla stanovena pomocí FACS (Obrázek č. 9). Nastavení průtokového cytometru umožnilo zaznamenat změnu v počtu částic o určité – velmi malé velikosti v podobě počtu událostí. Analýza výsledků ukázala, že proteinová korona z IgG v prostředí PB (nikoli však HEPES pufru) signifikantně ( $P < 0,01$ ) snížila počet zaznamenaných událostí (Obrázek č. 9A), což odráží větší velikost aglomerátů IgG-CNTCOOHs. Naproti tomu proteinová korona z HSA neměla signifikantní vliv na velikost aglomerátů HSA-CNTCOOHs suspendovaných v HEPES pufru nebo PB (Obrázek č. 9A) a dosahovala podobných hodnot jako v případě CNTCOOHs bez proteinové korony. V přítomnosti EGM-2 média, které bylo použito jako růstové médium pro kultivaci buněk

HUVEC a zároveň jako reakční prostředí pro sledování cytotoxicity fCNTs, docházelo k nepatrnému zmenšení velikosti aglomerátů NPs projevující se jako vyšší počet zaznamenaných událostí než tomu bylo v případě bezproteinových pufrů. Vliv jednotlivých proteinových korun na velikost aglomerátů CNTCOOHs sledoval v EGM-2 médiu podobné tendence jako v ostatních případech.



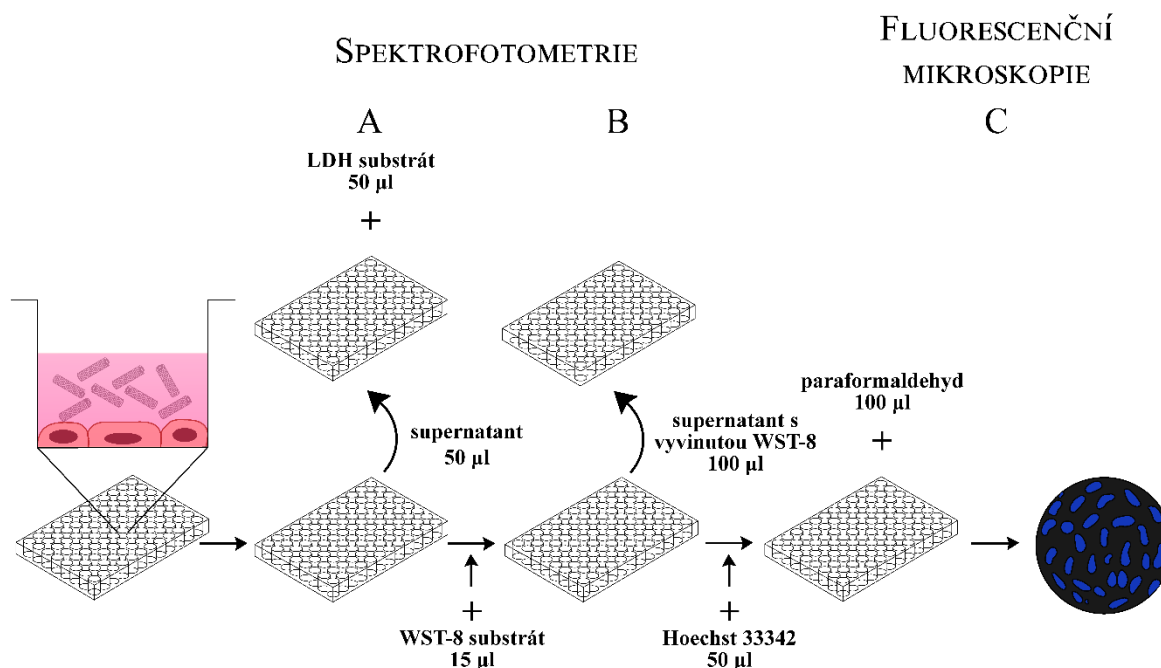
**Obrázek č. 9:** Vliv proteinové korony na velikost aglomerátů CNTCOOHs měřený pomocí průtokové cytometrie. A) Počet aglomerátů fCNTs (počet) v závislosti na typu proteinové korony a reakčním prostředí. B1 – B3) Reprezentativní dot ploty fCNT měřených v přítomnosti média. B1) CNTCOOHs, B2) IgG-CNTCOOHs, B3) HSA-CNTCOOHs. Data v grafu jsou prezentována jako průměrné hodnoty dvou replikátů  $\pm$  SEM ( $n = 2$ ). Statistická signifikance byla stanovena pomocí jednorozměrného ANOVA testu za využití Bonferroniho korekce.  $**P < 0,01$ . Zkratky: FSC-A - přímý rozptyl - plocha, SSC-A - boční rozptyl – plocha.

## 4.2 Stanovení cytotoxicity NPs *in vitro*

### 4.2.1 Vývoj CDS eseje

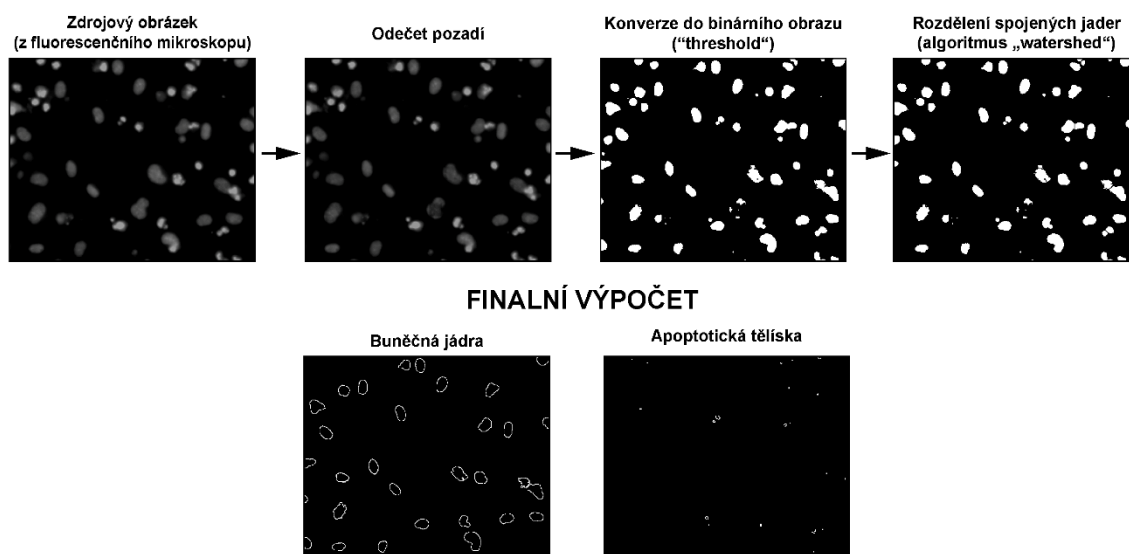
K ohodnocení cytotoxicity NPs a podrobnějšímu vyšetření jejich vlivu na typ a intenzitu buněčné smrti byla sestavena esej, která stanovuje životaschopnost buněk, nekrotické a apoptotické působení zároveň u stejné populace buněk narostlých v jedné jamce. Vzhledem k tomu, že životaschopnost buněk lze stanovit na základě různých parametrů, jejichž detailní studium by výrazně přesáhlo rámec této práce, byla „životaschopnost buněk“ (též viabilita buněk) zjednodušeně odvozována na základě metabolické aktivity buněčných dehydrogenáz, které zprostředkovaně redukují WST-8 za vzniku formazanu poskytujícího barevnou reakci. Tato aktivita buněčných dehydrogenáz byla využita ke stanovení počtu „živých“ buněk. Podobně, komplexní procesy, jakými jsou nekróza a apoptóza (viz kapitola 1.2.1 Apoptóza a 1.2.3 Nekróza) byly stanovovány pouze na základě jednoho z příznaků a v tomto smyslu také v dalším textu používány. V případě „nekrózy“ se jednalo o stanovení na základě výlevu LDH z buněk do okolí vlivem narušené plazmatické membrány, v případě „apoptózy“ o přítomnost apoptotických tělísek vznikajících v průběhu apoptotického procesu (viz kapitola 1.2.1 Apoptóza).

Výsledná kompozice CDS eseje, proces aplikace jednotlivých komponent, měření dat a vyhodnocování výsledků je popsán na Obrázku č. 10 a č. 11. Schéma provedení zahrnuje stručně vysazení buněk HUVEC na 96-jamkovou destičku a jejich kultivaci po 48 hodin (~70 – 80 % konfluence). Inkubaci NPs (případně jiných agens) s buňkami maximálně 24 hodin. Odebrání části buněčného supernatantu, jeho přenesení a následné smísení se směsí komponent z LDH kitu pro spektrofotometrické stanovení uvolněné LDH z prostředí buněk do okolí (stanovení nekrotického působení, Obrázek č. 10A). Přidání směsi obsahující WST-8 sůl (CCK-8 kit) k původní populaci buněk a následnou inkubaci tři hodiny. Přenesení části supernatantu s vyvinutou barvou do nové 96-jamkové destičky a spektrofotometrické změření životaschopnosti buněk (Obrázek č. 10B). Aplikaci roztoku fluorescenční barvy Hoechst 33342 na buňky v původní destičce, 30-ti minutovou inkubaci a následnou fixaci buněk pomocí PFA. Focení obarvených buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu (Obrázek č. 10C).



**Obrázek č. 10:** CDS esej pro stanovení cytotoxicity NPs a ohodnocení typu buněčné smrti. Jednotlivé kroky CDS eseje zahrnují: 1) vysazení buněk HUVEC na 96-jamkovou destičku, 2) aplikaci NPs nebo jiných testovaných agens a jejich následnou inkubaci při 37°C 24 hodin, 3) aplikaci reakčních substrátů/fluorescenčních barev pro ohodnocení buněčné smrti. A) Identifikace nekrotického působení pomocí LDH reakční směsi detekované spektrofotometricky. B) Stanovení životaschopnosti buněk prostřednictvím WST-8 tetrazoliové soli, která je po přidání k buňkám, následné inkubaci a odebrání jednotlivých alikvótů, měřena spektrofotometricky. C) Evaluace míry apoptotického působení za využití DNA fluorescenčního barvení Hoechst 33342. Po fixaci PFA jsou buňky nasnímány pomocí fluorescenční mikroskopie a vyhodnoceny speciálně navrženými makry v programu ImageJ. Obrázek publikován v naší předchozí práci (Filipova M. et al., 2018).

K počítačové analýze velkého množství fluorescenčních snímků bylo sestaveno speciální makro umožňující kvantifikaci počtu intaktních buněčných jader („counting\_of\_nuclei“) a apoptotických tělísek („counting\_of\_apoptotic\_bodies“) pomocí programu ImageJ. Jednotlivé kroky analýzy obrazu prováděné makrem zobrazuje Obrázek č. 11.



**Obrázek č. 11:** Sekvence kroků obrazové analýzy pro výpočet intaktních buněčných jader a apoptotických tělísek prováděné makry sestavenými pro program ImageJ. Obrázek publikován v naší předchozí práci (Filipova M. et al., 2018).

V první fázi program ImageJ nejprve odstraní ze zdrojových obrázků nechtěný světelný šum, který by komplikoval přesnost výsledné analýzy. Toho je dosaženo prostřednictvím příkazu „background subtraction“, který využívá algoritmu „rolling ball“ (Sternberg S. R., 1983). Poloměr v nastavení zvoleného algoritmu se v případě makra pro výpočet apoptotických tělísek odvíjí od velikosti nejmenšího apoptotického tělíska, které má být ještě zahrnuto do analýzy. Nеспецифické fragmenty DNA, které mohou vznikat po aplikaci příliš silně působících chemikálií, bývají menší a mohou tak být v rámci tohoto šumu výhodně odstraněny. V případě našich obrázků byl poloměr nastaven na 3 pixely (apoptická tělíska) nebo na 12 pixelů (intaktní buněčná jádra).

V další fázi dochází k převedení obrazu do binárního souboru, který každému obrazovému bodu přiřazuje buď hodnotu 1, nebo 0 (1 = bílá, 0 = černá). V tomto kroku může být upraven práh získaného fluorescenčního snímku tak, aby po následném převedení do binárního obrazu zůstaly zobrazeny pouze požadované objekty. Toho bylo využito v případě makra pro výpočet apoptotických tělísek, u kterého byl práh manuálně upraven na hodnoty 114 a 255. Makro pro výpočet buněčných jader nebylo upravováno. Převedení do binárního obrazu bylo následně realizováno prostřednictvím příkazu „convert to mask“.

Dělící se buňky HUVEC, které mají v určité fázi cyklu dvě ještě nekompletně oddělená jádra, nebo apoptotická tělíska, která leží příliš těsně u sebe, by mohla být počítána jako jeden objekt a mírně tak podhodnocovat výsledek konečné analýzy. Z těchto důvodů byl do obou maker zahrnut algoritmus „Watershed“ (Vincent L. a Soille P., 1991). Ten identifikuje cirkulární a do jisté míry i necirkulární objekty (Choudhry P., 2016), které následně rozdělují a počítá jako jednotlivé částice.

Námi sestavená makra využívají k rozlišení intaktních jader a apoptotických tělísek dvě podmínky: 1) velikost, 2) intenzitu jasu. Výsledná kalkulace, provedená příkazem „analyze particles“, je v případě počtu intaktních jader nastavena na základě velikosti objektů, a to konkrétně na 250 – 1500 pixelů, kruhovitost: 0 – 1. V případě makra pro stanovení počtu apoptotických tělísek je klíčovým parametrem nastavení prahu intenzity jasu, který na výsledném obrazu ponechá pouze výrazně svítící apoptotické tělíska. Konečná kalkulace pak počítá všechny objekty přítomné na obraze. Proto jsou hodnoty v příkazu „analyze particles“ nastaveny na velikost: 0 – nekonečno, kruhovitost: 0 – 1.

## **Výsledné makro pro kvantifikaci intaktních buněčných jader**

### **Counting\_of\_Nuclei**

```
source_path="C:\\Users\\%USERNAME%\\Desktop\\src_images\\";
```

```
output_path="C:\\Users\\%USERNAME%\\Desktop\\";
```

```
list=getFileList(source_path);
```

```
for(i=0;i<list.length;i++)
```

```
{
```

```
    open(source_path+list[i]);
```

```
    run("Subtract Background...", "rolling=12");
```

```
    run("Convert to Mask");
```

```
    run("Watershed");
```

```
    run("Analyze Particles...", "size=250-1500 pixel show=Outlines exclude summarize  
in_situ");
```

```
    saveAs("Tiff", output_path + list[i]);
```

```
    close();
```

```
}
```

## Výsledné makro pro kvantifikaci apoptotických tělísek

### Counting\_of\_Apoptotic\_Bodies

```
source_path="C:\\Users\\%USERNAME%\\Desktop\\src_images\\";
```

```
output_path="C:\\Users\\%USERNAME%\\Desktop\\";
```

```
list=getFileList(source_path);
```

```
for(i=0;i<list.length;i++)
```

```
{
```

```
    open(source_path+list[i]);
```

```
    run("Subtract Background...", "rolling=3");
```

```
run("8-bit");
```

```
setThreshold(114, 255);
```

```
setOption("BlackBackground", false);
```

```
run("Convert to Mask");
```

```
run("Watershed");
```

```
run("Analyze Particles...", "size=0Infinity show=Outlines exclude summarize in_situ");
```

```
saveAs("Tiff", output_path + list[i]);
```

```
close();
```

```
}
```

Obě makra byla publikována v naší předchozí práci (Filipova M. et al., 2018).

### 4.2.2 Ověření funkčnosti CDS eseje

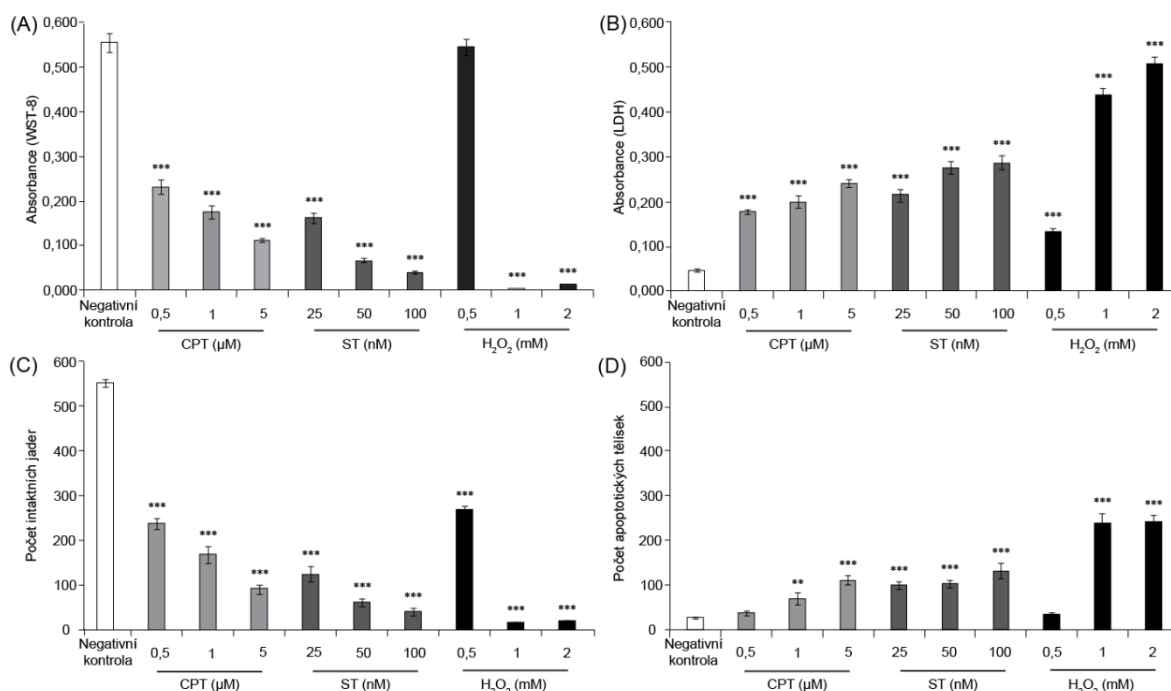
K otestování schopnosti CDS eseje správně stanovit životaschopnost buněk, míru nekrotického a také apoptotického působení, byla využita tři odlišná, ve vodě rozpustná agens, která vyvolávají apoptózu (CPT, ST) (Simenc J. a Lipnik-Stangelj M., 2012; Wolbers F. et al., 2004) a nekrózu (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (McKeague A. L. et al., 2003) a zároveň tak snižují životaschopnost buněk.

### Životaschopnost buněk (aktivita buněčných dehydrogenáz) - WST-8 eseje



Výsledky aktivity buněčných dehydrogenáz po 24 hodinách působení CPT, ST nebo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na buňky HUVEC ukázaly koncentračně závislé cytotoxické působení všech těchto činidel (Obrázek č. 12A). V rozpětí koncentrací 0,5 – 5 μM indukoval CPT pokles životaschopnosti buněk, a to na hodnoty 42,0 % (0,5 μM), 31,9 % (1 μM) a 20,0 % (5 μM) ve srovnání s negativní kontrolou. ST vykazoval silnější cytotoxické působení než CPT a po 24 hodinách inkubace navodil pokles životaschopnosti buněk na 29,4 % (25 nM), 11,9 % (50 nM) a 7,0 % (100 nM) hodnoty negativní kontroly. Letální koncentrace, která je smrtelná pro 50 % exponovaných buněk (LC<sub>50</sub>) byla pro CPT stanovena 0,2 μM, zatímco pro ST 25 nM. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indukoval masivní pokles v životaschopnosti buněk mezi koncentracemi 0,5 – 1 mM, přičemž právě 1 mM koncentrace byla pro buňky fatální. Tento prudký efekt tak znemožnil přesné stanovení LC<sub>50</sub>.

Vliv délky působení jednotlivých činidel na cytotoxicitu vyvolanou u buněk HUVEC byl sledován v časovém rozpětí 24 hodin (sledované body: 0, 3, 6, 12 a 24 hodin). Testované koncentrace byly pro CPT 5 μM, ST 100 nM a pro H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM. Časový průběh v poklesu životaschopnosti buněk zobrazený na Obrázku č. 13A ukazuje, že ve startovacím bodě 0 jak CPT, tak ST indukovaly pouze mírný, ale signifikantní, cytotoxický vliv (hodnoty absorbance: 0,449 a 0,463, v přepočtu: 88,6 % a 91,3 % negativní kontroly), na rozdíl od H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, který navodil silný pokles životaschopnosti (absorbance: 0,175, v přepočtu: 34,5 % negativní kontroly). Ten byl zřejmě způsoben jeho silným nekrotickým působením při použití koncentrací >500 μM (Saito Y. et al., 2006). Navíc je nutné zdůraznit, že v případě CDS eseje znamená časový bod 0 ve skutečnosti 3h, které jsou potřebné pro vývoj barevné reakce WST-8 soli. Rozvoj poklesu životaschopnosti buněk v dalších časových bodech byl postupný a nejvýraznější v případě CPT a ST (20,6 % a 4,7 %) po 24 hodinách, zatímco u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po 12 hodinách působení (1,1 %) ve srovnání s negativní kontrolou.

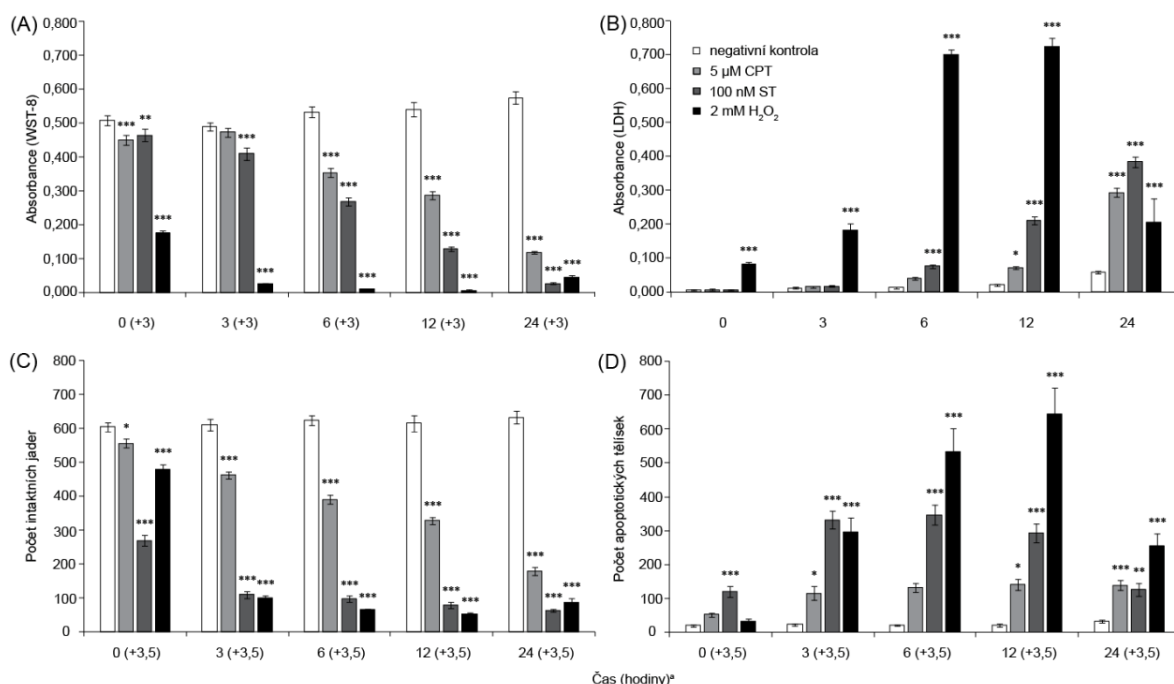


**Obrázek č. 12:** Koncentračně závislý cytotoxický efekt CPT, ST a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po 24 hodinách působení na buňky HUVEC měřený pomocí CDS eseje. A) Stanovení životaschopnosti buněk pomocí WST-8 eseje. B) Stanovení nekrotického působení pomocí LDH eseje. C) Stanovení počtu intaktních buněčných jader pomocí fluorescenční barvy Hoechst 33342. D) Stanovení počtu apoptotických tělísek (ohodnocení míry apoptózy) pomocí fluorescenční barvy Hoechst 33342. Data jsou uvedena jako průměry ± SEM tří nezávislých experimentů měřených v 6-ti replikátech. Měřená opakování byla statisticky vyhodnocena pomocí metody jednorozměrná ANOVA za využití Dunnettova post-hoc testu. \*\*\* $P < 0,001$ , \*\* $P < 0,01$  a \* $P < 0,05$  vzhledem k negativní kontrole. Obrázek publikován v naší předchozí práci (Filipova M. et al., 2018). Zkratky: CPT – kamptotecin, ST – staurosporin.

### Nekrotické působení (uvolnění LDH) - LDH esej

Absorbance vyvinuté LDH eseje monitorující koncentrační vliv CPT, ST a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na výlev LDH po 24 hodinách působení na buňky HUVEC je zobrazen na Obrázku č. 12B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v rozpětí koncentrací 0,5 – 2 mM indukoval masivní uvolnění LDH nejvýrazněji pozorovatelné při použití 2 mM koncentrace (~10x vyšší ve srovnání s negativní kontrolou). Jak CPT (0,5 – 5  $\mu$ M), tak ST (25 – 100 nM) navozovaly silně signifikantní výlev LDH, a to i přesto, že obecně indukují především apoptotickou formu buněčné smrti (Simenc J. a Lipnik-Stangelj M., 2012; Wolbers F. et al., 2004).

Detekce výlevu LDH u buněk HUVEC v časových bodech 0, 3, 6, 12 a 24 hodin vlivem 5  $\mu\text{M}$  CPT, 100 nM ST a 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  prokázala uvolňování LDH postupně se rozvíjející během prvních 12 hodin, s nejsilnějším efektem  $\text{H}_2\text{O}_2$ , který indukoval 36-ti násobný výlev LDH ve srovnání s negativní kontrolou (Obrázek č. 13B). Po 24 hodinách docházelo u CPT a ST k dalšímu navýšení výlevu LDH na rozdíl od  $\text{H}_2\text{O}_2$ , který v tomto časovém bodě vykazoval silný pokles detekované LDH.



**Obrázek č. 13:** Vliv délky působení 5  $\mu\text{M}$  CPT, 100 nM ST a 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  na cytotoxicitu navozenou u buněk HUVEC a měřenou pomocí CDS eseje. A) Životaschnopnost buněk detekovaná pomocí WST-8 eseje. B) Stanovení nekrotického působení LDH esejí. C) Kvantifikace počtu intaktních buněčných jader pomocí fluorescenční barvy Hoechst 33342. D) Kvantifikace počtu apoptotických tělísek (ohodnocení míry apoptózy) pomocí fluorescenční barvy Hoechst 33342. Data jsou uvedena jako průměry  $\pm$  SEM tří nezávislých experimentů měřených v 6-ti replikátech. Měřená opakování byla statisticky vyhodnocena pomocí metody jednorozměrná ANOVA za využití Dunnettova post-hoc testu (\*\*\*) $P < 0,001$ , (\*\*) $P < 0,01$ , a (\*) $P < 0,05$  ve srovnání s negativní kontrolou). Obrázek publikován v naší předchozí práci (Filipova M. et al., 2018). Zkratky: CPT – kamptotecin, ST – staurosporin.

<sup>a</sup>Zaznamenané časové body WST-8 eseje a detekce počtu intaktních buněčných jader a apoptotických tělísek byly ve skutečnosti zpracovány s 3 (WST-8 eseje) a 3,5 (fluorescenční barvení) hodinovým zpožděním potřebným k provedení metody.

## Počet intaktních buněčných jader a apoptických tělísek (apoptotické působení) – fluorescenční barvení Hoechst 33342 a semiautomatická kvantifikace pomocí programu ImageJ

Výpočet intaktních buněčných jader stanovený pomocí námi sestaveného semiautomatického makra programu ImageJ (viz kapitola 4.2.1 Vývoj CDS eseje) zahrnuje u buněk HUVEC všechna hladce ohraničená jádra oválného tvaru, která zároveň dosahují přesně definované velikosti. Tato jádra mohou reprezentovat jak živé buňky, tak buňky s mírně narušenou membránou v raném stádiu nekrózy (Syed Abdul Rahman S. N. et al., 2013). V rámci CDS eseje „intaktní“ jádra nesou informaci o životaschopnosti buněk a stanovení jejich počtu může v určitých případech přibližně korespondovat s životaschopností buněk stanovenou pomocí WST-8 eseje.

Koncentračně závislé vyšetřování cytotoxického působení CPT (0,5 – 5  $\mu$ M), ST (25 – 100 nM) a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 – 2 mM) na buňky HUVEC prokázalo po 24 hodinách postupný pokles v počtu intaktních jader (Obrázek č. 12C), který téměř identicky kopíruje tendence v poklesu životaschopnosti buněk naměřené pomocí WST-8 eseje. Jedinou výjimkou byla 0,5mM koncentrace H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, která indukovala, ve srovnání s negativní kontrolou, 48,4% pokles detekovaný fluorescenčně (Hoechst 33342, Obrázek č. 12C) oproti 98,2% poklesu měřenému kolorimetricky (WST-8 esej, Obrázek č. 12A).

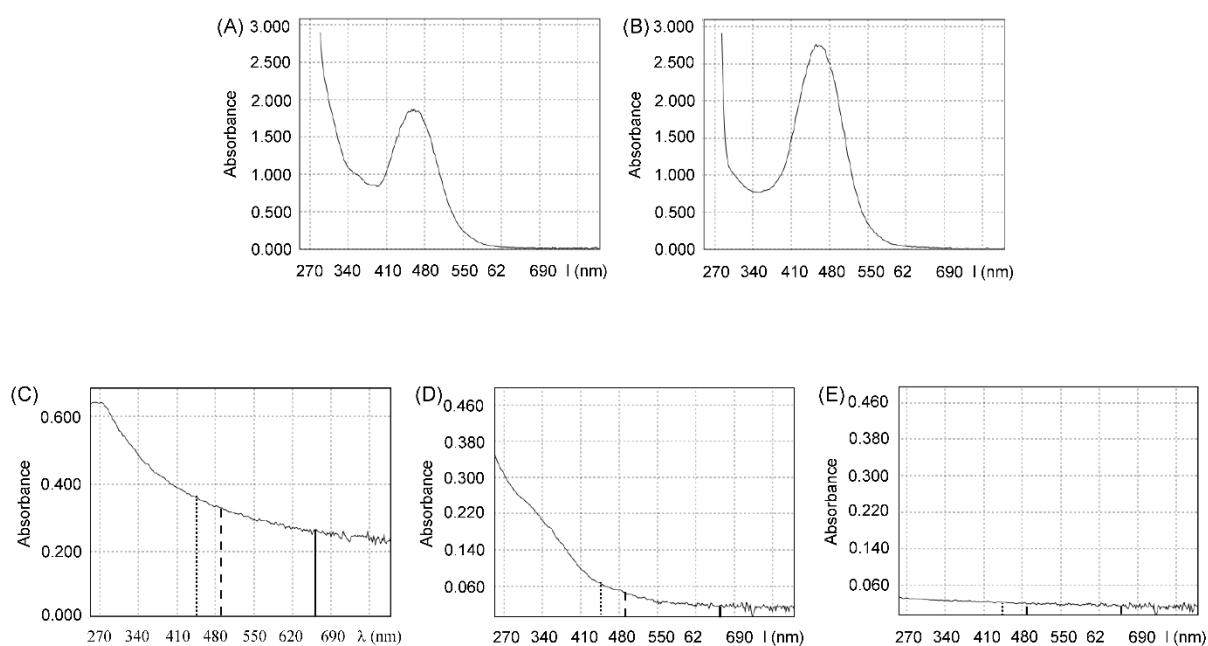
Větší rozdíly v životaschopnosti buněk stanovené těmito dvěma metodami však byly nalezeny v časově závislém experimentu (Obrázek č. 13A vs. Obrázek č. 13C). Zatímco 5  $\mu$ m CPT indukoval podobné tendence v cytotoxickém působení na buňky HUVEC u obou metod, 100 nM ST i 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> navozovaly výraznější rozdíly. WST-8 esej detekovala v případě ST mírný pokles v životaschopnosti buněk HUVEC na rozdíl od fluorescenční metody, která zaznamenala v časovém bodě 0 prudký pokles v počtu intaktních jader. Opačný efekt byl pozorován při působení H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, který indukoval výrazný pokles životaschopnosti buněk v časovém bodě 0 měřený pomocí WST-8 eseje, zatímco fluorescenční metoda detekovala pouze mírnější cytotoxické působení.

Míra apoptotického působení byla odvozena ze stanovení počtu apoptotických tělísek obsahujících úlomky kondenzovaného chromatinu (Saraste A. a Pulkki K., 2000) pomocí semiautomatického makra programu ImageJ (viz kapitola 4.2.1 Vývoj CDS eseje). Koncentračně závislé působení CPT (0,5 – 5  $\mu$ M), ST (25 – 100 nM) a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 – 2 mM) navodilo během 24 hodin signifikantní tvorbu apoptotických tělísek s nejvýraznějším vlivem

2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Obrázek č. 12D). Časově závislý experiment však ukázal, že k maximální indukci tvorby apoptotických tělísek docházelo již během prvních 12 hodin působení, a to vlivem všech testovaných činidel v pořadí H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>>ST >CPT (Obrázek č. 13D). Po zmíněných 24 hodinách došlo obecně u všech činidel k poklesu počtu apoptotických tělísek. Možnou příčinou je pravděpodobně úplný rozpad kondenzovaného chromatinu na buněčnou debris.

#### 4.2.3 Cytotoxicita SiNPs, SPIONs a CNTCOOHs stanovená pomocí CDS eseje

Funkčnost CDS eseje byla dále prověřena stanovením cytotoxicity tří typů pro biomedicínu potenciálně relevantních NPs, a to konkrétně SiNPs, SPIONs a CNTCOOHs. Před samotným provedením eseje byla změřena absorpční spektra SiNPs, SPIONs a CNTCOOHs (Obrázek č. 14D, E a F) pro odečet zvýšeného pozadí (viz kapitola 3.6.3 Ohodnocení nekrotického působení a kapitola 3.6.4 Ohodnocení životaschopnosti buněk) zapříčiněný absorbancí samotných NPs ve vlnových délkách 450 (WST-8 eseje, Obrázek č. 14A) a 490 nm (LDH eseje, Obrázek č. 14B).

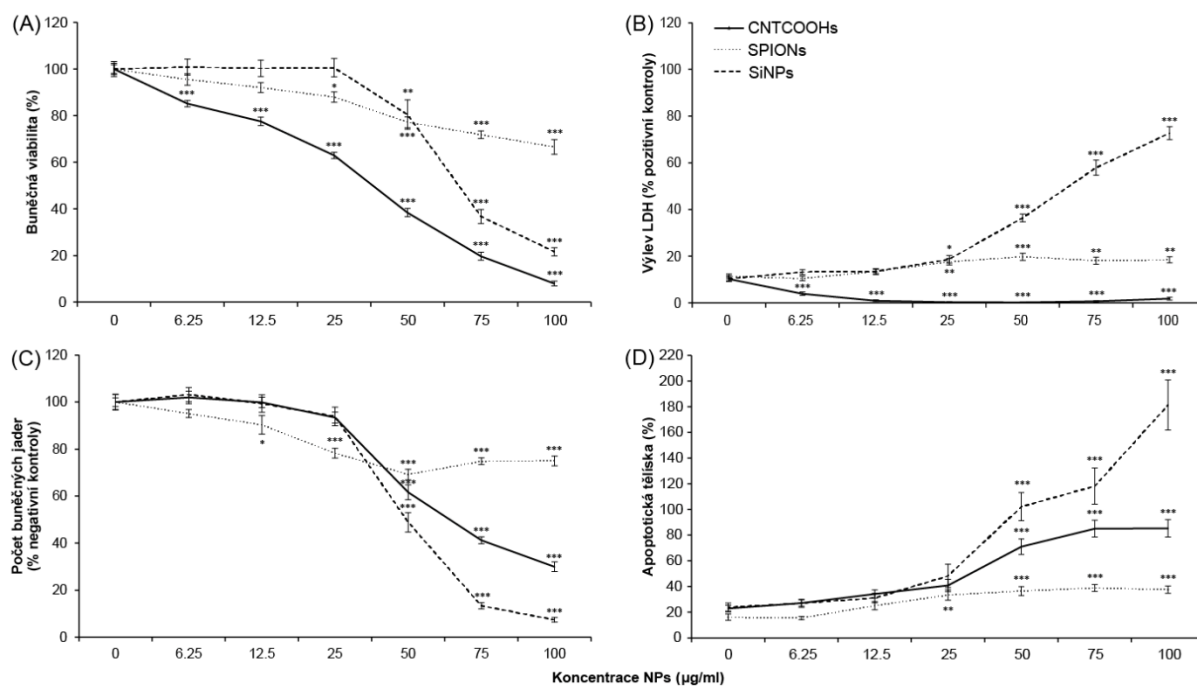


**Obrázek č. 14:** Reprezentativní absorpční spektra A) WST-8 eseje, B) LDH eseje, C) CNTCOOHs, D) SPIONs a E) SiNPs. Měřená koncentrace NPs rozpuštěných v MilliQ vodě byla 10 µg/ml. Odečítané hodnoty absorbance při vlnových délkách 450, 490 a 660 nm

zobrazeny tečkovanou, přerušovanou a plnou čarou. Obrázek publikován v naší předchozí práci (Filipova M. et al., 2018).

Výsledky vlivu koncentrace SiNPs, SPIONs a CNTCOOHs na cytotoxicitu a typ buněčné smrti po 24 hodinách působení na buňky HUVEC zobrazuje Obrázek č. 15. Mírné rozdíly vyplývající z použité metody detekce životaschopnosti buněk popsané v předchozí kapitole (viz kapitola 4.2.2 Ověření funkčnosti CDS eseje) byly pozorovány i v tomto případě. Cytotoxicita měřená pomocí WST-8 dosahovala nejsilnějšího efektu při aplikaci CNTCOOHs, následovaných SiNPs a SPIONs (Obrázek č. 15A). Počet intaktních jader naopak prokázal nejsilnější působení SiNPs, CNTCOOHs a SPIONs (Obrázek č. 15C).  $LC_{50}$  v případě WST-8 eseje byla pro CNTCOOHs a SiNPs stanovena na 27,7 a 69,5  $\mu\text{g/ml}$ . Protože SPIONs neindukovaly ani v nejvyšší použité koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  50% úmrtnost buněk, nemohla být  $LC_{50}$  pro tento typ NPs stanovena. Podobně tomu bylo i při stanovení životaschopnosti buněk na základě počtu intaktních jader, kde SPIONs indukovaly při koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  pokles počtu jader na hodnotu 75 % negativní kontroly a  $LC_{50}$  SiNPs a CNTCOOHs činila 47,3 a 66,1  $\mu\text{g/ml}$ .

Typ buněčné smrti vyvolaný působením SiNPs, CNTCOOHs a SPIONs naznačuje po 24 hodinách inkubace kombinovaný příspěvek apoptotické i nekrotické formy buněčné smrti. Ačkoli CNTCOOHs indukovaly středně silný výskyt apoptotických tělísek (Obrázek č. 15D), výlev LDH do okolí buněk byl přítomen pouze v minimálním množství nebo vůbec. Tento výsledek by mohl poukazovat na potenciální interferenci CNTCOOHs s LDH esejí (Obrázek č. 15B). Nejsilnější uvolňování LDH i tvorbu apoptotických tělísek navozovaly u buněk HUVEC SiNPs o koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ , a to na hodnotu 72,7 a 181,3 % příslušné kontroly. Naproti tomu SPIONs indukovaly pouze mírný výlev LDH (18,4 %) stejně tak jako nízkou tvorbu apoptotických tělísek (37,6 %) a byly tak shledány jako nejméně toxické ze všech námi testovaných typů NPs.

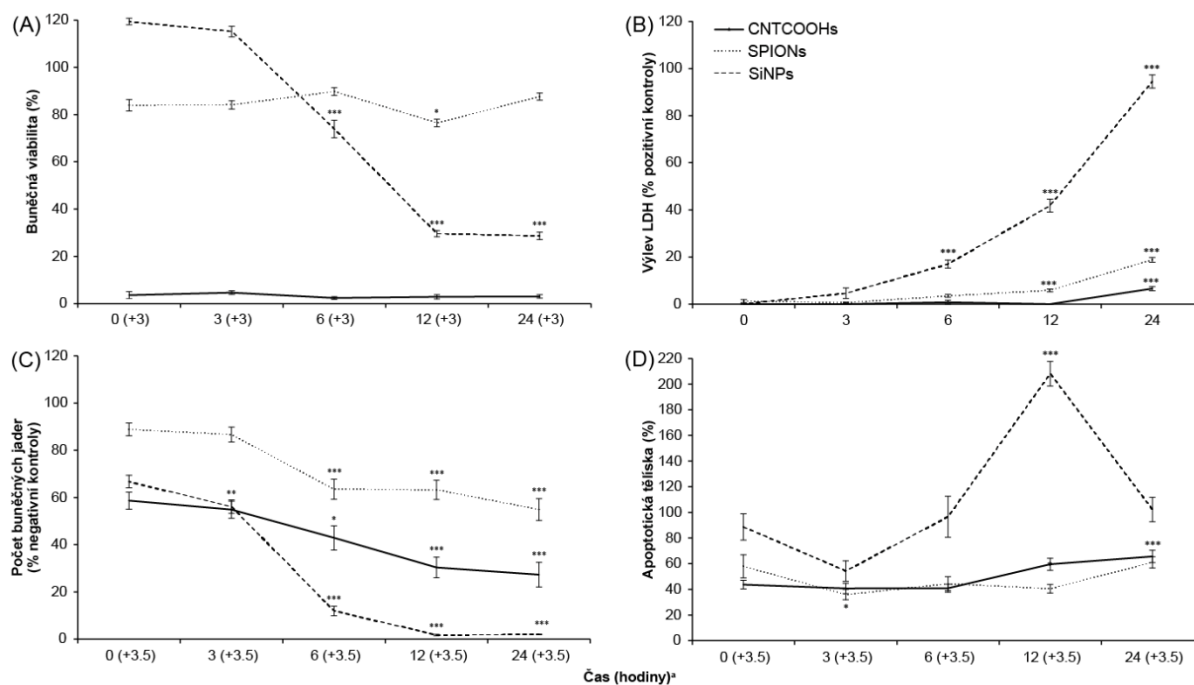


**Obrázek č. 15:** Závislost koncentrace CNTCOOHs, SPIONs a SiNPs na buňky HUVEC po 24 hodinách působení stanovená pomocí CDS eseje. A) Životaschopnost buněk - WST-8 eseje, B) nekrotické působení - LDH eseje, C) počet intaktních buněčných jader - fluorescenční barva Hoechst 33342 a D) apoptotické působení (počet apoptotických tělíšek) - fluorescenční barva Hoechst 33342. Data jsou uvedena jako průměry hodnot  $\pm$  SEM měřených v 6-ti replikátech ( $n = 3$ ). Jednotlivá opakování byla statisticky vyhodnocena pomocí metody jednorozměrná ANOVA za využití Dunnettova post-hoc testu ( $***P < 0,001$ ,  $**P < 0,01$  a  $*P < 0,05$  vs. negativní kontrola specifická pro každé měření). Obrázek publikován v naší předchozí práci (Filipova M. et al., 2018). Zkratky: CNTCOOHs – karboxylované uhlíkové nanotuby, SPIONs – superparamagnetické nanočástice oxidů železa, SiNPs – křemíkové nanočástice, NPs - nanočástice.

Časově závislý experiment ukázal, že SiNPs o koncentraci 100 µg/ml způsobily zřetelný pokles v aktivitě buněčných dehydrogenáz naznačující snížení životaschopnosti buněk. Tento pokles dosahoval rozmezí hodnot 119,4 – 28,7 % negativní kontroly v časových bodech 0, 3, 6, 12 a 24 hodin měřených pomocí WST-8 eseje (Obrázek č. 16A). SPIONs vykazovaly mírný cytotoxický vliv na buňky HUVEC pohybující se okolo průměrné hodnoty 84,4 %. CNTCOOHs vyvolávaly v tomto případě pouze minimální efekt, a to ve všech zaznamenaných časových bodech, což může naznačovat interferenci CNTCOOHs o koncentraci 100 µg/ml

s WST-8 esejí. V souladu s tímto podezřením je i výsledek získaný kalkulací počtu intaktních jader, který ukázal postupný pokles v počtu jader v časovém rozmezí 0 – 24 hodin po aplikaci 100 µg/ml CNTCOOHs (58,6 – 27,3 %, Obrázek č. 16C). Stejně tak SiNPs navozovaly výraznější časově závislý pokles v počtu jader, a to až na hodnotu 2,0 % po 24 hodinách působení. SPIONs indukovaly mírně silnější cytotoxické působení (88,8 – 54,9 %, časové rozmezí 0 – 24 hodin) stanovené prostřednictvím počtu intaktních jader než při stanovení pomocí WST-8 eseje (~84,4 %).

Detekce časového vývoje nekrotického působení opět poukázala na inhibici rozvoje barevné reakce LDH eseje vlivem CNTCOOHs (Obrázek č. 16B). SiNPs indukovaly masivní výlev LDH (94,5 %), který po 24 hodinách působení dosahoval téměř maximálních hodnot (100 % výlev). Naproti tomu SPIONs vyvolávaly pouze mírné uvolnění LDH, a to až v časovém úseku 12 – 24 hodin (1,2 – 18,8 %). Nízký počet apoptotických tělísek vzniklých po aplikaci SPIONs a CNTCOOHs (Obrázek 16D) naznačil spíše menší podíl apoptotické formy buněčné smrti na snížené životaschopnosti buněk HUVEC. Naproti tomu SiNPs indukovaly výrazný rozvoj v počtu apoptotických tělísek, a to zejména po 12 hodinách, ve kterých dosahoval až 208,1 % pozitivní kontroly (5 µM CPT).



**Obrázek č. 16:** Časově závislé cytotoxické působení CNTCOOHs, SPIONs a SiNPs o koncentraci 100 µg/ml na buňky HUVEC měřené pomocí CDS eseje. A) Životaschopnost buněk - WST-8 esej, B) nekrotické působení - LDH esej, C) počet intaktních buněčných jader

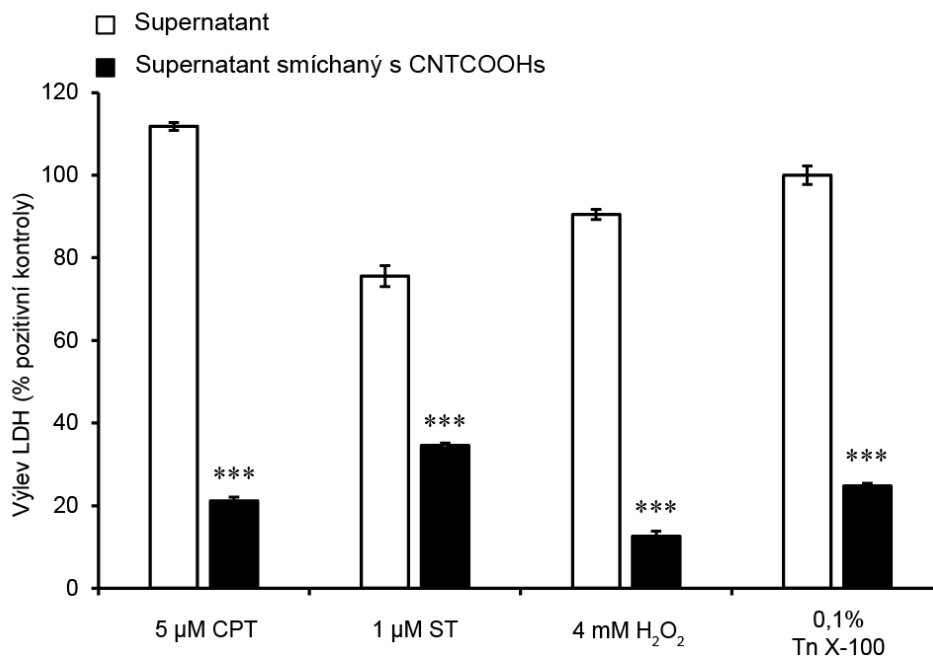


- fluorescenční barvení Hoechst 33342 a D) apoptotické působení (počet apoptotických tělísek)  
- fluorescenční barvení Hoechst 33342. Data jsou uvedena jako průměry hodnot  $\pm$  SEM měřených v 6-ti replikátech ( $n = 3$ ). Statistická signifikance byla stanovena pomocí metody jednorozměrná ANOVA za využití Dunnettova post-hoc testu ( $***P < 0,001$ ,  $**P < 0,01$  a  $*P < 0,05$  vzhledem k časovému bodu 0). Obrázek publikován v naší předchozí práci (Filipova M. et al., 2018). Zkratky: CNTCOOHs – karboxylované uhlíkové nanotuby, SPIONs – superparamagnetické nanočástice oxidů železa, SiNPs – křemíkové nanočástice.

<sup>a</sup>Jednotlivé časové body v případě WST-8 eseje a počtu intaktních buněčných jader a apoptotických tělísek byly zpracovány s 3 (WST-8 eseje) a 3,5 (fluorescenční barvení) hodinovým zpožděním potřebným k provedení metody.

#### **4.2.4 Interference CNTCOOHs s LDH esejí**

Ve výše popsaných výsledcích naznačená přítomnost interference CNTCOOHs s LDH esejí byla ověřena na vzorcích média odebraných z buněk HUVEC. Výsledky ukazují, že 0,5  $\mu$ M CPT, 1  $\mu$ M ST, 4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,1% Triton X-100 vyvolávaly masivní výlev LDH (Triton X-100 použit jako induktor maximálního – 100 % - LDH výlevu). Po přidání CNTCOOHs (100  $\mu$ g/ml) k supernatantům s vysokým obsahem LDH docházelo k silně signifikantní inhibici rozvoje barevné reakce (Obrázek č. 17), což prokázalo výraznou interferenci CNTCOOHs s komponentami LDH eseje.

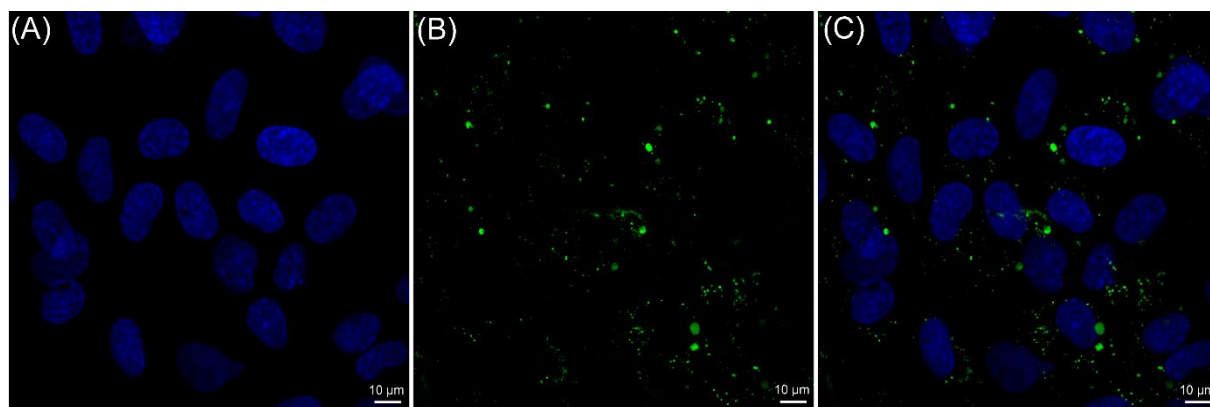


**Obrázek č. 17:** Interference CNTCOOHs s komponentami LDH eseje. Buňky HUVEC byly inkubovány s 0,5  $\mu\text{M}$  CPT, 1  $\mu\text{M}$  ST, 4 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  nebo 0,1% Tritonem X-100 po 24 hodin. Supernatanty s uvolněnou LDH bez NPs (bílý sloupec) a se 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CNTCOOHs (černý sloupec). Intenzita rozvoje barevné reakce byla detekována spektrofotometricky. Data zobrazují průměry  $\pm$  SEM čtyř replikátů ( $n = 3$ ). Signifikance rozdílů byla statisticky ohodnocena pomocí nepárového dvouvýběrového t-testu ( $***P < 0,001$  černý vs. bílý sloupec). Obrázek publikován v naší předchozí práci (Filipova M. et al., 2018). Zkratky: CNTCOOHs – karboxylované uhlíkové nanotuby, CPT – kamptotecin, ST – staurosporin, Tn X-100 – Triton X-100.

### 4.3 Modulace cytotoxicity CNTCOOHs

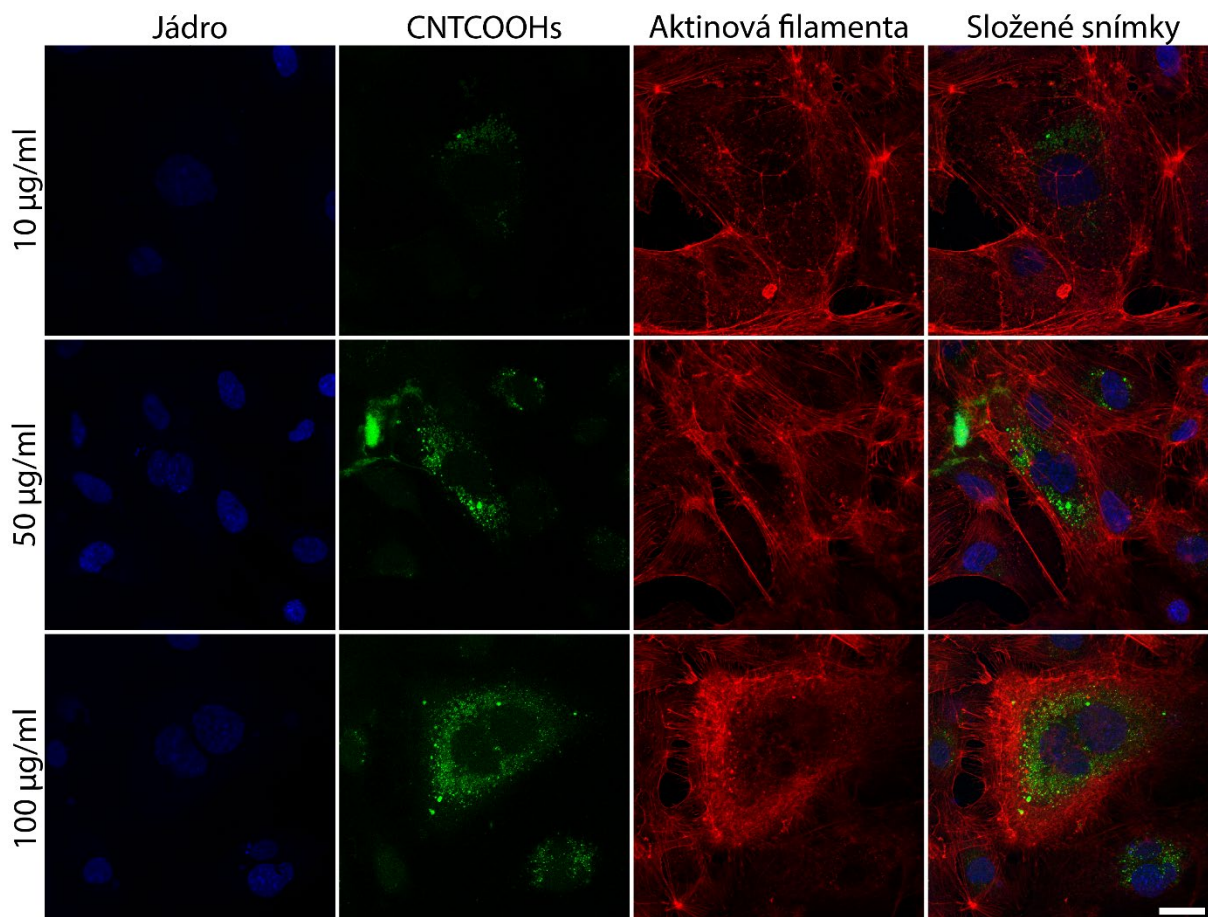
#### 4.3.1 Intracelulární lokalizace fCNTs

Intracelulární lokalizace CNTCOOHs byla vyšetřována pomocí konfokální mikroskopie na buňkách HUVEC (Obrázek č. 18). CNTCOOHs konjugované s Alexa Fluor 488 (Obrázek č. 18B, zeleně) byly po 4 hodinách inkubace s buňkami rozptýleny po celé cytoplazmě v podobě malých teček nebo větších ohraničených struktur (Obrázek č. 18C). Umístění CNTCOOHs v oblasti buněčného jádra nebylo nalezeno.



**Obrázek č. 18:** Intracelulární lokalizace CNTCOOHs. Konfokální mikroskopie lidských endotelových buněk HUVEC inkubovaných s CNTCOOHs o koncentraci 100 µg/ml 4 hodiny. A) Buněčná jádra obarvená TO-PRO-3 (modře). B) CNTCOOHs-488 (zeleně). C) Složené obrázky.

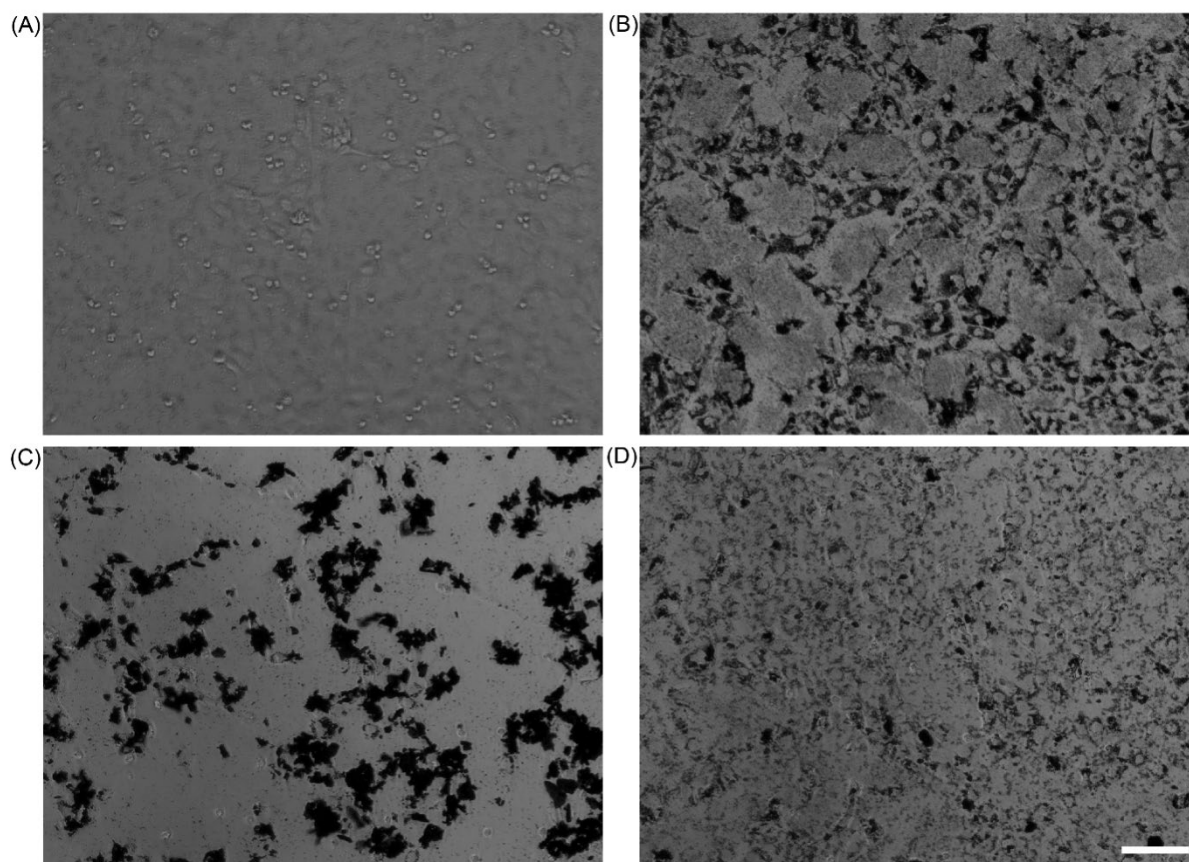
Po 24 hodinách inkubace docházelo ve všech tří testovaných koncentracích (10, 50 a 100 µg/ml) k nahromadění CNTCOOHs v perinukleární oblasti (Obrázek č. 19). Lokalizace CNTCOOHs uvnitř jader nebyla obecně pozorována. Jedinou výjimkou byla buňka dělicí se v přítomnosti CNTCOOHs-488 o koncentraci 100 µg/ml, u níž bylo nalezeno minimální množství NPs i uvnitř jádra, a to zřejmě v důsledku právě probíhající mitózy.



**Obrázek č. 19:** Intracelulární lokalizace CNTCOOHs zobrazená pomocí konfokální mikroskopie. Obrázky HUVEC buněk inkubovaných s A) 10  $\mu\text{g/ml}$ , B) 50  $\mu\text{g/ml}$  a C) 100  $\mu\text{g/ml}$  CNTCOOHs-488 24 hodin. Jádro – TO-PRO-3, CNTCOOHs – Alexa Fluor 488, aktinová filamenta – faloidin Alexa Fluor 555. Měřítka: 20  $\mu\text{m}$ . Zkratky: CNTCOOHs – karboxylované uhlíkové nanotuby.

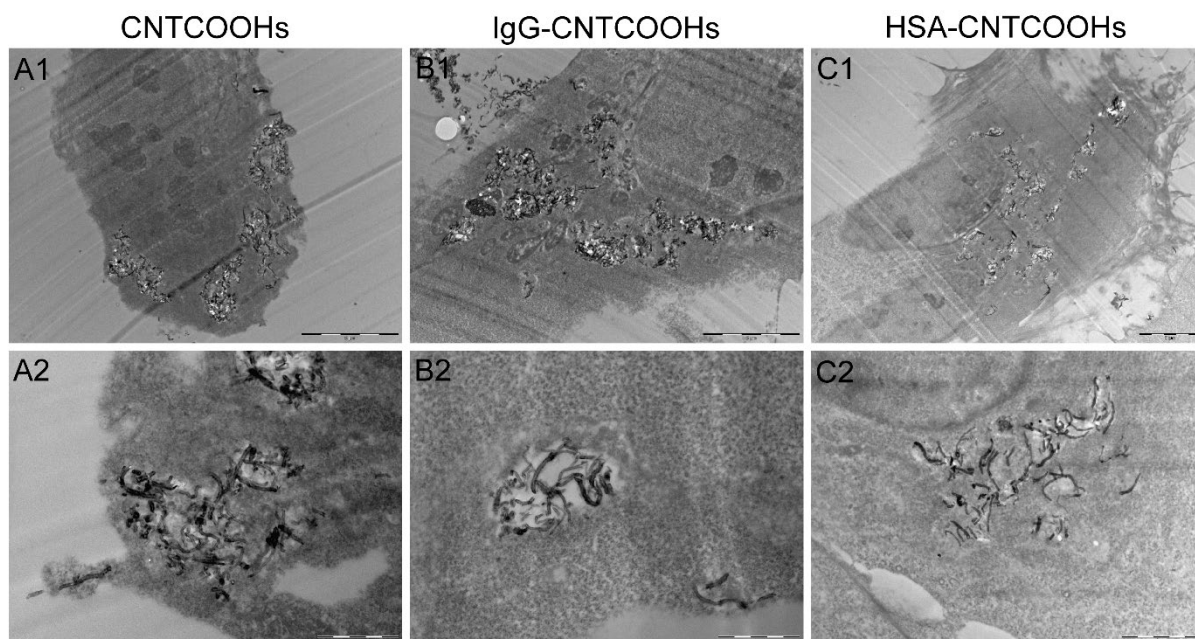
Obrázek č. 20 zobrazuje agregační status CNTCOOHs, IgG-CNTCOOHs a HSA-CNTCOOHs a morfologii buněk v rámci interakce NPs s buňkami vyšetřovaný pomocí světelné mikroskopie. Po 24 hodinách inkubace vytvářejí CNTCOOHs bez proteinové korony menší černé shluky, které pokrývají povrch buněk (Obrázek č. 20B). Podobně je tomu i u CNTCOOHs obalených proteinovou korunou z HSA (Obrázek č. 20D). Dříve popsaná tendence HSA-CNTCOOHs k nižší míře aglomerace ve srovnání s IgG-CNTCOOHs (viz kapitola 4.1.2 Charakterizace fCNTs odlišnými proteinovými koronami) se v prostředí buněk projevuje jako jemný prach se vzácněji se vyskytujícími agregáty NPs pokrývajícími povrch buněk. Naproti tomu IgG-CNTCOOHs vytvářejí velké aglomeráty hromadící se pouze v místech výskytu buněk (Obrázek č. 20C). V tomto čase (24 hodin inkubace) je při použité

koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$  patrný výrazný cytotoxický vliv IgG-CNTCOOHs projevující se jako rozsáhlejší oblasti bez buněk.



**Obrázek č. 20:** Agregací status fCNTs (50  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubovaných 24 hodin v přítomnosti buněk HUVEC zobrazený pomocí světelné mikroskopie. A) Buňky HUVEC bez přítomnosti NPs (kontrola), B) CNTCOOHs bez proteinové korony, C) IgG-CNTCOOHs D) HSA-CNTCOOHs. Zvětšení: 100x. Měřítka: 50  $\mu\text{m}$ .

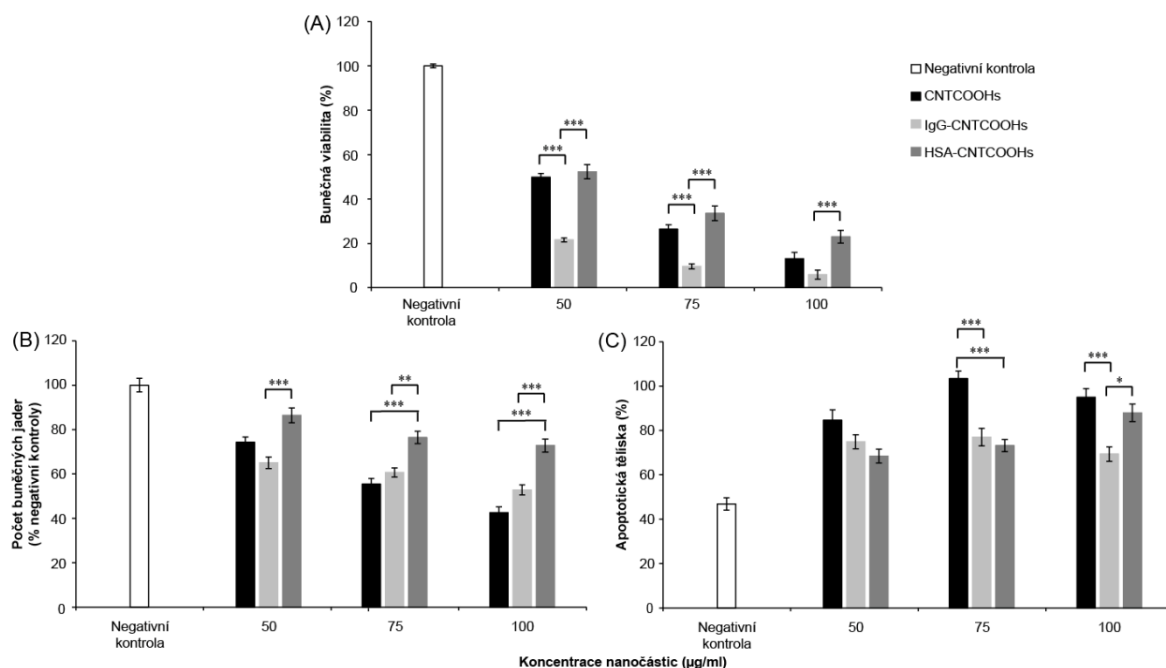
Vliv proteinové korony z IgG nebo HSA na intracelulární lokalizaci CNTCOOHs byl studován pomocí TEM (Obrázek č. 21). Výsledky naznačují, že všechny tři typy fCNTs (CNTCOOHs, IgG-CNTCOOHs a HSA-CNTCOOHs) o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  byly bez ohledu na typ proteinové korony po 24 hodinách internalizovány buňkami HUVEC a lokalizovány v oblasti cytoplazmy v podobě spíše oddělených oblastí, které obsahovaly jednotlivá vlákna NPs případně jejich menší shluky. Žádné fCNTs nebyly nalezeny v prostředí jádra.



**Obrázek č. 21:** Intracelulární lokalizace CNTCOOHs obalených proteinovou korunou z IgG nebo HSA zachycená pomocí TEM. A) CNTCOOHs, B) IgG-CNTCOOHs a C) HSA-CNTCOOHs o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  inkubované s buňkami HUVEC po 24 hodin. Měřítka: 5  $\mu\text{m}$ . A2 – B2) Měřítka: 1  $\mu\text{m}$ . C2) Měřítka: 2  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.2 Vliv proteinové korony na cytotoxicitu CNTCOOHs

Závislost vlivu koncentrace CNTCOOHs bez proteinové korony a s korunou z IgG (IgG-CNTCOOHs) nebo HSA (HSA-CNTCOOHs) na pokles aktivity buněčných dehydrogenáz (životaschopnosti buněk) a rozvoj apoptózy u buněk HUVEC znázorňuje Obrázek č. 22. CNTCOOHs bez proteinové korony snižovaly životaschopnost buněk v rozpětí koncentrací 50 – 100  $\mu\text{g/ml}$  na 49,9 – 13,1 % (Obrázek č. 22A). Proteinová korona z IgG měla výrazně statisticky významný vliv ( $P < 0,001$ ) na další pokles této životaschopnosti pozorovaný v koncentracích 50 a 75  $\mu\text{g/ml}$ , a to o 28,4 % a 16,8 % ve srovnání se CNTCOOHs bez proteinové korony. Koncentrace 100  $\mu\text{g/ml}$  byla u CNTCOOHs natolik cytotoxická, že přídatný efekt proteinové korony z IgG na pokles životaschopnosti buněk již nebyl statisticky významný. Naproti tomu proteinová korona z HSA měla opačný vliv a zvyšovala životaschopnost buněk v koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  o 9,9 % ve srovnání s CNTCOOHs.



**Obrázek č. 22:** Cytotoxicita CNTCOOHs bez proteinové korony a s proteinovou korunou z IgG (IgG-CNTCOOHs) a HSA (HSA-CNTCOOHs) měřená pomocí CDS eseje na buňkách HUVEC v rozpětí koncentrací NPs 0 – 100 µg/ml. A) Životaschopnost buněk (aktivita buněčných dehydrogenáz) měřená pomocí WST-8 eseje. B) Stanovení počtu intaktních buněčných jader vizualizovaných fluorescenční barvou Hoechst 33342. C) Míra apoptózy stanovená na základě počtu apoptotických tělísek pomocí Hoechst 33342. Data jsou uvedena jako průměrné hodnoty 6-ti replikátů ± SEM (n = 5). Měřená opakování byla statisticky vyhodnocena pomocí metody jednorozměrná ANOVA za využití Bonferroniho post-hoc testu. \*\*\* $P < 0,001$ , \*\* $P < 0,01$  a \* $P < 0,05$ .

Stejný koncentračně závislý cytotoxický efekt CNTCOOHs bez proteinové korony byl pozorován i v případě poklesu počtu buněčných jader (Obrázek č. 22B). Tento pokles nebyl ve srovnání s výsledky životaschopnosti buněk odvozených na základě aktivity buněčných dehydrogenáz natolik výrazný a v rozpětí koncentrací 50 – 100 µg/ml dosahoval 74,3 – 42,6 %. Proteinová korona z IgG nepůsobila signifikantní pokles v počtu buněčných jader, jako tomu bylo v případě stanovení životaschopnosti buněk odvozené od aktivity buněčných dehydrogenáz. Naopak byly pozorovány spíše tendence k mírnému zvýšení tohoto počtu v koncentracích 75 a 100 µg/ml, a to o 5 % a 10 %. Mírný nesignifikantní protektivní vliv proteinové korony z HSA vzhledem k cytotoxickému působení CNTCOOHs na buňky HUVEC pozorovaný na základě aktivity buněčných dehydrogenáz byl výrazně statisticky významný ( $P <$

0,001) při stanovení cytotoxicity v závislosti na počtu buněčných jader. V koncentracích 75 a 100  $\mu\text{g/ml}$  se tento počet zvyšoval o 21,0 % a 30,3 % ve srovnání se CNTCOOHs bez proteinové korony.

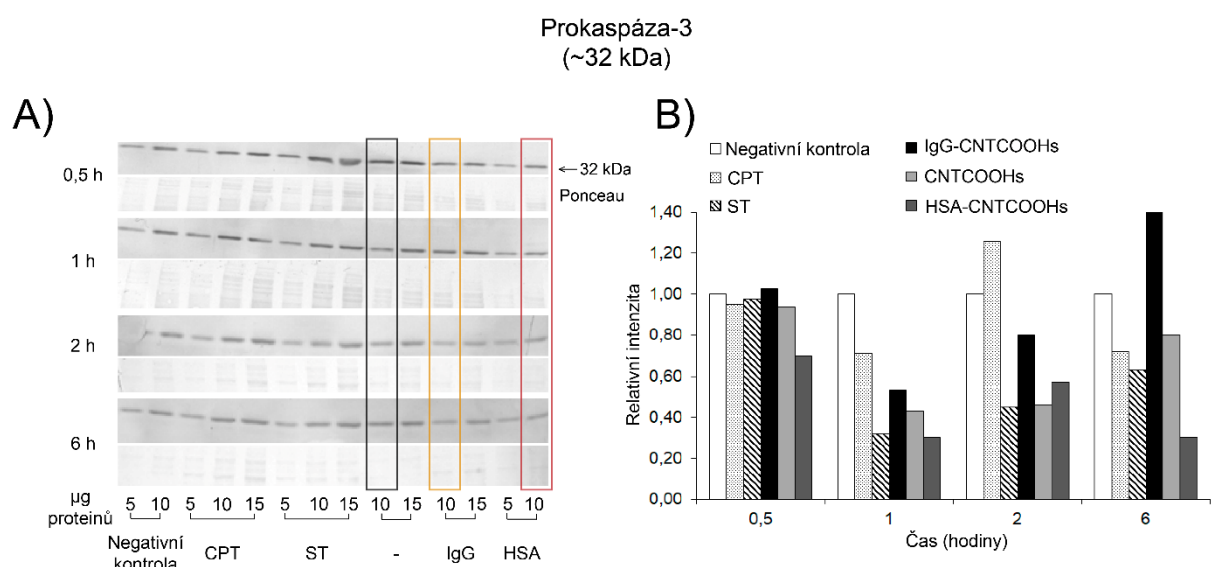
Vyšetřování apoptotického působení po aplikaci CNTCOOHs bez proteinové korony prokázalo koncentračně závislé působení (Obrázek č. 22C). Po 24 hodinách dosáhl počet apoptotických tělísek v koncentraci 75  $\mu\text{g/ml}$  CNTCOOHs nejvyššího počtu ze všech porovnávaných fCNTs. Naproti tomu proteinová korona z IgG neměla koncentračně závislý efekt a indukovala přibližně stejnou tvorbu apoptotických tělísek  $\sim 74\%$  ve všech třech použitých koncentracích NPs. Tato hodnota byla signifikantně nižší oproti hodnotě vyvolané CNTCOOHs bez proteinové korony (69,4 % pro IgG-CNTCOOHs vs. 94,9 % pro CNTCOOHs při maximální použité koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ ). CNTCOOHs s proteinovou korunou z HSA vykazovaly koncentračně závislou tvorbu apoptotických tělísek dosahující 68,4 – 87,9 % v rozmezí koncentrací 50 – 100  $\mu\text{g/ml}$ , která sledovala reverzní vývojovou tendenci k výsledkům získaným z počtu intaktních buněčných jader. Nicméně celkové množství apoptotických tělísek formovaných vlivem HSA-CNTCOOHs bylo mírně nižší než u CNTCOOHs bez proteinové korony, u kterých se pohybovalo mezi 84,6 – 94,9 %. Tento výsledek tak znovu naznačil možný protektivní vliv proteinové korony z HSA vůči cytotoxickému působení CNTCOOHs na buňky HUVEC.

### **4.3.3 Proteinová korona z IgG a HSA ovlivňuje míru apoptotického a nekrotického působení vyvolaných vlivem CNTCOOHs**

CPT i ST patří mezi účinné induktory apoptózy s odlišným mechanismem působení. CPT indukuje apoptózu na základě inhibice DNA topoizomerázy I vedoucí k aktivaci kaspáz, zatímco ST působí jak na kaspázách závislým, tak i nezávislým způsobem (Belmokhtar C. A. et al., 2001; Rodríguez-Hernández Á. et al., 2006). Ke studiu časového průběhu proteinové exprese neštěpené kaspázy-3, prokaspázy-3, v rámci procesu apoptózy u buněk HUVEC, byl aplikován 5  $\mu\text{M}$  CPT a 5  $\mu\text{M}$  ST po dobu 0,5, 1, 2 a 6 hodin (Obrázek č. 23). Zatímco u CPT docházelo k opakovanému poklesu a nárůstu prokaspázy-3 v průběhu sledovaných 6 hodin, ST indukoval v první hodině výrazný pokles v její expresi, která začala pozvolna narůstat až v časovém rozmezí 2 – 6 hodin (Obrázek č. 23B). Aplikace CNTCOOHs, IgG-CNTCOOHs a HSA-CNTCOOHs o koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$  po dobu 0,5, 1, 2 a 6 hodin sledovala podobné vývojové tendence v expresi prokaspázy-3 jako aplikace ST. Její nejnižší hodnota byla pozorována u CNTCOOHs bez proteinové korony po hodině působení, zatímco nejvyšší po



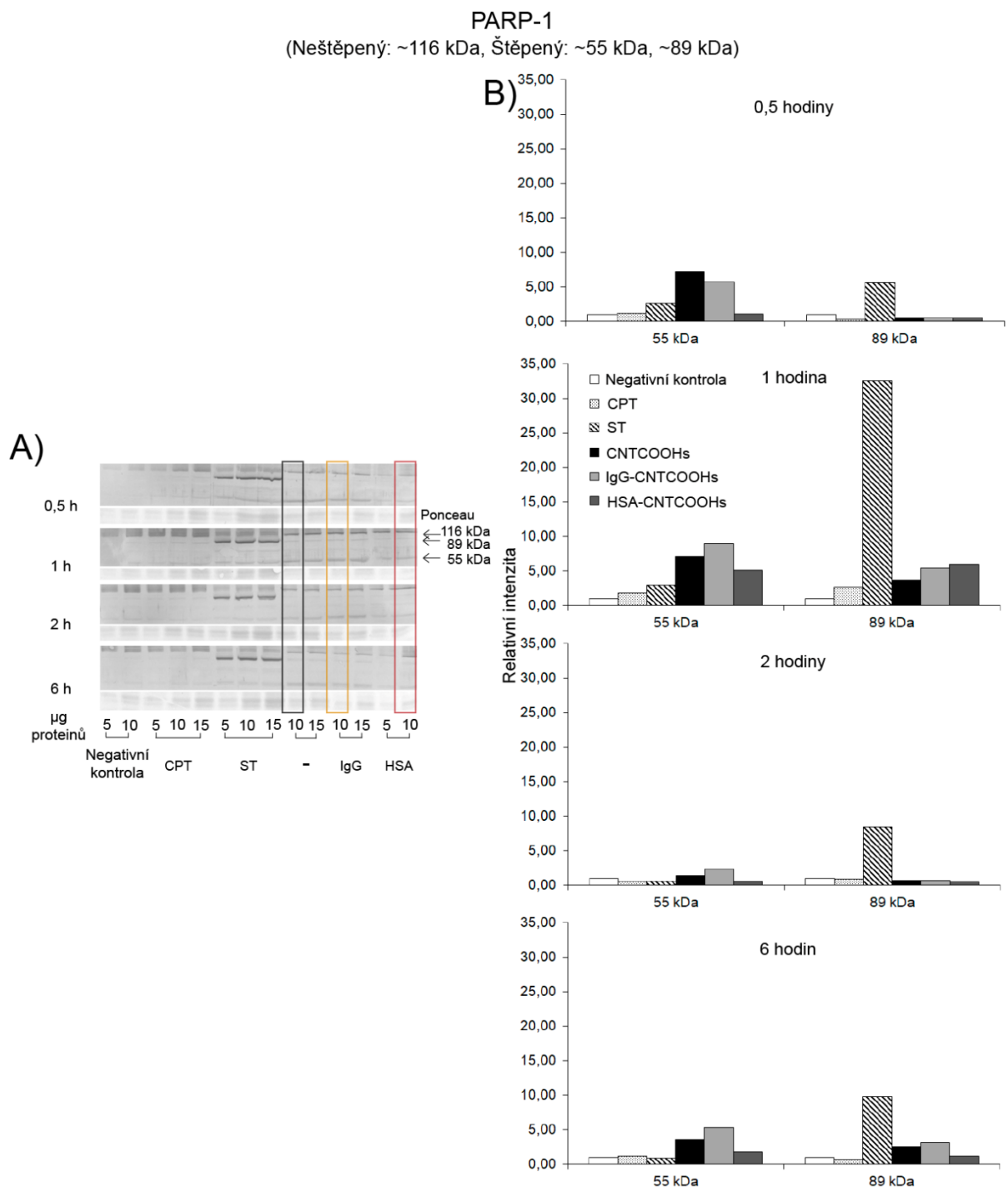
6 hodinách působení. Proteinová korona z IgG a HSA navodila podobně během první hodiny významný pokles v expresi prokaspázy-3, která byla v případě IgG-CNTCOOHs během dalších hodin postupně zvyšována. Naproti tomu v případě HSA-CNTCOOHs tato exprese kolísala v jednotlivých časových bodech a po 6 hodinách působení dosahovala podobně nízkých hodnot jako po první hodině působení. Celkové srovnání exprese prokaspázy-3 vlivem jednotlivých fCNTs po 6 hodinách působení naznačilo, že proteinová korona snížila ve srovnání s neobalenými CNTCOOHs hladinu prokaspázy-3 2,1x a 5,6x (IgG-CNTCOOHs a HSA-CNTCOOHs).



**Obrázek č. 23:** Analýza exprese neštěpené kaspázy-3 (prokaspázy-3) metodou Western blot u buněk HUVEC po jejich inkubaci s CNTCOOHs (50  $\mu$ g/ml) bez proteinové korony, s proteinovou korunou z IgG, HSA nebo s induktory apoptózy (5  $\mu$ M CPT, 5  $\mu$ M ST) po dobu 0,5, 1, 2 a 6 h. A) Obrázek Western blotu zachycující expresi prokaspázy-3. Barvení Ponceau bylo použito jako kontrola nanášky proteinů. B) Relativní denzity exprese prokaspázy-3. CPT - kamptotecin, ST - staurosporin „-“ - CNTCOOHs, IgG – IgG-CNTCOOHs, HSA – HSA-CNTCOOHs.

PARP-1 je jedním ze substrátů štěpených aktivovanou kaspázou-3 během pozdějších stádií apoptózy (Kaufmann S. H. et al., 1993; Nicholson D. W. et al., 1995; Tewari M. et al., 1995). Pro zjištění, zda snížená exprese prokaspázy-3 po hodině působení CNTCOOHs, IgG-CNTCOOHs a HSA-CNTCOOHs vede také ke štěpení PARP-1 (116 kDa), jsme mapovali výskyt jeho fragmentů pomocí Western blotu (Obrázek č. 24). Výsledky ukázaly, že ST

indukoval, zejména po první hodině působení, masivní výskyt štěpného fragmentu PARP-1 o molekulární velikosti 89 kDa, který je považován za marker apoptózy (Tewari M. et al., 1995). 89 kDa fragment byl v tomto časovém bodě v mírně zvýšené míře pozorován i u CNTCOOHs, IgG-CNTCOOHs a HSA-CNTCOOHs. Dále vlivem zejména CNTCOOHs a IgG-CNTCOOHs docházelo také ke zvýšené detekci fragmentu o molekulární velikosti 55 kDa (Obrázek č. 24B). Tento fragment, který je považován za marker nekrózy (Gobeil S. et al., 2001), byl u těchto dvou variant CNTs výrazněji pozorován už po 30 minutách působení, zatímco u HSA-CNTCOOHs až po jedné hodině působení. V dalších časových úsecích byl naopak u všech tří fCNTs jeho výskyt nižší. Proteinový obal z HSA také zřejmě vykazoval protektivní účinky vzhledem k nekrotickému působení CNTCOOHs projevující se jako snížený výskyt štěpného fragmentu o velikosti 55 kDa. Po 30 minutách působení snížil obal z HSA výskyt tohoto fragmentu 6,8x (CNTCOOHs vs. HSA-CNTCOOHs).

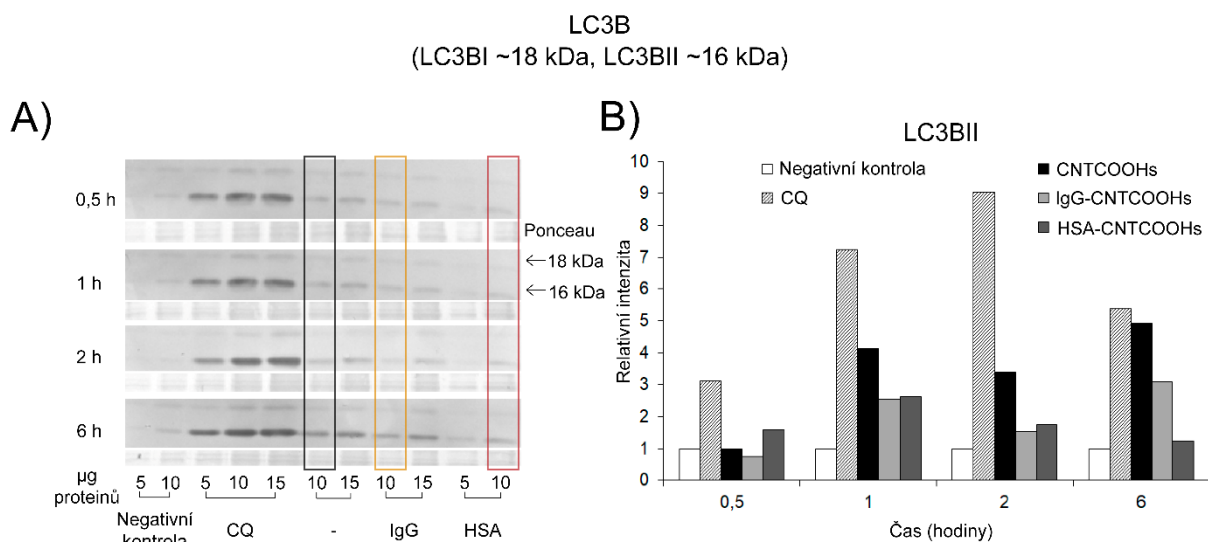


**Obrázek č. 24:** Štěpení proteinu PARP-1 u buněk HUVEC po aplikaci CNTCOOHs bez a s proteinovou korunou z IgG a HSA analyzovaných pomocí Western blotu. Buňky HUVEC byly vystaveny působení CNTCOOHs, IgG-CNTCOOHs, HSA-CNTCOOHs (50  $\mu\text{g/ml}$ ) a induktorů apoptózy (5  $\mu\text{M}$  CPT, 5  $\mu\text{M}$  ST) po dobu 0,5, 1, 2 a 6 hodin. A) Obrázek Western blotu zachycující expresi neštěpeného proteinu PARP-1 (116 kDa) a jeho štěpných fragmentů. Barvení Ponceau bylo použito jako kontrola nanášky proteinů. B) Relativní denzitometrické

stanovení štěpného fragmentu PARP-1 přítomného u apoptózy (89 kDa) a nekrózy (55 kDa). PARP-1 – poly(ADP-ribose) polymerase-1, CPT - kamptotecin, ST - staurosporin „-“ - CNTCOOHs, IgG – IgG-CNTCOOHs, HSA – HSA-CNTCOOHs.

#### **4.3.4 Proteinová korona z IgG a HSA snižuje akumulaci autofagických vezikulů vyvolanou působením CNTCOOHs**

K objasnění, zda samotné CNTCOOHs ovlivňují autofágii u buněk HUVEC a zda, případně v jaké míře, může proteinová korona z IgG nebo HSA toto působení pozměnit, jsme sledovali výskyt autofagozómů (Obrázek č. 25). V procesu tvorby autofagozómů se výrazně uplatňuje cytozolická forma LC3B proteinu, LC3BI, která může být konjugována s PE za vzniku LC3BII formy a integrována do membrány autofagozómů (Kabeya Y. et al., 2000; Kabeya Y. et al., 2004). Výrazná exprese LC3BII byla detekována pomocí Western blotu (Obrázek č. 25A) po aplikaci inhibitoru autofagického toku chlorochinu (chloroquine - CQ). Tato zvýšená exprese LC3BII naznačuje výraznou akumulaci autofagozómů a CQ tak byl využit jako pozitivní kontrola při studiu vlivu fCNTs na proces autofágie. Výsledky relativní exprese LC3BII zobrazené na Obrázku č. 25B naznačily, že CNTCOOHs bez proteinové korony indukují zvýšenou expresi LC3BII. Jak proteinová korona z IgG, tak proteinová korona z HSA, v časových úsecích 1 a 2 hodiny snižovaly expresi LC3BII vyvolanou působením CNTCOOHs, a to přibližně podobně (Obrázek č. 25B). Nicméně po 6 hodinách byl již patrný rozdíl v typu použité korony. Nejvyššího účinku bylo dosaženo obalem z HSA, který po 6 hodinách zmírnil expresi LC3BII 4x, zatímco korona z IgG pouze 1,6x ve srovnání s CNTCOOHs bez proteinové korony.

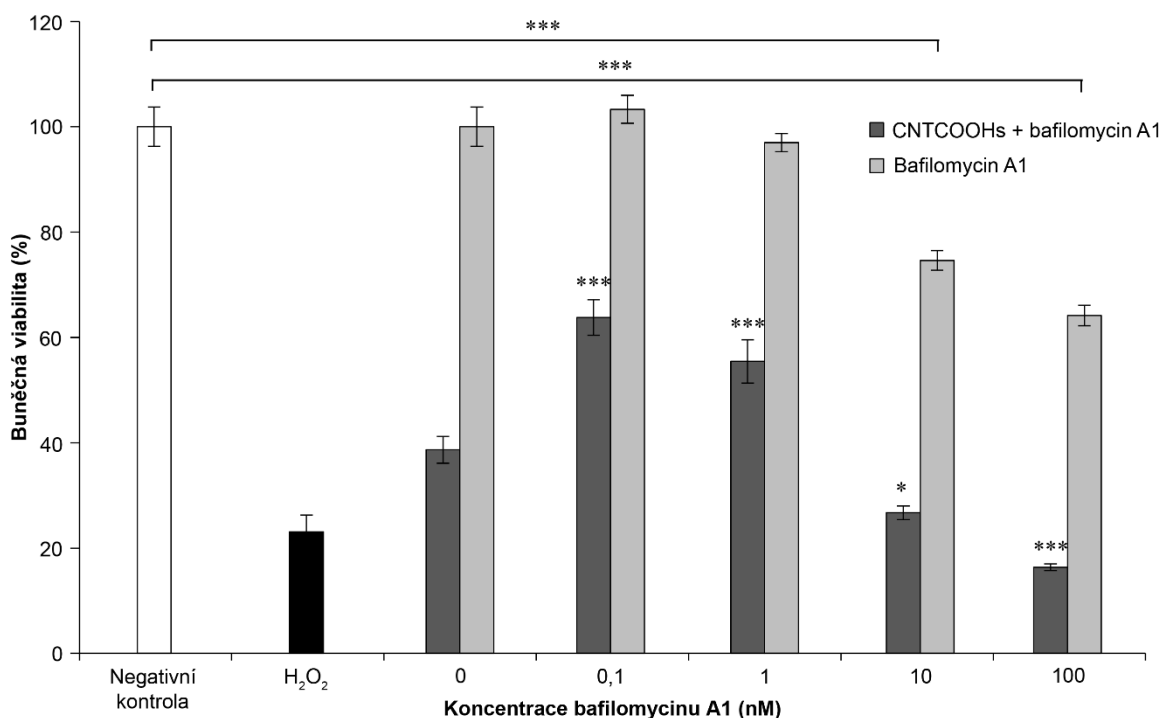


**Obrázek č. 25:** Expresa jednotlivých forem proteinu LC3B u buněk HUVEC po inkubaci s CNTCOOHs, IgG-CNTCOOHs, HSA-CNTCOOHs (50 µg/ml) a s inhibitorem autofagického toku (40 µM CQ) po dobu 0,5, 1, 2 a 6 h. A) Obrázek Western blot zachycující expresi cytosolické, LC3BI (18 kDa) a membránově vázané formy LC3B proteinu, LC3BII (16 kDa). Barvení Ponceau bylo použito jako kontrola nanášky proteinů. B) Relativní denzity exprese LC3BII. LC3B – lehký řetězec 3 beta proteinu 1 asociovaného s mikrotubuly, CQ - chlorochin, „-“ - CNTCOOHs, IgG – IgG-CNTCOOHs, HSA – HSA-CNTCOOHs.

#### 4.3.5 Snížení cytotoxicity CNTCOOHs prostřednictvím stimulace autofagického toku

Vzhledem k silnému působení CNTCOOHs na akumulaci autofagozómů (Obrázek č. 25) jsme zjišťovali, zda farmakologická stimulace autofagického toku může vést ke změně cytotoxicity navozené CNTCOOHs. Makrolidové antibiotikum bafilomycin A1 na jedné straně narušuje autofagický tok blokadou acidifikace lyzozómů a inhibicí fúze autofagozómů s lyzozómy (Mauvezin C. a Neufeld T. P., 2015), zatímco na straně druhé je v nanomolárních koncentracích ( $\leq 1$  nmol/l) schopné snižovat CQ-navozenou apoptózu, jak bylo ukázáno u granulárních neuronů mozečku (Shacka J. J. et al., 2006). Preinkubace buněk HUVEC v přítomnosti bafilomycinu A1 o koncentraci 0,1 a 1 nM významně snižovala cytotoxicitu vyvolanou CNTCOOHs (Obrázek č. 26). Tato preinkubace zvyšovala životaschopnost buněk odvozenou na základě aktivity buněčných dehydrogenáz měřenou pomocí WST-8 eseje o 25,1 a 16,8 % (0,1 a 1,0 nM bafilomycin A1). Ve vyšších koncentracích bafilomycinu A1 (10 a

100 nM) již nebyl tento efekt viditelný zřejmě kvůli cytotoxickému působení samotného bafilomycinu A1.



**Obrázek č. 26:** Vliv bafilomycinu A1 na snížení cytotoxicity CNTCOOHs. Buňky HUVEC byly inkubovány v přítomnosti bafilomycinu A1 2 hodiny před aplikací CNTCOOHs o koncentraci 10 µg/ml. Životaschopnost buněk (aktivita buněčných dehydrogenáz) byla stanovena pomocí WST-8 eseje. Sloupce v grafu reprezentují průměrné hodnoty 8- replikátů ± SEM (n = 3). Měřená opakování byla statisticky vyhodnocena pomocí metody jednorozměrná ANOVA za využití Dunnettova post-hoc testu. Pokud není uvedeno jinak, signifikance byla vztažena k životaschopnosti buněk po aplikaci CNTCOOHs inkubovaných bez bafilomycinu A1 (tj. při koncentraci bafilomycinu A1 0 nM, \*\*\* $P < 0,001$  a \* $P < 0,05$ ).

\*Vývoj WST-8 eseje byl vždy po 3 hodinách inkubace s detekční směsí zastaven pomocí 1% SDS.

## 5 Diskuze

V této práci jsme stanovovali cytotoxicitu NPs odlišného složení, tvaru a velikosti zahrnující SiNPs, SPIONs a CNTCOOHs. Dále byla studována modulace cytotoxického působení CNTCOOHs prostřednictvím proteinových koron různého složení nebo prostřednictvím farmakologického působení. Charakterizace fyzikálně-chemických vlastností zkoumaných NPs pomocí TEM,  $\zeta$ -potenciálu a  $D_H$  ukázala, že SiNPs, SPIONs a CNTCOOHs podléhaly zvýšené agregaci v přítomnosti kultivačního média bez ohledu na tvar, velikost a náboj. Námi sestavená „tři v jednom“ CDS esej k ohodnocení cytotoxicity a typu buněčné smrti *in vitro* prokázala signifikantní koncentračně a časově závislou cytotoxicitu u všech tří testovaných typů NPs. Nejvyššího cytotoxického působení na endotelové buňky HUVEC dosáhly SiNPs následované CNTCOOHs. SPIONs vykazovaly výrazně nižší buněčnou toxicitu. Výsledky modulace cytotoxicity silně toxických CNTCOOHs ukázaly, že proteinová korona z HSA může výrazně snižovat cytotoxicitu navozenou CNTCOOHs stejně tak jako působení makrolidového antibiotika bafilomycinu A1.

### 5.1 CDS esej ke stanovení cytotoxicity NPs a ohodnocení typu buněčné smrti

Snaha o přesné a správné vyšetření toxického vlivu NPs na buňky vede řadu laboratoří ke sjednocení výzkumných postupů a minimalizaci zdrojů variability (Bonner J. C. et al., 2013; Xia T. et al., 2013). V *in vitro* systémech vyplývají především z různé optické aktivity, adsorpční kapacity a schopnosti NPs interferovat s komponentami jednotlivých esejí (Kroll A. et al., 2012; Wörle-Knirsch J. M. et al., 2006; Zhang F. et al., 2011). Nezanedbatelná je i rozdílná citlivost různých buněčných typů k toxickému působení NPs (Sahu D. et al., 2016; Sohaebuddin S. K. et al., 2010). Všechny tyto faktory mohou vést k nekonzistentním výsledkům a ztížené interpretaci naměřených dat. V této práci byla vyvinuta esej pro základní stanovení cytotoxicity, která zahrnuje také vyšetřování některých aspektů buněčné smrti. Tato esej je složená z WST-8 esej (stanovení životaschopnosti buněk), LDH esej (ohodnocení nekrotického působení) a detekce intaktních jader a apoptotických tělísek pomocí fluorescenční barvy Hoeschst (semi-automatizované ohodnocení míry apoptotického působení). Jinými studiemi prokázaná interference některých typů NPs s esejemi na bázi tetrazoliových solí (Kroll A. et al., 2012; Wörle-Knirsch J. M. et al., 2006) byla kontrolována a částečně kompenzována zahrnutím fluorescenční metody do výsledné kompozice CDS esej.

## 5.2 Stanovení cytotoxicity SPIONs, SiNPs a CNTCOOHs pomocí CDS eseje

Jednotlivé druhy NPs mohou vykazovat v důsledku rozdílného složení, tvaru, velikosti a náboje odlišnou cytotoxicitu (Sohaebuddin S. K. et al., 2010; Surapaneni S. K. et al., 2018; Tarantola M. et al., 2011). Kovové, kladně nabitě SPIONs kulovitého tvaru použité v této práci vykazovaly mírné, přesto signifikantní, zvýšení cytotoxicity u endotelových buněk HUVEC. To bylo pravděpodobně způsobeno kombinací apoptotické a nekrotické formy smrti, jak ukázaly výsledky z námi použité CDS eseje. Apoptóza indukovaná působením SPIONs byla potvrzena i dalšími studiemi (Du S. et al., 2017; Liu Y. et al., 2018). Její rozvoj bývá dáván do souvislosti s narušením mitochondriálních funkcí vedoucí k produkci ROS (Du S. et al., 2017). Ty mohou vznikat vlivem vysoce reaktivních  $Fe^{2+}$  iontů (Pelizzoni I. et al., 2011), k jejichž potenciálnímu uvolnění by mohlo dojít při degradaci SPIONs v prostředí lyzozómů (Laskar A. et al., 2012; Schulze E. et al., 1995). Nekrotická forma smrti, která byla v menší míře patrná i v našich experimentech, byla v přibližně podobné intenzitě prokázána u buněk HUVEC při působení funkcionalizovaných SPIONs také v jiné studii (Poller J. M. et al., 2017).

Vyšetřování toxického vlivu SiNPs *in vitro* ukazuje nekonzistentní výsledky v rámci jednotlivých publikací (Cao Z. et al., 2017; Tokgun O. et al., 2015). Data naměřená v této práci naznačují silný cytotoxický vliv křemíkových, záporně nabitých SiNPs sférického až elipsoidního tvaru u buněk HUVEC. Signifikantní, koncentračně a časově závislý efekt na snížení životaschopnosti buněk za současného zvýšení nekrotického a apoptotického působení je v dobrém souladu s dříve publikovanou studií vlivu SiNPs o velikosti 62 nm na toxicitu buněk HUVEC. Použité SiNPs měly sférický tvar, záporný náboj a dobrou stabilitu podobně jako v našem případě. Nicméně indukovaly 3,5x nižší životaschopnost buněk v koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  ve srovnání s našimi daty (Duan J. et al., 2013). Příčinou by mohla být rozdílná velikost v použitých SiNPs (62 nm vs. 7-14 nm u námi použitých SiNPs). U té bylo ukázáno, že SiNPs menších rozměrů vykazují vyšší cytotoxické působení než stejné NPs o větších velikostech (I-Lun Hsiao A. M. G. R. J. M. S. M. G. a Andrea H., 2014; Tokgun O. et al., 2015). Potenciálním mechanismem stojícím za indukcí apoptózy a nekrózy může být schopnost SiNPs narušovat funkce mitochondrií a indukovat produkci ROS či peroxidaci membránových lipidů (Akhtar M. J. et al., 2010; Duan J. et al., 2013; Kusaczuk M. et al., 2018).

Cytotoxicita uhlíkových provazovitých MWCNTs může být výhodně snížena jejich karboxylací (Liu Z. et al., 2014; Sweeney S. et al., 2016). Při dosažení určitých koncentrací však i u karboxylované, záporně nabitě formy, dochází k buněčné toxicitě (Liu Z. et al., 2014).



Tento poznatek byl potvrzen i našimi výsledky, ze kterých vyplývá, že CNTCOOHs signifikantně indukovaly zvýšený výskyt apoptotických tělísek, který by mohl naznačovat rozvoj apoptotické formy buněčné smrti u buněk HUVEC. Zvýšená tvorba apoptotických tělísek mohla být vyvolána dříve prokázanou schopností MWCNTs narušovat funkce mitochondrií vedoucí ke zvýšené produkci ROS, poklesu mitochondriálního membránového potenciálu, uvolnění cytochromu c do cytoplazmy, aktivaci kaspáz a rozvoji programované formy buněčné smrti (Ghanbari F. et al., 2017; Liu Z. et al., 2014). Další příčina mohla spočívat v jehlovitém tvaru CNTs. Dlouhá tyčinkovitá vlákna vykazují výrazně vyšší cytotoxicitu ve srovnání se svými krátkými formami (Boyles M. S. et al., 2015). Jehlovitá struktura navíc umožňuje penetraci přes plazmatickou membránu za vzniku tzv. frustrované fagocytózy (viz kapitola 1.3.1 Cytotoxicita na úrovni vstupu NPs do buněk) (Boyles M. S. et al., 2015; Poland C. A. et al., 2008). Ta může potenciálně indukovat apoptotickou případně nekrotickou formu buněčné smrti.

Navození nekrózy vlivem CNTCOOHs bylo popsáno různými studiemi (Hiraku Y. et al., 2016; Romano-Feinholz S. et al., 2017; Zeinabad H. A. et al., 2016). Námi sestavená CDS esej by měla být schopná ohodnotit míru nekrotického působení po aplikaci NPs, případně jiných agens. Navzdory tomu z našich experimentů vyplývá, že CNTCOOHs silně interferují s LDH esejí. Tento výsledek je v souladu se studií Zhanga et al., ve které ukázali, že MWCNTs snižují enzymatickou aktivitu LDH (Zhang F. et al., 2011). Vzhledem k tomu, že CNTs nebo fulereny patří k přirozeným akceptorům elektronů (Fowler P. W. a Ceulemans A., 1995; Guldi D. M. et al., 2005), je možné, že námi použité CNTCOOHs vychytávaly elektrony potřebné pro redukci tetrazoliových solí obsažených v LDH esejí. V této interferenci se navíc může uplatnit také výrazná adsorpční kapacita CNTCOOHs vzhledem k proteinům a dalším molekulám (Guo L. et al., 2008), která může mít v konečném důsledku vliv na změnu konformace příslušných enzymů a ztrátu jejich aktivity, jak to bylo ukázáno v případě NPs na bázi uhlíku (Sanfins E. et al., 2011).

### **5.3 Rozšířený výzkum typů a mechanismů buněčné smrti vyvolaných působením CNTCOOHs**

Další výzkum typů a mechanismů buněčné smrti provedený v této práci ukázal, že CNTCOOHs mohou indukovat přechodné snížení prokaspázy-3, naznačující tak její možné štěpení (aktivaci). Tato tzv. efektorová kaspáza je ve své aktivní formě schopná štěpit protein PARP-1 za vzniku 89 kDa fragmentu při exekuci apoptózy (Gobeil S. et al., 2001; Lazebnik Y.

A. et al., 1994; Tewari M. et al., 1995). Jeho přítomnost byla ukázána po aplikaci námi testovaných CNTCOOHs. Detekovaná exprese tohoto fragmentu byla relativně nízká, nicméně po jedné hodině působení CNTCOOHs, IgG-CNTCOOHs a HSA-CNTCOOHs reverzně korelovala s expresí prokaspázy-3 po aplikaci fCNTs. Dále byl během první hodiny působení fCNTs identifikován zvýšený výskyt 55 kDa fragmentu, který je považován za marker nekrózy (Gobeil S. et al., 2001). Jeho přítomnost podporuje již dříve prokázanou indukci nekrózy (Romano-Feinholz Samuel et al., 2017; Zeinabad H. A. et al., 2016) zřejmě vlivem jehlovité struktury CNTs, která navozuje podobné cytotoxické působení jako azbestová vlákna (Boyles M. S. et al., 2015; Nagai H. et al., 2011).

Jak nekrotické, tak i výše zmíněné apoptotické působení, jsou v našem případě doprovázeny narušením autofágie, které se projevuje zvýšenou expresí membránově vázané formy proteinu LC3B, LC3BII, která naznačuje výrazné hromadění autofagických vakuol. Tento poznatek je v dobrém souladu s cytotoxickými mechanizmy působení CNTs popsány v jiných studiích (Hamilton R. F. et al., 2018; Liu H. L. et al., 2011; Tsukahara T. et al., 2013). Autofágie, jako hlavní degradační systém, který se uplatňuje při odstraňování a recyklaci vnitrobuněčných komponent nebo při zužitkování proteinů během hladovění buněk (Kristensen A. R. et al., 2008), je tak zřejmě výrazně narušena kontaktem buněk se CNTCOOHs. Dysfunkce autofágie vyvolává buněčnou cytotoxicitu a vede k akumulaci autofagických vezikul (Button R. W. et al., 2017). Příčinou této akumulace může být narušení samotného procesu autofágie (Tresse E. et al., 2010) nebo poškození (zablokování) fúze autofagozómů s lyzozómy (Mauthe M. et al., 2018). Snaha buňky o degradaci nežádoucích MWCNTs vede k jejich distribuci do lyzozómů (Cohignac V. et al., 2018). Výrazně acidifikované lyzozómy bývají spolu s pozdními endozómy umístěny do těsné blízkosti jádra (Johnson D. E. et al., 2016; Nakamura S. a Yoshimori T., 2017). Námi zjištěná perinukleární lokalizace fluorescenčně značených CNTCOOHs naznačuje inkorporaci těchto NPs do endozóm-lyzozomálního systému buněk HUVEC. Ačkoli mohou být CNTs degradovány za využití některých enzymů, jakými jsou např. myeloperoxidáza nebo křenová peroxidáza (Kagan V. E. et al., 2010; Zhao Y. et al., 2011), vlivem tuhé, vláknité struktury často dochází k permeabilizaci lyzozomální membrány a uvolnění lyzozomálních enzymů, např. katepsinu B ad., do okolí (Zhu W. et al., 2016). To navozuje poškození fyziologické funkce lyzozómů, které může vést k zastavení autofagického toku a v jeho důsledku také k akumulaci autofagozómů (Ma X. et al., 2011; Mizunoe Y. et al., 2017; Wang J. et al., 2017).

#### **5.4 Modulace cytotoxicity CNTCOOHs prostřednictvím specifické proteinové korony a farmakologického působení**

V minulosti bylo ukázáno, že CNTs patří k relativně účinným adsorbentům proteinů (Guo L. et al., 2008; Morikawa M. et al., 2012). Tato adsorpce může vést k vyčerpání nutrientů z okolního prostředí buněk (Guo L. et al., 2008) a přispívat tak, v případě CNTCOOHs, k námi naměřené cytotoxicitě. Adsorbce proteinů na povrch NPs se dá ale také využít ke snížení jejich cytotoxicity (Ge C. et al., 2011). Při kontaktu NPs s biologickými tekutinami, např. krevní plazmou, dochází ke kompetici v ní obsažených molekul, zejména proteinů, o povrch NPs za vzniku tzv. proteinové korony. Konečné složení tohoto obalu je velmi dynamické a mění se v čase nejen v závislosti na složení NPs a jejich povrchových vlastnostech (Lundqvist M. et al., 2008), ale také v závislosti na koncentraci příslušných proteinů a jejich asociačních a disociačních charakteristikách (Cedervall T. et al., 2007).

Mezi nejvýrazněji zastoupené proteiny v koruně CNTCOOHs po jejich kontaktu s lidskou krevní plazmou patří fibrinogen, HSA a IgG (De Paoli S. H. et al., 2014). De Paoli et al. ukázali, že proteinová korona z IgG měla výrazný vliv na agregaci, změnu morfologie a silné uvolňování LDH u krevních destiček (De Paoli S. H. et al., 2014). Tento poznatek je v souladu s námi naměřeným signifikantním snížením životaschopnosti buněk po obalení CNTCOOHs pomocí IgG. Toto silné zvýšení cytotoxicity však nebylo potvrzeno při využití fluorescenčního stanovení počtu intaktních jader (CDS esej). Popsaná nesrovnalost v působení proteinové korony z IgG na životaschopnost buněk stanovenou pomocí WST-8 eseje a na základě počtu fluorescenčně značených buněčných jader může být způsobena zvolenou detekční metodou. Zatímco WST-8 esej podává informaci o metabolickém stavu buněk odvozeném na základě aktivity buněčných dehydrogenáz, počet intaktních buněčných jader odráží pouze stav jader jako takových a neříká nic o stavu dalších organel. Dramatický pokles v životaschopnosti buněk HUVEC detekovaný pomocí WST-8 eseje může být také připisován aglomeračním tendencím IgG-CNTCOOHs, které zvyšují koncentraci těchto NPs na povrchu buněk, jak naznačily výsledky ze světelného mikroskopu (Obrázek č. 20). Tato „zvýšená“ koncentrace může silněji narušovat přenos elektronů, který probíhá na plazmatické membráně prostřednictvím meziprojektu – akceptoru elektronů, a je nezbytný pro redukci tetrazoliových solí na ve vodě rozpustný formazan (Berridge M. V. et al., 2005). Na druhou stranu naše výsledky naznačují, že proteinová korona z IgG mírně zesiluje nekrotické působení CNTCOOHs reprezentované zvýšeným výskytem 55 kDa štěpného fragmentu proteinu PARP-1. Možným vysvětlením může být vazba IgG-CNTCOOHs na IgG receptor přítomný na

buňkách HUVEC (Ortiz-Alegría L. B. et al., 2016). Ten by mohl potenciálně umožnit snažší, rychlejší endocytózu (Vidarsson G. et al., 2006), která by vedla k intenzivnějšímu projevu nekrotického působení CNTCOOHs spojeného s penetrací a frustrovanou endocytózou.

V minulosti bylo ukázáno, že proteinová korona z IgG vykazuje spíše „podpurný“ vliv na cytotoxické působení CNTCOOHs, naproti tomu obal formovaný z HSA zvyšuje biokompatibilitu a prodlužuje cirkulaci NPs v krvi (De Paoli S. H. et al., 2014; Li Z. et al., 2019). Podobně i naše výsledky naznačily, že proteinová korona z HSA snižuje cytotoxicitu CNTCOOHs, která se projevila jako nižší míra apoptotického a nekrotického působení a také menším hromaděním autofagických vakuol. Ačkoli by buňky HUVEC měly být schopné přijmout HSA, a tím i HSA-CNTCOOHs na caveolinu-1 závislou endocytózou (Pavlidis S. et al., 2014), může tento protein, na druhou stranu, minimalizovat interakci CNTCOOHs s buňkami (De Paoli S. H. et al., 2014). Pravděpodobným důsledkem by pak byla snížená interakce NPs s buňkami, která by mohla mít vliv na sníženou internalizaci NPs obalených HSA (Lawrence E. N. R. a Chao J.-I., 2017), a vést tak k jejich nižší cytotoxicitě. Nicméně naše výsledky z TEM ukázaly přítomnost HSA-CNTCOOHs uvnitř buněk HUVEC, což je spíše v souladu se studií, která ukázala, že proteinová korona z albuminu umožňuje vnitrobuněčnou internalizaci SWCNTs (Holt B. D. et al., 2011).

Snížená míra cytotoxicity může být také navozena pomocí nízkých koncentrací bafilomycinu A1 ( $\leq 1$  nM). V minulosti se tato strategie ukázala jako potenciální způsob podpory zachování autofagicko-lyzozomální dráhy po jejím poškození specifickými činidly nebo proteiny narušujícími fyziologické funkce lyzozómů (N Pivtoraiko V. et al., 2010). Makrolidové antibiotikum bafilomycin A1 v koncentracích vyšších než 10 nM selektivně inhibuje aktivitu protonové pumpy V-ATPázy (Bowman E. J. et al., 1988; Yoshimori T. et al., 1991). V-ATPáza je v endozóm-lyzozomálním systému obecně zodpovědná za udržování kyselého pH (Forgac M., 2007) a potažmo tak i za zajišťování optimální katalytické aktivity lyzozomálních enzymů, mezi které patří např. hydrolázy katepsin B, D ad. Inhibice V-ATPázy bafilomycinem A1 vede ke zvýšení lyzozomálního pH (Yoshimori T. et al., 1991) a narušení fyziologické funkce lyzozómů, které může vést až k buněčné smrti (Yan Y. et al., 2016). Nicméně velmi nízké koncentrace bafilomycinu A1 neindukují inhibici V-ATPázy, ale naopak obnovují autofagii narušenou zvýšením lyzozomálního pH po aplikaci CQ (Shacka J. J. et al., 2006). Námi použité nízké koncentrace bafilomycinu A1 (0,1 a 1 nM), zřejmě v důsledku podpory autofagického toku, významně zvýšily životaschopnost buněk HUVEC v přítomnosti CNTCOOHs, které mají silný vliv na poškození lyzozómů (Zhu W. et al., 2016). Bafilomycin A1 tak navozoval protektivní efekt vůči toxickému působení CNTCOOHs, což je

v souladu s nedávno publikovanou prací, která u makrofágů prokázala sníženou toxicitu NPs na bázi kobaltu vlivem bafilomycinu A1 (Wang S. et al., 2016).

Ve shrnutí výsledky této práce naznačují, že ačkoli CNTCOOHs vyvolávají silnou toxicitu u buněk HUVEC, může být tato cytotoxicita výrazně snížena využitím specifické proteinové korony a farmakologického působení. Kombinace obou strategií by tak mohla v budoucnu potenciálně přispět k využití unikátních fyzikálně-chemických vlastností CNTCOOHs na poli biomedicíny.

## 6 Závěr

Základním cílem této práce bylo ohodnotit buněčnou toxicitu vybraných NPs, a to konkrétně CNTCOOHs, SiNPs a SPIONs, pomocí eseje, která do určité míry omezuje variabilitu vyplývající z použití odlišné populace nasazených buněk testovaných různými esejemi. Dalším cílem práce bylo snížit cytotoxicitu vyvolanou působením CNTCOOHs u primárních endotelových buněk HUVEC a přispět tak k navržení a vývoji potenciálních postupů cílených na snížení toxického působení některých druhů NPs.

Zhodnocení hypotéz a cílů práce:

**Hypotéza č. 1: Cytotoxicitu NPs lze přesněji ohodnotit kombinací různých metod v rámci jedné detekční eseje provedené na stejné populaci buněk.** Zjistili jsme, že kombinace různých detekčních přístupů, která v našem případě zahrnovala kolorimetrické stanovení metabolické aktivity buněčných dehydrogenáz a fluorescenční zobrazení intaktních buněčných jader, může poskytnout rozdílnou informaci o životaschopnosti buněk. Celkový stav buňky by měl být tedy určován na základě více aspektů, které tak komplexněji zhodnotí její skutečný stav, a tím i přesněji stanoví cytotoxické působení NPs. Navíc lze tímto přístupem odhalit případnou interferenci NPs s některými částmi eseje.

**Hypotéza č. 2: Cytotoxicitu NPs lze ovlivnit preformováním proteinové korony na jejich povrchu.** V této práci proteinová korona z IgG a HSA výrazně ovlivnila toxicitu CNTCOOHs vzhledem k buňkám HUVEC. Vliv proteinové korony z IgG nelze z této práce naprosto jednoznačně určit vzhledem k rozdílným výsledkům získaným pomocí použitých detekčních metod. Naproti tomu proteinová korona z HSA umožnila určité snížení cytotoxicity navozené CNTCOOHs vedoucí k nižšímu rozvoji apoptotické a nekrotické formy buněčné smrti a nižší akumulaci autofagických váčků.

**Hypotéza č. 3: Cytotoxicitu NPs lze modulovat farmakologickým působením zaměřeným na ovlivnění buněčných procesů.** V našem případě bylo farmakologické ovlivnění autofágie jako procesu uplatňujícího se, alespoň v některých případech, při přežití buňky, úspěšné. Stimulace autofagického toku nízkými koncentracemi bafilomycinu A1 zvýšila životaschopnost buněk HUVEC naměřenou pomocí WST-8 eseje. Nicméně v rámci

komplexnějšího přístupu ohodnocení míry a významu této formy modulace bylo zapotřebí podrobnějšího výzkumu mechanismů účinku za využití širšího spektra metod, což bylo předmětem společné publikace (Orecna M. et al., 2014) vzniklé v rámci mezilaboratorní spolupráce s Laboratoří buněčné hematologie (Laboratory of Cellular Hematology, Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration) v Rockvillu, MD, USA.

Shrnutí dílčích výsledků odpovídajícím cílům práce:

1. Karboxylace MWCNTs směsí kyseliny dusičné a kyseliny sírové umožnila dobrou rozpustnost vzniklých CNTCOOHs ve vodě.
2. Charakterizace CNTCOOHs, SiNPs a SPIONs prokázala záporný náboj a sférický až elipsoidní tvar SiNPs, kladný náboj a kulovitou morfologii SPIONs a záporný náboj s vláknitou (tubulární) strukturou u CNTCOOHs. Všechny testované NPs vykazovaly výraznou tendenci k aglomeraci po 24 hodinách inkubace v kultivačním médiu, a to v pořadí SiNPs > SPIONs > CNTCOOHs.
3. Stanovení cytotoxicity pomocí námi sestavené „tři v jednom“ screeningové (CDS) eseje buněčné smrti prokázalo silný cytotoxický vliv SiNPs a střední cytotoxické působení CNTCOOHs. SPIONs vykazovaly pouze mírnou toxicitu u primárních endotelových buněk HUVEC.
4. Cytotoxické působení SiNPs měřené pomocí CDS eseje zahrnovalo výraznou přítomnost apoptotických tělísek a silný výlev LDH naznačujících podíl apoptózy i nekrózy na buněčné smrti. Oba aspekty těchto typů buněčné smrti byly přítomny v malém množství také v případě SPIONs. Aplikace CNTCOOHs na buňky HUVEC indukovala tvorbu apoptotických tělísek a překvapivě téměř nulové uvolňování LDH.
5. Minimální detekce nekrotického působení, v případě CNTCOOHs, byla zapříčiněna jejich výraznou interferencí s LDH esejí. Bylo prokázáno, že použití těchto typů esejí není pro studium cytotoxicity CNTCOOHs vhodné.

6. Detekce fragmentů štěpeného proteinu PARP-1 po aplikaci CNTCOOHs na buňky HUVEC naznačila podíl nekrotické formy buněčné smrti v rámci cytotoxického působení CNTCOOHs.
7. Proteinová korona z HSA, nikoli však z IgG, snižovala toxický vliv CNTCOOHs na primární endotelové buňky HUVEC.
8. Protektivní vliv proteinové korony z HSA zahrnoval snížení apoptotického i nekrotického působení CNTCOOHs.
9. Stimulace autofagického toku pomocí bafilomycinu A1 snížila toxicitu navozenou působením CNTCOOHs na endotelové buňky HUVEC.



## 7 Seznam příloh

Příloha č. 1:

**Filipova, M.**, Elhelu, O.K., De Paoli, S.H., Fremuntova, Z., Mosko, T., Cmarko, D., Simak, J. & Holada, K., 2018. An effective “three-in-one” screening assay for testing drug and nanoparticle toxicity in human endothelial cells. *PLOS ONE*, 13, e0206557. (IF = 2,766)

Příloha č. 2:

**Filipová, M.**, Rusina, R., Holada, K. Nanočástice jako nosiče léků přes hematoencefalickou bariéru – naděje pro léčbu neurodegenerativních onemocnění v budoucnosti?. *Cesk Slov Neurol N* 2016; 79/112(2): 160-167. (IF = 0,508)

Příloha č. 3:

Orecna, M., De Paoli, S.H., Janouskova, O., Tegegn, T.Z., **Filipova, M.**, Bonevich, J.E., Holada, K. & Simak, J., 2014. Toxicity of carboxylated carbon nanotubes in endothelial cells is attenuated by stimulation of the autophagic flux with the release of nanomaterial in autophagic vesicles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10, e939-e948. (IF = 6,500)

## 8 Použitá literatura

- AbouAitah K. et al., *Oncotarget*, 2018. **9**(41):26466-26490.
- Acehan D. et al., *Mol Cell*, 2002. **9**(2):423-32.
- Adkinson N. F. et al., *Am J Hematol*, 2018. **93**(5):683-690.
- Akhtar M. J. et al., *Toxicology*, 2010. **276**(2):95-102.
- Alpha Raj, M., *Calculating LD50/LC50 using Probit Analysis in Excel*. [online]. 2016.[cit. 23.6.2019].Dostupné z WWW: <http://probitanalysis.blogspot.com/>.
- Antonelli A. et al., *Nanotechnology*, 2010. **21**(42):425101.
- Anu Mary E. Saravanakumar M. P., *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 2017. **263**(3):032019.
- AshaRani P. V. et al., *ACS Nano*, 2009. **3**(2):279-90.
- Auffan M. et al., *Environmental Science & Technology*, 2008. **42**(17):6730-6735.
- Balcells L. et al., *ACS Omega*, 2019. **4**(2):2728-2740.
- Baltazar G. C. et al., *PLoS One*, 2012. **7**(12):e49635.
- Bedrov D. et al., *J Phys Chem B*, 2008. **112**(7):2078-84.
- Bekyarova E. et al., *J Biomed Nanotechnol*, 2005. **1**(1):3-17.
- Bellail A. C. et al., *J Cell Mol Med*, 2010. **14**(6A):1303-17.
- Belmokhtar C. A. et al., *Oncogene*, 2001. **20**(26):3354-3362.
- Berg T. O. et al., *J Biol Chem*, 1998. **273**(34):21883-92.
- Berridge M. V. et al., *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction*, in *Biotechnology Annual Review*. 2005, Elsevier. p. 127-152.
- Bhardwaj V. et al., *Analyst*, 2015. **140**(12):3929-34.
- Bharti C. et al., *Int J Pharm Investig*, 2015. **5**(3):124-33.
- Bonner J. C. et al., *Environ Health Perspect*, 2013. **121**(6):676-82.
- Boverhof D. R. et al., *Regul Toxicol Pharmacol*, 2015. **73**(1):137-50.
- Bowman E. J. et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1988. **85**(21):7972.
- Boyles M. S. et al., *Toxicol In Vitro*, 2015. **29**(7):1513-28.
- Boyoglu C. et al., *Nanotechnology 2011: Bio Sensors, Instruments, Medical, Environment and Energy, Nano Science and Technology Institute*, 2012. 489-492.
- Braydich-Stolle L. K. et al., *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 2010. **116**(2):577-589.
- Briley-Saebo K. et al., *Cell and Tissue Research*, 2004. **316**(3):315-323.

Brown D. L. et al., *Surgery*, 1997. **121**(4):372-80.

Butler R. F., Banerjee S. K., *Journal of Geophysical Research*, 1975. **80**(29):4049-4058.

Button R. W. et al., *The Journal of biological chemistry*, 2017. **292**(33):13599-13614.

Cao Z. et al., *Nanoscale*, 2017. **9**(22):7602-7611.

Capjak I., et al., *Arch Ind Hyg Toxicol*, 2017. **68**(4):245-253.

Carrington P. E. et al., *Mol Cell*, 2006. **22**(5):599-610.

Cartiera M. S. et al., *Biomaterials*, 2009. **30**(14):2790-8.

Casals E. et al., *ACS Nano*, 2010. **4**(7):3623-32.

Catchpole D. R., Stewart B. W., *Exp Cell Res*, 1995. **216**(1):169-77.

Cedervall T. et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. **104**(7):2050.

Cohignac V. et al., *Autophagy*, 2018. **14**(8):1323-1334.

Cowan K. N. et al., *FASEB J*, 2005. **19**(13):1848-50.

Cui X. et al., *Sci Rep*, 2017. **7**(1):1518.

Danielsson I., Lindman B., *Colloids and Surfaces*, 1981. **3**:391-392.

Das G. et al., *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(6).

De Paoli S. H. et al., *Biomaterials*, 2014. **35**(24):6182-6194.

Decuzzi P., Ferrari M., *Biomaterials*, 2007. **28**(18):2915-22.

Degterev A. et al., *Nat Chem Biol*, 2005. **1**(2):112-9.

Deng Z. J. et al., *Nat Nanotechnol*, 2011. **6**(1):39-44.

Dickens L. S. et al., *Mol Cell*, 2012. **47**(2):291-305.

Dodson M. et al., *Mol Cell Biol*, 2018.

Domenech M. et al., *ACS Nano*, 2013. **7**(6):5091-101.

Donovan K. W., Bretscher A., *J Cell Biol*, 2015. **210**(2):181-9.

Dresselhaus M. S. et al., *Phys Rev B Condens Matter*, 1992. **45**(11):6234-6242.

Du S. et al., *Oncotarget*, 2017. **8**(6):9410-9424.

Duan J. et al., *PLoS One*, 2013. **8**(4):e62087.

Dunlop D. J., Özdemir Ö., *Rock Magnetism: Fundamentals and Frontiers*. Cambridge Studies in Magnetism. 1997, Cambridge: Cambridge University Press.

Eatemadi A. et al., *Nanoscale research letters*, 2014. **9**(1):393-393.

Efeoglu E. et al., *Analytical Methods*, 2015. **7**(23):10000-10017.

Eibauer M. et al., *Nat Commun*, 2015. **6**:7532.

Elias A., Tsourkas A., *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2009:720-6.

- EMA, European Medicines Agency. *Withdrawal Assessment Report for Sinerem*. [online]. 2008. [cit. 20.7.2019]. Dostupné z WWW: <https://www.ema.europa.eu/en>. Doc.Ref.:EMA/CHMP/11527/2008.
- Ema M. et al., *J Toxicol Sci*, 2017. **42**(3):367-378.
- Eskes R. et al., *J Cell Biol*, 1998. **143**(1):217-24.
- FDA, Food and Drug Administration. *FDA Drug Safety Communication: FDA strengthens warnings and changes prescribing instructions to decrease the risk of serious allergic reactions with anemia drug Feraheme (ferumoxytol)*. [online]2015. [cit. 20.7.2019]. Dostupné z WWW: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-fda-strengthens-warnings-and-changes-prescribing-instructions-decrease>.
- Feng Q. et al., *Sci Rep*, 2018. **8**(1):2082.
- Filipova M. et al., *PLoS One*, 2018. **13**(10):e0206557.
- Finney D. J., *Cambridge, UK*, 1971.
- Finucane D. M. et al., *J Biol Chem*, 1999. **274**(4):2225-33.
- Forgac M., *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007. **8**:917.
- Foroozandeh P., Aziz A. A., *Nanoscale research letters*, 2018. **13**(1):339-339.
- Fowler P. W., Ceulemans A., *The Journal of Physical Chemistry*, 1995. **99**(2):508-510.
- Freire-de-Lima C. G. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(50):38376-38384.
- Fujita N. et al., *Elife*, 2017. **6**.
- Fujita N. et al., *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(5):2092-100.
- Galluzzi L. et al., *Cell Death Differ*, 2018. **25**(3):486-541.
- Gao J. et al., *Sci Rep*, 2017. **7**:45215.
- Gao W. et al., *Chem Commun (Camb)*, 2014. **50**(60):8117-20.
- Ge C. et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011. **108**(41):16968.
- Ge C. et al., *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 2011. **11**(3):2389-2397.
- Ge L. Schekman R., *Autophagy*, 2014. **10**(1):170-2.
- Ghanbari F. et al., *J Biomed Mater Res A*, 2017. **105**(7):2047-2055.
- Gholami L. et al., *Ceramics International*, 2018. **44**(8):9263-9268.
- Gobeil S. et al., *Cell Death Differ*, 2001. **8**(6):588-94.
- Goossens V. et al., *Antioxid Redox Signal*, 1999. **1**(3):285-95.
- Gu L. et al., *ACS Nano*, 2012. **6**(6):4947-54.
- Guicciardi M. E., Gores G. J., *FASEB J*, 2009. **23**(6):1625-37.
- Guldi D. M. et al., *Accounts of Chemical Research*, 2005. **38**(11):871-878.

Gunduz N. et al., *Sci Rep*, 2017. **7**:40493.

Günther C. et al., *Nature*, 2011. **477**(7364):335-339.

Guo L. et al., *Small*, 2008. **4**(6):721-7.

Hamilton R. F. et al., *International journal of molecular sciences*, 2018. **19**(2):354.

Hanada T. et al., *J Biol Chem*, 2007. **282**(52):37298-302.

Haniu H. et al., *Int J Nanomedicine*, 2011. **6**:3487-97.

He W. L. et al., *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008. **9**(9):707-12.

He X. et al., *Analytical Chemistry*, 2012. **84**(21):9056-9064.

Henkler F. et al., *J Cell Biol*, 2005. **168**(7):1087-98.

Henson P. M., Hume D. A., *Trends Immunol*, 2006. **27**(5):244-50.

Hiraku Y. et al., *Part Fibre Toxicol*, 2016. **13**:16.

Hitomi J. et al., *J Cell Biol*, 2004. **165**(3):347-56.

Holt B. D. et al., *Small*, 2011. **7**(16):2348-2355.

Hou J. et al., *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(3):409.

Huang L. et al., *Chem Commun (Camb)*, 2015. **51**(18):3923-6.

Huang L. et al., *Synthesis of single-walled carbon nanotubes by an arc-discharge method using selenium as a promoter*. Vol. 49. 2011. 4792-4800.

Huefner A. et al., *ACS Nano*, 2016. **10**(1):307-16.

Chai G. H. et al., *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016. **8**(9):5929-40.

Chakraborty A., Jana N. R., *J Phys Chem Lett*, 2015. **6**(18):3688-97.

Chakravarty P. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(25):8697-702.

Chan F. K. et al., *Methods Mol Biol*, 2013. **979**:65-70.

Chang Y. J. et al., *PLoS One*, 2015. **10**(3):e0120713.

Chekli L. et al., *Water Res*, 2013. **47**(13):4585-99.

Chen W.-H. et al., *Biomaterials*, 2016. **76**:87-101.

Chithrani B. D. Chan W. C., *Nano Lett*, 2007. **7**(6):1542-50.

Cho Y. S. et al., *Cell*, 2009. **137**(6):1112-23.

Chou L. Y. et al., *Chem Soc Rev*, 2011. **40**(1):233-45.

Choudhry P., *PLoS One*, 2016. **11**(2):e0148469.

Chu B. et al., *Anal Chem*, 2016. **88**(18):9235-42.

Chu Z. et al., *Sci Rep*, 2015. **5**:11661.

I-Lun Hsiao A. M. G. R. J. M. S. M. G., Andrea H., *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 2014. **5**(6):-.

Iijima S., *Nature*, 1991. **354**:56.

Inbaraj B. S., Chen B. H., *Int J Nanomedicine*, 2012. **7**:4419-32.

Iverson N. M. et al., *Nat Nanotechnol*, 2013. **8**(11):873-80.

Iyer S. S. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(48):20388-93.

Jäger S. et al., *Journal of Cell Science*, 2004. **117**(20):4837.

Janko C. et al., *Methods Mol Biol*, 2013. **1004**:3-15.

Jeevanandam J. et al., *Beilstein J Nanotechnol*, 2018. **9**:1050-1074.

Jiang P. et al., *Mol Biol Cell*, 2014. **25**(8):1327-37.

Jianwei C. et al., *Nanotechnology*, 2000. **11**(2):65.

Jiao Y. et al., *Int J Biol Sci*, 2016. **12**(5):580-93.

Johnson D. E. et al., *The Journal of Cell Biology*, 2016. **212**(6):677.

Jung S. Y. et al., *J Am Chem Soc*, 2003. **125**(42):12782-6.

Jürgensmeier J. M. et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998. **95**(9):4997.

Kabeya Y. et al., *EMBO J*, 2000. **19**(21):5720-8.

Kabeya Y. et al., *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 13):2805-12.

Kaczanowski S., *Phys Biol*, 2016. **13**(3):031001.

Kagan V. E. et al., *Nature Nanotechnology*, 2010. **5**:354.

Kalimuthu S., Se-Kwon K., *Int J Mol Sci*, 2013. **14**(2):2334-54.

Kang B. et al., *Small*, 2010. **6**(21):2362-6.

Kaufmann S. H. et al., *Cancer Res*, 1993. **53**(17):3976-85.

Kaushik S., Cuervo A. M., *Trends Cell Biol*, 2012. **22**(8):407-17.

Kavithaa K. et al., *Karbala International Journal of Modern Science*, 2016. **2**(1):46-55.

Kharissova O. V., Kharisov B. I., *RSC Advances*, 2014. **4**(58):30807-30815.

Kim C. S. et al., *MethodsX*, 2015. **2**:306-15.

Kim J.-S. et al., *Journal of veterinary science*, 2006. **7**(4):321-326.

Kim S. J. et al., *Hum Mol Genet*, 2006. **15**(11):1826-34.

Kivinen K. et al., *Experimental Cell Research*, 2005. **311**(1):62-73.

Kluck R. M. et al., *Science*, 1997. **275**(5303):1132-6.

Korolchuk V. I. et al., *Nat Cell Biol*, 2011. **13**(4):453-60.

Köseoğlu Y., *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2006. **300**(1):e327-e330.

Kossatz S. et al., *Breast Cancer Res*, 2015. **17**:66.

Kristensen A. R. et al., *Molecular & Cellular Proteomics*, 2008. **7**(12):2419.

Kroemer G. et al., *Cell Death Differ*, 2009. **16**(1):3-11.

Kroll A. et al., *Arch Toxicol*, 2012. **86**(7):1123-36.

Kuhn D. A. et al., *Beilstein J Nanotechnol*, 2014. **5**:1625-36.

Kuma A. et al., *J Biol Chem*, 2002. **277**(21):18619-25.

Kurzahls S. et al., *Nanoscale*, 2017. **9**(8):2793-2805.

Kusaczuk M. et al., *Int J Nanomedicine*, 2018. **13**:2279-2294.

Lacerda L. et al., *Biomaterials*, 2012. **33**(11):3334-43.

Lamprecht C. et al., *J Phys Condens Matter*, 2012. **24**(16):164206.

Landry M. J. et al., *Autophagy*, 2018. **14**(8):1323-1334.

Laskar A. et al., *Nanomedicine (Lond)*, 2012. **7**(5):705-17.

Lawrence E. N. R., Chao J.-I., *The FASEB Journal*, 2017. **31**(1\_supplement):lb132-lb132.

Lazebnik Y. A. et al., *Nature*, 1994. **371**(6495):346-347.

Lee J. E. et al., *Journal of the American Chemical Society*, 2010. **132**(2):552-557.

Lewinski N. A., *Nanoparticle Cytotoxicity*, in *Encyclopedia of Nanotechnology*, B. Bhushan, Editor. 2012, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 1644-1651.

Li J. Yuan J., *Oncogene*, 2008. **27**(48):6194-206.

Li P. et al., *Cell*, 1997. **91**(4):479-89.

Li Q. et al., *Scientific reports*, 2017. **7**(1):9894-9894.

Li Z. et al., *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019. **14**(1):52-62.

Lin Y. et al., *Nano Letters*, 2004. **4**(2):191-195.

Liu H. L. et al., *Cell death & disease*, 2011. **2**(5):e159-e159.

Liu Y. et al., *Toxicol Lett*, 2018. **292**:151-161.

Liu Z. et al., *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2014. **102**(3):665-673.

Ludwig R. et al., *Int J Nanomedicine*, 2017. **12**:1009-1018.

Lundqvist M. et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(38):14265.

Lunov O. et al., *ACS Nano*, 2011. **5**(3):1657-69.

Ma J. et al., *Journal of Materials Chemistry*, 2009. **19**(19):3033-3041.

Ma X. et al., *ACS Nano*, 2011. **5**(11):8629-39.

Ma X. et al., *ACS Nano*, 2012. **6**(12):10486-96.

MacKenzie S. H., Clark A. C., *Adv Exp Med Biol*, 2012. **747**:55-73.

Majumder P., Chakrabarti O., *Cell Death Dis*, 2015. **6**:e1970.

Malvindi M. A. et al., *PLoS One*, 2014. **9**(1):e85835.

Mansouri A. et al., *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018. **106**:78-86.

Mariappan L. et al., *Nanomedicine*, 2016. **12**(3):689-699.

Masood F., *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016. **60**:569-578.

Matsui T. et al., *The Journal of Cell Biology*, 2018. **217**(8):2633.

Matuszak J. et al., *Int J Nanomedicine*, 2018. **13**:8443-8460.

Mauthe M. et al., *Autophagy*, 2018. **14**(8):1435-1455.

Mauvezin C., Neufeld T. P., *Autophagy*, 2015. **11**(8):1437-8.

Mazzaglia A. et al., *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2018. **163**:55-63.

McKeague A. L. et al., *Br J Cancer*, 2003. **88**(1):125-31.

Milani S. et al., *ACS Nano*, 2012. **6**(3):2532-41.

Mills J. C. et al., *The Journal of cell biology*, 1998. **140**(3):627-636.

Mizunoe Y. et al., *Autophagy*, 2017. **13**(4):642-653.

Mohammadinejad R. et al., *Autophagy*, 2019. **15**(1):4-33.

Moon H. K. et al., *ACS Nano*, 2009. **3**(11):3707-3713.

Mora J. et al., *Journal of Molecular Cell Biology*, 2016. **8**(5):426-438.

Morikawa M. et al., *Nano Biomedicine*, 2012. **4**(2):66-75.

Mu Q. et al., *Nano Lett*, 2009. **9**(12):4370-5.

Murali K., et al., *JSM Nanotechnol Nanomed*, 2018. **6**(1):1064.

N Pivtoraiko V. et al., *Low-Dose Bafilomycin Attenuates Neuronal Cell Death Associated with Autophagy-Lysosome Pathway Dysfunction*. Vol. 114. 2010. 1193-204.

Nagai H. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(49):E1330-8.

Nakamura S., Yoshimori T., *Journal of Cell Science*, 2017. **130**(7):1209.

Nakatogawa H. et al., *Cell*, 2007. **130**(1):165-78.

Narayan R. et al., *Pharmaceutics*, 2018. **10**(3):118.

Narita M. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(25):14681-6.

Ng C. T. et al., *The Anatomical Record*, 2015. **298**(2):418-427.

Nicholson D. W. et al., *Nature*, 1995. **376**(6535):37-43.

Ogata M. et al., *Molecular and cellular biology*, 2006. **26**(24):9220-9231.

Ojha R. et al., *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 2015. **11**(3):514-524.

Okon E. et al., *Lab Invest*, 1994. **71**(6):895-903.

Orecna M. et al., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2014. **10**(5):e939-e948.

Orlinick J. R. et al., *J Biol Chem*, 1997. **272**(46):28889-94.

Ortiz-Alegria L. B. et al., *Potential of HMEC-1 line and HUVEC primary culture cells to study the neonatal IgG Fc receptor in vitro*. Vol. 12. 2016. 1-9.

Pal S. L. et al., *J Appl Pharm Sci*, 2011. **1**(06):228-234.

Palomäki J. et al., *ACS Nano*, 2011. **5**(9):6861-6870.

Pante N., Kann M., *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(2):425-34.



Pavlidis S. et al., *Cell and tissue research*, 2014. **356**(1):147-157.

Pelizzoni I. et al., *Aging Cell*, 2011. **10**(1):172-83.

Peng Q. et al., *Biomaterials*, 2013. **34**(33):8521-30.

Pillai S. K. et al., *Nanostructured Materials and Nanotechnology V*, 2011.

Pok S. et al., *ACS Nano*, 2014. **8**(10):9822-32.

Poland C. A. et al., *Nature Nanotechnology*, 2008. **3**:423.

Poller J. M. et al., *Int J Nanomedicine*, 2017. **12**:3207-3220.

Pouliquen D. et al., *Magn Reson Imaging*, 1991. **9**(3):275-83.

Price D. N. et al., *Mol Pharm*, 2017. **14**(12):4741-4750.

Rajesh R. et al., *RSC Advances*, 2016. **6**(85):82385-82393.

Rello S. et al., *Apoptosis*, 2005. **10**(1):201-8.

Remaut K. et al., *J Control Release*, 2014. **195**:29-36.

Richards D. A. et al., *Chemical science*, 2017. **8**(1):63-77.

Roberts A. W. et al., *Immunity*, 2017. **47**(5):913-927 e6.

Robertson A. M. G. et al., *The Journal of Pathology*, 1978. **126**(3):181-187.

Robertson J. D. et al., *Sci Rep*, 2016. **6**:27494.

Rodríguez-Hernández Á. et al., *Apoptosis*, 2006. **11**(3):131-139.

Romano-Feinholz S. et al., *Int J Nanomedicine*, 2017. **12**:6005-6026.

Romano-Feinholz S. et al., *International journal of nanomedicine*, 2017. **12**:6005-6026.

Rong Y. et al., *Nat Cell Biol*, 2012. **14**(9):924-34.

Russell R. C. et al., *Nat Cell Biol*, 2013. **15**(7):741-50.

Rydell-Törmänen K. et al., *European Respiratory Journal*, 2006. **28**(2):268.

Ryoo H. D., *FEBS J*, 2016. **283**(20):3718-3722.

Sabella S. et al., *Nanoscale*, 2014. **6**(12):7052-61.

Sahu D. et al., *Journal of Nanoscience*, 2016. **2016**:9.

Sachet M. et al., *Apoptosis*, 2017. **22**(10):1189-1204.

Saito R. et al., *Physical Properties of Carbon Nanotubes*. 1998. 272.

Saito R. et al., *Applied Physics Letters*, 1992. **60**(18):2204-2206.

Saito Y. et al., *Free Radical Research*, 2006. **40**(6):619-630.

Sakulkhu U. et al., *Sci Rep*, 2014. **4**:5020.

Salata O., *J Nanobiotechnology*, 2004. **2**(1):3.

Samanta S. et al., *New Journal of Chemistry*, 2018. **42**(4):2804-2814.

Sanfins E. et al., *ACS Nano*, 2011. **5**(6):4504-11.

Sanchez C. et al., *Journal of Materials Chemistry*, 2005. **15**(35-36):3559-3592.

Sano R., Reed J. C., *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1833**(12):3460-3470.

Sansuk S. et al., *Analytical Chemistry*, 2013. **85**(1):163-169.

Saraste A., Pulkki K., *Cardiovascular Research*, 2000. **45**(3):528-537.

Sawai H., *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **432**(3):451-5.

Scott F. L. et al., *Nature*, 2009. **457**(7232):1019-22.

Seo M. Y., Rhee K., *Cell Death Dis*, 2018. **9**(5):571.

Shacka J. J. et al., *Molecular Pharmacology*, 2006. **69**(4):1125.

Shamas-Din A. et al., *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013. **5**(4):a008714.

Shi X. et al., *Nat Nanotechnol*, 2011. **6**(11):714-9.

Shimizu S. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(4):1455-9.

Shiri-Yekta Z. et al., *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2013. **30**(8):1644-1651.

Shirshahi V., Soltani M., *Contrast Media Mol Imaging*, 2015. **10**(1):1-17.

Schläfli A. M. et al., *European journal of histochemistry : EJH*, 2015. **59**(2):2481-2481.

Schulze E. et al., *Invest Radiol*, 1995. **30**(10):604-10.

Schütz I. et al., *The Journal of biological chemistry*, 2016. **291**(27):14170-14184.

Schweichel J. U. Merker H. J., *Teratology*, 1973. **7**(3):253-266.

Silva E. et al., *Acta Biomater*, 2017. **53**:439-449.

Simard J. C. et al., *Apoptosis*, 2016. **21**(11):1279-1290.

Simenc J., Lipnik-Stangelj M., *Radiol Oncol*, 2012. **46**(4):312-20.

Singh K. K. et al., *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part N: Journal of Nanomaterials, Nanoengineering and Nanosystems*, 2017. **231**(3):141-151.

Sitailo L. A. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(22):19346-19352.

Slee E. A. et al., *J Biol Chem*, 2001. **276**(10):7320-6.

Slowing I. I. et al., *Journal of Materials Chemistry*, 2010. **20**(37):7924-7937.

Sohaebuddin S. K. et al., *Part Fibre Toxicol*, 2010. **7**:22.

Stancu M. et al., *Purification of multiwall carbon nanotubes obtained by AC arc discharge method*. Vol. 5. 2011.

Stennicke H. R. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(42):27084-27090.

Stepien G. et al., *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018. **10**(5):4548-4560.

Sternberg S. R., *Computer*, 1983. **16**(1):22-34.

Stöber W. et al., *Journal of Colloid and Interface Science*, 1968. **26**(1):62-69.

Sukhanova A. et al., *Nanoscale research letters*, 2018. **13**(1):44-44.

Sun L. et al., *Toxicol In Vitro*, 2011. **25**(8):1619-29.

Surapaneni S. K. et al., *Sci Rep*, 2018. **8**(1):12295.

Sweeney S. et al., *Carbon*, 2014. **78**:26-37.

Sweeney S. et al., *Environmental Science: Nano*, 2016. **3**(6):1340-1350.

Syed Abdul Rahman S. N. et al., *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013. **2013**:257108.

Takada T. et al., *Suitable condition for sidewall carboxylation of multwalled carbon nanotubes*. Vol. 2. 2010. 147-152.

Takahashi S. et al., *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 17):4049-57.

Tan S. Y. et al., *Nanoscale*, 2017. **9**(6):2253-2261.

Tarantola M. et al., *Nanotoxicology*, 2011. **5**(2):254-68.

Tenzer S. et al., *Nat Nanotechnol*, 2013. **8**(10):772-81.

Terry L. J. et al., *Science*, 2007. **318**(5855):1412-6.

Tewari M. et al., *Cell*, 1995. **81**(5):801-9.

Thomaidou D. et al., *J Neurosci*, 1997. **17**(3):1075-85.

Tiwari A. et al., *Nanoscale*, 2018. **10**(7):3369-3384.

Tiwari J. N. et al., *Progress in Materials Science*, 2012. **57**(4):724-803.

Tokgun O. et al., *Silica nanoparticles can induce apoptosis via dead receptor and caspase 8 pathway on A549 cells*. Vol. 37. 2015. 65-70.

Tooze S. A. Yoshimori T., *Nat Cell Biol*, 2010. **12**(9):831-5.

Tresse E. et al., *Autophagy*, 2010. **6**(2):217-227.

Tsukahara T. et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013. **440**(2):348-353.

Unterweger H. et al., *Int J Nanomedicine*, 2017. **12**:5223-5238.

Vander Heiden M. G. et al., *Cell*, 1997. **91**(5):627-637.

Venkatachalam K. et al., *Cell Calcium*, 2015. **58**(1):48-56.

Ventola C. L., *P T*, 2017. **42**(12):742-755.

Vidarsson G. et al., *Blood*, 2006. **108**(10):3573.

Vidu R. et al., *Front Syst Neurosci*, 2014. **8**:91.

Vincent L., Soille P., *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence*, 1991. **13**(6):583-598.

Vivero-Escoto J. L., Huang Y. T., *Int J Mol Sci*, 2011. **12**(6):3888-927.

Vivero-Escoto J. L. et al., *Chem Soc Rev*, 2012. **41**(7):2673-85.

Wahajuddin Arora S., *Int J Nanomedicine*, 2012. **7**:3445-71.

Walker N. I., *Methods Achiev. Exp. Pathol*, 1988. **13**:18-54.

Wang C. et al., *JAMA*, 2015. **314**(19):2062-2068.

Wang F. et al., *Open Biol*, 2018. **8**(4).

Wang F. et al., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2013. **9**(8):1159-1168.

Wang H. et al., *Mol Cell*, 2014. **54**(1):133-146.

Wang J. et al., *Int J Nanomedicine*, 2017. **12**:809-825.

Wang S. et al., *Biol Trace Elem Res*, 2016. **169**(1):94-105.

Wang X. et al., *Nano Lett*, 2009. **9**(9):3137-41.

Wang X. et al., *Bioconjugate Chemistry*, 2011. **22**(7):1438-1450.

Wang X. D. et al., *J Colloid Interface Sci*, 2010. **341**(1):23-9.

Wataha J. C. et al., *J Biomed Mater Res*, 2000. **52**(2):360-4.

Wei F. et al., *Sci Rep*, 2017. **7**:42591.

Wei Y. et al., *Sci Rep*, 2016. **6**:29110.

Weigel P. H., Oka J. A., *J Biol Chem*, 1981. **256**(6):2615-7.

Weinmann M. et al., *Oncogene*, 2004. **23**:3757.

Widmann C. et al., *J Biol Chem*, 1998. **273**(12):7141-7.

Winzen S. et al., *Nanoscale*, 2015. **7**(7):2992-3001.

Wolbers F. et al., *Apoptosis*, 2004. **9**(3):385-392.

Wörle-Knirsch J. M. et al., *Nano Letters*, 2006. **6**(6):1261-1268.

Xia T. et al., *Environ Health Perspect*, 2013. **121**(6):683-90.

Xia T. et al., *ACS Nano*, 2008. **2**(10):2121-34.

Xie X. et al., *Sci Rep*, 2017. **7**(1):3827.

Xie Z. et al., *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(8):3290-8.

Xu H. Ren D., *Annu Rev Physiol*, 2015. **77**:57-80.

Xu S. et al., 2011.

Xue Y. et al., *International journal of nanomedicine*, 2014. **9**:2891-2903.

Yan Y. et al., *Scientific Reports*, 2016. **6**:37052.

Yang X. et al., *Toxicol Lett*, 2015. **234**(1):40-9.

Yang Y. et al., *Environ Toxicol Pharmacol*, 2017. **52**:161-169.

Yaron P. N. et al., *J Nanobiotechnology*, 2011. **9**:45.

Yoshimori T. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 1991. **266**(26):17707-17712.

Yu L. et al., *Nature*, 2010. **465**(7300):942-6.

Yu Y. et al., *J Hazard Mater*, 2014. **270**:176-86.

Zeinabad H. A. et al., *Scientific Reports*, 2016. **6**:26508.

Zhai J. P. et al., *Microporous and Mesoporous Materials*, 2009. **124**(1):15-19.

Zhang F. et al., *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 2011. **82**:74-8.

- Zhang J. et al., *Nanoscale*, 2017. **9**(9):3269-3282.
- Zhao Y. et al., *The Journal of Physical Chemistry A*, 2011. **115**(34):9536-9544.
- Zhou F. et al., *Nano Lett*, 2010. **10**(5):1677-81.
- Zhu W. et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016:201605030.
- Zick M., Wickner W., *Mol Biol Cell*, 2013. **24**(23):3746-53.
- Zou H. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(17):11549-11556.