

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**OXIDATIVNÍ STRES V LIDSKÝCH FIBROBLASTECH PO
EXPOZICI TITANOVÝMI A GRAFENOVÝMI
NANOČÁSTICEMI**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. BARBORA SZOTÁKOVÁ, Ph.D.

Konzultant: RNDr. LADISLAVA SCHRÖTEROVÁ, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2024

Bc. MAGDALENA KOROPECKÁ

PODĚKOVÁNÍ

Velice ráda bych poděkovala své školitelce prof. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, za cenné rady, připomínky, formální úpravu práce a vstřícnost. Velké poděkování směřuje ke konzultantce, paní RNDr. Ladislavě Schröterové, Ph.D. za odborné, teoretické i praktické rady a za čas, který mi při řešení diplomové práce věnovala. Dále paním laborantkám za jejich pomocnou ruku v laboratořích.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala mé rodině, a hlavně mému synovi za trpělivost a psychickou podporu v průběhu celého studia.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 30.8.2024

Bc. Magdalena Koropecká

ABSTRAKT

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Magdalena Koropečká

Školitel: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Ladislava Schröterová, Ph.D.

Název diplomové práce: Oxidativní stres v lidských fibroblastech po expozici titanovými a grafenovými nanočásticemi

Nanočástice neboli částice, které mají alespoň jeden rozměr v rozsahu velikostí 1-100 nm, jsou předmětem rozsáhlého studia. Zejména v posledních letech počet publikací, které se zabývají toxickými účinky nanočástic, rychle stoupá. Jedním z hlavních mechanismů, které jsou zapojeny do toxického účinku nanočástic, je tvorba reaktivních forem kyslíku a s ní spojený oxidační stres.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit míru oxidačního stresu v lidských fibroblastech po expozici titanovými a grafenovými nanočásticemi, který úzce koreluje s experimentálně naměřenou hladinou redukováného glutathionu v ovlivněných buňkách. Za tímto účelem bylo využito dvou optimalizovaných metod, a to stanovení glutathionu pomocí monochlorobimanu a stanovení celkového a oxidovaného glutathionu pomocí enzymatické recyklační reakce.

Část buněk byla ovlivněna dvěma formami nemodifikovaných grafenových nanoplátek o různých laterálních velikostech (80-300 a 250-400 nm) po dobu 24 a 48 hodin. U testovaných grafenových nanočástic byla prokázána závislost míry oxidačního stresu na velikosti částic, koncentraci a době inkubace.

Druhá část buněk byla ovlivněna dvěma formami titanových nanočástic anatas/rutil o podobné velikosti (~ 27 a 20–30 nm) a jednou formou rutilových nanočástic (4-6 nm) po dobu 24 a 48 hodin. U testovaných titanových nanočástic nebyla pozorovaná žádná statisticky významná závislost na míře oxidačního stresu. Po 48 hodinách byla pozorována vzrůstající hladina redukováného glutathionu.

Na základě experimentálně získaných dat ze tří nezávislých měření, byla provedena statistická analýza a vzájemné porovnání obou optimalizovaných metod. Byla

zjištěna velmi silná korelace mezi použitými metodami, které poskytovaly srovnatelné hodnoty koncentrací redukovaného glutathionu ve vzorcích.

Klíčová slova: nanočástice, TiO_2 , grafen, oxidační stres, glutathion, enzymatická recyklační metoda, monochlorobiman

ABSTRACT

Charles University
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Magdalena Koropečká

Supervisor: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Consultant: RNDr. Ladislava Schröterová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Oxidative stress in human fibroblasts after exposure to titanium and graphene nanoparticles

Nanoparticles, or particles which have at least one dimension in the size range of 1-100 nm in size, have been studied extensively. Especially in recent years, the number of publications dealing with the toxic effects of nanoparticles has increased rapidly. One of the main mechanisms involved in the toxic effect of nanoparticles is the formation of reactive oxygen species and the associated oxidative stress.

This thesis aimed to determine the degree of oxidative stress in human fibroblasts after exposure to titanium and graphene nanoparticles, which correlates closely with the experimentally measured level of reduced glutathione in the affected cells. For this purpose, two optimized methods were used, namely the determination of glutathione by monochlorobimane and the determination of total and oxidized glutathione by enzymatic recycling reaction.

One part of the cells was treated with two forms of unmodified graphene nanoplates of different lateral sizes (80-300 and 250-400 nm) for 24 and 48 hours. For the tested graphene nanoparticles, the dependence of oxidative stress level on particle size, concentration, and incubation time was demonstrated.

The second part of the cells was affected by two forms of titanium anatase/rutile nanoparticles of similar size (~27 and 20-30 nm) and one form of rutile nanoparticles (4-6 nm) for 24 and 48 hours. No statistically significant dependence on the degree of oxidative stress was observed for the tested titanium nanoparticles. After 48 hours, an increase in the level of reduced glutathione was detected.

Based on the experimentally obtained data from three independent measurements, statistical analysis was performed, and the two optimized methods were

compared. A significant correlation was found between the methods used, which gave comparable values of reduced glutathione concentrations in the samples.

Key words:

Nanoparticles, TiO₂, graphene, oxidative stress, glutathione, enzymatic recycling method, monochlorobimane

OBSAH

1 ÚVOD.....	10
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1. OXIDAČNÍ STRES.....	11
2.1.1. Vznik kyslíkových radikálů a antioxidanty.....	11
2.1.2. BIOMARKERY OXIDAČNÍHO STRESU.....	13
2.2. Glutathion.....	14
2.2.1. Funkce glutathionu v organismu.....	16
2.2.2. Metody stanovení glutathionu.....	16
2.3. Nanočástice.....	19
2.3.1. testování toxicity nanočástic.....	19
2.3.2. Grafenové nanočástice.....	22
2.3.3. Titan.....	25
3 CÍLE.....	27
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	28
4.1. MATERIÁL.....	28
4.1.1. Buněčná linie.....	28
4.1.2. Nanomateriály a nanočástice.....	28
4.1.3. Přístrojové vybavení.....	29
4.1.4. Chemikálie.....	29
4.1.5. Pomůcky.....	30
4.2. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ.....	30
4.3. Stanovení glutathionu pomocí mcb.....	32
4.3.1. Optimalizace stanovení glutathionu pomocí MCB.....	33
4.4. PŘÍPRAVA BUNĚČNÉHO LYZÁTU.....	34
4.4.1. Optimalizace přípravy buněčného lyzátu.....	36
4.5. Stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA metody.....	36
4.6. Stanovení celkového a oxidovaného (GSSG) glutathionu pomocí enzymatické recyklační reakce.....	38
4.7. Statistická analýza.....	42
5 VÝSLEDKY.....	43
5.1. Stanovení glutathionu (GSH) pomocí monochlorobimanu.....	43
5.1.1. Optimalizace metody.....	43
5.1.2. STANOVENÍ GLUTATHIONU V BUŇKÁCH OVLIVNĚNÝCH TITANOVÝMI NANOČÁSTICEMI.....	46
5.1.3. STANOVENÍ GLUTATHIONU V BUŇKÁCH OVLIVNĚNÝCH GRAFENOVÝMI NANOČÁSTICEMI.....	51

5.2. STANOVENÍ CELKOVÉHO A OXIDOVANÉHO GLUTATHIONU POMOCÍ ENZYMATICKÉ RECYKLAČNÍ REAKCE	55
5.2.1. OPTIMALIZACE METODY	55
5.2.2. Stanovení glutathionu v buňkách ovlivněných titanovými nanočásticemi	56
5.2.3. Stanovení glutathionu v buňkách ovlivněných grafenovými nanočásticemi	60
5.3. POROVNÁNÍ TESTOVANÝCH METOD	63
5.3.1. POROVNÁNÍ PRO TITANOVÉ NANOČÁSTICE	63
5.3.2. POROVNÁNÍ PRO GRAFENOVÉ NANOČÁSTICE	64
6 DISKUSE	65
7 ZÁVĚR	69
8 POUŽITÉ ZKRATKY	70
9 SEZNAM TABULEK	71
10 SEZNAM OBRÁZKŮ.....	73
11 SEZNAM GRAFŮ.....	74
12 POUŽITÁ LITERATURA	76

1 ÚVOD

V posledních letech přineslo rozšířené využití nanočástic v biomedicině a průmyslu nové výzvy ve zkoumání jejich potenciálního dopadu na lidské zdraví. Zejména nanočástice oxidu titaničitého (TiO_2) a grafenu, které jsou ceněny pro své unikátní fyzikální a chemické vlastnosti, vyvolávají obavy ohledně možného indukovaného oxidačního stresu v lidských buňkách.

Oxidační stres, reflektovaný nerovnováhou mezi produkcí reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a schopností buněčného antioxidantního systému je neutralizovat, může vést k poškození buněčných komponent a je spojován s různými patologickými stavy. Glutathion (GSH), hlavní intracelulární antioxidant, má zásadní roli v obraně proti oxidačnímu stresu. Změny v jeho hladinách mohou sloužit jako citlivý ukazatel oxidačního poškození vyvolaného expozicí nanočásticemi.

Teoretická část této diplomové práce shrnuje základní poznatky o oxidačním stresu a antioxidantní obraně organismu se zaměřením na GSH a metody, jeho stanovení, které byly v této práci využity. Dále se věnuje poznatkům o nanočásticích, nanotoxicitě a zaměřuje se na nanočástice oxidu titaničitého a grafenu.

V experimentální části této práce byla míra oxidativního stresu v lidských fibroblastech po expozici titanovými a grafenovými nanočásticemi kvantifikována měřením koncentrace GSH. Kvantifikace GSH byla provedena pomocí specifické detekční metody s využitím monochlorobimanu (MCB), který reaguje s GSH a vytváří fluorescenční produkt, jehož intenzita koreluje s koncentrací přítomného GSH ve vzorku. Dále bylo provedeno referenční stanovení enzymatickou recyklační metodou, která umožňuje přesné a citlivé stanovení celkové hladiny redukováného a oxidovaného GSH. Porovnání těchto metod a experimentálně získaných výsledků je dále diskutováno.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1. OXIDAČNÍ STRES

Oxidační stres je definován jako nerovnováha mezi výskytem reaktivních forem kyslíku/dusíku (ROS/RNS) a schopností organismu reagovat proti jejich působení antioxidačními ochrannými systémy (*Pisoschi, Pop, 2015*).

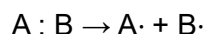
Zvýšená koncentrace volných radikálů, které vznikají v důsledku biologické oxidace, způsobuje narušení struktury a funkcí intracelulárních proteinů, poškození membrány v důsledku peroxidace polynenasycených mastných kyselin, které jsou obsaženy v lipidech, modifikace bází nukleových kyselin a změny chromozomů jako jsou jednořetězcové a dvouřetězcové zlomy DNA, příčné vazby DNA a proteinů. Dále způsobuje buněčnou smrt a oxidační poškození buněčných struktur a složek, jako je depolymerizace polysacharidů a degradace sacharidů (*Juan et al. 2021*).

2.1.1. VZNIK KYSLÍKOVÝCH RADIKÁLŮ A ANTIOXIDANTY

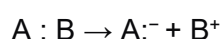
Kyslíkové radikály neboli reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou ionty nebo molekuly obsahující kyslík, které obsahují ve svém elektronovém obalu jeden nebo více nepárových elektronů a jsou schopné krátkodobé samostatné existence. Nepárový elektron je však činí vysoce reaktivní a nestabilní. Radikály se snaží získat nepárový elektron odtržením od jiných sloučenin, aby dosáhly stabilní elektronové konfigurace. Dotyčná molekula tak ztrácí svůj elektron a stává se sama radikálem, čímž začíná kaskáda radikálových řetězových reakcí, které mohou vést k poškození buňky (*Phaniendra et al., 2015*).

Radikály mohou vznikat třemi různými způsoby:

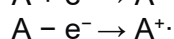
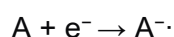
- > Homolytická fragmentace: Jedná se o homolytické štěpení kovalentní vazby v molekule, přičemž v každém fragmentu zůstává jeden ze společných elektronů.



- > Heterolytická fragmentace: Jedná se o ztrátu elektronů nebo heterolytické štěpení molekuly, kdy vznikají dva různě nabitě ionty.



- > Přenos elektronů: Dochází k němu přidáním nebo odebráním elektronu z molekuly bez radikálu (*Halliwell, Gutteridge, 2015*).



Radikálové ROS zahrnují superoxid ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál ($\cdot OH$) a alkoxylové ($RO\cdot$) a peroxylové radikály ($ROO\cdot$). Mezi neradikálové druhy patří peroxid vodíku (H_2O_2), kyselina chlorná ($HOCl$), singletový molekulární kyslík (1O_2) a organické hydroperoxydy ($ROOH$) (Phaniendra et al., 2015).

Tabulka 1

Přehled hlavních reaktivních forem kyslíku (Kiran et al., 2023)

Název	Vzorec	Vznik	Reakce
superoxid	$O_2^{\cdot-}$	přenos elektronu na molekulou kyslíku $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$	Dismutace katalyzovaná superoxiddismutázou $2 O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
hydroxylový radikál	$\cdot OH$	dýchací řetězec, Fentonova reakce, homolytické štěpení H_2O, H_2O_2	hydroxylace aminokyselin, nukleových kyselin, iniciace lipoperoxidace
peroxid vodíku	H_2O_2	dismutace $2 O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	Fentonova reakce $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + Fe^{3+} + OH^-$ reakce katalyzovaná katalázou $2 H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$

Endogenně mohou tyto radikály, které slouží jako prekurzory pro mnoho reakcí, vznikat v kompartmentech, jako je buněčná membrána, mitochondrie, endoplazmatické retikulum nebo Golgiho aparát. Kromě toho může dojít ke stresu a únavě, produkci volných radikálů vyvolanou imunitním systémem v reakci na patogeny (Kiran et al., 2023)

Mezi exogenní zdroje indukující tvorbu ROS patří kontaminanty životního prostředí, těžké kovy, gama záření, neionizující záření, výfukové plyny, cigaretový kouř, průmyslové znečišťující látky a xenobiotika (Phaniendra et al., 2015).

Antioxidanty jsou látky, které mohou zabránit nebo zpomalit oxidaci látek, jako jsou bílkoviny, lipidy, sacharidy a DNA v biologických systémech. Antioxidační ochranu lze popsat jako složitý systém, který chrání biomolekuly a organismus před škodlivými účinky volných radikálů, snižuje nebo opravuje poškození způsobené ROS na cílové molekule (Kiran et al., 2023)

Tabulka 2

Přehled hlavních intracelulárních antioxidantů (Kiran et al. 2023)

Název	Působení
Superoxiddismutáza	Katalyzuje dismutační reakci $2 \text{O}_2^{\cdot -} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
Kataláza	Katalyzuje rozklad peroxidu vodíku o vysokých koncentracích $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
Glutathionperoxidáza	Katalyzuje rozklad peroxidů za účasti glutathionu $\text{ROOH} + 2 \text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O} + \text{ROH}$
Glutathion	Vytváří uvnitř buňky prostředí s vysokým redoxním potenciálem
Glutathion-S-transferáza	Katalyzuje detoxikaci peroxidu vodíku o nízké koncentraci a konjugaci GSH se širokou škálou xenobiotik
Glutathionreduktáza	Katalyzuje regeneraci redukováného glutathionu $\text{GSSG} \rightarrow 2 \text{GSH}$

2.1.2. BIOMARKERY OXIDAČNÍHO STRESU

2.1.2.1. MARKERY POŠKOZENÍ LIPIDŮ

Buněčné membrány jsou složeny z lipidových dvojvrstev a zajišťují buněčnou integritu. Přítomnost dvojných vazeb v lipidech, které obsahují nenasycené mastné kyseliny, způsobuje náchylnost lipidů k autooxidaci na základě uspořádání dvojných vazeb v molekule (Demirci-Cekic et al., 2022). Volný radikál napadne a abstrahuje vodík z methylenových skupin v mastné kyselině, což vede ke vzniku lipidového radikálu zaměřeného na uhlík. Lipidový radikál může dále reagovat s molekulárním kyslíkem za vzniku lipidového peroxylového radikálu, který prochází přeskupením prostřednictvím cyklizační reakce za vzniku endoperoxidů, které nakonec tvoří malondialdehyd a 4-hydroxynonenal (Phaniendra et al., 2015). Peroxidace lipidů je spojena se změnami v různých biochemických drahách a může poškodit buněčnou membránu narušením její tekutosti, propustnosti a biofyzikálních vlastností (Kiran et al., 2023).

2.1.2.2. MARKERY POŠKOZENÍ PROTEINŮ

Oxidace proteinů může být vyvolána jak řadou volných radikálů, tak i neradikálovými molekulami (Phaniendra et al., 2015). V důsledku interakce aminokyseliny s radikálem dojde k odstranění vodíku z α -uhlíku a vzniká radikál

zaměřený na uhlík. Přidáním kyslíku se vytvoří alkylperoxylový radikál, který může dále v nepřítomnosti kyslíku reagovat s jiným uhlíkovým radikálem a tím vytvářet příčné vazby protein-protein (*Demirci-Cekic et al., 2022*), což má za následek denaturaci, ztrátu fungování proteinů a enzymové aktivity, ztrátu funkce receptorů a transportních proteinů.

Methionin a cystein jsou náchylnější k oxidaci způsobené ROS a jsou přeměněny na disulfidy a methionin sulfoxid. A pouze tyto disulfidy a methionin sulfoxid mohou být enzymaticky přeměněny na svoji původní formu (*Demirci-Cekic et al., 2022; Phaniendra et al., 2015*).

Zbytky aminokyselin lysinu, prolinu, threoninu a argininu po oxidaci ROS poskytují karbonylové deriváty, jejichž přítomnost v proteinech je považovaná za marker oxidace proteinů (*Phaniendra et al., 2015*).

2.1.2.3. MARKERY POŠKOZENÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN

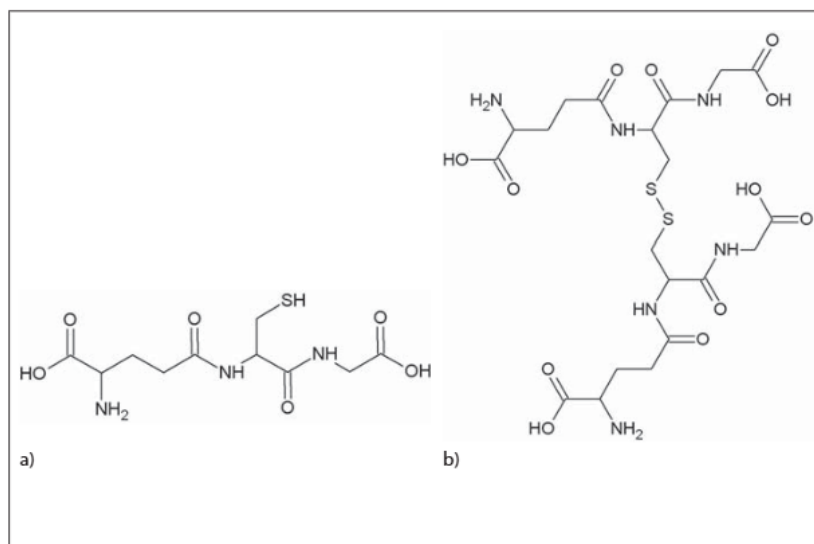
Hydroxylový radikál přímo reaguje se všemi složkami DNA a způsobuje řadu změn včetně jednořetězcových a dvouřetězcových zlomů v DNA. Hydroxylový radikál abstrahuje atomy vodíku za vzniku modifikovaných purinových a pyrimidinových aduktů a vzájemných vazeb protein-DNA. Pyrimidinový adukt 8-hydroxydeoxyguanosin je považován za hlavní biomarker oxidačního poškození DNA (*Phaniendra et al., 2015*).

2.2. GLUTATHION

Glutathion (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycin, GSH) je endogenní tripeptid, který je složen z kyseliny L-glutamové, L-cysteinu a glycinu. Je produkován všemi buňkami lidského těla. Jeho intracelulární koncentrace je pohybuje v rozmezí 1-10 mmol/l, nejvíce je však produkován v hepatocytech, kde jeho koncentrace dosahuje hodnot kolem 10 mmol/l. Extracelulárně dosahuje pouze mikromolárních koncentrací v rozmezí okolo 2-20 μ mol/l. Až 90 % intracelulárního GSH se nachází v cytosolu, kolem 10 % obsahují mitochondrie a velmi malé procentuální zastoupení GSH se nachází v endoplazmatickém retikulu a peroxisomech (*Nýdlová, et al. 2014*).

Glutathion se v buňkách může vyskytovat ve dvou volných formách, a to jako glutathion redukovaný (GSH) a oxidovaný glutahiondisulfid (GSSG), který vzniká spojením dvou molekul GSH disulfidickým můstkem (*Nýdlová, et al., 2014*), nebo vázaný na thiolové skupiny proteinů. Samotná koncentrace GSH neudává dostatečné informace o míře oxidačního stresu, proto se využívá poměru GSH/GSSG, který je důležitým

ukazatelem oxidačního stresu v různých biochemických reakcích (Kand'ár, 2016; Zhu, *et al.*, 2021). Poměr koncentrací GSH/GSSG je za fyziologických podmínek vyšší než 100:1, ale za působení oxidačního stresu se poměr GSH/GSSG může výrazně změnit (Roušar *et al.*, 2012).



Obrázek 1

Chemická struktura glutathionu: (a) **GSH** – redukováná forma; (b) **GSSG** – oxidovaná forma (Nýdlová, *et al.*, 2014)

Na působení oxidačního stresu se mohou podílet různé faktory, jako jsou oxidanty a volné radikály, vyčerpání GSH, zvýšená koncentrace GSSG, porucha genové exprese, nebo porušená aktivita enzymů souvisejících s GSH/GSSG. Důsledkem oxidačního stresu může být oxidace lipidů, proteinů, DNA a dalších buněčných složek, což má za následek oxidační poškození buněk a apoptózu (Guan, 2023).

Poměr GSH/GSSG je za fyziologických podmínek regulován dvěma cestami, a to samotnou syntézou GSH *de novo* a zpětnou redukcí oxidovaného GSSG na dvě molekuly GSH za působení enzymu glutathionreduktázy (GR) (Guan, 2023; Nýdlová, *et al.* 2014) Dysfunkce či narušení GSH/GSSG redoxního pufru se podílí na různých onemocněních, čímž činí GSH, GSSG a jejich příbuzné systémy platnými a účinnými cíli pro intervence medicínou (Guan, 2023).

2.2.1. FUNKCE GLUTATHIONU V ORGANISMU

Glutathion má v organismu řadu metabolicky a fyziologicky důležitých funkcí, které jsou úzce spjaty s jeho chemickou strukturou (tabulka 3).

Tabulka 3

Přehled nejdůležitějších funkcí GSH v organismu (*upraveno podle Nýdlová, et al., 2014*)

Přímá reakce s reaktivními formami kyslíku
Regenerace vitamínů A a C
Zásobní a transportní forma cysteinu
Udržování thiolového stavu proteinů
Detoxikace xenobiotik a jejich metabolitů
Metabolismus prostaglandinů a leukotrienů
Regulace buněčného cyklu
Modulace buněčných procesů (syntéza DNA a proteinů)
Aktivace T-lymfocytů a polymorfonukleárních leukocytů

2.2.2. METODY STANOVENÍ GLUTATHIONU

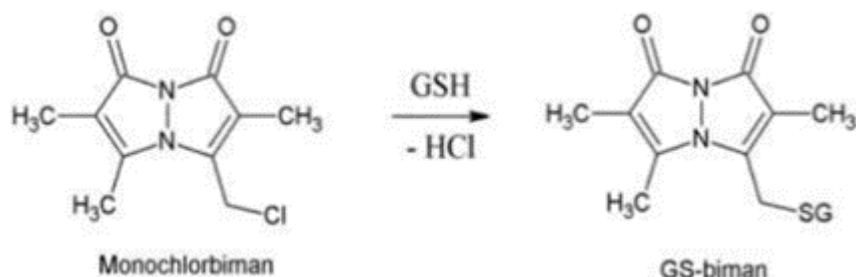
V současné době je zavedeno a optimalizováno mnoho metod pro stanovení GSH, GSSG nebo celkového glutathionu (tGSH). Patří sem spektrofotometrické, fluorimetrické, elektrochemické, chemiluminiscenční, NMR a separační metody jako jsou HPLC, GC a HPCE (*Kandřár, 2016*).

2.2.2.1 STANOVENÍ GLUTATHIONU POMOCÍ MONOCHLOROBIMANU

Stanovení GSH pomocí monochlorobimanu (MCB) je fluorometrickou metodou stanovení redukované formy glutathionu. Molekula MCB reaguje za katalytického působení glutathion-S-transferázy (GST) s thiolovou skupinou glutathionu za vzniku fluorescenčního produktu. Tato metoda je vhodná pro stanovení hladin glutathionu v intaktních buňkách bez nutnosti další preanalytické úpravy, a to díky schopnosti MCB pronikat do buněk bez poškození buněčné membrány, čímž je možné zabránit pravděpodobné oxidaci GSH po lýze buněk. Produkt reakce GSH s MCB lze dále detekovat za použití HPLC, průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie (*Čapek, et al., 2017*).

Mezi výhody stanovení GSH pomocí MCB patří jednoduchost, rychlost, citlivost a specifita stanovení. Nevýhodou této metody je nutnost prezentovat její výsledky pouze

jako procentní podíl koncentrace GSH vztažený ke kontrolám (Davidová, 2018).



Obrázek 2

Molekulární struktura nefluorescenčního monochlorobimanu a jeho reakce s glutathionem (**GSH**) za vzniku fluorescenčního aduktu biman-glutathionu (**GS-biman**) (Davidová, 2018)

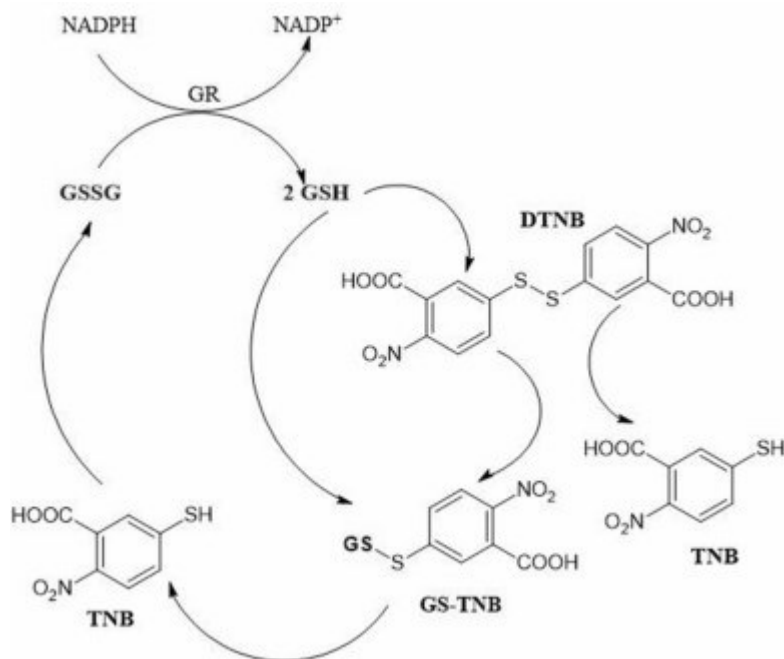
2.2.2.2. STANOVENÍ CELKOVÉHO A OXIDOVANÉHO GLUTATHIONU POMOCÍ ENZYMATICKÉ RECYKLAČNÍ METODY

Enzymatická recyklační metoda využívá specifity enzymu glutathionreduktázy (GR) k redukci GSSG na GSH v přítomnosti NADPH. GSH obsažené ve vzorku reaguje s kyselinou 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoovou) (DTNB) za vzniku směsného disulfidu GS-TNB a chromoforu 5-thionitrobenzoátu (TNB). GS-TNB je následně redukován na GSH působením GR, nebo přímou reakcí s GSH, který je v testovací směsi stále přítomen. Z tohoto důvodu se nestanovuje množství DTNB reagujícího s GSH, ale měří se rychlost produkce TNB, která je přímo úměrná počátečnímu množství GSH ve vzorku (Lörincz, Szarka, 2017). Nárůst absorbance vznikajícího TNB je monitorován při vlnové délce 412 nm. GSSG ve vzorku je zpět redukován GR na GSH (Kubát, et al., 2024; Giustarini, et al., 2016).

Koncentrace celkového glutathionu a GSSG je měřena nezávisle na sobě. Tato metoda udává informaci o koncentraci celkového GSH (GSH + GSSG) ve vzorcích. Pro stanovení koncentrace GSSG se k oddělenému vzorku přidává thiol maskovací činidlo, jako je N-ethylmaleimid (NEM) nebo vinylpyridin, umožňuje přesné stanovení GSSG již při velmi nízkých koncentracích (Lörincz, Szarka, 2017). Koncentraci redukováného GSH lze poté určit odečtením koncentrace GSSG od koncentrace celkového GSH (Kand'ár, 2016; Roušar et al., 2012).

K výhodám této metody patří dostatečně vysoká senzitivita, specifita a možnost stanovit obě formy glutathionu. Hlavní nevýhodou je nemožnost automatizace metody a

možné interference sloučenin inhibujících GR (Kubát, et al., 2024; Giustarini, et al., 2016).



Obrázek 3

Mechanismus metody GSH recyklace (**DTNB** – kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová, **TNB** – kyselina 2-nitro-5-thiobenzoová, **GR** – glutathionreduktáza, **GSH** – glutathion, **GSSG** – glutathiondisulfid, **GS-TNB** – glutathionový adukt TNB, **NADPH** – redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát) (Kubát, et al. 2024).

2.2.2.3. PŘÍPRAVA VZORKU

Stanovení GSH se nejčastěji provádí ve vzorcích plné krve, hemolyzátu erytrocytů, plazmě nebo přímo ve tkáních (Kand'ár, 2016).

Přesné stanovení poměru GSH/GSSG v reálných vzorcích vyžaduje preventivní opatření ve všech fázích před analýzou, od odběru až po přípravu vzorku, a to kvůli snadné autooxidaci GSH. Koncentrace GSH je obvykle o dva řády vyšší než koncentrace GSSG, proto i minimální oxidace GSH může vést k významnému zvýšení koncentrace GSSG.

Prvním krokem přípravy vzorku před stanovením GSH, který by měl být proveden ihned po odběru vzorku je alkylace thiolové skupiny sloužící k prevenci před autooxidací GSH. Mezi nejpoužívanější thiolová maskovací činidla patří kyselina jodoctová, N-ethylmaleinimid (NEM) a 2-vinylpyridin (2-VP).

Dalším krokem je vysrážení proteinů, které lze provést buď přidáním organických rozpouštědel mísitelných s vodou, methanolem a acetonitrilem, nebo přidávkem minerálních kyselin, kyseliny trichloroctové, kyseliny chloristé či trifluoroctové. Poté následuje centrifugace vzorku za vzniku supernatantu bez proteinů.

Stanovení celkového GSH a GSH vázaných na proteiny vyžaduje redukční krok před derivatizací, aby se mohl produkovat volný GSH. Výběr redukčního činidla závisí také na použití derivatizačního činidla a typu derivatizační reakce. Redukční činidla se skládají hlavně z thiolů a trialkylfosfinů. Hlavními thiolovými redukčními činidly jsou 2-merkaptoethanol, dithiothreitol, dithioerythritol a dithiobutylamin. Thiolové skupiny uvedených redukčních činidel mají $pK_a > 9$, z tohoto důvodu jsou thiolové skupiny při kyselém nebo neutrálním pH protonizovány a nemohou reagovat jako redukční činidla. Dále se může využívat například borohydrid nebo hojně využívané redukční činidlo tris(karboxyethyl)fosfin, který produkuje ireversibilní produkty a neinterferuje s derivatizujícími činidly. Jako alternativní volba může být enzymatická redukce GSSG, kdy se využívá glutathionreduktázy (GR) v přítomnosti NADPH.

GSH neobsahuje ve své molekule žádný silný chromofor ani fluorofor, proto musí být před spektrofotometrickou a spektrofluorimetrickou detekcí derivatizován. Protože koncentrace GSH je před krokem derivatizace snižena, může být znovu oxidován, což by vedlo k chybným výsledkům. Tomu lze předejít opětovným přidáním thiol-maskovacího činidla. Krok derivatizace zvyšuje specifitu a senzitivitu GSH testů (Tsiasioti, Tzanavaras, 2023).

2.3. NANOČÁSTICE

Nanotechnologie je multidisciplinární obor, který se zabývá nanočásticemi neboli částicemi o velikosti 1-100 nm, jejich syntézou, charakterizací a aplikací. Nanočástice našly uplatnění v mnoha odvětvích lidské činnosti jako jsou strojírenství, elektronika a v neposlední řadě našly velký potenciál v oblasti biomedicíny. (Kučírková et al., 2015)

2.3.1. TESTOVÁNÍ TOXICITY NANOČÁSTIC

Testy cytotoxicity jsou klasifikovány jako testy *in vivo* (testy v organismech) a *in vitro* (testování založené na kultivaci buněk). Pro testování toxicity je preferované *in vitro* testování (Fard et al., 2015).

2.3.1.1. *IN VITRO* TESTOVÁNÍ TOXICITY

Pro testování toxicity nanočástic *in vitro* se využívá těchto testů: testování buněčné morfologie, viability a proliferace buněk, produkce ROS, genotoxicity a buněčného příjmu nanočástic. Kromě těchto základních testů lze testovat mnoho dalších parametrů jako je například lokalizace nanočástic v cytosolu, vliv na jednotlivé buněčné struktury, vliv na buněčný cyklus a apoptózu, produkce zánětlivých cytokinů a další (Kučírková *et al.*, 2015).

Životaschopnost buněk je definována jako počet zdravých buněk ve vzorku. Testy životaschopnosti buněk jsou založeny na různých funkcích buněk včetně enzymové aktivity, permeability buněčné membrány, buněčné adherence, produkce adenosintrifosfátu (ATP), produkce koenzymů a aktivity příjmu nukleotidů (Kamiloglu, 2020).

K nejpoužívanějším testům patří test barvení trypanovou modří. Princip tohoto testu spočívá v tom, že životaschopné buňky mají intaktní buněčné membrány, které neumožňují vstup trypanové modři do buňky a jejich cytoplazma bude světlá, zatímco cytoplazma mrtvých buněk bude zbarvená do modra. Stanovení probíhá vizuálně pod světelnou mikroskopií, aby se určilo, zda buňky obsahují nebo neobsahují barvivo. (Strober, 2015). Alternativou tohoto testu jsou testy barvení eosinem, kongo červení a erythrosinem B., které jsou založené na stejném principu (Kamiloglu, 2020).

Běžně jsou používány i další kolorimetrické testy. MTT: Principem testu je redukce tetrazoliové soli na nerozpustné formazanové barvivo enzymem dehydrogenázou přítomným v životaschopných buňkách. Dále se nerozpustná formazanová sůl rozpustí přidáním solubilizačních činidel a barevný produkt se kvantitativně měří při 570 nm (Kamiloglu, 2020). Intenzita barevného produktu je přímo úměrná počtu životaschopných buněk přítomných v kultuře (Präbst *et al.*, 2017). Alternativou je MTS, který nevyžaduje krok rozpouštění formazanové sraženiny (Kamiloglu, 2020).

WST-8: Principem testu je redukce světla žlutého WST-8 životaschopnými buňkami na oranžový ve vodě rozpustný formazanový produkt, který je přímo úměrný počtu životaschopných buněk. Tento test je vhodný i pro buněčné suspenze (Sari *et al.*, 2021).

Laktátdehydrogenázový test: laktátdehydrogenáza (LDH) je stabilní intracelulární cytoplazmatický enzym, který je vhodným ukazatelem ztráty integrity membrány, což je typická charakteristika buněk procházejících apoptózou, nekrózou nebo jinými formami buněčného poškození. LDH uvolněná z buněk oxiduje NADH na NAD⁺ a katalyzuje

přeměnu laktátu na pyruvát. Principem testu je redukce žluté tetrazoliové soli pomocí NADH na ve vodě rozpustné červené formazanové barvivo, jehož absorbance je přímo úměrná počtu poškozených buněk (*Kamiloglu, 2020*).

K posouzení poškození nukleových kyselin se používá nejčastěji tzv. kometového testu. Princip testu je založen na pohybu fragmentů DNA podle velikosti v elektrickém poli. Tento test slouží k identifikaci jednovláknových a dvouvláknových zlomů DNA (*Azqueta, 2013*). Mezi další testy reflektující poškození DNA patří TUNEL test, který dokáže detekovat buněčnou apoptózu. Princip metody spočívá v přidání značeného nukleotidu na volné 3'-OH konce jednoduchých a dvojitých řetězců DNA a následnou detekcí zlomů pomocí fluorescenční mikroskopie (*Brice et al., 2020*).

Průtoková cytometrie je kvantitativní analýza jednotlivých buněk, které jsou charakterizovány v závislosti na velikosti a granularitě (hustotě). Na základě průtokové cytometrie lze sledovat fáze apoptózy či nekrózy buněk. Patří sem testy membránové asymetrie, propustnosti membrány a testy mitochondrií, které se vzájemně liší specifitou použitého barviva a použitých excitačních a emisních vlnových délek (*Kamiloglu, 2020*).

Dále se využívají testy oxidačního stresu, které zahrnují intracelulární detekci kyslíkových radikálů. Ke kvantifikaci ROS bylo vyvinuto mnoho technik, jako jsou elektronová spinová rezonance, hmotnostní spektrometrie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, fluorescenční spektrometrie a elektrochemické techniky. Neexistuje však žádná univerzální metoda, která by dokázala zajistit přímou a konzistentní detekci (*Duanghathaipornsuk et al., 2021*). Pro testování buněčné viability se využívá například fluorescenční indikátor 2,7-dichlorofluorescein diacetát (*Soni et al., 2017*).

Pro průkaz peroxidace lipidů se stanovuje koncentrace malondialdehydu, který je nejčastějším biomarkerem oxidačního stresu. Nejběžněji se využívá stanovení kyseliny thiobarbiturové, které je založené na principu kondenzace dvou molekul kyseliny s jednou molekulou malondialdehydu (*Khoubnasabjafari et al., 2015*).

2.3.1.2. IN VIVO TESTOVÁNÍ TOXICITY

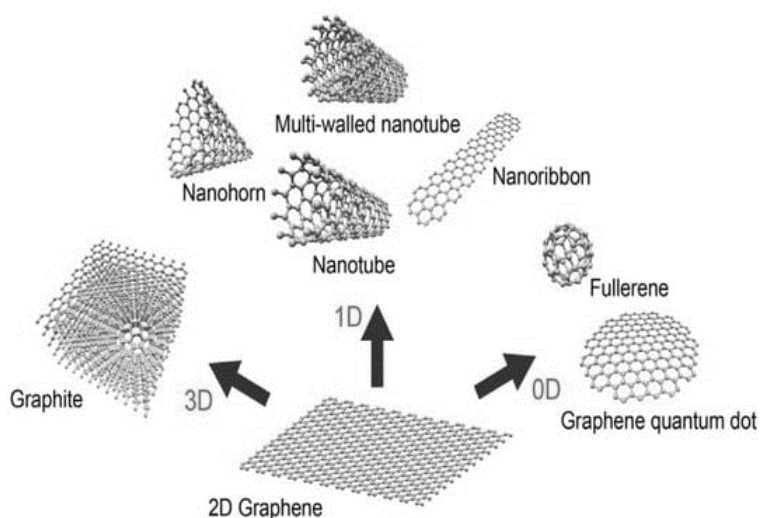
In vivo testy jsou nenahraditelné pro zkoumání biologických účinků, které nemohou být namodelovány *in vitro*. Pro testování *in vivo* se používají převážně drobná laboratorní zvířata jako jsou potkani, králíci a morčata (*Kučírková et al., 2015*).

2.3.2. GRAFENOVÉ NANOČÁSTICE

Klasifikace uhlíkových nanomateriálů je obvykle určena počtem rozměrů přesahujících nanoměřítko 100 nm. V souladu s tím je možné rozdělit uhlíkové materiály dle geometrického hlediska na:

- > 0D, částice se všemi rozměry menšími než 100 nm (fullereny, uhlíkové tečky, grafenové kvantové tečky)
- > 1D, částice s jedním rozměrem větším než 100 nm (jednovrstvé a vícevrstvé uhlíkové nanotrubičky)
- > 2D, částice s dvěma rozměry většími než 100 nm (grafen, vícevrstvé grafenové nanoplátky)
- > 3D, částice se všemi rozměry většími než 100 nm, ale povrchové nebo vnitřní struktury obsahují alespoň jeden rozměr do 100 nm, je to kombinace výše zmíněných (nanokrystaly, hydrogely apod) (Riley, Narazan, 2021; Zhang et al., 2017).

Grafen (2D) je základním stavebním kamenem pro další uhlíkové materiály všech ostatních dimenzí (obrázek 4)



Obrázek 4

Uhlíkaté nanomateriály různých rozměrů (Liao et al., 2018)

2.3.2.1. GRAFEN

Každý atom uhlíku v grafenové struktuře je spojen se třemi sousedními uhlíkovými atomy kovalentní vazbou, čímž se tvoří jeho charakteristická struktura připomínající včelí plástve. Nehybridizované p-orbitály atomů uhlíku jsou orientovány

kolmo k rovinné struktuře grafenového listu a vzájemně se ovlivňují, což vede ke vzniku zpola plného π orbitalu, které dodává grafenu aromatický charakter. Rovinné vazby uhlík-uhlík poskytují volné π elektrony a reaktivní místa pro různé povrchové modifikace (Georgakilas *et al.* 2015). Pro kovalentní modifikace mohou být využity například hydroxylové, karboxylové a epoxylové skupiny. Na rozdíl od kovalentních modifikací nekovalentní zachovávají strukturu a vlastnosti grafenu (Zhang *et al.*, 2017).

Grafen má tloušťku jednoho atomu s modulem pružnosti v rozmezí 0,5-1 TPa, zatímco konečná pevnost v tahu činí 130 GPa. Slabé Van Der Waalsovy přitažlivé síly mezi různými vrstvami grafenu, jej dělají měkkým a lehkým (Alagarsamy *et al.*, 2021).

Grafen může být syntetizován dvěma způsoby. Prvním z nich je tzv. „top-down“ přístup, který zahrnuje procesy, při nichž je grafen nebo modifikované grafenové plátky produkován separací nebo exfoliací grafitu a jeho derivátů. Mezi tyto procesy patří mechanická exfoliace, kulové frézování, sonikace, elektrochemická exfoliace. Druhý přístup, označovaný jako „bottom-up“, začíná tvorbou malých molekul uhlíku za účelem získání grafenu. Tento přístup zahrnuje metody epitaxního růstu na SiC, chemickou depozici par a chemickou redukci (Olatomiwa *et al.*, 2022).

Kvalita grafenu záleží na zvolené metodě výroby. Nekvalitní grafen může vykazovat špatnou elektrickou vodivost nebo mechanickou pevnost, a to v důsledku defektů nebo kyslíkových míst, která jsou rozptýlena v grafenové mřížce. Kvalitu grafenu je možné hodnotit pomocí Ramanovy spektroskopie (Georgakilas *et al.* 2015).

2.3.2.2. TOXICITA GRAFENU

Hlavním problémem při používání materiálů na bázi grafenu pro biomedicínské aplikace je jejich biokompatibilita. Ze zavedených prací v literatuře vyplývá, že biokompatibilita grafenu a jeho derivátů je často protichůdná (Liao *et al.*, 2018). Nanomateriály na bázi grafenu mohou být k buňkám biokompatibilní, ale také toxické. Toxicita grafenu je závislá na jeho povrchu, a to včetně chemické struktury nebo povahy funkcionalizovaných povlaků, laterální velikosti, počtu vrstev, typu buněk, způsobu podání (pro experimenty *in vivo*), dávce, době expozice a metodě syntézy (Seabra *et al.* 2014).

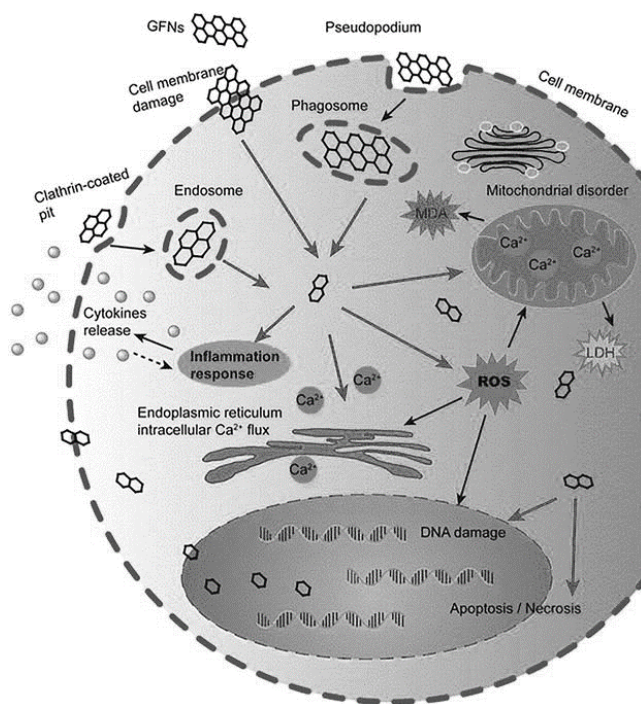
Grafen a jeho deriváty mají velké specifické povrchy a díky svým hydrofobním vlastnostem mohou vstupovat do buněk různými cestami včetně endocytózy, pinocytózy a fagocytózy (Ou *et al.*, 2016).

Interakce grafenových nanomateriálů s buněčnými membránami mohou vést k poškození membrány a cytotoxicitě. Čistý grafen bez povrchových nábojů nemůže elektrostaticky interagovat s membránovými fosfolipidy, proto upřednostňuje hydrofobní interakce s volnými lipidovými konci. Hydrofobní interakce mezi čistým grafenem a cholesterolem mohou také extrahovat nebo odstranit molekuly cholesterolu z membrány, což má za následek tvorbu dutin a deformaci membrány, což vede ke ztrátě její integrity. Oxid grafenu (GO) má vysokou hustotu záporného náboje poskytovanou okysličenými funkčními skupinami, proto může vyvolat poškození buněčné membrány prostřednictvím hydrofobních interakcí, aniž by pronikl do buněk (*Liao et al., 2018*).

Nanomateriály na bázi grafenu (GFN) mohou také vstupovat do cytoplazmy díky své malé velikosti a ostrým hranám. Snadno pronikají buněčnou membránou, což vede k jejímu poškození a úniku cytoplazmatického obsahu. V živých buňkách mohou vyvolat toxicitu vytvořením ROS, které mohou způsobit mitochondriální poruchu snížením mitochondriálního membránového potenciálu a poškození buněčné membrány spojené s uvolněním laktátdehydrogenázy. V druhém případě může ROS indukovat peroxidaci lipidů reakcí s nenasycenými mastnými kyselinami membránových lipidů za vzniku malondialdehydu. Produkce ROS, mitochondriální dysfunkce a únik LDH jsou klíčovými faktory souvisejícími s buněčnou smrtí (*Liao et al., 2018*).

Pokud se GFN dostanou do jádra, mohou přímo interagovat s DNA a způsobit genotoxicitu (*Liao et al., 2018*).

Mezi nejvyužívanější testy pro stanovení toxicity GFN patří testy cytotoxicity MTT/WST-8, test integrity membrány pomocí LDH, generování reaktivních forem kyslíku, hemolýza, buněčná adheze a morfologie, aktivace krevních destiček, test apoptózy detekce cytokinů, genotoxicita a hemokompatibilita (*Seabra et al., 2014*).



Obrázek 5

Schématický diagram ukazuje možné mechanismy cytotoxicity grafenů. GFN se dostávají do buněk různými cestami, které vyvolávají tvorbu ROS, zvýšení LDH a MDA a uvolňování Ca^{2+} . Následně GFN způsobují poškození buněk, například poškození buněčné membrány, zánět, poškození DNA, mitochondriální poruchy, apoptózu nebo nekrózu. (Ou, et al., 2016)

2.3.3. TITAN

Oxid titaničitý (TiO_2) patří mezi nejpoužívanější nanočástice. Velikost částic závisí na jeho využití, od ultra jemných částic o velikosti menší než 100 nm až po částice 0,1-3 μm . Vyskytuje se ve třech formách, a to jako rutil, anatas a brookit (Baranowska-Wójcik et al., 2020). Vyznačuje se svojí chemickou stabilitou, biokompatibilitou a silnou fotokatalytickou aktivitou (Shabbir et al., 2021). Krystalická struktura, velikost částic a povlak mohou ovlivnit povrchový náboj, sedimentaci, agregaci a tím i toxicitu (Baranowska-Wójcik et al., 2020). Anatasová forma nanočástic je díky svým fotokatalytickým účinkům toxičtější než rutilová. Tvoří velké aglomeráty, které mohou způsobit poškození buněčné DNA (Shabbir et al., 2021).

Syntéza TiO_2 zahrnuje řadu technik, přičemž nejčastěji se používají sol-gel syntézy a hydrotermální metody, na vzestupu je zelená chemie a mikrovlnné metody. Vhodnou volbou a úpravou parametrů procesu, to znamená použitých substrátů, poměru rozpouštědel, teploty, doby procesu je možné získat částice s různými specifickými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, jako je plocha povrchu, morfologie a forma, velikost a

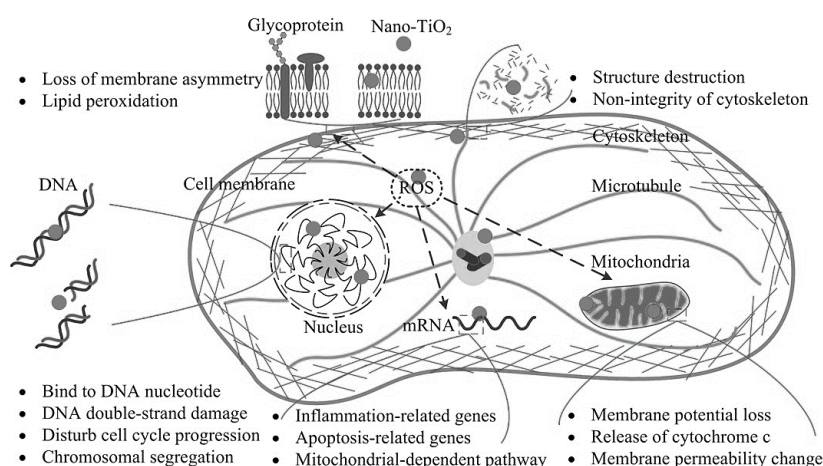
jednotnost distribuce velikosti, tvorba agregátů a krystalická struktura, fotoaktivita a mnoho dalších. Tyto vlastnosti mohou být dodatečně modifikovány během syntézy přidáním různých povrchově aktivních látek na bázi uhlíku nebo postsyntetickými modifikacemi, jako je povrchová funkcionalizace nebo vazba s organickými molekulami (Ziental et al., 2020).

2.3.3.1 TOXICITA TITANOVÝCH NANOČÁSTIC

Fyzikálně-chemické vlastnosti TiO_2 nanočástic jako jsou velikost, tvar, krystalická forma, rozpustnost, agregace a interakce nanočástic s proteiny, může významně ovlivnit jejich toxicitu (Báčová et al. 2022)

Nanočástice TiO_2 nevolňují toxické ionty, proto je toxicita těchto částic připisována hlavně interakci mezi nanočásticemi a intracelulárními biomolekulami adsorbovanými na nanočástice (Fard et al., 2015). Tyto interakce mají za následek zvýšenou tvorbu kyslíkových radikálů a s ní spojený oxidační stres, který je jedním z hlavních mechanismů toxických účinků titanových nanočástic. Zvýšená koncentrace kyslíkových radikálů může způsobit mitochondriální depolarizaci, prosakování plazmatické membrány, intracelulární influx vápníku a uvolňování cytokinů (obrázek 6) (Shabbir, et al. 2021; Fard et al., 2015).

Dalším mechanismem toxicity TiO_2 je fototoxicita, kdy titanové nanočástice po fotoaktivaci UV zářením vykazují vyšší toxicitu než neozářené částice (Fard et al., 2015)



Obrázek 6

Mechanismy nanotoxicity TiO_2 na buněčné úrovni (Sha, et al., 2015)

3 CÍLE

Cílem této diplomové práce bylo stanovit míru oxidačního stresu v lidských fibroblastech po expozici titanovými a grafenovými nanočásticemi. Stanovení oxidačního stresu bylo provedeno využitím dvou optimalizovaných metod, a to měřením koncentrace glutathionu pomocí monochlorobimanu a stanovením celkového a oxidovaného glutathionu pomocí enzymatické recyklační reakce.

Dílními cíli bylo:

1. optimalizovat obě metody pro stanovení glutathionu
2. porovnat testované metody mezi sebou a určit, zda poskytují srovnatelné experimentálně získané hodnoty koncentrace glutathionu
3. sledovat časovou a koncentrační závislost inkubace nanočástic grafenu a titanu s lidskými fibroblasty na obsah glutathionu v buňkách
4. porovnat jednotlivé formy titanu, které byly použity k ovlivnění buněk
5. porovnat jednotlivé formy grafenu, které byly použity k ovlivnění buněk

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. MATERIÁL

4.1.1. BUNĚČNÁ LINIE

Pro potřeby této diplomové práce byly použity lidské dermální fibroblasty izolované z novorozenecké předkožky, HDFn (Human Dermal Fibroblast (neonatal)), které byly zakoupeny od firmy Thermo Fisher Scientific (Cat.No.C-004-5C).

Buňky byly kultivovány dle doporučeného návodu od firmy Thermo Fisher Scientific, v buněčném CO₂ inkubátoru (při teplotě 37 °C a 5 % CO₂/95 % vzduchu) v mediu 106 (Cat. No.M-106-500) v kultivačních lahvích s kultivační plochou 25 cm².

4.1.2. NANOMATERIÁLY A NANOČÁSTICE

Veškeré nanomateriály byly dodány v práškové formě, přičemž následná příprava pracovních suspenzí probíhala ve spolupráci s Dr. Švadlákovou z Ústavu klinické imunologie a alergologie.

4.1.2.1. GRAFENOVÉ NANOČÁSTICE

Zásobní suspenze obou typů GP (0,25 mg/ml) byly připraveny pomocí ultrazvukové homogenizace v 0,02 % cholátu sodném („microtip“ sonda, 30 min, 75 % amplitudy; Q700, QSonica, NY, USA) (Švadláková, *et al.*, 2020; Švadláková, 2022).

- **GP1**: nemodifikované grafenové plátky, (PL-P-G750; PlasmaChem GmbH, Německo); laterální velikost 80-300 nm. V diplomové práci uváděny pod zkratkou **G1**.
- **GP2**: nemodifikované grafenové plátky, laskavě poskytnuty prof. Adriele Prina-Mello z centra CRANN (The Centre for Research on Adaptive Nanostructures and Nanodevices, Trinity College Dublin, Irsko); laterální velikost 250-400 nm. V diplomové práci uváděny pod zkratkou **G2**.

4.1.2.2. TITANOVÉ NANOČÁSTICE

Zásobní suspenze všech TiO₂ (1 mg/ml) byly připraveny pomocí ultrazvukové homogenizace ve vodě pro přípravu injekcí („microtip“ sonda, 20 min, 75 % amplitudy, Q700). Detailní charakterizace probíhala ve spolupráci s Centrem materiálů a nanotechnologií (CEMNAT, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice) (Báčová, *et al.*, 2022)

- **TiO₂** P25 (718467, Lot: MKCD8503; Sigma-Aldrich, USA), Anatase/Rutile, velikost: ~ 27 nm. V diplomové práci uváděny pod zkratkou **S**.
- **TiO₂** P25 (Lot: 614060298; Evonik Industries, Essen, Německo), Anatase/Rutile, velikost: 20-30 nm. V diplomové práci uváděny pod zkratkou **E**.
- **TiO₂** (PL-TiO-NO, Lot: YF20051217; Plasmachem PlasmaChem GmbH, Německo), Anatase, velikost: 4-6 nm. V diplomové práci uváděny pod zkratkou **T**

4.1.3. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

- Analytické váhy Bel Engineering
- Centrifuga Hettich Rotina 380R
- CO₂ inkubátor Sanyo
- Hlubokomrazicí box skříňový MDF-U500VX Panasonic
- Homogenizátor TissueLyser LT Qiagen
- Laminární box Thermo Fisher Scientific
- Mikroskop Nikon Eclipse TS100
- Minitřepačka MS2 IKA
- Odsávačka FTA-2i Biosan
- Spektrofotometr Tecan Infinite M200Pro, Tecan
- Ultrazvuková lázeň K10 Kraintek
- Vodní lázeň Memmert

4.1.4. CHEMIKÁLIE

- 1 % Bovinní sérový albumin, BSA, Biosera
- 3,3 mM Cisplatina (Pt(NH₃)₂Cl₂, Mr = 300,05, Sigma-Aldrich)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄, Mr=136,1, Penta)
- Dimethylsulfoxid, DMSO ((CH₃)₂SO, Sigma-Aldrich)
- Fosfátový pufr, PBS, PAN-Biotech GmbH
- Glutathion oxidovaná forma, GSSG (C₂₀H₃₂N₆O₁₂S₂, Mr=612,63, Sigma-Aldrich)
- Glutathion redukována forma, GSH (C₁₀H₁₇N₃O₆S, Mr=307,32, Sigma-Aldrich)
- Glutathion reduktáza, GR (Sigma-Aldrich)
- Hydrogenfosforečnan draselný (K₂HPO₄, Mr=174,2, Sigma-Aldrich)
- Kit pro stanovení bílkoviny – kyselina bicinchoninová BCA (Thermo Fisher Scientific)

- Kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová, DTNB ($C_{14}H_8N_2O_8S_2$, Mr=396,34, Sigma-Aldrich)
- Ethylendiamintetraoctan sodný, EDTA (2Na) (Mr=336,21, Sigma-Aldrich)
- 35 % kyselina chlorovodíková, HCl (Mr=36,46, $\rho=1,18$ g/ml, Lach:ner)
- 13 % kyselina 5-sulfosalicylová, SSA (Mr=254,21, Sigma-Aldrich)
- Medium 106 (Cat.No.M-106-500, Thermo Fisher Scientific)
- Monochlorbiman, MCB ($C_{10}H_{11}ClN_2O_2$, Mr=226,66, Sigma-Aldrich 69899)
- Nikotinamidadeninnukleotidfosfát, NADPH ($C_{21}H_{29}N_7O_{17}P_3$, Mr=744,416, Serva)
- Ultračistá voda, MQ
- 2-vinylpyridin, 2-VP, (C_7H_7N , Mr=105,14 Sigma-Aldrich)

4.1.5. POMŮCKY

- jednorázové rukavice
- Pipety Eppendorf
- Špičky různých velikostí Eppendorf
- Mikrozskumavky Eppendorf
- 6-jamkové kultivační destičky
- 96-jamkové mikrotitrační destičky
- 96-jamková polypropylenová destička
- Plastová škrabka
- Plastová korýtko
- Skleněné kádinky

4.2. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

- ***Kyselina chlorovodíková, HCl (10 mM)***

10 mM HCl byla připravena přidáním 88 μ l 35 % HCl do 100 ml ultračisté vody a byla skladována v lednici při teplotě 4 °C.

- ***Fosfátový pufr (145 mM) s kyselinou etylendiamintetraoctovou (1 mM)***

Pufr byl připraven rozpuštěním 10,36 g K_2HPO_4 , 1,77 g KH_2PO_4 a 0,168 g EDTA (2 Na) v 500 ml ultračisté vody. Následně bylo pH upraveno na hodnotu 7,4. Hotový pufr byl skladován v lednici při teplotě 4 °C.

- **13 % kyselina 5-sulfosalicylová – zásobní roztok**

13 % kyselina 5-sulfosalicylová byla připravena rozpuštěním 4,68 g SSA ve 36 ml ultračisté vody a přidáním 300 μ l 37 % kyseliny chlorovodíkové. Kyselina byla skladována v lednici při teplotě 4 °C.

Pracovní roztok 1,3 % SSA byl připraven ředěním zásobního roztoku 13 % kyseliny 5-sulfosalicylové ultračistou vodou v poměru 1:9.

- **Glutathion oxidovaná forma, GSSG (10 mM) – zásobní roztok**

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním 6,12 mg GSSG v 1 ml 1,3 % SSA. Takto připravený roztok je, při uchování v mrazáku při teplotě -24 °C, stabilní po dobu 12 měsíců.

Pracovní roztok byl připraven smícháním 5 μ l 10 mM zásobního roztoku GSSG a 9,995 ml 1,3 % SSA na výslednou koncentraci 5 μ M (2000x zředěný). Pracovní roztok byl alikvótován po 1,5 ml a uchováván při teplotě -24 °C.

- **Glutathion redukována forma, GSH (10 Mm) – zásobní roztok**

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním 3,06 mg GSH v 1 ml 1,3 % SSA. Takto připravený roztok je, při uchování v mrazáku při teplotě -24 °C, stabilní po dobu 2 týdnů.

Pracovní roztok byl připraven smícháním 20 μ l 10 mM zásobního roztoku GSH a 9,980 ml 1,3 % SSA na výslednou koncentraci 20 μ M (500x zředěný). Pracovní roztok je nestabilní a nelze uchovávat.

- **Kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová, DTNB (6 mM) – zásobní roztok**

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním 2,4 mg DTNB v 1 ml fosfátového pufru. Takto připravený roztok je, při uchování v mrazáku při teplotě -24 °C, stabilní po dobu 2 měsíců, proto byl podle potřeby připravován v nadbytku, alikvótován po 1 ml.

- **Nikotinamidadeninnukleotidfosfát redukovaný, NADPH**

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním 6,7 mg NADPH v 1 ml fosfátového pufru. Takto připravený roztok je, při uchování v mrazáku při teplotě -24 °C, stabilní po dobu 1-2 měsíců, proto byl podle potřeby připravován v nadbytku, alikvótován po 1 ml.

- **Glutathion reduktáza, GR**

Roztok GR byl vždy před měřením připraven čerstvý. Na jednu 96-jamkovou mikrotitrační destičku se připravoval roztok smícháním 50 μ l GR a 5 ml fosfátového pufru.

- **2-vinylpyridin, 2-VP**

Roztok 2-VP se vždy připravoval čerstvý, a to naředěním 0,5 ml 2-VP 0,5 ml chlazeného ethanolu.

- **Monochlorobiman, MCB (10 mM) – zásobní roztok**

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním 5 mg MCB v 2205 μ l DMSO. Takto připravený roztok byl alikvótován po 100 μ l a skladován ve tmě v mrazáku při $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pracovní roztok MCB byl vždy před měřením připraven čerstvý. Na jednu 96-jamkovou mikrotitrační destičku se připravoval roztok smícháním 37 μ l 10 mM MCB a 9363 μ l předem nahřátého média (ve vodní lázni na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$), aby výsledná koncentrace MCB odpovídala 40 μ M.

4.3. STANOVENÍ GLUTATHIONU POMOCÍ MCB

Buňky byly kultivovány v černých 96-jamkových kultivačních destičkách s průhledným dnem, v koncentracích 4 a 5 tisíc buněk na jamku. Následující den bylo médium z jamek odsáto a buňky byly ovlivněny 100 μ l suspenze grafenových a titanových nanočástic v příslušných koncentracích, které jsou uvedeny v tabulkách 4 a 5. Pro pozitivní kontrolu byla část buněk ovlivněna 3,3 M roztokem cisplatiny (cisPt) o výsledných koncentracích 30 μ M a 50 μ M cisPt na jamku a jako negativní kontrola sloužila část buněk, u kterých bylo pouze vyměněno médium. Ovlivněné buňky byly dále inkubovány po dobu 24 a 48 hodin.

Tabulka 4

Ředění suspenze grafenových nanočástic o koncentraci 250 μ g/ml pro ovlivnění 16 jamek

Koncentrace v jamce [μ g/ml]	Grafen (250 μ g/ml) [μ l]	Médium [μ l]
5	40	1960
15	120	1880
30	240	1760

Tabulka 5

Ředění suspenze titanových nanočástic o koncentraci 1 mg/ml pro ovlivnění 16 jamek.

Koncentrace v jamce [µg/ml]	TiO ₂ (1 mg/ml) [µl]	Médium [µl]
1	2	1998
10	20	1980
100	200	1800

Po uplynutí inkubační doby bylo médium z jamek odsáto a do každé jamky byla přidána směs 100 µl média s MCB. Výsledná koncentrace byla 40 µM MCB na jamku.

Po přidání MCB byla měřena kinetika reakce na přístroji Tecan Infinite M200PRO, předem vytemperovaného na 37 °C. Podmínky měření jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6

Podmínky spektrofluorimetrického stanovení GSH pomocí MCB.

Teplota detekce	37 °C
Vlnová délka excitace/emise	394 nm/490 nm
Kinetické měření	1 hodina
Časový interval měření	3 minuty
Výtěžek (gain)	110

Výsledná koncentrace redukovaného GSH přítomného ve vzorcích byla vyhodnocena pomocí směrnice jako procentuální podíl koncentrace GSH vztažený ke kontrolnímu vzorku neovlivněných buněk.

4.3.1. OPTIMALIZACE STANOVENÍ GLUTATHIONU POMOCÍ MCB

Metoda stanovení glutathionu pomocí MCB byla pro potřeby této diplomové práce optimalizována. První parametr, který byl optimalizován, byla koncentrace přídatku roztoku MCB ke vzorku buněk, které byly ovlivněny titanovými nanočásticemi, cis-platinou jako pozitivní kontrolou a k části neovlivněných buněk pro negativní kontrolu.

Ke vzorku buněk byl přidáván roztok MCB tak, aby výsledná koncentrace byla 0-50 µM MCB na jamku. Poté byla měřena kinetika reakce podle uvedeného postupu (kapitola 4.3). Na základě získaných dat, ze kterých byla vypočítána průměrná směrnice

(tabulka 11), byla pro účely diplomové práce byla vybrána koncentrace 40 μM MCB na jamku.

Druhým parametrem, který byl optimalizován, byl způsob přidání roztoku MCB ke vzorku buněk. Byly testovány hned dva způsoby přidavku.

Pro první způsob byl připraven pracovní roztok smísením 60 μl 10 mM MCB s 2440 μl předem vytemperovaného média. Do každé jamky, přímo do 100 μl buněčného média, bylo přidáno 20 μl pracovního roztoku tak, aby byla výsledná koncentrace 40 μM MCB na jamku.

Pro druhý způsob byl připraven pracovní roztok smísením 37 μl 10 mM MCB s 9363 μl předem vytemperovaného média. Buněčné médium bylo z jamek odsáto a následně bylo přidáno 100 μl pracovního roztoku o výsledné koncentraci 40 μM MCB na jamku.

Pro oba způsoby byla měřena kinetika reakce podle výše uvedených podmínek (kapitola 4.3., tabulka 6). Z naměřených dat byly sestrojeny grafy závislosti fluorescence na koncentraci roztoku MCB (kapitola 5.1.2.). Pro účely diplomové práce byl zvolen druhý testovaný způsob, a to výměna média s následným přidavkem 100 μl pracovního roztoku 40 μM MCB.

4.4. PŘÍPRAVA BUNĚČNÉHO LYZÁTU

Buňky byly kultivovány v 6-jamkových kultivačních destičkách v koncentracích 50 a 65 tisíc buněk na jamku. Následující den byly buňky ovlivněny suspenzí grafenových a titanových nanočástic v příslušných koncentracích, uvedených v tabulkách 4 a 5. Pro pozitivní kontrolu byla část buněk ovlivněna 3,3 M roztokem cisplatin o výsledné koncentraci 50 μM cisPt na jamku a jako negativní kontrola sloužila část buněk, které zůstaly neovlivněné. Buňky byly dále inkubovány po dobu 24 a 48 hodin.

Tabulka 7

Ředění suspenze grafenových nanočástic o koncentraci 250 µg/ml pro ovlivnění buněk na přípravu buněčného lyzátu.

	Koncentrace v jamce [µg/ml]	Médium [µl]	Grafen (250 µg/ml) [µl]
1	5	-40	40
2	15	-120	120
3	30	-240	240

Pozn.: Z každé jamky 6-ti jamkové destičky s buňkami při ovlivnění byl odsát takový objem media, který tam byl poté přidán ve formě zásobního roztoku grafenových či titanových nanočástic.

Tabulka 8

Ředění suspenze titanových nanočástic o koncentraci 1 mg/ml pro ovlivnění buněk na přípravu buněčného lyzátu.

	Koncentrace v jamce [µg/ml]	Médium [µl]	TiO₂ (1 mg/ml) [µl]
1	10	-20	20
2	100	-200	200

Po uplynutí inkubační doby bylo médium z jamek odsáto. Jamky s buňkami byly následně propláchnuty 1 ml na 37 °C vyhřátého PBS a znovu odsáty do sucha.

Do každé jamky bylo přidáno 50 µl chlazené 10 mM HCl a destička se nechala 5 minut inkubovat na ledu. Poté byly buňky z kultivačních destiček seškrabovány a převedeny do 1,5 ml zkumavek, které byly po celou dobu seškrabu umístěny na ledu.

Pomocí dalších 50 µl 10 mM HCl byly jamky destičky propláchnuty a seškrábány zbytky buněk, které ulpávaly v krajích jamek. Tento postup byl dvakrát opakován.

Zkumavky se seškrabanými buňkami byly poté dvakrát zmrazeny v hlubokomrazícím boxu při teplotě -70 °C a rozmrazeny při laboratorní teplotě.

Následovně byly zkumavky s buňkami centrifugovány při 15 000 g v chlazené centrifuze na 4 °C po dobu 10 minut. Po stočení byl supernatant odebrán do nových 1,5

ml zkumavek, z nichž bylo odebráno po 30 μ l lyzátu na stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA metody a ke zbytku lyzátu byla přidána 13 % SSA v poměru 1:10. Lyzát s 13 % SSA byl znovu centrifugován při 15 000 g v chlazené centrifuze na 4 °C po dobu 10 minut.

Po stočení byl odebraný supernatant ihned zpracován, nebo byl uložen v hlubokomrazícím boxu při teplotě -70 °C pro další použití.

4.4.1. OPTIMALIZACE PŘÍPRAVY BUNĚČNÉHO LYZÁTU

Metoda byla optimalizována, aby bylo dosaženo nejvyšší koncentrace proteinu ve vzorku lyzátu. Za tímto účelem bylo využito čtyř rozdílných metod lyze buněk.

- Zmrazení při teplotě -70 °C – zkumavka s buňkami byla dvakrát zmrazena v hlubokomrazícím boxu při teplotě -70 °C a následně rozmrazena za laboratorní teploty
- 10 mM HCl – zkumavka s buňkami byla ihned zpracována
- Ultrazvuk – do zkumavky s buňkami byly přidány skleněné kuličky a zkumavka byla dvakrát ponořena po dobu 15 sekund v ultrazvukové lázni
- Homogenizace – do zkumavky s buňkami byly přidány skleněné kuličky a zkumavka byla následně vložena do homogenizátoru, s předem vychlazením karuselem. Homogenizace probíhala po dobu 10 minut.

Pro účely diplomové práce byla vybrána metoda opakovaného zmrazení vzorku lyzátu při -70 °C v hlubokomrazícím boxu a bylo dále postupováno dle výše uvedeného postupu (kap. 4.4).

4.5. STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ POMOCÍ BCA METODY

Kolorimetrické stanovení kyseliny bicinchoninové (BCA) se využívá ke kvantifikaci proteinů ve vzorku. Principem tohoto stanovení je schopnost proteinů redukovat měďnaté ionty na ionty měďné za alkalických podmínek prostřednictvím biuretové reakce. Měďné ionty chelatují s kyselinou bicinchoninovou za vzniku fialově zbarveného komplexu. Koncentrace stanovovaných proteinů je přímo úměrná intenzitě fialového zbarvení měřené při vlnové délce 562 nm (*Rogatsky, 2021*)

Podle tabulky 6 byly připraveny kalibrační roztoky bovinního sérového albuminu (BSA) pro stanovení kalibrační křivky. Koncentrace proteinů byla stanovována u vzorků, které

byly 2x ředěny 10 mM HCl (30 µl vzorku buněčného lyzátu + 30 µl 10 mM HCl) a u vzorků po přidání denaturačního činidla 13 % SSA v poměru 1:10.

Tabulka 9

Ředění roztoků pro stanovení kalibrační křivky pro BCA měření koncentrace proteinů

	Koncentrace BSA [µg/ml]	1% roztok BSA [µl]	Destilovaná voda [µl]
1	0	0	500
2	200	10	490
3	400	20	480
4	600	30	470
5	800	40	460
6	1000	50	450

Pracovní roztok C byl připraven smísením roztoku A (kyselina bicinchoninová, uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný v 0,1 M NaOH) s roztokem B (4 % (w/v) hexahydrát síranu měďnatého) v poměru 50:1.

10 µl kalibračních standardů a naředěných vzorků bylo pipetováno spolu s 200 µl pracovního roztoku C do 96-jamkové destičky, která byla řádně promíchána a inkubována po dobu 30 minut při 37 °C.

Pomocí spektrofotometru Tecan Infinite M200Pro byla naměřena absorbance při vlnové délce 562 nm.

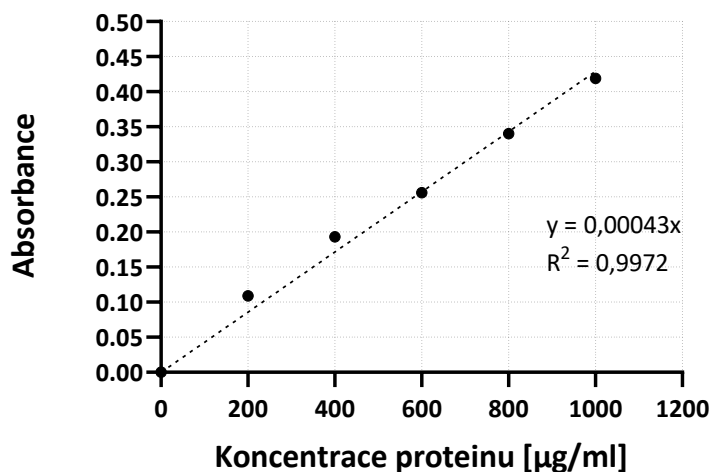
Z průměrných hodnot absorbance kalibračních standardů byla sestrojena kalibrační křivka. Od průměrných hodnot absorbance vzorků byla odečtena průměrná hodnota slepého vzorku a následně pomocí rovnice kalibrační křivky byla vypočítána koncentrace proteinů ve vzorku.

Tabulka 10

Naměřené hodnoty absorbance, které byly použity k sestrojení kalibrační křivky (graf 1), pro odečet koncentraci proteinu [µg/ml] ve vzorku buněčného lyzátu

Koncentrace proteinu [µg/ml]	0	200	400	600	800	1000
Absorbance	0	0,109	0,193	0,256	0,340	0,419

Kalibrační křivka pro BCA měření koncentrace proteinů



Graf 1

Kalibrační přímka pro BCA měření koncentrace proteinu (lineární v rozsahu 0–1000 $\mu\text{g/ml}$ proteinu).

4.6. STANOVENÍ CELKOVÉHO A OXIDOVANÉHO (GSSG) GLUTATHIONU POMOCÍ ENZYMATICKÉ RECYKLAČNÍ REAKCE

Nejprve byly připraveny pracovní roztoky oxidované a redukované formy glutathionu (kapitola 4.2.), z nichž byly podle tabulek 7 a 8 naředěny kalibrační roztoky. Kalibrace byly provedeny pro GSH, GSSG a GSSG s přídávkem 20 μl derivatizačního činidla 2-vinylpyridinu. Roztok 2-VP byl připraven naředěním 0,5 ml 2-VP 0,5 ml chlazeného EtOH. Následná derivatizace byla prováděná v digestoři.

Tabulka 11

Ředění roztoků pro stanovení kalibrační křivky GSSG (0-5 μM)

	Koncentrace GSSG [μM]	5 μM GSSG [μl]	1,3 % SSA [μl]
1	0	0	400
2	0,5	40	360
3	1	80	320
4	1,5	120	280
5	2	160	240
6	3	240	160
7	4	320	80
8	5	400	0

Tabulka 12

Ředění roztoků pro stanovení kalibrační křivky GSH (0-20 μM)

	Koncentrace GSH [μM]	20 μM GSH [μl]	1,3 % SSA [μl]
1	0	0	200
2	2	20	180
3	4	40	160
4	6	60	140
5	8	80	120
6	12	120	80
7	16	160	40
8	20	200	0

Do 96-jamkové polypropylenové destičky bylo napipetováno 200 μl od každého kalibračního roztoku 0-5 μM GSSG a 200 μl vzorků buněčného lyzátu s přídatkem denaturačního činidla 13 % SSA v poměru 1:10, ke kterému bylo přidáno 20 μl 2-VP. Inkubace probíhala po dobu 1 hodiny za stálého míchání na třepačce.

V mezidobí byl připraven pracovní roztok, a to smícháním 0,7 ml zásobního roztoku DTNB, 0,7 ml zásobního roztoku NADPH a 12,6 ml fosfátového pufru (kapitola 4.2.) na jednu 96-jamkovou destičku.

Po uplynutí inkubační doby bylo do 96-jamkové destičky rozpipetováno multikanálovou pipetou po 50 μl vzorku buněčného lyzátu, který byl naředěn v poměru

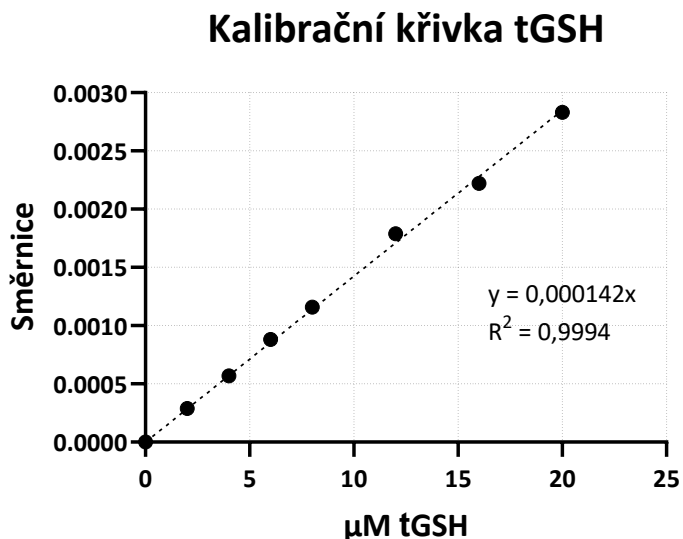
1:3 10 mM HCl, po 50 μ l vzorku s přidavkem 2-VP. Dále po 50 μ l kalibrační standardy pro GSH, GSSG a kalibrační standardy pro GSSG s přidavkem 2-VP. Do každé jamky bylo přidáno 100 μ l pracovního roztoku a 50 μ l pracovního glutathionreduktázy (kapitola 4.2.). Ihned byla měřena kinetika na přístroji Tecan Infinite M200PRO. Podmínky měření jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 13

Podmínky stanovení GSH/GSSG pomocí enzymatické recyklační reakce

Vlnová délka	412 nm
Kinetické měření	3 minuty
Časový interval měření	30 s

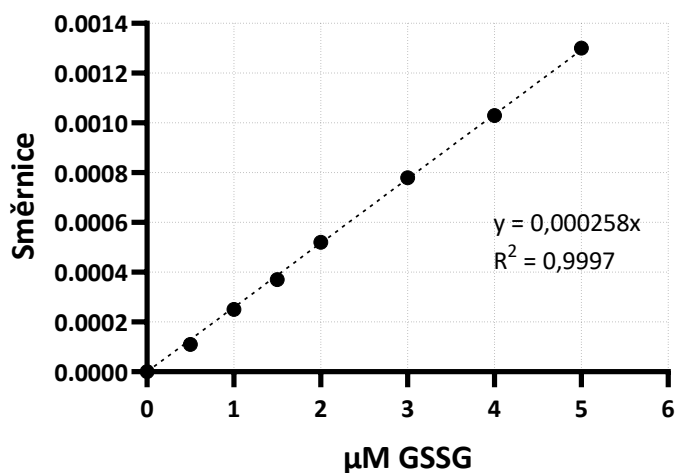
Koncentrace celkového tGSH a oxidovaného glutathionu GSSG ve vzorku byla stanovena z kalibrační křivky. Koncentrace redukováného GSH byla vypočtena odečtením hladiny GSSG od hladiny celkového glutathionu ($GSH = tGSH - 2 \times GSSG$).



Graf 2

Kalibrační křivka pro výpočet celkového glutathionu ve vzorku buněčného lyzátu. Sestrojená jako závislost směrnice na koncentraci tGSH [μ M].

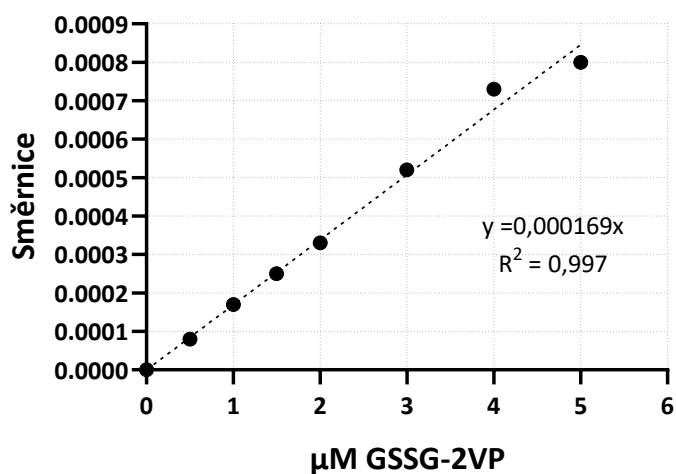
Kalibrační křivka GSSG



Graf 3

Kalibrační křivka pro výpočet oxidované formy glutathionu GSSG ve vzorku buněčného lyzátu. Sestrojená jako závislost směrnice na koncentraci GSSG [μM].

Kalibrační křivka GSSG-2-VP



Graf 4

Kalibrační křivka oxidované formy glutathionu GSSG s přidavkem derivatizačního činidla 2-VP. Sestrojená jako závislost směrnice na koncentraci GSSG-2-VP [μM].

4.7. STATISTICKÁ ANALÝZA

Všechna experimentální měření byla provedena alespoň třikrát nezávisle pro obě metody. Všechny hodnoty byly měřeny v kvadruplikátech. Data byla vyjádřena jako procentuální zastoupení hladiny glutathionu vztažené ke kontrole (kontrola = 100 %). Výsledky měření byly vyjádřeny jako průměrná hodnota \pm SD. Rozdíly mezi skupinami vzorků měřené různým testem byly hodnoceny pomocí analýzy rozptylu (ANOVA), $p = 0,05$. Statistická významnost značená jako * (případně #) odpovídá $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Korelační koeficient mezi testy MCB a enzymatickou recyklační reakcí byl vypočten po analýze podobných vzorků, pomocí párového t-testu. Ke zpracování analýzy byl využit program GraphPad Prism 10.2.3.

5 VÝSLEDKY

5.1. STANOVENÍ GLUTATHIONU (GSH) POMOCÍ MONOCHLOROBIMANU

5.1.1. OPTIMALIZACE METODY

5.1.1.1. KONCENTRACE MCB

Nejprve byla optimalizována koncentrace přídavku MCB. K ovlivněnému vzorku buněk, byl přidán roztok MCB tak, aby výsledná koncentrace byla 0-50 μM . Poté byla měřena kinetika reakce podle uvedeného postupu (kapitola 4.3)

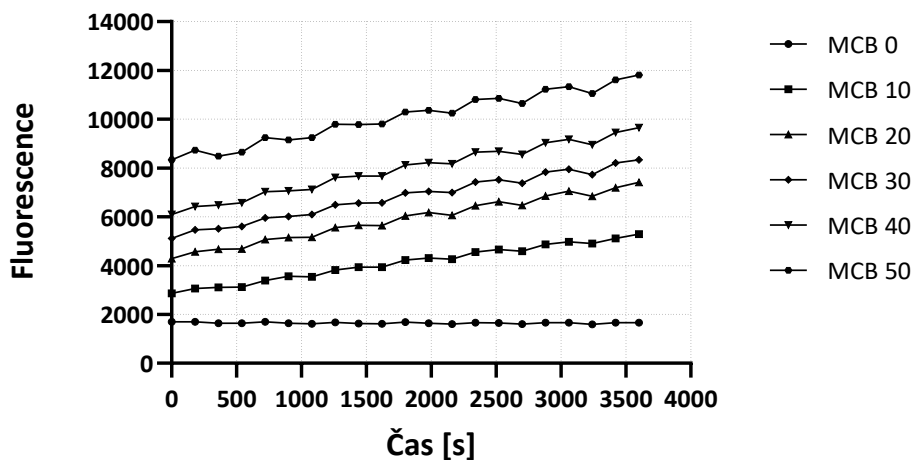
Na základě získaných dat, ze kterých byla vypočítána průměrná směrnice (tabulka 11), byla vybrána výsledná koncentrace 40 μM MCB. Pro tuto koncentraci byla získána první nejvyšší průměrná směrnice pro pozitivní kontrolu, negativní kontrolu (vzorek neovlivněných buněk) i pro buňky ovlivněné titanovými nanočásticemi (graf 5).

Tabulka 14

Hodnoty směrnic pozitivní a negativní kontroly pro stanovení optimální koncentrace MCB v rozsahu 0-50 μM .

	MCB 0	MCB 10	MCB 20	MCB 30	MCB 40	MCB 50
Směrnice pro kontrolu	-0,009	0,644	0,769	0,821	0,904	0,795
Směrnice po pozitivní kontrolu	-0,003	0,234	0,343	0,365	0,371	0,329

Koncentrace MCB - buňky ovlivněné titanovými nanočásticemi



Graf 5

Závislost fluorescence ovlivněných buněk s roztokem 0-50 μM MCB na čase. Kinetika reakce byla měřena podle podmínek uvedených v tabulce 3 (kapitola 4.3.)

5.1.1.2. ZPŮSOB PŘIDÁNÍ MCB

Dále byl optimalizován způsob přidavku roztoku MCB (kapitola 4.3.1.2). Ze získaných dat byla metoda, kdy byl roztok MCB přidán přímo do buněčného média, vyhodnocena jako méně vhodná. Z grafu 6 a 7 bylo patrné, že v prvních 900 sekundách má křivka závislosti fluorescence na čase klesající charakter pro pozitivní kontrolu i kontrolní vzorek neovlivněných buněk.

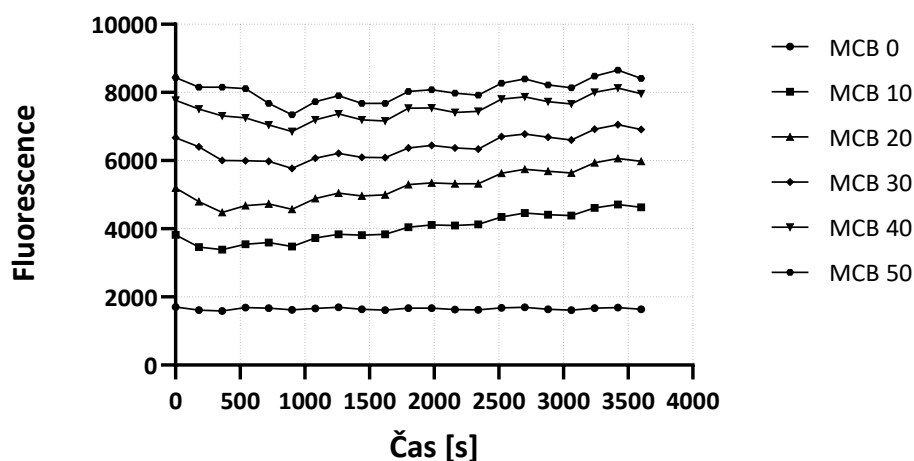
V tabulce 12 byly uvedeny směrnice pro měření v čase 0-3600 s a přepočítané směrnice v čase 1800-3600 s. Pro koncentraci 40 μM MCB, která byla v této práci používána pro stanovení glutathionu ve vzorcích, byl zaznamenán největší rozdíl mezi směrnici u pozitivní kontroly, negativní kontroly, tak i pro vzorky ovlivněných buněk titanovými nanočásticemi.

Tabulka 15

Hodnoty směrnic pozitivní a negativní kontroly pro časy 0-3600 s a přepočítané směrnice pro časy 1800-3600 s pro koncentrace výsledné 0-50 μM MCB.

	Směrnice pro pozitivní kontrolu		Směrnice pro kontrolu	
	čas 0-3600 [s]	čas 1800-3600 [s]	čas 0-3600 [s]	čas 1800-3600 [s]
MCB 0	0,002	0,001	-0,008	0,002
MCB 10	0,353	0,377	0,498	0,482
MCB 20	0,391	0,447	0,538	0,560
MCB 30	0,239	0,371	0,503	0,578
MCB 40	0,204	0,334	0,484	0,579
MCB 50	0,141	0,308	0,511	0,597

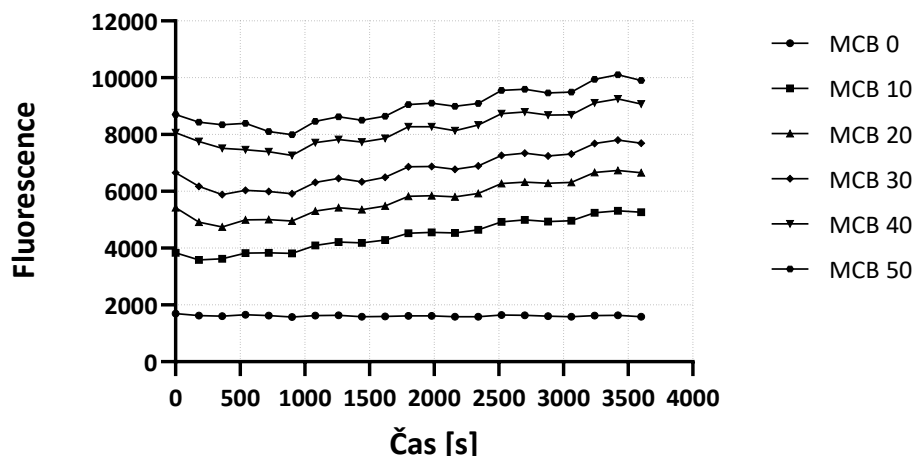
Přídavek MCB - pozitivní kontrola



Graf 6

Závislost fluorescence na čase pro koncentrace výsledné 0-50 μM MCB, kde vzorek buněk byl ovlivněn 50 μM cisplatinou – pozitivní kontrola.

Přídavek MCB - negativní kontrola



Graf 7

Závislost fluorescence na čase pro koncentrace výsledné 0-50 μM MCB, kde vzorek neovlivněných buněk – negativní kontrola.

5.1.2. STANOVENÍ GLUTATHIONU V BUŇKÁCH OVLIVNĚNÝCH TITANOVÝMI NANOČÁSTICEMI

Pro ovlivnění buněk HDFn byly použity tři různé formy titanových nanočástic (kapitola 4.1.2.2.), dále značené jako **S** (Anatase/Rutile, ~ 27 nm), **E** (Anatase/Rutile, 20-30 nm) a **T** (Anatase, 4-6 nm) o koncentracích 1, 10 a 100 $\mu\text{g/ml}$. Buňky byly inkubovány po dobu 24 a 48 hodin.

Výsledná koncentrace redukováného GSH přítomného ve vzorcích HDFn ovlivněných titanovými nanočásticemi byla vyhodnocena pomocí směrníc jako procentuální podíl koncentrace GSH vztažený ke kontrolnímu vzorku neovlivněných buněk.

Byla provedena statistická analýza pomocí jednocestné analýzy rozptylu one-way ANOVA, kdy nebyly pozorovány signifikantní statistické poklesy oproti kontrolám mezi jednotlivými formami a koncentracemi použitých titanových nanočástic. Signifikantní statistický pokles byl pozorován pouze u HDFn ovlivněných 30 a 50 μM roztokem ciplatiny jako pozitivní kontrola, a to u obou testovaných dob inkubace (graf 8 a 9).

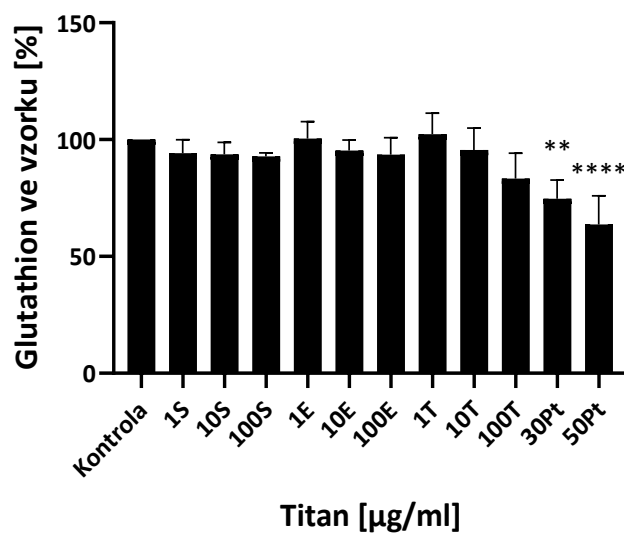
Pomocí testu dvoucestné analýzy rozptylu two-way ANOVA byly porovnány vlivy doby inkubace (graf 10). Téměř u všech buněk, s výjimkou buněk ovlivněných nanočásticemi značenými S a T při koncentraci 1 µg/ml, došlo po 48 hodinách k adaptaci na oxidační stres působený titanovými nanočásticemi a vzrostlo procentuální zastoupení redukovaného glutathionu.

Tabulka 16

Hodnoty procentuálního zastoupení redukovaného GSH po 24 hodinové inkubaci HDFn s titanovými nanočásticemi. Experimentálně získaná data byla vyjádřena jako procento kontroly (100 %) a byla dopočítána průměrná směrodatná odchylka (\pm SD) ze tří nezávislých experimentů.

	% GSH	\pmSD
Kontrola	100	0
1S	100,5	5,5
10S	95,4	3,0
100S	93,5	5,7
1E	94,1	4,4
10E	93,7	3,9
100E	92,8	1,0
1T	102,3	6,4
10T	95,6	6,5
100T	83,3	8,3
30Pt	74,7 **	5,7
50Pt	63,7 ****	9,3

Glutathion inkubace 24 h



Graf 8

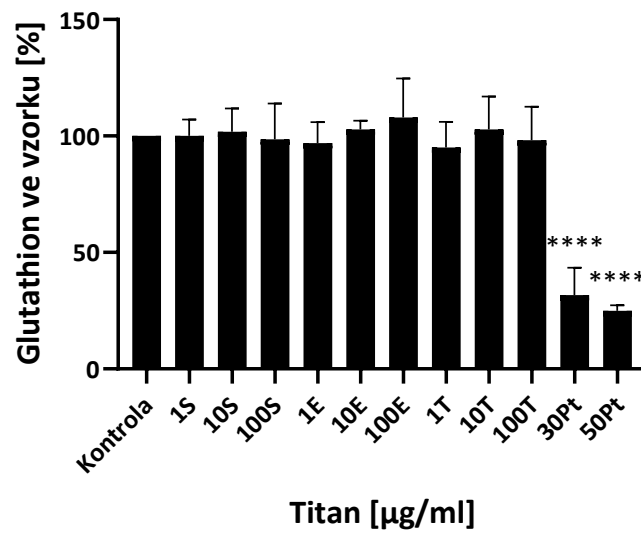
Procentuální zastoupení redukované formy glutathionu (GSH) po 24 hodinové inkubaci lidských fibroblastů s titanovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ byl pozorován pouze u HDFn ovlivněných cisplatinou jako pozitivní kontrolou.

Tabulka 17

Hodnoty procentuálního zastoupení redukovaného GSH po 48 hodinové inkubaci HDFn s titanovými nanočásticemi. Experimentálně získaná data byla vyjádřena jako procento kontroly (100 %) a byla dopočítána průměrná směrodatná odchylka (\pm SD) ze tří nezávislých experimentů.

	% GSH	\pm SD
Kontrola	100	0
1S	96,9	6,9
10S	102,9	2,5
100S	107,9	12,7
1E	100,1	5,3
10E	101,8	7,2
100E	98,5	10,4
1T	95,1	8,2
10T	102,8	10,6
100T	98,2	11,1
30Pt	31,7 ****	8,4
50Pt	25,0 ****	1,8

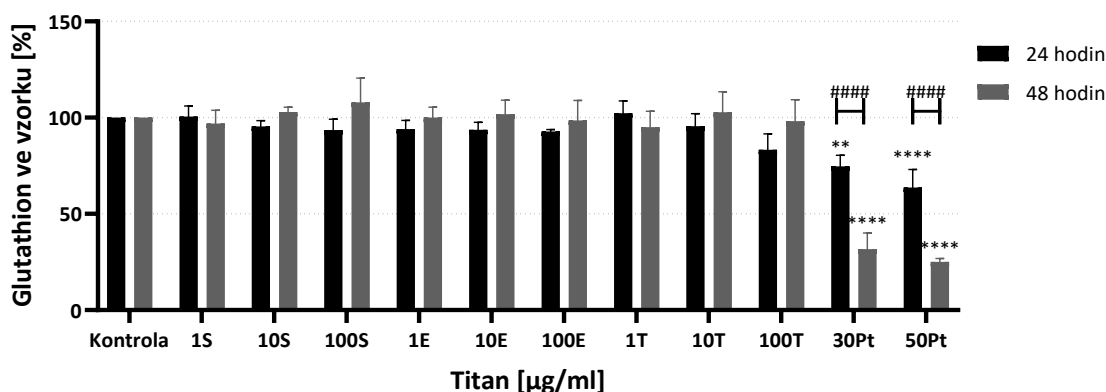
Glutathion inkubace 48h



Graf 9

Procentuální zastoupení redukované formy glutathionu (GSH) po 48 hodinové inkubaci lidských fibroblastů s titanovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám **** $p < 0,0001$ byl pozorován pouze u HDFn ovlivněných cisplatinou jako pozitivní kontrolou.

Porovnání vlivu doby inkubace



Graf 10

Porovnání vlivu doby inkubace buněk HDFn s titanovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů (hodnoty jsou uvedeny v tabulkách 13 a 14). Statisticky významný rozdíl mezi dvěma inkubačními časy v rámci jedné koncentrace ##### $p < 0,0001$ byl pozorován pouze u HDFn ovlivněných cisplatinou jako pozitivní kontrolou.

5.1.3. STANOVENÍ GLUTATHIONU V BUŇKÁCH OVLIVNĚNÝCH GRAFENOVÝMI NANOČÁSTICEMI

Pro ovlivnění buněk HDFn byly použity dvě různé formy grafenových nanočástic (kapitola 4.1.2.1.), dále značené jako **G1** (nemodifikované grafenové částice, laterální velikost 80-300 nm) a **G2** (nemodifikované grafenové částice, laterální velikost 250-400 nm) o koncentracích 5, 15 a 30 µg/ml. Buňky byly inkubovány po dobu 24 a 48 hodin.

Výsledná koncentrace redukovaného GSH přítomného ve vzorcích HDFn ovlivněných titanovými nanočásticemi byla vyhodnocena pomocí směrnice jako procentuální podíl koncentrace GSH vztažený ke kontrolnímu vzorku neovlivněných buněk.

Byla provedena statistická analýza pomocí jednocestné analýzy rozptylu one-way ANOVA, kdy byly pozorovány signifikantní statistické poklesy oproti kontrolám u HDFn ovlivněných grafenovými nanočásticemi značenými G1 u nejvyšší použité koncentrace 30 µg/ml po 24 hodinové inkubaci (graf 11). Po 48 hodinové inkubaci byly pozorovány signifikantní statistické poklesy u HDFn ovlivněných nanočásticemi G1 opět pro koncentraci 30 µg/ml a nanočásticemi značenými jako G2 pro koncentraci 30 µg/ml

(graf 12). Signifikantní statistický pokles byl pozorován i u HDFn ovlivněných 30 a 50 μ M roztokem ciplatiny jako pozitivní kontrola, a to u obou testovaných dob inkubace (graf 11 a 12).

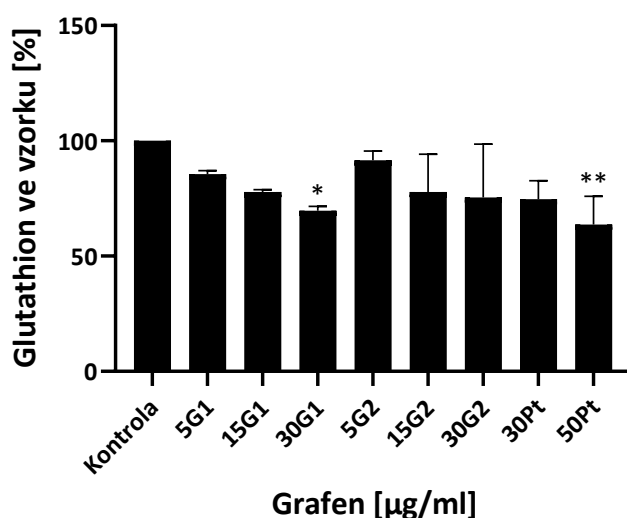
Pomocí testu dvoucestné analýzy rozptylu two-way ANOVA byly porovnány vlivy doby inkubace (graf 13). Téměř u všech buněk, s výjimkou buněk ovlivněných nanočásticemi značenými G2 při koncentraci 5 μ g/ml, došlo po 48 hodinách k dalšímu poklesu procentuálního zastoupení redukovaného glutathionu.

Tabulka 18

Hodnoty procentuálního zastoupení redukovaného GSH po 24 hodinové inkubaci HDFn s grafenovými nanočásticemi. Experimentálně získaná data byla vyjádřena jako procento kontroly (100 %) a byla dopočítána průměrná směrodatná odchylka (\pm SD) ze tří nezávislých experimentů.

	% GSH	\pm SD
Kontrola	100	0
5G1	85,6	1,1
15G1	77,9	0,6
30G1	69,6 *	1,5
5G2	91,6	3,0
15G2	77,9	12,4
30G2	75,4	17,7
30Pt	74,7	5,7
50Pt	63,7 **	9,3

Glutathion inkubace 24h



Graf 11

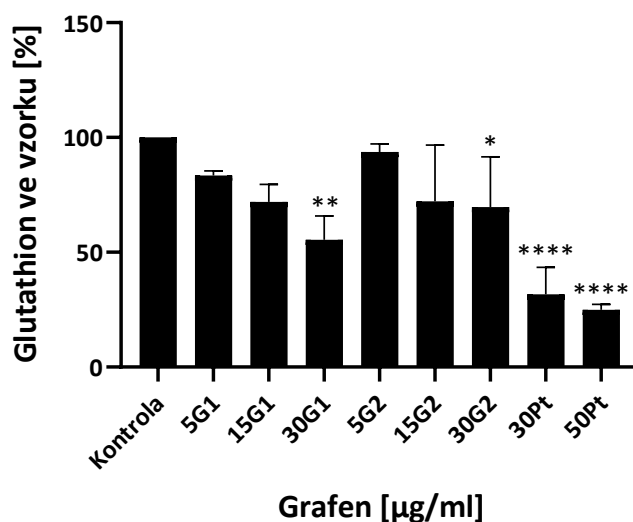
Procentuální zastoupení redukované formy glutathionu (GSH) po 24 hodinové inkubaci lidských fibroblastů s grafenovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám * p < 0,05, ** p < 0,01.

Tabulka 19

Hodnoty procentuálního zastoupení redukovaného GSH po 48 hodinové inkubaci HDFn s grafenovými nanočásticemi. Experimentálně získaná data byla vyjádřena jako procento kontroly (100 %) a byla dopočítána průměrná směrodatná odchylka (±SD) ze tří nezávislých experimentů.

	% GSH	± SD
Kontrola	100	0
5G1	83,4	1,4
15G1	71,9	5,5
30G1	55,4 **	7,6
5G2	93,6	2,6
15G2	72,2	18,6
30G2	69,6 *	16,5
30Pt	31,7 ****	8,4
50Pt	25,0 ****	1,8

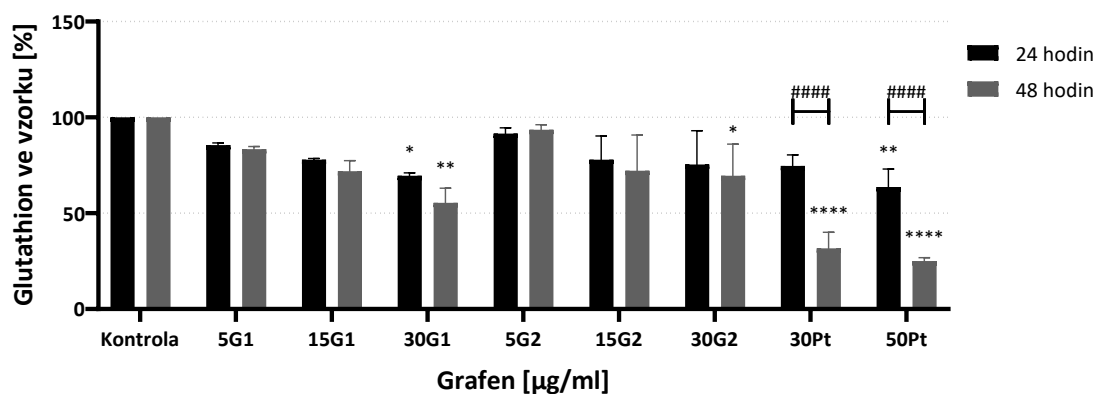
Glutathion inkubace 48h



Graf 12

Procentuální zastoupení redukované formy glutathionu (GSH) po 24 hodinové inkubaci lidských fibroblastů s grafenovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám * p < 0,05, ** p < 0,01, **** p < 0,0001.

Porovnání vlivu doby inkubace



Graf 13

Porovnání vlivu doby inkubace lidských fibroblastů s grafenovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný rozdíl mezi dvěma inkubačními časy v rámci jedné koncentrace ##### p < 0,0001.

5.2. STANOVENÍ CELKOVÉHO A OXIDOVANÉHO GLUTATHIONU POMOCÍ ENZYMATICKÉ RECYKLAČNÍ REAKCE

5.2.1. OPTIMALIZACE METODY

5.2.1.1. PŘÍPRAVA BUNĚČNÉHO LYZÁTU

Před stanovením celkového a oxidovaného (GSSG) glutathionu pomocí enzymatické recyklační reakce, byla optimalizována metoda přípravy buněčného lyzátu, kdy byly testovány čtyři způsoby přípravy (kapitola 4.4.1.).

Tabulka 20

Hodnoty směrníc výsledných koncentrací celkového tGSH a oxidovaného GSSG s přidavkem derivatizačního činidla 2-VP.

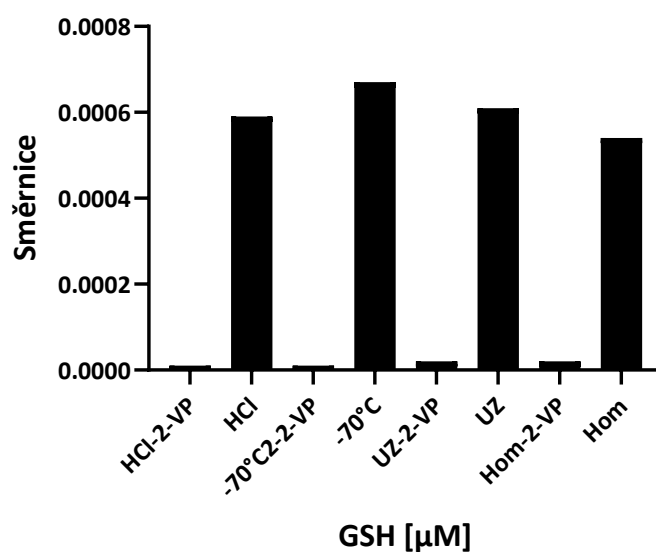
	HCl-VP	HCl	-70 °C- VP	-70 °C	UZ-VP	UZ	Hom- VP	Hom
Směrnice	0,00001	0,00059	0,00001	0,00067	0,00002	0,00061	0,00002	0,00054

Tabulka 21

Hodnoty glutathionu [μM] pro jednotlivé způsoby přípravy buněčného lyzátu.

	HCl [μM]	-70 °C [μM]	Ultrazvuk (UZ) [μM]	Homogenizace (Hom) [μM]
Celkový	3,605	4,123	3,703	3,277
Oxidovaný	0,147	0,124	0,172	0,233
Redukovaný	3,312	3,875	3,358	2,810
%oxidovaného	4,07	3,01	4,65	7,12

Vzorky tGSH/GSSH



Graf 14

Sloupcový graf závislosti směrnice na výsledné koncentraci celkového tGSH a oxidovaného GSSG s přidavkem derivatizačního činidla 2-VP.

Z grafu 8 a tabulek 17 a 18 bylo patrné, že příprava buněčného lyzátu pomocí opakovaného zmrazení vzorku při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ byla vyhodnocena jako nejvhodnější. Ačkoliv výtěžek bílkoviny pro tuto metodu nebyl z testovaných metod nejvyšší, byla zvolena pro nejnižší poměr GSSG/GSH.

5.2.2. STANOVENÍ GLUTATHIONU V BUŇKÁCH OVLIVNĚNÝCH TITANOVÝMI NANOČÁSTICEMI

Pro ovlivnění buněk HDFn byly použity tři různé formy titanových nanočástic (kapitola 4.1.2.2.), dále značené jako **S** (Anatase/Rutile, $\sim 27\text{ nm}$), **E** (Anatase/Rutile, $20\text{-}30\text{ nm}$) a **T** (Anatase, $4\text{-}6\text{ nm}$) o koncentracích 10 a $100\text{ }\mu\text{g/ml}$. Buňky byly inkubovány po dobu 24 a 48 hodin.

Koncentrace celkového tGSH a oxidovaného glutathionu GSSG ve vzorku byla stanovena z kalibrační křivky (kapitola 4.6.). Koncentrace redukovaného GSH byla vypočtena odečtením hladiny GSSG od hladiny celkového glutathionu ($\text{GSH} = \text{tGSH} - 2 \times \text{GSSG}$).

Byla provedena statistická analýza pomocí jednocestné analýzy rozptylu one-way ANOVA, kdy nebyly pozorovány signifikantní statistické poklesy oproti kontrolám mezi jednotlivými formami a koncentracemi použitých titanových nanočástic. Signifikantní statistický pokles byl pozorován pouze u HDFn ovlivněných 50 μ M roztokem ciplatiny jako pozitivní kontrola, a to u obou testovaných dob inkubace (graf 15 a 16).

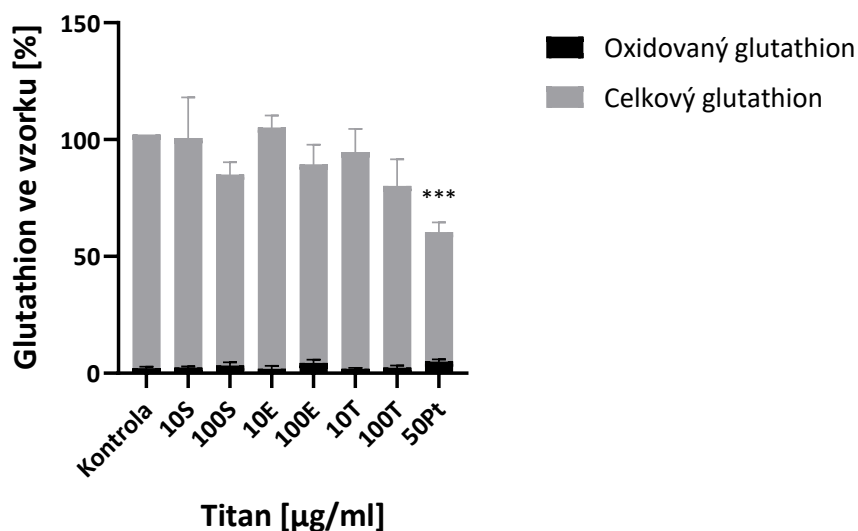
Pomocí testu dvoucestné analýzy rozptylu two-way ANOVA byly porovnány vlivy doby inkubace (graf 17). Téměř u všech buněk, s výjimkou buněk ovlivněných nanočásticemi značenými S při koncentraci 10 μ g/ml, došlo po 48 hodinách k adaptaci na oxidační stres působený titanovými nanočásticemi a vzrostlo procentuální zastoupení redukovaného glutathionu.

Tabulka 22

Průměrné hodnoty experimentálně naměřených hodnot glutathionu získaných ze tří nezávislých experimentů a dopočítaných hodnot redukovaného glutathionu po 24 hodinové inkubaci buněk HDFn s titanovými nanočásticemi. Experimentálně získaná data byla vyjádřena jako procento kontroly (100 %).

	K	10E	100E	10S	100S	10T	100T	50Pt
Oxidovaný glutathion	2,16	1,97	4,47	2,43	3,25	1,89	2,48	5,07
Redukovaný glutathion	97,84	101,19	80,49	95,84	78,62	90,93	75,24	50,32 ***

Glutathion inkubace 24h



Graf 15

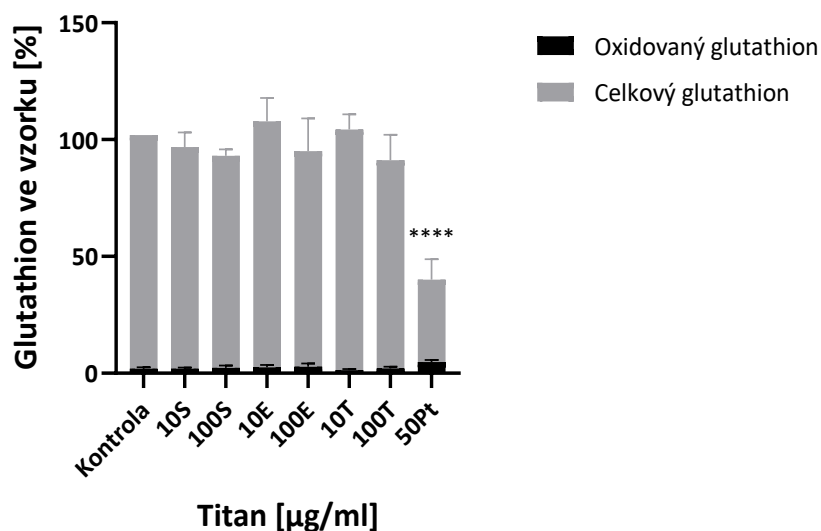
Procentuální zastoupení redukované formy glutathionu (GSH) po 48 hodinové inkubaci lidských fibroblastů s titanovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám ** p < 0,01.

Tabulka 23

Průměrné hodnoty experimentálně naměřených hodnot glutathionu získaných ze tří nezávislých experimentů a dopočítaných hodnot redukovaného glutathionu po 48 hodinové inkubaci buněk HDFn s titanovými nanočásticemi. Experimentálně získaná data byla vyjádřena jako procento kontroly (100 %).

	K	10E	100E	10S	100S	10T	100T	50Pt
Oxidovaný glutathion	1,92	2,54	2,78	1,92	2,33	1,37	2,08	4,85
Redukovaný glutathion	98,08	102,70	89,47	93,02	88,36	101,61	87,00	30,37 ****

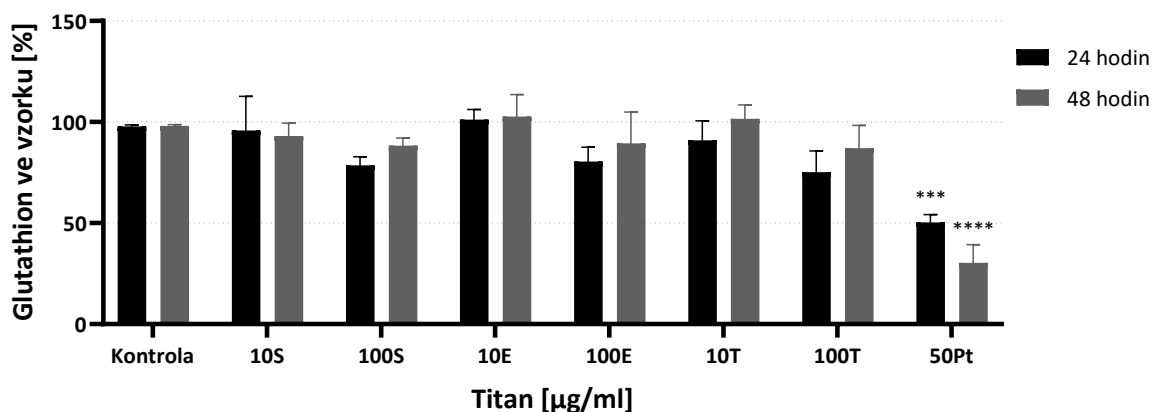
Glutathion inkubace 48h



Graf 16

Procentuální zastoupení redukované formy glutathionu (GSH) po 48 hodinové inkubaci lidských fibroblastů s titanovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám **** $p < 0,0001$.

Porovnání vlivu doby inkubace



Graf 17

Porovnání vlivu doby inkubace lidských fibroblastů s titanovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů.

5.2.3. STANOVENÍ GLUTATHIONU V BUŇKÁCH OVLIVNĚNÝCH GRAFENOVÝMI NANOČÁSTICEMI

Pro ovlivnění buněk HDFn byly použity dvě různé formy grafenových nanočástic (kapitola 4.1.2.1.), dále značené jako **G1** (nemodifikované grafenové částice, laterální velikost 80-300 nm) a **G2** (nemodifikované grafenové částice, laterální velikost 250-400 nm) o koncentracích 5, 15 a 30 µg/ml. Buňky byly inkubovány po dobu 24 a 48 hodin.

Koncentrace celkového tGSH a oxidovaného glutathionu GSSG ve vzorku byla stanovena z kalibrační křivky (kapitola 4.6.). Koncentrace redukovaného GSH byla vypočtena odečtením hladiny GSSG od hladiny celkového glutathionu ($GSH = tGSH - 2 \times GSSG$).

Byla provedena statistická analýza pomocí jednocestné analýzy rozptylu one-way ANOVA, kdy byly pozorovány signifikantní statistické poklesy oproti kontrolám u HDFn ovlivněných grafenovými nanočásticemi značenými G1 při koncentracích 15 a 30 µg/ml po 24 hodinové inkubaci a u nanočástic značených jako G2 pro nejvyšší použitou koncentraci 30 µg/ml (graf 18). Po 48 hodinové inkubaci byly pozorovány signifikantní statistické poklesy u HDFn ovlivněných nanočásticemi G1 opět pro koncentraci 15 a 30 µg/ml a G2 pro koncentraci 30 µg/ml (graf 19). Signifikantní statistický pokles byl pozorován i u HDFn ovlivněných 50 µM roztokem ciplatiny jako pozitivní kontrola, a to u obou testovaných dob inkubace (graf 18 a 19).

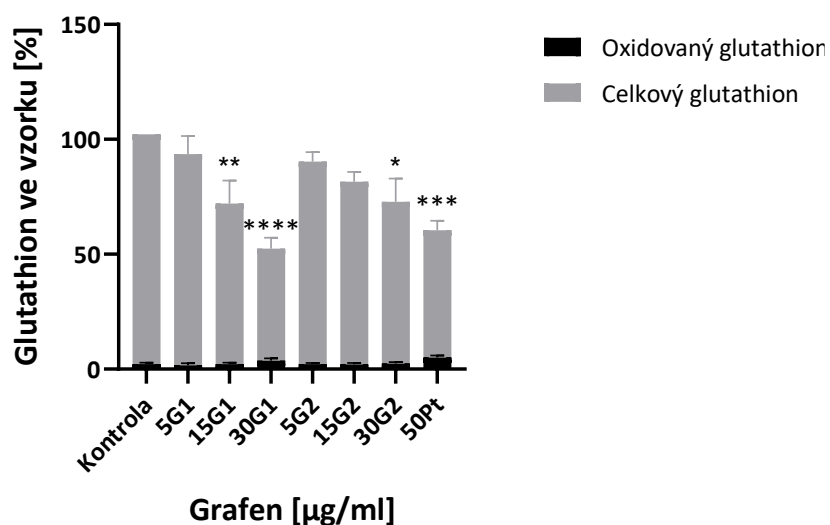
Pomocí testu dvoucestné analýzy rozptylu two-way ANOVA byly porovnány vlivy doby inkubace (graf 20). Téměř u všech buněk, s výjimkou buněk ovlivněných nanočásticemi značenými G1 při koncentraci 30 µg/ml, došlo po 48 hodinách k dalšímu poklesu procentuálního zastoupení redukovaného glutathionu.

Tabulka 24

Průměrné hodnoty experimentálně naměřených a dopočítaných hodnot glutathionu po 24 hodinové inkubaci lidských fibroblastů s grafenovými nanočásticemi.

	K	5G1	15G1	30G1	5G2	15G2	30G2	50Pt
Oxidovaný glutathion	2,16	1,67	2,20	3,67	2,20	2,09	2,49	5,07
Redukovaný glutathion	97,84	90,18	67,73 **	45,05 ****	85,89	77,37	67,88 *	50,32 ***

Glutathion inkubace 24 h



Graf 18

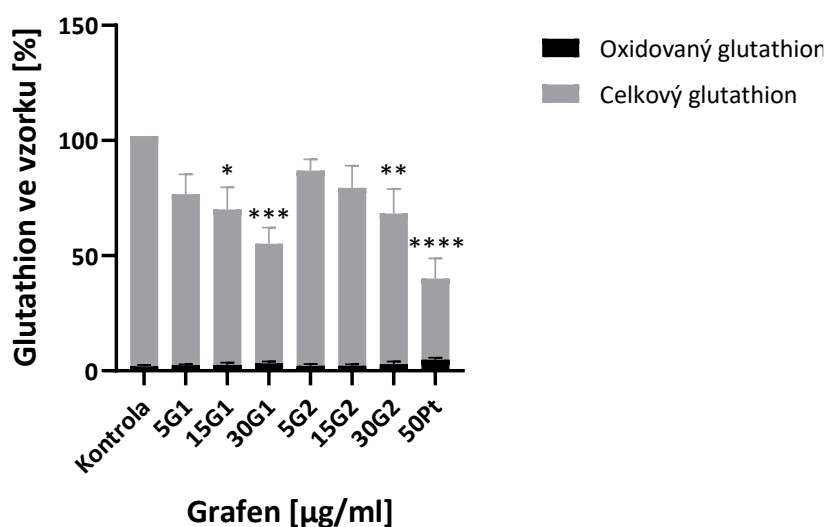
Procentuální zastoupení redukované formy glutathionu (GSH) po 24 hodinové inkubaci lidských fibroblastů s grafenovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

Tabulka 25

Průměrné hodnoty experimentálně naměřených a dopočítaných hodnot glutathionu po 24 hodinové inkubaci lidských fibroblastů s grafenovými nanočásticemi.

	K	5G1	15G1	30G1	5G2	15G2	30G2	50Pt
Oxidovaný glutathion	1,92	2,43	2,59	3,32	2,21	2,23	2,92	4,85
Redukovaný glutathion	98,08	71,79	64,93 *	48,58 ***	82,51	74,96	62,41 **	30,37 ****

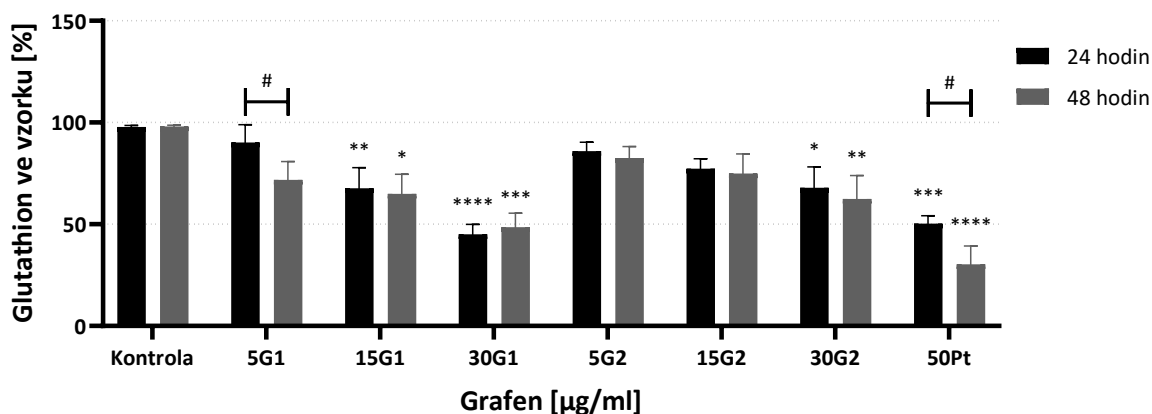
Glutathion inkubace 48h



Graf 19

Procentuální zastoupení redukované formy glutathionu (GSH) po 24 hodinové inkubaci lidských fibroblastů s grafenovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

Porovnání vlivu doby inkubace



Graf 20

Porovnání vlivu doby inkubace lidských fibroblastů s grafenovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný rozdíl mezi dvěma inkubačními časy v rámci jedné koncentrace # p < 0,05.

5.3. POROVNÁNÍ TESTOVANÝCH METOD

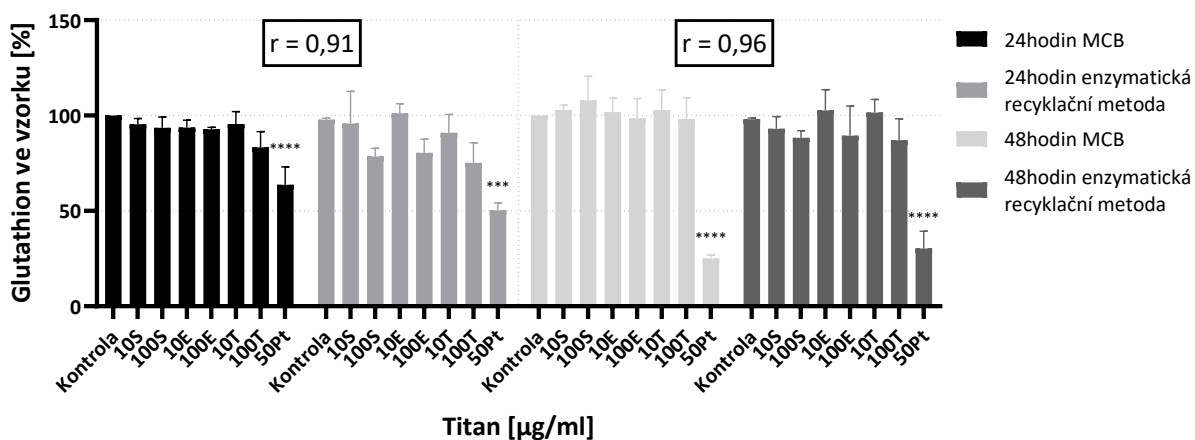
Testované metody byly na závěr vzájemně porovnány. Korelační koeficient mezi testy MCB a enzymatickou recyklační metodou byl vypočten po analýze podobných vzorků, pomocí párového t-testu. Získané výsledky byly vyjádřeny jako % kontrol redukovaného GSH v testovaných HDFn.

Byla zjištěna velmi silná korelace mezi metodami pro obě doby inkubace s nanočásticemi. Metody MCB a enzymatická recyklační metoda poskytují srovnatelné výsledky koncentrace redukovaného GSH v testovaných HDFn.

5.3.1. POROVNÁNÍ PRO TITANOVÉ NANOČÁSTICE

Korelační koeficient mezi MCB a enzymatické recyklační metody pro inkubace HDFn titanovými nanočásticemi po dobu 24 hodin byl stanoven na hodnotu **0,91** a **0,96** pro dobu inkubace 48 hodin.

Provnání metod MCB a enzymatické recyklační metody pro vzorky buněk ovlivněné titanovými nanočásticemi



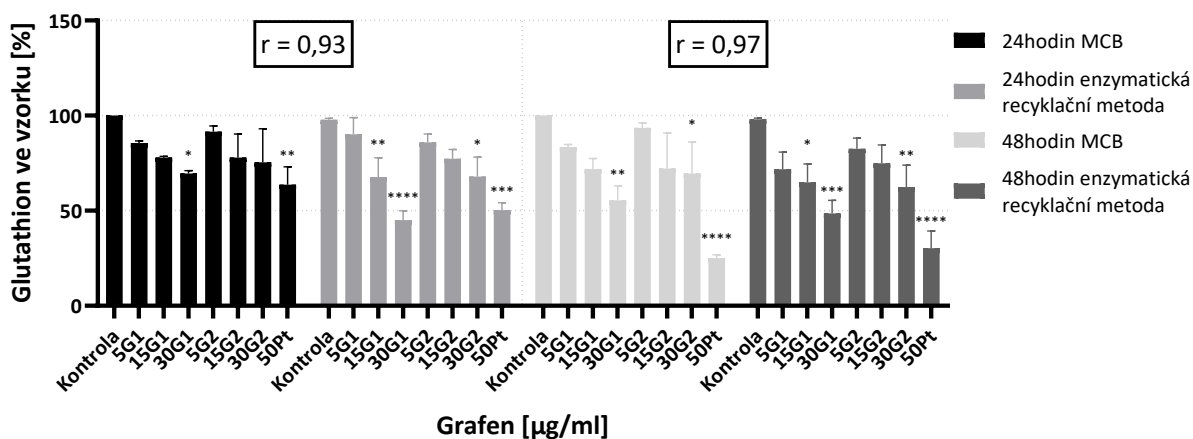
Graf 21

Porovnání metod MCB a enzymatické recyklační metody pro vzorky HDFn, ovlivněných třemi formami titanových nanočástic (kapitola 4.1.2.2) po dobu expozice 24 a 48 hodin. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám ***p < 0,001, **** p < 0,0001. Korelační koeficient mezi testy MCB a enzymatickou recyklační metodou byl vypočten po analýze podobných vzorků, pomocí párového t-testu.

5.3.2. POROVNÁNÍ PRO GRAFENOVÉ NANOČÁSTICE

Korelační koeficient mezi MCB a enzymatické recyklační metody pro inkubace HDFn grafenovými nanočásticemi po dobu 24 hodin byl stanoven na hodnotu **0,93** a **0,97** pro dobu inkubace 48 hodin.

Provnání metod MCB a enzymatické recyklační metody pro vzorky buněk ovlivněné grafenovými nanočásticemi



Graf 22

Porovnání metod MCB a enzymatické recyklační metody pro vzorky HDFn, ovlivněných dvěma formami grafenových nanočástic (kapitola 4.1.2.1) po dobu expozice 24 a 48 hodin. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám * p < 0,05, ** p < 0,01, ***p < 0,001, **** p < 0,0001. Korelační koeficient mezi testy MCB a enzymatickou recyklační metodou byl vypočten po analýze podobných vzorků, pomocí párového t-testu.

6 DISKUSE

Prvním předmětem této diskuse je porovnání použitých metod a možná interpretace získaných výsledků. V této práci byly využity dvě zavedené metody pro stanovení glutathionu v kultivovaných HDFn buňkách. Jedním z cílů této práce bylo zjistit, zda metody stanovení GSH pomocí monochlorobimanu a enzymatické recyklační metody poskytují srovnatelné výsledky.

V současné literatuře nejsou dostupné studie, které by porovnávaly konkrétně tyto dvě metody. Čapek et al. ve své studii použili pro porovnání výsledků GSH naměřených metodou MCB optimalizovaný fluorometrický glutathionový test odvozený od ortho-ftalaldehydu (OPA). Pro obě metody prokázali velmi dobrou korelaci ($r = 0,96$) (Čapek et al., 2017). Porovnání této metody s metodou využívající MCB zvolili na základě studie Roušara et al. V této studii byla prokázána silná korelace mezi glutathionovým testem odvozeným od OPA a enzymatickou recyklační metodou ($r = 0,99$) (Roušar et al., 2012).

Z našich experimentálně získaných výsledků vyplývá, že korelace mezi použitými metodami je silná pro obě doby inkubace buněk s titanovými a grafenovými nanočásticemi. Výsledky získané pomocí enzymatické recyklační metody ukázaly nižší hodnoty GSH ve srovnání s MCB metodou.

Jako možný zdroj chyb v naší práci lze uvést volba 2-VP jako maskovacího činidla GSH. Přesto že je použití 2-VP v současné době preferováno před maskováním N-ethylmaleinimidem, není úplně bezproblémové. 2-VP je velice pomalý reaktant a jeho použití může vést k uměle vysokým hodnotám GSSG v důsledku autooxidace během reakce. McGill a Jaeschke ve své studii porovnávali hodnoty oxidovaného glutathionu za použití maskovacích činidel 2-VP a NEM. Prokázali, že použití NEM ve spojení s jednoduchým postupem extrakce na tuhé fázi vydává nižší hladiny GSSG než více preferovaný 2-VP (McGill, Jaeschke, 2015). Giustarini et al. ve své studii porovnávali hladiny GSSG ve zdravých játrech a zjistili, že procento GSH + GSSG ve formě GSSG ve vzorku je mnohem nižší při optimalizovaném použití NEM, což poukazuje na skutečnost, že prodloužená reakční doba 2-VP s GSH vede k oxidaci nezreagovaného GSH (Giustarini et al., 2016).

Dalším zdrojem chyb spojeným s 2-VP je preanalytická příprava buněk. 2-VP na rozdíl od NEM neproniká buněčnými membránami, proto je nutné provést lýzu buněk. Lýza buněk se provádí okyselením, které opět může vést k navýšení hladin GSSG (McGill, Jaeschke, 2015). Metoda MCB, jak již bylo uvedeno, je vhodná pro stanovení

hladin GSH v intaktních buňkách a nevyžaduje preanalytickou úpravu vzorku, čímž je možné zabránit pravděpodobné oxidaci GSH po lýze buněk (Čapek *et al.* 2017).

Druhým předmětem této diskuse je vliv titanových nanočástic na hladiny glutathionu v porovnání s našimi výsledky. Pro srovnání byly použity studie prováděné na různých typech lidských buněk, a to z důvodu nedostatku novodobých studií, které by se věnovaly stanovení hladin glutathionu na námi použitých dermálních fibroblastech.

Pro měření míry oxidativního stresu na lidských HDFn buňkách jsme zvolili nanočástice na bázi TiO₂ a zároveň jsme testovali buňky ovlivněné nemodifikovanými grafenovými plátky. Zvolili jsme dva typy nanočástic TiO₂ P25 o přibližně stejné velikosti 27 a 20-30 nm, které jsou krystalickou směsí anatasu a rutilu, a jeden typ čistě anatasových nanočástic o velikosti 4-6 nm. HDFn buňky jsme inkubovali s TiO₂ o koncentraci 1, 10 a 100 µg/ml pro stanovení intracelulárního GSH optimalizovanou metodou MCB (Čapek *et al.*, 2017). Tuto metodu využili ve svých studiích i další autoři jako referenční test k jiným testům testování cytotoxicity TiO₂ (Báčová *et al.*, 2022; Jelínková, 2022). Výsledky jsme vztahovali ke kontrolním neovlivněným buňkám. Pro stanovení enzymatickou recyklační metodou byly buňky ovlivněny nanočásticemi o koncentraci 10 a 100 µg/ml.

Některé studie udávají vyšší toxicitu pro anatasové částice v porovnání s rutilovými. Například Wilson *et al.* ve své studii na astrocytech porovnávali toxicitu anatasových a rutilových nanočástic. Pozorovali na koncentraci a typu závislý nárůst produkce ROS a tím i zvýšenou míru oxidačního stresu vyvolanou anatasem (Wilson *et al.*, 2015). V naší práci jsme nepozorovali žádný signifikantní rozdíl mezi složením použitých titanových nanočástic na míru oxidačního stresu vyvolanou snížením koncentrace glutathionu. Naopak, po 48 hodinách buňky ovlivněné čistě anatasovými nanočásticemi vykazovaly nejlepší adaptaci na oxidační stres a nárůst hladiny glutathionu.

Rozdílem mezi krystalickou strukturou se zabývali Sweeney *et al.*, kteří porovnávali vliv dvou anatasových a dvou rutilových forem titanových nanočástic na lidské alveolární epitelální buňky typu I. Buňky byly vystaveny koncentracím 0,5-100 µg/ml po dobu 2, 6 a 24 hodin pro všechny testované nanočástice. Pro čistý anatas zaznamenali zvýšený nárůst GSSG již po dvou hodinách, kdežto po 24 hodinách koncentrace oxidovaného glutathionu prudce klesla. Čistý rutil měl obrácený trend a nejvyšší koncentraci GSSG vykazoval až po 24 hodinách (Sweeney *et al.*, 2015). V naší práci nebyla zjištěna spojitost mezi krystalovou strukturou titanových nanočástic a dobou inkubace.

Pozorovali jsme závislost koncentrace TiO_2 na koncentraci GSH. Pro nejvyšší koncentraci titanových nanočástic 100 $\mu\text{g/ml}$, byla pozorována nejnižší hladina GSH, a to pro všechny testované formy. Přesto tato závislost nebyla významná v porovnání s neovlivněnými buňkami. To se shoduje se studií Báčové et al. (Báčová et al., 2022). Koncentrační závislost ve své studii hodnotili i Assadian et al., kteří inkubovali lidské lymfocyty s TiO_2 o koncentracích 80, 160 a 320 $\mu\text{g/ml}$ a měřili koncentrace GSH a GSSG po 2, 4 a 6 hodinách. Pro nejvyšší koncentraci titanových nanočástic pozorovali nejvyšší úbytek koncentrace GSH v závislosti na čase. Nejvyšší nárůst GSSG byl pozorován po 4 hodinách pro koncentraci 160 $\mu\text{g/ml}$ (Assadian et al., 2023).

Chen et al. ve své studii inkubovali lidské normální bronchiální epitelální buňky s TiO_2 o koncentracích 25, 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$. Po 24 hodinách byl naměřen statisticky významný pokles poměru GSH/GSSG pro koncentrace 25 a 100 $\mu\text{g/ml}$. (Chen et al., 2022)

Závislost koncentrace TiO_2 na snížení koncentrace GSH pravděpodobně souvisí s tvorbou agregátů při vyšších koncentracích. Této problematice se věnovali Murugadoss et al, kteří prokázali snížení hladin glutathionu v závislosti na koncentraci TiO_2 a tendenci nanočástic tvořit agregáty. Test prováděli na buněčné linii THP-1 při koncentracích 4-256 $\mu\text{g/ml}$. (Murugadoss et al. 2020).

Posledním předmětem diskuse je vliv nanočástic z rodiny grafenu na hladiny glutathionu, kde je třeba brát v úvahu různé vlastnosti jednotlivých forem grafenu. Diskutované studie se opět zabývají různými typy ovlivňovaných buněk.

Pro referenční stanovení jsme zvolili dva typy nemodifikovaných grafenových plátků o různých laterálních velikostech 80-300 a 250-400 nm. HDFn buňky jsme inkubovali grafenovými nanočásticemi o koncentracích 5, 15 a 30 $\mu\text{g/ml}$. Tyto koncentrace byly použity pro obě metody stanovení.

Vliv grafenových nanočástic na koncentrace GSH pro léčebné účely studovali Ma et al. Ti inkubovali více druhů rakovinných buněk s nanočásticemi GO. Prokázali oxidaci GSH oxidem grafenu na GSSG, čímž došlo ke snížení poměru GSH/GSSG. Dále byl pozorován nárůst koncentrace ROS, což po 48 hodinách vedlo ke snížení životaschopnosti a proliferace buněk (Ma et al. 2021). V naší práci jsme pozorovali výrazné snížení hladin GSH po 48 hodinách inkubace.

K léčebným účelům byly testovány i nanočástice modifikovaného rGO a jejich účinek na rakovinné buňky. Ma et al. ve své další studii modifikovali rGO oxidem

manganičitým a opět prokázali signifikantní snížení hladin GSH doprovázený nárůstem ROS. (*Ma et al., 2021b*)

Vysoké koncentrace grafenových nanočástic využívali ve své studii Imarah et al., kteří sledovali vliv nanočástic GO na lidské epitelální prsní buňky. Buňky inkubovali s 250, 500 a 750 $\mu\text{g/ml}$ a prokázali signifikantní snížení glutathionu oproti kontrole u všech uvedených koncentrací nanočástic a významné cytotoxické a apoptotické účinky. (*Imarah et al, 2023*)

Opačný trend uvádí Tasdemir et al. Jejich studie se zabývala vlivem grafenových nanočástic o různé povrchové velikosti (150 a 750 m^2/g) v různých koncentracích (400-3125 $\mu\text{g/ml}$) na dopaminergních neuronových modelových buňkách. Obě velikosti grafenu prokázaly zvýšenou životaschopnost buněk při klesajících koncentracích. Naměřené hodnoty glutathionu vzrostly během prvních 24 a 48 hodin u obou typů grafenu, čímž prokazují antioxidační účinky grafenu. (*Tasdemir et al., 2023*)

V naší práci jsme pozorovali vliv velikosti a koncentrace grafenových nanočástic na koncentraci glutathionu. Signifikantní rozdíl v koncentraci GSH oproti kontrole vykazovaly nanočástice o laterální velikosti 80-300 nm při nejvyšší testované koncentraci 30 $\mu\text{g/ml}$. Ke stejným výsledkům dospěli i Málková et al. Ve své studii na lidské THP-1 buněčné linii. Testovali stejné nemodifikované grafenové plátky o dvou laterálních velikostech o koncentracích 5, 30 a 60 $\mu\text{g/ml}$. Po inkubační době 40 hodin měřili hladiny GSH a prokázali signifikantní snížení oproti kontrole pouze u menších nanočástic a koncentrací 30 a 60 $\mu\text{g/ml}$ (*Málková et al. 2021*).

Jelikož se výsledky jednotlivých studií značně rozcházejí, je nutné vlivy grafenových a titanových nanočástic na lidské buňky dále studovat.

7 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo stanovit míru oxidačního stresu v lidských fibroblastech po expozici titanovými a grafenovými nanočásticemi. Stanovení oxidačního stresu bylo provedeno využitím dvou optimalizovaných metod, a to měřením koncentrace glutathionu pomocí monochlorobimanu a stanovením celkového a oxidovaného glutathionu pomocí enzymatické recyklační reakce.

Na základě provedených experimentů byly získané výsledky shrnuty do následujících bodů:

1. Metody stanovení glutathionu byly pro účely této diplomové práce optimalizovány.
2. Párovým t-testem byl vypočítán korelační koeficient pro obě testované doby inkubace HDFn s titanovými a grafenovými nanočásticemi. Byla zjištěna velmi silná korelace mezi metodami MCB a enzymatickou recyklační metodou, tudíž optimalizované metody poskytují srovnatelné výsledky koncentrace redukovaného GSH v testovaných HDFn.
3. Testem dvojcestné analýzy rozptylu byla provedena statistická analýza porovnávací vliv doby inkubace HDFn ovlivněných titanovými a grafenovými nanočásticemi. Bylo zjištěno, že HDFn se zvládly po 48 hodinách inkubace adaptovat na oxidační stres způsobený titanovými nanočásticemi, což mělo za následek nárůst koncentrace redukovaného glutathionu. Naopak u HDFn ovlivněných grafenovými nanočásticemi došlo po 48 hodinách ke snížení koncentrace redukovaného glutathionu.
4. U HDFn exponovaných titanovými nanočásticemi nebyl sledován signifikantní statistický rozdíl mezi použitou formou nanočástic TiO_2 .
5. U HDFn exponovaných grafenovými nanočásticemi byl sledován signifikantní statistický rozdíl mezi použitou formou nanočástic. Snížení koncentrace redukovaného glutathionu, u buněk ovlivněných G1 (nemodifikované grafenové plátky, laterální velikost 80-300 nm), koreluje s mírou oxidačního stresu.

8 POUŽITÉ ZKRATKY

2-VP	2-vinylpyridin
BCA	bicinchoninová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin
cisPt	cisplatina
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EtOH	ethanol
GFNs	grafenové nanočástice
GO	oxid grafenu
GPx	glutathionperoxidáza
GR	glutathionreduktáza
GSH	glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion, glutathiondisulfid
GST	glutathion-S-transferáza
HCl	kyselina chlorovodíková
HDFn	human dermal fibroblast (neonatal)
LDH	laktátdehydrogenáza
MCB	monochlorbiman
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NEM	N-ethylmaleinimid
OPA	ortho-ftalaldehyd
ROS	reaktivní formy kyslíku
SAA	5-sulfosalicylová kyselina
SD	průměrná směrodatná odchylka
tGSH	celkový glutathion
TiO ₂	oxid titaničitý/titanové nanočástice

9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Přehled reaktivních forem kyslíku.....	12
Tabulka 2 Přehled hlavních antioxidačních enzymů organismu.....	13
Tabulka 3 Přehled nejdůležitějších funkcí GSH v organismu (upraveno podle Nýdlová, et al., 2014).....	16
Tabulka 4 Ředění suspenze grafenových nanočástic o koncentraci 250 µg/ml pro ovlivnění 16 jamek	32
Tabulka 5 Ředění suspenze titanových nanočástic o koncentraci 1 mg/ml pro ovlivnění 16 jamek.	33
Tabulka 6 Podmínky spektrofotometrického stanovení GSH pomocí MCB.	33
Tabulka 7 Ředění suspenze grafenových nanočástic o koncentraci 250 µg/ml pro ovlivnění buněk na přípravu buněčného lyzátu.....	35
Tabulka 8 Ředění suspenze titanových nanočástic o koncentraci 1 mg/ml pro ovlivnění buněk na přípravu buněčného lyzátu.....	35
Tabulka 9 Ředění roztoků pro stanovení kalibrační křivky pro BCA měření koncentrace proteinů	37
Tabulka 10 Naměřené hodnoty absorbance, které byly použity k sestavení kalibrační křivky (graf 1), pro odečet koncentraci proteinu [µg/ml] ve vzorku buněčného lyzátu... 37	37
Tabulka 11 Ředění roztoků pro stanovení kalibrační křivky GSSG (0-5 µM)	39
Tabulka 12 Ředění roztoků pro stanovení kalibrační křivky GSH (0-20 µM).....	39
Tabulka 13 Podmínky stanovení GSH/GSSG pomocí enzymatické recyklační reakce40	40
Tabulka 14 Hodnoty směrnice pozitivní a negativní kontroly pro stanovení optimální koncentrace MCB v rozsahu 0-50 µM.....	43
Tabulka 15 Hodnoty směrnice pozitivní a negativní kontroly pro časy 0-3600 s a přepočítané směrnice pro časy 1800-3600 s pro koncentrace výsledné 0-50 µM MCB.	45
Tabulka 16 Hodnoty procentuálního zastoupení redukováného GSH po 24 hodinové inkubaci HDFn s titanovými nanočásticemi. Experimentálně získaná data byla vyjádřena jako procento kontroly (100 %) a byla dopočítána průměrná směrodatná odchylka (±SD) ze tří nezávislých experimentů.	47
Tabulka 17 Hodnoty procentuálního zastoupení redukováného GSH po 48 hodinové inkubaci HDFn s titanovými nanočásticemi. Experimentálně získaná data byla vyjádřena jako procento kontroly (100 %) a byla dopočítána průměrná směrodatná odchylka (±SD) ze tří nezávislých experimentů.	49
Tabulka 18 Hodnoty procentuálního zastoupení redukováného GSH po 24 hodinové inkubaci HDFn s grafenovými nanočásticemi. Experimentálně získaná data byla vyjádřena jako procento kontroly (100 %) a byla dopočítána průměrná směrodatná odchylka (±SD) ze tří nezávislých experimentů.	52
Tabulka 19	53
Tabulka 20 Hodnoty směrnice výsledných koncentrací celkového tGSH a oxidovaného GSSG s přidavkem derivatizačního činidla 2-VP.	55
Tabulka 21 Hodnoty glutathionu [µM] pro jednotlivé způsoby přípravy buněčného lyzátu.....	55
Tabulka 22 Průměrné hodnoty experimentálně naměřených hodnot glutathionu získaných ze tří nezávislých experimentů a dopočítaných hodnot rekukovaného glutathionu po 24 hodinové inkubaci buněk HDFn s titanovými nanočásticemi. Experimentálně získaná data byla vyjádřena jako procento kontroly (100 %).	57
Tabulka 23 Průměrné hodnoty experimentálně naměřených hodnot glutathionu získaných ze tří nezávislých experimentů a dopočítaných hodnot rekukovaného	

glutathionu po 48 hodinové inkubaci buněk HDFn s titanovými nanočásticemi. Experimentálně získaná data byla vyjádřena jako procento kontroly (100 %).	58
Tabulka 24 Průměrné hodnoty experimentálně naměřených a dopočítaných hodnot glutathionu po 24 hodinové inkubaci lidských fibroblastů s grafenovými nanočásticemi.	60
Tabulka 25 Průměrné hodnoty experimentálně naměřených a dopočítaných hodnot glutathionu po 24 hodinové inkubaci lidských fibroblastů s grafenovými nanočásticemi.	61

10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Chemická struktura glutathionu: (a) GSH – redukovaná forma; (b) GSSG – oxidovaná forma (Nýdlová, et al., 2014)	15
Obrázek 2 Molekulární struktura nefluorescenčního monochlorobimanu a jeho reakce s glutathionem (GSH) za vzniku fluorescenčního aduktu biman-glutathionu (GS-biman) (Davidová, 2018).....	17
Obrázek 3 Mechanismus metody GSH recyklace (DTNB – kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová, TNB – kyselina 2-nitro-5-thiobenzoová, GR – glutathionreduktáza, GSH – glutathion, GSSG – glutathiondisulfid, GS-TNB – glutathionový adukt TNB, NADPH – nikotinamid adenindinukleotid fosfát). (Kubát, et al. 2024)	18
Obrázek 4 Uhlíkaté nanomateriály různých rozměrů (Liao et al., 2018)	22
Obrázek 5 Schématický diagram ukazuje možné mechanismy cytotoxicity grafenů. GFN se dostávají do buněk různými cestami, které vyvolávají tvorbu ROS, zvýšení LDH a MDA a uvolňování Ca^{2+} . Následně GFN způsobují druhy poškození buněk, například poškození buněčné membrány, zánět, poškození DNA, mitochondriální poruchy, apoptózu nebo nekrózu. (OU, et al., 2016)	25
Obrázek 6 Mechanismy nanotoxicity na buněčné úrovni (SHA, et al., 2015).....	26

11 SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Kalibrační přímka pro BCA měření koncentrace proteinu (lineární v rozsahu 0–1000 µg/ml proteinu).....	38
Graf 2 Kalibrační křivka pro výpočet celkového glutathionu ve vzorku buněčného lyzátu. Sestrojená jako závislost směrnice na koncentraci tGSH [µM].	40
Graf 3 Kalibrační křivka pro výpočet oxidované formy glutathionu GSSG ve vzorku buněčného lyzátu. Sestrojená jako závislost směrnice na koncentraci GSSG [µM].	41
Graf 4 Kalibrační křivka oxidované formy glutathionu GSSG s přidavkem derivatizačního činidla 2-VP. Sestrojená jako závislost směrnice na koncentraci GSSG-2-VP [µM].	41
Graf 5 Závislost fluorescence ovlivněných buněk s roztokem 0-50 µM MCB na čase. Kinetika reakce byla měřena podle podmínek uvedených v tabulce 3 (kapitola 4.3.)...44	44
Graf 6 Závislost fluorescence na čase pro koncentrace výsledné 0-50 µM MCB, kde vzorek buněk byl ovlivněn 50 µM cisplatinou – pozitivní kontrola.....	45
Graf 7 Závislost fluorescence na čase pro koncentrace výsledné 0-50 µM MCB, kde vzorek neovlivněných buněk – negativní kontrola.....	46
Graf 8 Procentuální zastoupení redukované formy glutathionu (GSH) po 24 hodinové inkubaci lidských fibroblastů s titanovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám ** p <0,01, **** p <0,0001 byl pozorován pouze u HDFn ovlivněných cisplatinou jako pozitivní kontrolou.....	48
Graf 9 Procentuální zastoupení redukované formy glutathionu (GSH) po 48 hodinové inkubaci lidských fibroblastů s titanovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám **** p <0,0001 byl pozorován pouze u HDFn ovlivněných cisplatinou jako pozitivní kontrolou.....	50
Graf 10 Porovnání vlivu doby inkubace buněk HDFn s titanovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů (hodnoty jsou uvedeny v tabulkách 13 a 14). Statisticky významný rozdíl mezi dvěma inkubačními časy v rámci jedné koncentrace ##### p <0,0001 byl pozorován pouze u HDFn ovlivněných cisplatinou jako pozitivní kontrolou.....	51
Graf 11 Procentuální zastoupení redukované formy glutathionu (GSH) po 24 hodinové inkubaci lidských fibroblastů s grafenovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám * p <0,05, ** p <0,01.	53
Graf 12 Procentuální zastoupení redukované formy glutathionu (GSH) po 24 hodinové inkubaci lidských fibroblastů s grafenovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám * p <0,05, ** p <0,01, **** p <0,0001.....	54
Graf 13 Porovnání vlivu doby inkubace lidských fibroblastů s grafenovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný rozdíl mezi dvěma inkubačními časy v rámci jedné koncentrace ##### p <0,0001.	54
Graf 14 Sloupcový graf závislosti směrnice na výsledné koncentraci celkového tGSH a oxidovaného GSSG s přidavkem derivatizačního činidla 2-VP.....	56
Graf 15 Procentuální zastoupení redukované formy glutathionu (GSH) po 48 hodinové inkubaci lidských fibroblastů s titanovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám ** p <0,01.....	58

Graf 16 Procentuální zastoupení redukované formy glutathionu (GSH) po 48 hodinové inkubaci lidských fibroblastů s titanovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám **** p <0,0001.	59
Graf 17 Porovnání vlivu doby inkubace lidských fibroblastů s titanovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů.	59
Graf 18 Procentuální zastoupení redukované formy glutathionu (GSH) po 24 hodinové inkubaci lidských fibroblastů s grafenovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám * p <0,05, ** p <0,01, ***p <0,001, **** p <0,0001.	61
Graf 19 Procentuální zastoupení redukované formy glutathionu (GSH) po 24 hodinové inkubaci lidských fibroblastů s grafenovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám p <0,05, ** p <0,01, ***p <0,001, **** p <0,0001.	62
Graf 20 Porovnání vlivu doby inkubace lidských fibroblastů s grafenovými nanočásticemi. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný rozdíl mezi dvěma inkubačními časy v rámci jedné koncentrace # p <0,05.	62
Graf 21 Porovnání metod MCB a enzymatické recyklační metody pro vzorky HDFn, ovlivněných třemi formami titanových nanočástic (kapitola 4.1.2.2) po dobu expozice 24 a 48 hodin. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám ***p <0,001, **** p <0,0001. Korelační koeficient mezi testy MCB a enzymatickou recyklační metodou byl vypočten po analýze podobných vzorků, pomocí párového t-testu.	63
Graf 22 Porovnání metod MCB a enzymatické recyklační metody pro vzorky HDFn, ovlivněných dvěma formami grafenových nanočástic (kapitola 4.1.2.1) po dobu expozice 24 a 48 hodin. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 µg/ml) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám * p <0,05, ** p <0,01, ***p <0,001, **** p <0,0001. Korelační koeficient mezi testy MCB a enzymatickou recyklační metodou byl vypočten po analýze podobných vzorků, pomocí párového t-testu.	64

12 POUŽITÁ LITERATURA

1. ALAGARSAMY, Keshav Narayan, et al. Carbon nanomaterials for cardiovascular theranostics: Promises and challenges. *Bioactive Materials*, 2021, 6.8: 2261-2280.
2. ASSADIAN, Evelyn, et al. Antioxidants and mitochondrial/lysosomal protective agents reverse toxicity induced by titanium dioxide nanoparticles on human lymphocytes. *Toxicology and Industrial Health*, **2023**, 39.10: 594-602.
3. AZQUETA, Amaya, and COLLINS, Andrew R. "The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair." *Archives of toxicology* 87 **2013**: 949-968.
4. BÁČOVÁ, Jana, et al. Evaluating the use of TiO₂ nanoparticles for toxicity testing in pulmonary A549 cells. *International Journal of Nanomedicine*, **2022**, 17: 4211.
5. BARANOWSKA-WÓJCIK, Ewa, et al. Effects of titanium dioxide nanoparticles exposure on human health—a review. *Biological trace element research*, **2020**, 193: 118-129.
6. BRICE, Laure; GIRARDET, Thomas; FLEUTOT, Solenne. Nanoparticles Toxicity and Biocompatibility Tests. **2020**.
7. ČAPEK, Jan, et al. Comparison of glutathione levels measured using optimized monochlorobimane assay with those from ortho-phthalaldehyde assay in intact cells. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, **2017**, 88: 40-45.
8. DAVIDOVÁ, Kateřina. Porovnání metod pro stanovení glutathionu v biologickém materiálu. **2018**.
9. DEMIRCI-CEKIC, Sema, et al. Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defense. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **2022**, 209: 114477.
10. DUANGHATHAIPORNSUK, Surachet, et al. Detection technologies for reactive oxygen species: fluorescence and electrochemical methods and their applications. *Biosensors*, **2021**, 11.2: 30.
11. FARD, Javad Khalili; JAFARI, Samira; EGHBAL, Mohammad Ali. A review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles. *Advanced pharmaceutical bulletin*, **2015**, 5.4: 447.
12. GEORGAKILAS, Vasilios, et al. Broad family of carbon nanoallotropes: classification, chemistry, and applications of fullerenes, carbon dots, nanotubes, graphene, nanodiamonds, and combined superstructures. *Chemical reviews*, **2015**, 115.11: 4744-4822.
13. GIUSTARINI, Daniela, et al. Pitfalls in the analysis of the physiological antioxidant glutathione (GSH) and its disulfide (GSSG) in biological samples: An elephant in the room. *Journal of Chromatography B*, **2016**, 1019: 21-28.

14. GUAN, Xiangming. Glutathione and glutathione disulfide—their biomedical and pharmaceutical applications. *Medicinal Chemistry Research*, **2023**, 32.9: 1972-1994.
15. HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA, **2015**.
16. CHEN, Zhangjian, et al. DNA oxidative damage as a sensitive genetic endpoint to detect the genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles. *Nanomaterials*, **2022**, 12.15: 2616.
17. IMARAH, Ameer A., et al. Graphene oxide-induced, reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunctions and apoptosis: high-dose toxicity in normal cells. *Nanomedicine*, **2023**, 18.11: 875-887.
18. JELÍNKOVÁ, Štěpánka. Testování cytotoxicity nanomateriálů. 2022.
19. JOO, Kyung-Mi, et al. Development and validation of UPLC method for WST-1 cell viability assay and its application to MCTT HCE™ eye irritation test for colorful substances. *Toxicology in Vitro*, **2019**, 60: 412-419.
20. JUAN, Celia Andrés, et al. The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International journal of molecular sciences*, **2021**, 22.9: 4642.
21. KAMILOGLU, Senem, et al. Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, **2020**, 1.3: 332-349.
22. KANĎÁR, Roman. Stanovení glutathionu a glutathiondisulfidu v biologických vzorcích. *Chemické listy, volume 110, issue: 11*, **2016**.
23. KIRAN, Tugba Raika; OTLU, Onder; KARABULUT, Aysun Bay. Oxidative stress and antioxidants in health and disease. *Journal of Laboratory Medicine*, **2023**, 47.1: 1-11.
24. KUBÁT, Miroslav, et al. Recent Advances in Separation Methods for Characterization of Glutathione Metabolism and Dietary Supplementation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2024**, 117751.
25. KUČÍRKOVÁ, LUCIE, et al. Toxicita magnetických nanočástic. *Chemické listy*, **2015**, 109.9: 693-700.
26. KHOUBNASABJAFARI, Maryam, et al. Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *BiolImpacts: BI 5.3* **2015**: 123.
27. LIAO, Chengzhu; LI, Yuchao; TJONG, Sie Chin. Graphene nanomaterials: Synthesis, biocompatibility, and cytotoxicity. *International journal of molecular sciences*, **2018**, 19.11: 3564.
28. LŐRINCZ, Tamás; SZARKA, András. The determination of hepatic glutathione at tissue and subcellular level. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **2017**, 88: 32-39.

29. MURUGADOSS, Sivakumar, et al. Agglomeration of titanium dioxide nanoparticles increases toxicological responses in vitro and in vivo. *Particle and fibre toxicology*, 2020, 17: 1-14.
30. MA, Baojin, et al. Reaction between graphene oxide and intracellular glutathione affects cell viability and proliferation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2021**, 13.3: 3528-3535.
31. MA, Baojin; NIŠINA, Yuta; BIANCO, Alberto. Nanoplatforma reagující na glutathion vyrobená z redukováného oxidu grafenu a nanočástic MnO₂ pro fototermální a chemodynamickou kombinovanou terapii. *Carbon*, **2021b**, 178: 783-791.
32. MÁLKOVÁ, Andrea, et al. In vitro assessment of the genotoxic potential of pristine graphene platelets. *Nanomaterials*, **2021**, 11.9: 2210.
33. MCGILL, Mitchell R.; JAESCHKE, Hartmut. A direct comparison of methods used to measure oxidized glutathione in biological samples: 2-vinylpyridine and N-ethylmaleimide. *Toxicology mechanisms and methods*, 2015, 25.8: 589-595.
34. NGA, N. T. H., et al. Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. *Analytical biochemistry*, **2020**, 610: 113937.
35. NÝDLOVÁ, Erika, et al. Glutathion a jeho enzymový systém. *Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa*, **2014**, 17: 202-208.
36. OU, Lingling, et al. Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms. *Particle and fibre toxicology*, **2016**, 13: 1-24.
37. OLATOMIWA, Agbolade Lukman, et al. Graphene synthesis, fabrication, characterization based on bottom-up and top-down approaches: An overview. *Journal of Semiconductors*, **2022**, 43.6: 061101.
38. PARCHETA, Monika, et al. Recent developments in effective antioxidants: The structure and antioxidant properties. *Materials*, **2021**, 14.8: 1984.
39. PHANIENDRA, Aluguju; JESTADI, Dinesh Babu; PERIYASAMY, Latha. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry*, **2015**, 30: 11-26.
40. PISOSCHI, Aurelia Magdalena; POP, Aneta. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, **2015**, 97: 55-74.
41. PRÄBST, K., et al. "Cell viability assays." *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, **2017**: 1-17.
42. RILEY, Parand R.; NARAYAN, Roger J. Recent advances in carbon nanomaterials for biomedical applications: A review. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, **2021**, 17: 100262.

43. ROGATSKY, Eduard. Pandora box of BCA assay. Investigation of the accuracy and linearity of the microplate bicinchoninic protein assay: Analytical challenges and method modifications to minimize systematic errors. *Analytical Biochemistry*, **2021**, 631: 114321.
44. ROUŠAR, Tomáš, et al. Assessment of reduced glutathione: comparison of an optimized fluorometric assay with enzymatic recycling method. *Analytical biochemistry*, **2012**, 423.2: 236-240.
45. SARI, Ceren, et al. A comparative study of MTT and WST-1 assays in cytotoxicity analysis. *Haydarpasa Numune Med J*, **2021**, 61.3: 281-8.
46. SEABRA, Amedea B., et al. Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. *Chemical research in toxicology*, **2014**, 27.2: 159-168.
47. SHA, Baoyong, et al. "The potential health challenges of TiO₂ nanomaterials." *Journal of applied toxicology*, **2015**, 1086-1101.
48. SHABBIR, Samina, et al. Toxicological consequences of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs) and their jeopardy to human population. *BioNanoScience*, **2021**, 11.2: 621-632
49. SONI, Deepika, et al. Oxidative stress and genotoxicity of zinc oxide nanoparticles to *Pseudomonas* species, human promyelocytic leukemic (HL-60), and blood cells. *Biological trace element research* 178, **2017**: 218-227.
50. SWEENEY, Sinbad, et al. Nano-titanium dioxide bioreactivity with human alveolar type-I-like epithelial cells: Investigating crystalline phase as a critical determinant. *Nanotoxicology*, **2015**, 9.4: 482-492.
51. ŠVADLÁKOVÁ, Tereza. Nanočástice a jejich vliv na imunitní systém: Studium prozánětlivého potenciálu vybraných karbonových nanomateriálů. **2022**.
52. ŠVADLÁKOVÁ, Tereza, et al. Proinflammatory effect of carbon-based nanomaterials: In vitro study on stimulation of inflammasome NLRP3 via destabilisation of lysosomes. *Nanomaterials*, **2020**, 10.3: 418.
53. TASDEMIR, Seyma, et al. Surface area of graphene governs its neurotoxicity. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **2023**, 9.6: 3297-3305.
54. TSIASIOTI, Apostolia; TZANAVARAS, Paraskevas D. Determination of glutathione and glutathione disulfide using liquid chromatography: A review on recent applications. *Microchemical Journal*, **2023**, 109157.
55. WILSON, Christina L., et al. Mitochondrial dysfunction and loss of glutamate uptake in primary astrocytes exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Nanoscale*, **2015**, 7.44: 18477-18488.

56. ZHANG, Qi, et al. Advanced review of graphene-based nanomaterials in drug delivery systems: Synthesis, modification, toxicity and application. *Materials Science and Engineering: C*, **2017**, 77: 1363-1375.
57. ZHU, Yingjie, et al. Facile and sensitive measurement of GSH/GSSG in cells by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Talanta*, **2021**, 224: 121852.
58. ZIENTAL, Daniel, et al. Titanium dioxide nanoparticles: prospects and applications in medicine. *Nanomaterials*, **2020**, 10.2: 387.