

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra antropologie a genetiky člověka**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



**Bc. Tereza Červená**

**Využití buněčné linie BEAS-2B pro analýzu mikrojader v genetické toxikologii**

**The use of BEAS-2B cell line for micronucleus assay in genetic toxicology**

**Diplomová práce**

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Pavel Rössner Jr., Ph.D.

Praha, 2016

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Čerčanech, 28. 4. 2016

.....

Bc. Tereza Červená

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat všem kolegům z Oddělení genetické ekotoxikologie Ústavu experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., kteří ve mě měli důvěru a pomohli mi vždy, když jsem si nevěděla rady. Jmenovitě Mgr. Zuzaně Novákové, díky níž jsem se naučila samostatně pracovat v buněčné laboratoři, Mgr. Andree Rössnerové, Ph.D., která si vždy našla chvíli pro odborné i přátelské rozhovory a také Ing. Janu Topinkovi, DrSc. a MUDr. Radimu Šrámovi, DrSc. za možnost pracovat na tomto oddělení. Především bych ale chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Pavlu Rössnerovi Jr., Ph.D. za vstřícnost s jakou naslouchal mým návrhům a pečlivost s jakou přistupoval k mé práci.

Také bych chtěla poděkovat své rodině, milovaným a přátelům, kteří se mnou měli trpělivost v hektických obdobích a dokázali mě vždy přivést na lepší myšlenky.

## **Abstrakt**

Práce se zabývá využitím buněčné linie BEAS-2B pro analýzu mikrojadern v genetické toxikologii. Je rozdělena do dvou hlavních částí: a) teoretický úvod do problematiky analýzy a hledání vhodných modelů pro testování vlivu znečištěného ovzduší a vyráběných nanočástic, b) praktická část popisující výsledky analýzy mikrojadern indukovaných polycyklickými aromatickými uhlovodíky (PAU), extrahovatelnou organickou hmotou (EOM) ze spalin tří typů dieselového paliva a vyráběných nanočástic. Buněčná linie BEAS-2B představuje nenádorový model lidského plicního epitelu, který se jeví jako vhodný pro analýzu mikrojadern. Tato analýza je běžně používaným postupem pro stanovení genotoxicity látek, který se používá u širokého spektra buněčných kultur a také v lidských studiích. V rámci této diplomové práce byly po dobu 28, 48 a 72 hodin testovány následující látky: benzo[*a*]pyren, 3-nitrobenzantron a 1-nitropyren jakožto karcinogenní PAU běžně se vyskytující ve znečištěném ovzduší; EOM ze spalin 100% nafty, nafty s 30% přídavkem biosložky, 100% bionafty a dvě vyráběné nanočástice TiO<sub>2</sub> a Ag. Výsledky práce potvrzují vhodnost zvolené buněčné linie jako modelového systému pro stanovení genotoxicity testovaných látek při využití specifických kultivačních podmínek zajišťujících stabilitu linie BEAS-2B. Práce současně ukazuje genotoxický potenciál testovaných PAU i EOM z emisí dieselových paliv. Překvapivě však nebyly zjištěny rozdíly v genotoxicitě EOM ze spalin ze standardního dieselového paliva a z paliv obsahujících biosložku. Genotoxicita testovaných nanočástic je za daných experimentálních podmínek jen slabá, což může souviset s omezeními danými detekční metodou, jak je podrobně v práci diskutováno.

## **Klíčová slova**

1-nitropyren, 3-nitrobenzantron, Ag, analýza mikrojadern, BEAS-2B, benzo[*a*]pyren, diesel, EOM, genotoxicita, nanočástice, PAU, TiO<sub>2</sub>

## **Abstract**

This thesis deals with the application of BEAS-2B cell line for micronucleus assay in genetic toxicology. It is divided into two main parts: a) theoretical introduction to the analysis and search for suitable models for testing the impact of air pollution and manufactured nanoparticles, b) practical part that describes the results of micronuclei induction by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), extractable organic matter (EOM) from diesel exhaust particles obtained from emissions of three types of fuel and engineered nanoparticles. BEAS-2B cell line is a nonmalignant human model of lung epithelium which seems to be suitable for micronucleus assay. This assay is commonly used for determining the genotoxicity of various substances to wide variety of cell cultures and also in human studies. In this thesis, the following substances were tested: benzo[*a*]pyrene, 3-nitrobenzanthrone and 1-nitropyrene as carcinogenic PAHs commonly found in polluted air; EOMs from exhaust particles of 100 % diesel fuel, a blend of diesel fuel and 30 % of biodiesel, 100 % biodiesel and two types of engineered nanoparticles (TiO<sub>2</sub> and Ag). The cells were treated with the compounds for 28, 48 and 72 hours. The results confirm the suitability of BEAS-2B cell line as a model for testing the genotoxicity of substances under the specific culture conditions that provide the stability of the cells. The results also show genotoxic potential of tested PAHs and EOMs from diesel fuel. Surprisingly, no differences were found in genotoxicity of EOMs from exhaust particles from 100% diesel and fuels containing biodiesel. Under the experimental conditions the genotoxicity of tested nanoparticles is weak, which may be associated with the limits of the detection method, as discussed in the thesis.

## **Key words**

1-nitropyrene, 3-nitrobenzathrone, Ag, micronucleus assay, BEAS-2B, benzo[*a*]pyrene, diesel fuel, EOM, genotoxicity, nanoparticles, PAHs, TiO<sub>2</sub>

# Obsah

Abstrakt

Abstract

Obsah

Seznam zkratek

1	Úvod.....	5
1.1	Znečištění ovzduší a látky poškozující lidské zdraví.....	5
1.1.1	Ovzduší v ČR a imisní limity.....	6
1.1.2	Vliv znečištěného ovzduší na jedince.....	7
1.1.3	Nanočástice a jejich bezpečnost.....	11
1.1.4	Možnosti testování vlivu znečištění ovzduší a látek poškozujících lidské zdraví.....	13
1.2	Lidská dýchací soustava.....	14
1.2.1	Onemocnění respiračního systému a kvalita ovzduší.....	15
1.2.2	Modelové systémy pro studium nemocí respiračního systému.....	16
1.3	Buněčná linie BEAS-2B.....	18
1.3.1	Vznik buněčné linie BEAS-2B.....	19
1.3.2	Karyotyp.....	19
1.3.3	Kultivace buněčné linie BEAS-2B.....	19
1.4	Analýza mikrojader.....	20
1.4.1	Mikrojádru – jeho vznik a stavba.....	20
1.4.2	Princip analýzy mikrojader.....	21
2	Cíle práce a hypotézy.....	23
2.1	Dílčí cíle práce.....	23
2.2	Hypotézy.....	23
3	Materiál a metody.....	24
3.1	Testované látky.....	24
3.1.1	Polycyklické aromatické uhlovodíky B[a]P, 3-NBA, 1-NP.....	24
3.1.2	Extrahovatelná organická hmota ze spalín nafty a bionafty.....	26
3.1.3	Nanočástice TiO <sub>2</sub> a Ag.....	26
3.2	Kultivační protokol buněčné linie BEAS-2B.....	28
3.2.1	Roztoky pro kultivaci buněk BEAS-2B.....	28
3.2.2	Příprava roztoků pro kultivaci buněk BEAS-2B.....	28
3.2.3	Potažení kultivačních nádob podkladovým médiem.....	29
3.2.4	Rozmražení buněk BEAS-2B.....	29
3.2.5	Kultivace a pasážování buněk BEAS-2B.....	30

3.3	Protokol zpracování vzorků pro analýzu mikrojadern v Lab-Tek™ Chamber Slide systému .....	30
3.3.1	Kultivace buněk BEAS-2B v Lab-Tek™ Chamber Slide systému.....	31
3.3.2	Pracovní postup pro 28, 48 a 72 hodinovou expozici .....	31
3.3.3	Ukončení expozice a fixace preparátu .....	32
3.4	Způsob hodnocení analýzy mikrojadern .....	32
4	Výsledky.....	34
4.1	Polycyklické aromatické uhlovodíky .....	34
4.2	Extrahovatelná organická hmota ze spalin dieselových paliv.....	35
4.3	Nanočástice TiO <sub>2</sub> a Ag.....	35
5	Diskuze.....	62
6	Závěr.....	67
7	Seznam použité literatury .....	68
8	Přílohy .....	79

## Seznam zkratek

1-NP	1-nitropyren
3-NBA	3-nitrobenzantron
AB	aberantní buňka
ABB	dvoujaderná aberantní buňka
Al	hliník
As	arsen
ATCC	<i>angl. American Type Culture Collection</i>
B[a]P	benzo[a]pyren
B0	nafta
B100	100% bionafta
B30	nafta s 30% přídavkem biosložky
Ba	barium
BEBM	<i>angl. Bronchial epithelial basal medium</i> ; basální médium pro bronchiální epitel
BEGM	<i>angl. Bronchial epithelial growth medium</i> ; médium pro bronchiální epitel
BSA	bovinní sérový albumin
CA	<i>angl. Chromosome aberration</i> ; chromozomová aberace
Ca	vápník
CBMN	<i>angl. Cytokinesis-block micronucleus assay</i> ; analýza mikrojadér za použití cytochalasinu-B
CBPI	<i>angl. Cytokinesis-block proliferation index</i> ; proliferační index buněk
Cd	kadmium
CO	oxid uhelnatý
k-PAU	karcinogenní polycyklické aromatické uhlovodíky
ČHMÚ	Český hydrometeorologický ústav
DEP	<i>angl. Diesel exhaust particles</i> ; pevná složka spalin nafty
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDS	<i>angl. Energy dispersive spectrometer</i>
EEA	<i>angl. European Environment Agency</i> ; Evropská agentura pro životní prostředí
FISH	<i>angl. Fluorescent in situ hybridization</i> ; fluorescenční in situ hybridizace



HR	<i>angl. Hazard ratio</i> ; hazard risk (poměr funkcí hazardu)
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
IARC	<i>angl. International Agency for Research on Cancer</i> ; Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
ICP-OES	<i>angl. Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> ; emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
IRR	<i>angl. Incidence rate ratio</i> ; poměr incidence
IUGR	<i>angl. Intrauterine growth restriction</i> ; nitroděložní růstová retardace
K	draslík
MN	mikrojádru
mRNA	mediátorová RNA
Na	sodík
ncRNA	nekódující RNA
Ni	nikl
NO	oxid dusný
NO <sub>2</sub>	oxid dusičitý
NO <sub>x</sub>	souhrnné označení pro oxidy dusíku
O <sub>3</sub>	ozon
P	fosfor
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
Pb	olovo
PM	<i>angl. Particulate matter</i> ; prachové částice
PVP	polyvinylpyrrolidon
RR	<i>angl. Risk ratio</i> ; relativní riziko
S	síra
Si	křemík
SO <sub>2</sub>	oxid siřičitý
TiO <sub>2</sub>	oxid titaničitý
V	vanad
VOCs	<i>angl. Volatile organic compounds</i> ; těkavé organické látky
VTP	Vědeckotechnický park Rožtoky
WHO	<i>angl. World Health Organization</i> ; Světová zdravotnická organizace
Xi	inaktivovaná verze chromozomu X

ZnO oxid zinečnatý

Zr zirkon

# 1 Úvod

## 1.1 Znečištění ovzduší a látky poškozující lidské zdraví

Mezi látky znečišťující ovzduší řadíme kromě jiného plynné látky jako ozon či oxidy dusíku a prachové částice s aerodynamickým průměrem  $10^{-5}$  metru a menším ( $PM_{10}$ ).

První vědeckou prací zabývající se vlivem znečištěného ovzduší na člověka je zpráva J. Firketa z roku 1931. Podrobně popisuje smogovou situaci v údolí Meuse v Belgii, kde na začátku prosince 1930 zemřelo v důsledku respiračních obtíží 60 lidí. Mezi příznaky vyskytující se u obyvatel byla nespavost, bolest hlavy, zvracení, bolest v oblasti hrudníku, dušnost a silný kašel (Nemery et al., 2001). Nejznámějším případem zvýšené mortality obyvatelstva z důvodu znečištění ovzduší je smogová situace v Londýně v prosinci roku 1952. Zde bylo zaznamenáno o 4000 více úmrtí, než byla průměrná hodnota pro toto období, a zpráva z roku 1953 také uvádí, že bylo nutné porazit až třetinu dobytka vystaveného znečištěnému ovzduší (Scott, 1953).

Od druhé poloviny 20. století probíhá intenzivní výzkum vlivu znečištění ovzduší na lidské zdraví a na základě zjištěných informací bylo v roce 2013 mezinárodní agenturou IARC (*angl. International Agency for Research on Cancer*) znečištění ovzduší zařazeno mezi lidské karcinogeny (kategorie 1) (IARC, 2013).

Lidské zdraví je kromě znečištěného ovzduší ohroženo i chemickými látkami v předmětech denní potřeby. S rozvojem mikroskopie a nových technologií se od 80. let 20. století zvyšuje poptávka a výroba nanomateriálů s velikostí částic mezi 1 – 100 nm. Nanomateriály vyráběné na zakázku mají unikátní vlastnosti dané jejich tvarem, velikostí a velkým povrchem a jejich využití u věcí denní potřeby stále stoupá. Příkladem může být jejich použití v kosmetice, barvách či při úpravě povrchů (Vance et al., 2015). Bezpečnost těchto nově vznikajících látek je nutné pečlivě ověřovat. Látky, které lidskému organismu nijak neškodí ve formě větších částic, mohou jako nanočástice působit silně toxicky. Příkladem může být titan, který se běžně používá v lékařství jako součást implantátů, ale v podobě některých typů nanočástic způsobuje dle skupiny Karlsson et al. (2008) a Gurr et al. (2005) významné poškození DNA.

### 1.1.1 Ovzduší v ČR a imisní limity

Mezi látky, jejichž výskyt v ovzduší je monitorován, patří prachové částice (PM, *angl. particulate matter*), benzo[*a*]pyren (B[*a*]P), benzen, NO<sub>x</sub> (směs monodusíkatých oxidů), ozon (O<sub>3</sub>), těžké kovy, oxid siřičitý (SO<sub>2</sub>) a oxid uhelnatý (CO). Mimo výše zmíněné jsou v ČR sledovány také koncentrace těkavých organických látek (VOCs, *angl. Volatile organic compounds*), amoniaku a rtuti, tj. látek bez imisního limitu, které jsou zdraví škodlivé. Vzhledem k tématu této diplomové práce budou v následujících odstavcích podrobněji popsány pouze PM, B[*a*]P a benzen.

PM představují komplexní a heterogenní směs částic, kterou rozdělujeme dle aerodynamického průměru v  $\mu\text{m}$  obvykle na složky PM < 10  $\mu\text{m}$  (PM<sub>10</sub>) a PM < 2.5  $\mu\text{m}$  (PM<sub>2,5</sub>). Díky své velikosti se mohou vdechnutím dostat do organismu a dopravit tak látky navázané na jejich povrchu přímo do těla. V současnosti jsou za největší problém považovány PM s navázanými polycyklickými aromatickými uhlovodíky (PAU) a dalšími látkami (např. dusíkaté, síranové, hliníkové či křemíkové sloučeniny). PM mohou vznikat zcela přírodními procesy jako je větrná eroze, vulkanická činnost, lesní požáry atd. Umělé zdroje PM jsou pak především spalování tuhých paliv, metalurgie a těžký průmysl obecně, doprava či kouření. V roce 2014 činil roční imisní limit pro PM<sub>2,5</sub> 25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  a byl překročen na 1,8 % území ČR s cca 8,6 % obyvatel. Pro PM<sub>10</sub> činil roční imisní limit 40  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  a byl překročen na 0,45 % území ČR s cca 2,2 % obyvatel (ČHMÚ, 2015a; *Zákon č. 201/2012 Sb., o ochraně ovzduší*, 2012). Samostatně zkoumanou složku PM tvoří tzv. extrahovatelná organická hmota (EOM, *angl. Extractable organic matter*). Složení EOM závisí na zdroji znečištění, přičemž nejvíce zkoumanou skupinou látek ve směsi jsou PAU.

Z hlediska ochrany zdraví se v České republice v ovzduší měří hodnoty benzo[*a*]pyrenu a benzenu jakožto prokázaných lidských karcinogenů. Benzen řadíme mezi aromatické uhlovodíky, jejichž zdrojem je především uhlí, ropa a chemický průmysl. B[*a*]P patří do skupiny PAU. PAU jsou organické sloučeniny, které vznikají nedokonalým spalováním organické hmoty, tj. obdobně jako prachové částice, na které se velmi dobře adsorbují. Za zdroj B[*a*]P se z více jak 87% považuje lokální vytápění domácností tuhými palivy (především uhlí) v zastaralých typech kotlů (odhořivací, prohořivací) (ČHMÚ, 2015a). Imisní limit v roce 2014 pro B[*a*]P činil 1  $\text{ng}/\text{m}^3$  a byl překročen na 10,7 % plochy území ČR s cca 51,1 % obyvatel. Pro benzen činil roční imisní limit 5  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  a na území ČR překročen nebyl (ČHMÚ, 2015b; *Zákon č. 201/2012 Sb., o ochraně ovzduší*, 2012).

Kompletní přehled PAU včetně informací o vlivu na lidské zdraví je uveden v publikaci agentury IARC (IARC, 2010).

U zbylých látek, jejichž výskyt v ovzduší je monitorován, byl imisní limit v roce 2014 překročen u  $\text{NO}_x$  (imisní limit  $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) v lokalitách s vysokým stupněm dopravního zatížení, tj. v Praze, Ostravě a Brně (0,001% území ČR s 0,15% obyvatelstva). Předpokládá se ale, že tento imisní limit byl překročen i na dalších dopravně zatížených místech (ČHMÚ, 2015a). Imisní limit byl v roce 2014 také překročen u  $\text{O}_3$  (maximální denní 8hodinový klouzavý průměr s hodnotou  $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) na 5,6 % území ČR s cca 0,8 % obyvatel, přičemž méně zatížená jsou centra měst, kde je ozon odbouráván nadbytkem  $\text{NO}_x$  z dopravy na kyslík a  $\text{NO}_2$  (ČHMÚ, 2015a; *Zákon č. 201/2012 Sb., o ochraně ovzduší*, 2012). U ostatních látek jejich imisní limit v roce 2014 překročen nebyl.

### **1.1.2 Vliv znečištěného ovzduší na jedince**

Znečištění ovzduší bylo mezinárodní agenturou IARC v roce 2013 zařazeno mezi lidské karcinogeny (kategorie 1) (IARC, 2013). Je prokázáno, že má negativní vliv na zdraví jedince, plodnost a významně ovlivňuje i délku dožití (Lelieveld et al., 2015; Rubes et al., 2010; Sram et al., 1999). Ze zprávy Evropské komise pro životní prostředí za rok 2015 vyplývá, že v součtu ve 28 zemích Evropské unie předčasně zemřelo až 491 000 lidí na chronickou expozici znečištění (počítáno souhrnně pro  $\text{PM}_{2,5}$ ,  $\text{NO}_x$ ,  $\text{O}_3$ ) (EEA, 2015). Vliv znečištění ovzduší na střední délku dožití zkoumalo několik studií, mezi nimi např. Nevalainen & Pekkanen (1998), kteří ve studii na finské kohortě určili zkrácení střední délky života ve znečištěné oblasti (o  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$   $\text{PM}$  více než kontrolní oblast), a to metodou podle Dockery et al. (1993) o 0,6 roku, a metodou podle Pope III. et al. (1995) o 1,01 roku.

Hlavními faktory určujícími vliv znečištěného ovzduší na zdraví jedince je míra a délka expozice. Krátkodobé vystavení nadlimitním hodnotám škodlivých látek se považuje za méně závažné, pokud nezpůsobí akutní otravu či smrt jedince. Oproti tomu dlouhodobá expozice jedince nízkým koncentracím látek, které nevyvolávají akutní příznaky, může způsobit chronická onemocnění či být mutagenní (WHO Regional Office for Europe, 2010). Významným faktorem je také věk a kondice exponovaného jedince.

Studie probíhající v letech 1993-1998 se podrobně zabývala vlivem znečištění ovzduší na plodnost a porodnost v lokalitách Teplice a Prachatic v ČR. Byla prokázána pozitivní korelace zvýšených hodnot  $\text{PM}_{10}$  v ovzduší ( $> 40 \mu\text{g}/\text{m}^3$  v prvním gestačním měsíci)

a výskytu nitroděložní růstové retardace (IUGR, *angl. Intrauterine growth restriction*), která zvyšuje riziko potratu, sníženou porodní hmotnost či vyšší morbiditu dětí. Dále byl také prokázán vliv znečištění SO<sub>2</sub> na kvalitu spermií. Vyšší hladiny SO<sub>2</sub> v ovzduší byly spojeny se změnou morfologie a motility spermií, což negativně ovlivňuje plodnost jedince (Sram et al., 1999).

Morbidita dětí žijících ve znečištěných oblastech je až několikanásobně vyšší než u dětí žijících v méně znečištěných oblastech. Příkladem může být studie z roku 2013 prováděná v Ostravě, kdy se sledovaly děti ve věku 0-5 let. U všech věkových skupin byl nejčastější nemocí za sledované období zánět horních cest dýchacích. Dle výsledků se u skupiny do 1 roku života ve východní průmyslové oblasti vyskytoval zánět horních cest dýchacích 3x častěji než v západní části města a i u starších dětí byl trend podobný. Dále byl zjištěn vyšší výskyt akutní tonsilitidy, pneumonie a virových infekcí u všech věkových skupin žijících ve východní průmyslové oblasti než v západní části města. U dětí ve věku 5 let z východní průmyslové oblasti Ostravy byl zjištěn významný nárůst četnosti atopické dermatitidy a alergické rýmy oproti západní části Ostravy (Dostal et al., 2013). Obdobným tématem se zabývá recentní studie vlivu znečištění ovzduší a koncentrací NO<sub>2</sub> na zdraví a výskyt astmatu u dětí (Kim et al., 2016). Autoři uvádí signifikantní ( $p < 0,05$ ) zvýšení frekvence astmatu u dětí vystavených vyšším hodnotám znečištění.

Chronická expozice karcinogenním látkám v ovzduší je zodpovědná za přibližně 5 % případů úmrtí na rakovinu plic (Cohen et al., 2004). Jedním z markerů pro studium zvýšeného rizika rakoviny je stanovení frekvence chromozomových aberací (CA, *angl. Chromosome aberration*) (Bonassi et al., 2004). Práce z roku 2008 zkoumala kohortu 22 358 zdravých jedinců, kterým mezi lety 1965-2002 bylo provedeno vyšetření množství CA v periferních lymfocytech a poté byli sledováni průměrně 10,1 roku. Bylo zjištěno zvýšení relativního rizika (RR) vzniku rakoviny ve středním tercilu na RR = 1,31 (95% konfidenční interval CI = 1,07–1,60) a třetím tercilu na RR = 1,41 (95% CI = 1,16–1,72) při porovnání s prvním tercilem (Bonassi et al., 2008).

Frekvence CA může být přímo ovlivněna expozicí jedince znečištěnému ovzduší. Tento efekt byl sledován ve studii na 52 pražských policistech, kteří denně tráví > 8 hodin v ulicích Prahy, a na 53 kontrolních jedincích, kteří stejný čas tráví v uzavřených budovách. Při monitorování personální expozice byl zaznamenán signifikantní rozdíl ( $p < 0,001$ ) v koncentracích B[a]P [kontrola: 0,8 (0,3–2,8) ng/m<sup>3</sup>, policisté: 1,6 (0,3–8,7)

ng/m<sup>3</sup>] i k-PAU (karcinogenní PAU) [kontrola: 5,8 (3,1–19,3) ng/m<sup>3</sup>, policisté: 9,7 (3,1–58,2) ng/m<sup>3</sup>], jimž byli jedinci vystaveni. Metodou FISH (*angl. Fluorescent in situ hybridization*) bylo poté stanoveno následující procento aberantních buněk (AB): u kontrolní skupiny % AB = 0,24±0,18 a u policistů % AB = 0,33±0,25 (p<0,05). Rozdíl v počtu CA byl také signifikantní (p < 0,05): kontrola CA/1000 buněk = 3,90±3,06, policisté CA/1000 buněk = 5,58±4,62. Policisté zahrnutí ve studii byli vystaveni nadlimitním hodnotám B[a]P (imisní limit 1 ng/m<sup>3</sup>) a míra poškození DNA byla vyšší než u kontrolní skupiny (Sram et al., 2007).

Vlivu PM<sub>10</sub> a PM<sub>2,5</sub> na vznik rakoviny plic se věnovala studie 17 evropských kohort s 312 944 jedinci, kteří byli sledováni průměrně 12,8 roku. Výsledky ukazují signifikantní asociaci hazardu rizik (HR) vzniku rakoviny a koncentrací PM<sub>10</sub> a PM<sub>2,5</sub> [HR<sub>PM10</sub> = 1,22 (95% konfidenční interval CI = 1,03–1,45) při koncentraci 10 µg/m<sup>3</sup>; HR<sub>PM2.5</sub> = 1,18 (95% konfidenční interval CI = 0,96–1,46) při koncentraci 5 µg/m<sup>3</sup>] (Raaschou-Nielsen et al., 2013). Na tuto studii navazuje recentní práce z února 2016, která sledovala rozdíl mezi složením PM<sub>10</sub> a PM<sub>2,5</sub> a rizikem vzniku rakoviny plic. Výsledky potvrdily předpoklad, že látky navázané na povrchu prachových částic významně ovlivňují škodlivost prachových částic. Konkrétně byly sledovány PM<sub>10</sub> a PM<sub>2,5</sub> obsahující Cu, Fe, K, Ni, S, Si, V a Zn. Kromě vanadu byly všechny testované látky spojeny s vyšším HR pro vznik rakoviny plic. Statisticky významné výsledky byly zjištěny pro PM<sub>2,5</sub> Cu [HR = 1,25 (95% konfidenční interval CI = 1,01–1,53) při 5 ng/m<sup>3</sup>], PM<sub>10</sub> Zn [HR = 1,28 (95% konfidenční interval CI = 1,02–1,59) při 20 ng/m<sup>3</sup>], PM<sub>10</sub> S [HR = 1,58 (95% konfidenční interval CI = 1,03–2,44) při 200 ng/m<sup>3</sup>], PM<sub>10</sub> Ni [HR = 1,59 (95% konfidenční interval CI = 1,12–2,26) při 2 ng/m<sup>3</sup>] a PM<sub>10</sub> K [HR = 1,17 (95% konfidenční interval CI = 1,02–1,33) při 100 ng/m<sup>3</sup>]. Z výsledků je patrné, že částice obsahující síru a nikl jsou potenciálně škodlivější (Raaschou-Nielsen et al., 2016).

Studie Rossner et al. (2013a) byla zaměřena na vliv EOM z ovzduší z prachových částic PM<sub>2,5</sub> odebraných v zimním a letním období v Praze a v Ostravě z ovzduší na buňky HEL12469. Koncentrace karcinogenního B[a]P se pohybovaly mezi 0,01 - 0,25 ng/µg EOM, podle lokality a období, kdy PM<sub>2,5</sub> byly odebírány, a bylo prokázáno mírné poškození DNA u testovaných buněk. Obdobně i studie autorů Hanzalova et al. uvádí oxidační poškození DNA a lipidů po expozici buněk HepG2 různým koncentracím EOM (PM byly odebrány z ovzduší v Praze, 2000-2005). Konkrétně již koncentrace 10 µg/ml

aplikovaná po dobu 24 h vykazovaly signifikantně ( $p < 0,01$  pro vzorek z léta 2000,  $p < 0,001$  pro vzorek ze zimy 2005) zvýšené oxidační poškození DNA. EOM se také používají např. pro určení toxicity spalin diesellových a benzínových motorů. Tímto tématem se zabývá práce z roku 2012, kdy autoři sledovali změny v genotoxicitě EOM ze spalin rozdílných druhů paliv (Topinka et al., 2012).

Vzhledem k tomu, že 8,6 % obyvatel ČR bylo vystaveno nadlimitním hodnotám  $PM_{2,5}$  (imisní limit  $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) a 2,2% obyvatel ČR nadlimitním hodnotám  $PM_{10}$  (imisní limit  $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ), jsou výsledky z výše zmíněných studií znepokojivé (ČHMÚ, 2015a).

Jedním z doposud ne zcela objasněných faktorů majících vliv na míru dopadu expozice škodlivinám je pohlaví a míra individuální vnímavosti. Cook et al. (2009) analyzoval data výskytu rakoviny v USA mezi lety 1975-2004 za účelem nalezení intersexuálního rozdílu v incidenci jednotlivých typů rakoviny. Ve většině případů byla vyšší četnost výskytu rakoviny zaznamenána u mužů s tím, že největší rozdíly vyjádřené jako poměr incidence (IRR) byly zjištěny pro Kaposiho sarkom (28.73), rakovinu rtů (7.16) či rakovinu hrtanu (5.17). Pouze pět typů rakoviny (rakovina prsu, žlučníku, štítné žlázy, rekta a souhrnně dutiny břišní) vykazovalo mírně zvýšenou incidenci u žen. Bonassi et al. (2001) naopak poukazuje na zvýšenou frekvenci mikrojader, spolehlivý marker genetického poškození, v periferních lymfocytech u žen. Tento výsledek částečně vysvětluje jev popsáný skupinou Hando et al. (1994), podle níž se až v 72,2 % mikrojader nachází chromozom X, dle Abruzzo et al. (1985) pak především jeho inaktivovaná verze Xi. Z výsledků studií by se dalo říct, že rakovinou více ohroženým pohlavím jsou muži, ale vždy záleží na konkrétním jedinci a konkrétní expozici. Ne nevýznamnou roli hraje i životní styl v jednotlivých oblastech.

Kvalita ovzduší v ČR je významnou měrou ovlivněna hutnickým průmyslem a sektorem veřejné energetiky a výroby tepla. V období 1990-2001 se díky legislativním nařízením snížily emise  $\text{SO}_2$  o 88% a v případě tuhých znečišťujících látek, kam spadají i  $PM_{10}$  a  $PM_{2,5}$ , se jedná o snížení o 85%. Dřívější trend ve snižování spotřeby tuhých paliv pro vytápění domácností od roku 2001 již nepokračuje, pouze se mění poměr domácností vytápěných uhlím a palivovým dřevem (ČHMÚ, 2015a). Kvalita ovzduší je významně snížena především v zimních měsících a je ovlivněna rozptylovými podmínkami v dané oblasti (Lyman & Tran, 2015)



### 1.1.3 Nanočástice a jejich bezpečnost

Ačkoli se většina současných prací zabývajících se znečištěním prostředí soustředí na prachové částice a na EOM z nich získanou, jedná se často o velikost částic  $> 2,5 \mu\text{M}$ . Velmi významnou část prachových částic ale tvoří částice  $< 100 \text{ nm}$ . Tyto částice vznikají především díky dopravě a při spalování tuhých paliv a jsou tak přítomny ve městech a poblíž frekventovaných komunikací. Skupina Shi et al. (1999) měřila velikostní distribuci částic z dopravy poblíž univerzity v Birminghamu v Anglii a udává, že z celkové koncentrace částic  $1.6 - 1.9 \times 10 \text{ cm}^3$  ve velikosti  $10 - 10\,000 \text{ nm}$  byla více jak polovina o velikosti  $< 30 \text{ nm}$ . V další studii ze stejné lokality se skupina zaměřila na částice  $< 10 \text{ nm}$  a udává, že částice ve velikosti  $3 - 7 \text{ nm}$  tvořily  $36 - 44 \%$  z celkového počtu částic (Shi et al., 2001).

Lidský organismus je vystaven nanočásticím nejen z dopravy, ale také těm, které se do ovzduší dostanou při výrobě či používání předmětů denní potřeby. Jak již bylo zmíněno dříve, využití nanomateriálů vyráběných na zakázku stále stoupá. Mezi nejpoužívanější vyráběné nanomateriály, se kterými se běžně setkáváme a jejichž částice vdechujeme, patří kovy a jejich oxidy, uhlíkové sloučeniny a křemík. Jejich působení jsou ve velké míře vystaveni pracovníci výroby nanočástic, lidé žijící poblíž této výroby, ale také spotřebitelé produktů, ve kterých se tyto částice používají. V dalších odstavcích se budeme věnovat konkrétně nanočásticím stříbra, titanu, zinku, mědi a jejich oxidů jako nejvíce využívaným nanočásticím.

Stříbro a jeho oxidy jsou celosvětově nejpoužívanějším nanomateriálem (Vance et al., 2015). Využívají se především kvůli antimikrobiálním vlastnostem pro úpravu povrchů, jako součást kosmetiky či v oděvním průmyslu. Ačkoli jsou používány dlouhodobě a autoři jako Nowack et al. (2010) uvádí, že se nejedná o nové, potenciálně nebezpečné materiály, výsledky skupiny Sung et al. (2009) poukazují na zánětlivou reakci plicní a jaterní tkáně při inhalační expozici po dobu 13 týdnů (6 hodin denně, 5 dní v týdnu) u potkanů Sprague-Dawley. Podobné výsledky uvádí i Kim et al. (2011), který poukazuje na oxidační poškození DNA u lidské bronchiální linie BEAS-2B po 24 hodinové expozici. To, jakým způsobem nanočástice stříbra reagují s organismem, souvisí nejen s jejich velikostí, která se mezi studiemi liší, ale především na jejich povrchové úpravě (Nymark et al., 2013). Toxicita stříbrných nanočástic totiž největší měrou pochází z tvorby reaktivních  $\text{Ag}^+$  iontů, které jsou uvolňovány z povrchu částic (Yang et al., 2012).

Titan a jeho oxidy se běžně vyskytují v kosmetice a jako pigmentační složka barviv. Přestože se titan v těle chová zcela inertně, jeho nanočástice podle některých studií vykazují toxické účinky. Toxicita nanočástic titanu a jeho oxidů není objasněna. Byla prokázána silná tvorba kyslíkových radikálů při fotoaktivaci nanočástic  $\text{TiO}_2$  ve vodném prostředí, které u buněk způsobují oxidační poškození (Konaka et al., 2001). V případě vyloučení fotoaktivace dochází dle některých studií k přímé vazbě částic na biomolekuly, která způsobí disbalanci buňky a její poškození. Byla také popsána korelace mezi velikostí nanočástic a jejich toxicitou (Gurr et al., 2005; Jin et al., 2011).

Oxidy zinku se stejně jako oxidy titanu používají v kosmetice a jako pigmentační složka. Na rozdíl od titanu je však toxicita zinečnatých nanomateriálů dána tvorbou reaktivních  $\text{Zn}^{2+}$  iontů. Nejčastější expozice oxidům zinku a titanu je v produktech na opalování, kde slouží jako blokátory UV spektra světelného záření. Široce diskutovanou možnost průchodu těchto nanočástic skrz vrstvu *stratum corneum* (nejsvrchnější vrstva epidermis) do těla vylučuje několik studií (Cross et al., 2007; Filipe et al., 2009), ačkoli jiné poukazují na mírně zvýšené hodnoty zmíněných nanočástic po epidermální expozici v krvi a moči (Gulson et al., 2010). Jelikož je toxicita nanočástic zinku dána především jejich rozpustností ve vodném prostředí, je typ expozice, které je jedinec vystaven, primárním rizikovým faktorem. Studie prováděné na plicních epiteliálních buňkách i inhalační studie poukazují na zánětlivou reakci a poškození buněk stejně jako u nanočástic stříbra (Karlsson et al., 2008; Wang et al., 2010).

Podobně jako u výše zmíněných i nanomateriály obsahující měď jsou typické tvorbou aktivních iontů  $\text{Cu}^{2+}$ , které způsobují jejich toxicitu. Tyto nanomateriály se používají především v elektrotechnickém průmyslu a například jako antimikrobiální složka plastiku. Ze skupiny často využívaných kovových nanomateriálů se tyto nanočástice dle více studií jeví jako významně rizikové, přičemž jejich použití a bezpečnost práce s nimi je nutné zvážit (Ahmad et al., 2016; Karlsson et al., 2008).

Sledování vlivu nanočástic na člověka je omezeno na pracovní expozice zaměstnanců ve výrobě nanomateriálů a na testy dobrovolníků. Shvedova et al. (2016) se zabývala potenciální toxicitou uhlíkových nanovláken u zaměstnanců firmy Nanotech Center Ltd. (Tambov, Rusko). Výsledkem studie u 15 zaměstnanců (8 exponovaných a 7 kontrolních) byly významné aberace a změny v regulaci ncRNA a mRNA u exponovaných zaměstnanců, které byly spjaty s buněčným cyklem, proliferací a apoptózou. Obdobně

skupina Pelclova et al. (2016) provedla studii na zaměstnancích výroby nanočástic TiO<sub>2</sub>. Jednalo se o 36 exponovaných pracovníků a 46 kontrolních jedinců ze stejného provozu (0.40 – 0,65 mg/m<sup>3</sup> TiO<sub>2</sub> exponování, 0.16 mg/m<sup>3</sup> TiO<sub>2</sub> kontroly; 80 % částic < 100 nm). Byly zjištěny významně zvýšené hladiny markerů oxidačního poškození v dechu u exponovaných jedinců.

Dobrovolníci byli součástí studií zabývajících se oxidy titanu a zinku a jejich možnostmi průchodu skrz *stratum corneum*. Filipe et al. (2009) uvádí, že ve studii s 37 dobrovolníky (17 zdravých bez úpravy exponovaného místa, 10 zdravých s odstraněnými vrchními vrstvami *stratum corneum*, 4 jedinci s psoriázou a 6 kontrol) nebylo naměřeno statisticky významné zvýšení koncentrace TiO<sub>2</sub> ani ZnO ani po 48h expozici. Naopak Gulson et al. (2010) ve své práci provedené na 20 dobrovolnících, kteří byli exponováni oxidům zinku ve formě krému na opalování, uvádí mírné zvýšení koncentrace zinku v krvi i moči u všech dobrovolníků i po 6 dnech po poslední expozici.

#### **1.1.4 Možnosti testování vlivu znečištění ovzduší a látek poškozujících lidské zdraví**

Sledování vlivu znečištění ovzduší a látek poškozujících lidské zdraví je možné provádět pomocí populačních studií (Rossner et al., 2013b; Shvedova et al., 2016), na zvířecích modelech (Bolton et al., 2013; Stapleton et al., 2015) či *in vitro* testů (Hanzalova et al., 2010; Prasad et al., 2014).

Populační studie jsou časově a finančně nejnáročnější metodou pro testování a obvykle se takto sleduje vliv znečištění či látek na danou populaci v konkrétní lokalitě. Příkladem může být výše zmíněná populační studie z Teplic mezi lety 1993-1998 (Sram et al., 1999) či studie profesionální expozice z provozu výroby uhlíkových nanomateriálů ve městě Tambov, Rusko (Shvedova et al., 2016). Hlavní výhodou populačních studií je, že takto získaná data, přímo ukazují na zdravotní stav dané populace v dané lokalitě při známých koncentracích škodlivin. Další z výhod je možnost rozdělit sledovanou populaci do skupin např. podle věku, pohlaví či zaměstnání a tím zvýšit přesnost studie. Další zpřesnění mohou poskytnout i dotazníky pro jednotlivé sledované osoby. Od jedinců zahrnutých ve studii se obvykle odebírá periferní krev a vzorek moči, které jsou posléze analyzovány. Mezi nevýhody mimo časovou a finanční náročnost patří omezený počet jedinců, které je možné sledovat. Jen velmi málo studií je prováděno na souborech větších než v řádu tisíců

osob a výsledek tak může být zkrácen malým počtem vstupních dat a populační variabilitou (Beelen et al., 2014; Pope III. et al., 1995).

Studium škodlivin na zvířecích modelech poskytuje komplexní informace o cytotoxickém, genotoxickém i behaviorálním vlivu látky na sledovaného jedince. Dalšími výhodami jsou standardizované linie pokusných zvířat, reprodukovatelnost pokusů, možnost vysokého počtu jedinců ve studii a kontrolované podmínky expozice. Nevýhodou je, že jsou testy finančně náročné a zvířata je nutné v průběhu pokusu usmrtit, přičemž můžeme také diskutovat o aplikovatelnosti takto získaných výsledků na člověka.

*In vitro* testy jsou oproti výše popsaným studiím méně finančně náročné a nedochází k usmrcování laboratorních zvířat, tudíž je vhodné i z etického hlediska je preferovat vždy, když to studie umožňuje. Lze používat lidské buňky z primárních kultur přímo odebrané od dárce, či buněčné linie nádorového i nenádorového původu. Další z výhod je možnost rychlého testování nově vznikajících látek v průmyslu a případné zamezení zvýšeného zdravotního rizika jedinců vystavených těmto látkám.

Mezi základní metody, kterými se posuzuje míra poškození DNA, patří analýza periferních lymfocytů z krve jedince, který byl vystaven škodlivinám. Jedná se o standardizovaný, široce používaný způsob vyšetření, který je možné provést konvenčním chromozomovým vyšetřením, metodou FISH, analýzou mikrojader, metodami na detekci aduktů DNA, kometovým testem pro analýzu fragmentace DNA či např. studiem genové exprese (Spector et al., 1998). Stejná škála metod se využívá i pro buněčné kultury s tím, že výsledné hodnoty poškození mohou být vztaženy pro konkrétní orgán, ze kterého buňky pochází. V případě zvířecích modelů se k výše zmíněným metodám obvykle přidává histologické vyšetření studované tkáně.

## **1.2 Lidská dýchací soustava**

Lidská dýchací soustava se dělí na horní (nos, nosní dutiny, hltan a hrtan) a dolní (průdušnice, průdušky a plíce s průdušinkami a plicnímu sklípky) cesty dýchací. Celá dýchací soustava je pokryta sliznicí, která zajišťuje ochranu těla před patogeny a nečistotami v ovzduší, přičemž zamezuje také vysokým ztrátám vody. Buňky slizničního povrchu dýchací soustavy jsou v přímém kontaktu s látkami v ovzduší a jsou chráněny jen tenkou vrstvou hlenu, která slouží k odstraňování nečistot. V případě, že se látky ve

vdechovaném vzduchu dostanou až do plic, mohou přímo přestoupit až do krevního řečiště jedince skrz plicní sklípky.

### **1.2.1 Onemocnění respiračního systému a kvalita ovzduší**

Látky obsažené ve vdechovaném vzduchu jsou v přímém kontaktu se slizničním povrchem celé dýchací soustavy. Pokud mají tyto látky dráždivý, cytotoxický či karcinogenní charakter, mohou výrazným způsobem ovlivňovat zdraví jedince. Mezi nejčastější onemocnění spojená se zhoršenou kvalitou ovzduší patří zánětlivá onemocnění jako astma bronchiale, bronchitida a pneumonitida.

Astma bronchiale se řadí mezi závažná chronická zánětlivá onemocnění, kdy u postiženého při vystavení dráždivým látkám v ovzduší (např. prach) dojde k zúžení dýchacích cest, zvýšení frekvence dýchání a časté je i typické sípání a lapání po dechu. Byla dokázána pozitivní korelace výskytu astmatu a znečištění ovzduší, přičemž ohroženou skupinou jsou především děti (Kim et al., 2016).

Bronchitida neboli zánět průdušek je dalším zánětlivým onemocněním plic, jehož příčinou nejčastěji bývá bakteriální či virová nákaza. Pokud je jedinec vystaven dráždivým škodlivinám z ovzduší, povrch dýchacích cest může být narušen a vzniká zánět. V případě, že iritace přetrvává a zánět je neléčen, může se vyvinout v chronickou podobu. Bronchitida se projevuje silným kašlem, vykašláváním hlenu a v případě akutní formy teplotami. Typicky jsou chronickou bronchitidou postiženi kuřáci a jedinci pracující v prostředí s vysokým obsahem dráždivých látek ve vzduchu. V případě, že jsou zánětem zasaženy přímo plíce, onemocnění se označuje jako pneumonitida (Challen et al., 1958; Sram et al., 2013).

Trvalým následkem neléčených a opakovaných zánětů průdušek a plic je tzv. plicní emfyzém. Jedná se o abnormální rozšíření dýchacích cest, které je charakterizováno úbytkem a zjizvením plicní tkáně. Ve spojení s chronickým zánětem dolních cest dýchacích pak souhrnně hovoříme o chronické obstrukční plicní nemoci (CHOPN), která, dle některých studií, významně zvyšuje riziko vzniku rakoviny plic (Turner et al., 2007).

Rakovina plic je druhou nejčastější rakovinou postihující obě pohlaví a z celkového počtu lidí, kteří zemřou na rakovinu, až 26 % žen a 28 % mužů umírá právě na rakovinu plic. Dle recentní statistiky prováděné na území USA je procento pětiletého relativního přežití při diagnóze mezi lety 2004-2010 pouhých 18 % (Siegel et al., 2015). V České

republiky je toto číslo ještě nižší, pouhých 11,1 % (+/- 0,6 %) pro diagnózy mezi roky 2005-2008 (Pavlik et al., 2014). Jak již bylo zmíněno, znečištění ovzduší karcinogenními látkami je celosvětově zodpovědné za přibližně 5 % případů úmrtí na rakovinu plic (Cohen et al., 2004). Avšak nejen karcinogenní látky mohou zvyšovat riziko vzniku rakoviny plic, bylo prokázáno, že také dlouhodobý zánět vyvolaný dráždivými látkami významně zvyšuje riziko vzniku rakoviny plic (HR při výskytu emfyzému, 1.66; 95% konfidenční interval CI = 1.06, 2.59) (Turner et al., 2007).

### **1.2.2 Modelové systémy pro studium nemocí respiračního systému**

Studium poškození respiračního systému člověka pomocí modelových organismů je prováděno *in vivo* na zvířecích modelech či *in vitro* na buněčných kulturách.

Obecně jsou zvířecí modely vybírány podle konkrétního procesu, který má být zkoumán. Největší procento studií je prováděno na hlodavcích, tj. myších, potkanech, morčatech a králících. Minoritně jsou zastoupeny práce na větších savcích, jako jsou fretky, psi, opice či koně (Aizawa et al., 2013; Barrett et al., 2003; Evans et al., 2003; Leclere et al., 2011).

Při výběru vhodného zvířecího modelu je nutné vzít v úvahu průběh postnatálního vývoje plic člověka a zvířecího modelu. U člověka je v době porodu přítomna asi polovina z celkového počtu alveolů v dospělosti a ke zvyšování jejich počtu dochází intenzivně do dvou a poté pomaleji do osmi let života (Dunnill, 1962; Hislop et al., 1986; Thurlbeck, 1982). U morčat, jako jednoho z nejvíce využívaných modelů pro testování onemocnění spojených s respirací, probíhá vývoj podobně jako u lidí, přičemž po morfologické stránce mají morčata významně vyšší stupeň vývoje plic při narození než myši a potkani (Burri, 1974; Lechner & Banchero, 1982). Pokud je tento vývoj narušen v období citlivé periody nemocí či např. vysokým znečištěním ovzduší, může dojít ke snížení celkového počtu alveolů u dospělého jedince a tím ke snížení kvality respirace (Massaro et al., 1985). Tento stav může mít za následek vyšší pravděpodobnost vzniku CHOPN z důvodu původně nižšího počtu alveolů v plicích než u zdravého jedince. Celkově můžeme říci, že je třeba používat takové modely, které mají co nejvíce podobné aktuální stádium vývoje plic jako námi sledovaná cílová skupina.

Dalším faktorem, který je třeba zohlednit při výběru modelového zvířete, je stavba dýchacího epitelu a jeho metabolická odpověď na podráždění. Dle skupiny Ressmeyer et

al. (2006) je morče vhodnějším modelem pro studium dýchací soustavy než myši či potkani a podobné závěry uvádí i Muccitelli et al. (1987). Naproti tomu myší modely jsou méně finančně náročné a bylo vytvořeno velké množství mutantních linií s konkrétními genotypovými a fenotypovými projevy. Méně často používané modely, jako je např. kůň či pes, jsou sice z etického i finančního hlediska náročné a diskutabilní, ale mohou poskytovat unikátní informace díky své velikosti, vyšší příbuznosti s člověkem a např. přirozeným výskytem nemocí podobných astmatu (Barrett et al., 2003; Leclere et al., 2011).

Pro primární, ale i rutinní testování vlivu látek na lidský dýchací systém se používají buněčné kultury. Jak již bylo zmíněno, je možné používat lidské buňky z primárních kultur přímo odebrané od dárce, či buněčné linie nádorového i nenádorového původu.

U primárních kultur je znám jejich přesný původ, fenotyp dárce a nejsou zatíženy změnami souvisejícími s imortalizací buněčných linií (Sack, 1981). Další z výhod je možnost zachycení populační variability, která ale může v některých případech být naopak nevýhodou. Více studií poukazuje na významné rozdíly v buněčné odpovědi u kultur od rozdílných dárců. Např. studie skupiny Vakhrushev et al. (2016) zabývající se mezenchymálními kmenovými buňkami získanými ze dřeně zubu udává, že ačkoli se primární kultury od sebe morfologicky, ani ve zkoumaných proteinech nelišily, byl zde významný rozdíl v proliferaci a migraci buněk mezi jednotlivými dárci. K podobným závěrům došla i skupina Matthews et al. (2000), která se zabývala fagocytující aktivitou monocytů z periferní krve 6 zdravých dárců. Studie popisuje významné rozdíly v sekreci pro-zánětlivých cytokininů mezi primárními kulturami od rozdílných dárců.

Lidské buněčné linie nádorového původu vykazují neomezený počet dělení a jsou proto vhodné pro dlouhodobé kultivace. Jedná o aneuploidní buňky s velkým množstvím chromozomových přestaveb jako jsou translokace, delece či inserce. Míra těchto přestaveb a počet chromozomů je variabilní jak mezi jednotlivými liniemi, tak i mezi kulturami v jednotlivých laboratořích, a proto jsou tyto linie vhodným modelem pro studium vývoje nádorových onemocnění (Isaka et al., 2003; Peng et al., 2010).

Tomuto tématu se věnuje práce na často používané plicní nádorové buněčné linii A549 skupiny Isaka et al. (2003). Autoři v článku stanovili počet chromozomů v metafázní buňce na průměrnou hodnotu 62, přičemž jejich počet je značně variabilní a při použití zobrazovací metody FISH nalezeno až 25% abnormálních chromozomů. V práci je

zmíněno, že takto vysoké procento abnormálních chromozomů může vést k blokaci metafáze buněk a následné apoptóze, což by zapříčinilo rychlejší selektivní výběr buněk s takovým množstvím abnormálních chromozomů, které je slučitelné s mechanismem metafáze a následné anafáze buněčného cyklu. Přímo selekcí buněk A549 se zabývá práce skupiny Onul et al. (2012), která udává, že po 70 dnech kultivace buněk A549 s postupně se zvyšujícími koncentracemi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> došlo k vytvoření dceřiné linie A549-HHP. Tato linie vykazovala vyšší míru proliferace než původní linie A549 a byla odolná vůči 2,4 mM koncentraci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, která byla pro původní A549 100% letální.

Lidské buněčné linie nenádorového původu představují mezistupeň mezi primárními kulturami a buněčnými liniemi nádorového původu. Buňky mohou být immortalizované např. virem či lidskou telomerázovou reverzní transkriptázou společně s cyklin dependentní kinázou 4 (Ramirez et al., 2004; Reddel et al., 1988). Takto upravené buňky mají významně prodlouženou dobu dělení při zachování karyotypu, který je podobný mateřským buňkám z primární kultury. V případě působení mutagenních látek, stresu či dlouhodobé kultivace se tyto buňky stávají nestabilní (Ohnuki et al., 1996; Werner et al., 2014, 2015). Proto jsou tyto linie vhodným modelem např. pro studium buněčné transformace.

### **1.3 Buněčná linie BEAS-2B**

Buněčná linie BEAS-2B představuje lidskou buněčnou adherentní linii pocházející z tkáně průdušek zdravého dospělého jedince, kterou vytvořila skupina Reddel et al. (1988). Jedná se o průduškový epitel immortalizovaný hybridním virem Ad12-SV40 (Schell et al., 1966), který díky této úpravě nepodléhá senescenci a tato metoda byla úspěšně použita ve více studiích (Andley et al., 1994; Webber et al., 1996). Po morfologické stránce tyto buňky vykazují typický polygonální tvar epiteliálních buněk a jejich proliferace je shodná s normálními bronchiálními buňkami. Produkce virových částic ověřovaná elektronovým mikroskopem neprokázala přítomnost virových částic a ani nebyla prokázána ani tumorogeneze u athymických myší (Reddel et al., 1988). Karyotyp bude popsán v podkapitole 1.3.2.

Buněčná linie BEAS-2B dle mnoha studií představuje spolehlivý model plicního epitelu. Byla úspěšně použita např. jako model ve studiích zabývajících se změnami v genové expresi a epigenetických změnách (Seriani et al., 2016; Zhou et al., 2016), kde



výsledky ukazují deregulaci ve zkoumaných genech a mitochondriální aktivitě a nízkou membránovou integritu při stresu. Linie byla použita i při testování DNA aduktů, fragmentace DNA kometovým testem či analýzou mikrojadér (Agen et al., 1997; Longhin et al., 2013). Dále byla potvrzena například přítomnost histaminových receptorů jakožto jednoho z hlavních hormonů v plicní tkáni spojeného s onemocněním a záněty (Noah et al., 1991).

### **1.3.1 Vznik buněčné linie BEAS-2B**

Primární kultura normálních bronchiálních buněk nenádorového původu byla vytvořena z autopsie dospělého muže dle metody Lechner et al. (1985). Infikováním kultury hybridním onkogenním DNA virem Ad12-SV40 (Schell 1965) došlo po 41 dnech k immortalizaci části buněk, které byly odděleny od senescentních buněk a byly pojmenovány BEAS-2A, BEAS-2B a BEAS-2C. Buňky BEAS-2A a BEAS-2C postupně zpomalily proliferaci a po přibližně 20 týdnech kultivace došlo k senescenci. Buňky BEAS-2B proliferovaly více než rok a nedošlo u nich k žádnému zpomalení růstu ani morfologickým změnám (Reddel et al., 1988).

### **1.3.2 Karyotyp**

Karyotyp buněk vykazuje typické změny vyvolané virem SV40, tj. chromozomové zlomy, endoreduplikace, rozvolnění chromozomů, translokace či delece (Sack, 1981). Počet chromozomů je až u 81 % buněk téměř diploidní (42-50 chromozomů v metafázní buňce). Práce z roku 1996 (Ohnuki a Reddel) výše zmíněné potvrzuje a dodává, že při dlouhodobé kultivaci buněk dochází k akumulaci změn karyotypu a mírnému zvýšení tumorigeneze.

### **1.3.3 Kultivace buněčné linie BEAS-2B**

Buněčná linie BEAS-2B má být dle skupiny Reddel et al. kultivována v bezsérovém médiu LHC-9 či, dle dodavatele ATCC (*angl. American Type Culture Collection*), v bezsérovém mediu BEGM (*angl. Bronchial epithelial growth medium*).

Existuje poměrně velké procento prací, které pro kultivaci buněk BEAS-2B používá médium s přidavkem séra (Deutschle et al., 2006; Gurbani et al., 2013; Gurr et al., 2005; Landsiedel et al., 2009), ale bylo prokázáno, že buňky BEAS-2B za těchto podmínek podstupují terminální diferenciaci v dlaždicový epitel, mění se tedy jejich morfologie,

senzitivita a schopnost proliferace (Lechner et al., 1984; Zhao & Klimecki, 2014). Oproti tomu buňky nádorového původu tuto diferenciaci nepodstupují, a proto dlouhodobá kultivace BEAS-2B v sérovém médiu může vést k silné pozitivní selekci více aberantních buněk a jejich rychlejší nádorové transformaci.

Kultivační povrch má být před samotnou kultivací potažen směsí fibronektinu, kolagenu a bovinního sérového albuminu, aby byla zajištěna lepší adheze a morfologická i metabolická stabilita buněk. Tímto tématem se zabývá práce z roku 2004, která uvádí významné snížení apoptózy u stresovaných buněk BEAS-2B při potahování kultivačního povrchu kolagenem typu I. a fibronektinem (Wadsworth et al., 2004).

Kultivace buněčné linie BEAS-2B je doporučena v maximální konfluenci 80% kultivačního povrchu. Vyšší konfluencí či dokonce kompletní pokrytí kultivačního povrchu způsobuje buňkám stres a zároveň může vést k jejich terminální diferenciaci v dlaždicový epitel plic. Tento efekt byl např. pozorován u keratinocytů, které při vysoké konfluenci ztratily schopnost proliferace a došlo u nich k terminální diferenciaci (Poumay & Pittelkow, 1995).

## **1.4 Analýza mikrojadér**

Analýza mikrojadér (MN analýza) představuje spolehlivou a na vybavení nenáročnou metodu stanovení nespecifického poškození DNA. Za zakladatele této metody považujeme autory Schmid a Heddle (Heddle & Salamone, 1981), kteří nezávisle na sobě zkoumali v 70. letech výskyt mikrojadér v polychromatických erythrocytech v roztěrech kostní dřeni myši, a později byla tato metoda rozšířena o použití cytochalasinu-B (Fenech & Morley, 1985). Dnes je nejvíce používána analýza mikrojadér v lymfocytech periferní krve (Joksic et al., 2016; OECD, 2010; Rossnerova et al., 2011), která byla poprvé popsána v roce 1976 (Countryman & Heddle, 1976) a její modifikace se používají i pro jiné buněčné typy (Sharma et al., 2014).

### **1.4.1 Mikrojádro – jeho vznik a stavba**

V průběhu anafáze dochází k rozdělení sesterských chromatid k opačným pólům pomocí mikrotubulů dělicího vřeténka, které jsou spojeny s centromerou chromatidy (viz Obrázek 2). Následuje telofáze, kdy dojde k znovuvytvoření jaderné membrány, vznikají dvě samostatná jádra a buňka může podstoupit cytokinezi. V případě, že v jádře jsou

přítomny fragmenty chromozomů či acentrické chromatidy, které nemohou být odtaženy mikrotubuly dělicího vřeténka, vytvoří se v telofázi tzv. mikrojádru, které zůstává uvnitř jedné ze dvou dceřiných buněk. Jedná se o samostatný útvar o maximální velikosti 1/3 průměru hlavního jádra buňky, ve kterém je obsažen fragment chromozomu. Po morfologické stránce je mikrojádru identické s hlavním jádrem, takže např. po obarvení preparátu roztokem Giemsky má hlavní jádro i mikrojádru stejnou barvu. Počet mikrojader je variabilní, ale obvykle nacházíme 1-2 jádra, buňka s více jak 5 mikrojadry je spíše raritou (Fenech, 2007). Mikrojádru jsou známá také jako Howell-Jolly tělíška v erythrocytech (Mathew et al., 2015). Viz Obrázek 1.

Basální hladina počtu mikrojader je variabilní a odráží míru poškození DNA konkrétního organismu. Příkladem může být studie na pražských policistech, kdy skupina nekuřáků v letních měsících měla  $4.61 \pm 2.72$  mikrojader/1000 dvoujaderných buněk a v průběhu zimních měsíců s horší kvalitou ovzduší se u nich vyskytovalo  $7.31 \pm 3.72$  mikrojader/1000 dvoujaderných buněk (Rossnerova et al., 2009)

#### **1.4.2 Princip analýzy mikrojader**

Analýzu mikrojader rozdělujeme na dva základní typy dle toho, zda byl použit cytochalasin-B (CBMN, *angl. Cytokinesis-block micronucleus assay*), či nikoli. Cytochalasin-B je inhibitor polymerace aktinových vláken při tvorbě mikrofilamentového prstence, který slouží k cytokinezi a rozdělení dceřiných buněk po mitóze (Fenech & Morley, 1985). Přidáním této látky k buněčné kultuře, dojde k zastavení cytokineze a buňky jsou tak synchronizovány do té doby, než proběhne další dělení. Přidání cytochalasinu-B k buňkám může být provedeno současně s testovanou látkou, po ukončení expozice, či jako odložená ko-kultivace. V případě lidských lymfocytů z periferní krve se cytochalasin-B přidává na posledních 28 hodin kultivace, kdy dojde právě k jednomu dělení lymfocytů (Fenech, 2007).

Test CBMN má několik výhod, tj. např. zachycení právě těch mikrojader, která vznikla během expozice testované látky a vyloučení falešně negativních výsledků pomocí kontroly dělicího indexu kultury. Jsou hodnoceny pouze neapoptotické dvoujaderné buňky se srovnatelně velkými jádry, která jsou od sebe viditelně oddělena. Obvyklý počet hodnocených dvoujaderných buněk je 1000 buněk/vzorek.

CBMN je vhodné kombinovat např. s metodou FISH. Balajee et al. (2014) ve své práci provedli celochromozomové barvení lidských lymfocytů z periferní krve, které byly vystaveny ionizujícímu záření v různých dávkách. Práce uvádí, že častěji byla nalezena mikrojádra s více než jedním fragmentem chromozomu a také to, že v 60-70% mikrojaderech se nenacházela centromera. Dle skupiny Minissi et al. (1999) může mít použití cytochalasinu-B negativní vliv na počet mikrojaderech i proliferaci, a proto je vhodné jej používat jen u dobře proliferujících buněk (Kirsch-Volders et al., 2003).

V případě, že cytochalasin-B použit není, jsou hodnocena všechna mikrojádra, která se v buněčné kultuře nachází.

## 2 Cíle práce a hypotézy

Cílem této diplomové práce je otestovat vhodnost buněčné linie BEAS-2B pro zjišťování genotoxicity vybraných látek pomocí analýzy MN.

Tato práce navazuje na obdobné studie provedené na jiných buněčných typech představujících lidský plicní epitel. Na základě těchto studií bylo navrženo 5 hypotéz. Konkrétní podklady pro testované koncentrace jsou rozebrány v kapitole 5.1 Testované látky.

### 2.1 Dílčí cíle práce

- Optimalizace kultivace buněčné linie BEAS-2B v Lab-Tek™ Chamber Slide systému
- Vytvoření protokolu CBMN v systému Lab-Tek™ Chamber Slide pro buněčnou linii BEAS-2B
- Analýza genotoxicity vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků (B[a]P, 3-nitrobenzantron (3-NBA), 1-nitropyren (1-NP)), EOM ze spalin paliv B0, B30, B100, a vyráběných nanočástic (TiO<sub>2</sub> a Ag).

### 2.2 Hypotézy

H1: „Buněčná linie BEAS-2B je vhodným modelem pro testování genotoxicity pomocí MN analýzy.“

H2: „B[a]P a 3-NBA jsou genotoxické látky, přičemž vyvolávají časově i koncentračně závislou tvorbu MN při námi testovaných koncentracích.“

H3: „1-NP a EOM jsou potenciálně genotoxické látky, přičemž očekáváme pozitivní časově i koncentračně závislou tvorbu MN při námi testovaných koncentracích.“

H4: „Nanočástice TiO<sub>2</sub> jsou potenciálně genotoxickou látkou, ale pozitivní časově i koncentračně závislou tvorbu MN při námi testovaných koncentracích neočekáváme.“

H5: „Nanočástice Ag jsou potenciálně genotoxickou látkou, přičemž očekáváme pozitivní časově i koncentračně závislou tvorbu MN při námi testovaných koncentracích.“

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Testované látky

Při expozici testovaným látkám bylo cílem určit koncentrační a také časovou závislost indukce mikrojader. Při 28 a 48 h expozici byla sledována jak koncentrační, tak časová závislost při stejných koncentracích testované látky. 72 h expozice nižším koncentracím představovala oddělený test, kdy byl sledován vliv nízkých koncentrací za delší časovou jednotku.

#### 3.1.1 Polycyklické aromatické uhlovodíky B[a]P, 3-NBA, 1-NP

PAU jsou stabilní organické sloučeniny obsahující dva a více aromatických benzenových jader, které vznikají nedokonalým spalováním organické hmoty. Na strukturu benzenových jader se mohou navázat další sloučeniny, jako je např. dusík či metan. PAU jsou obvykle ve formě bělavého či žlutého prášku, který je dobře rozpustný v organických rozpouštědlech.

Benzo[a]pyren představuje jeden z nejlépe prozkoumaných karcinogenních PAU, který běžně vzniká při spalování organických sloučenin. Největší měrou jsme jeho působení vystaveni při příjmu potravy a jeho inhalace může vést až k rozvoji rakoviny plic (Agen et al., 1997; Kazerouni et al., 2001). Dle mezinárodní agentury IARC se B[a]P řadí do kategorie 1, tj. prokázané lidské karcinogeny (IARC Monographs, 2014). Studie z roku 1998 uvádí, že při expozici koncentrací B[a]P 50  $\mu\text{g/ml}$  (200  $\mu\text{M}$  při  $M [\text{g/mol}] = 252,31$ ) došlo u buněčné linie BEAS-2B k signifikantnímu zvýšení počtu chromozomových aberací, které, jak již bylo zmíněno, přímo souvisí s počtem mikrojader v buňce (Lee & Lee, 1998). V práci z roku 2013 byl B[a]P použit jako pozitivní kontrola tvorby DNA aduktů u buněčné linie BEAS-2B v koncentraci 15  $\mu\text{M}$  po 24 hodin (Longhin et al., 2013). Vlivem B[a]P na poškození DNA se zabývala i práce skupiny Rossner et al. (2014), která pracovala s buněčnou linií embryonálních plicních fibroblastů HEL12469. Zde byly testované koncentrace pro 24 h kultivaci 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ . Na základě těchto zjištění byly koncentrace B[a]P v této diplomové práci určeny následovně: 28 h kultivace (25  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ ), 48 h kultivace (25  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ ), 72 h kultivace (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ ). B[a]P (Sigma-Aldrich) byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO) a ředěn médiem dle Tabulka 17, Tabulka 18 a Tabulka 19.

3-nitrobenzantron představuje stejně jako B[a]P PAU vznikající při spalování organické hmoty. Byl ve velké míře nalezen ve výfukových plynech dieselových motorů a na povrchu prachových částic, přičemž je prokázáno, že se jedná o silně karcinogenní látku (Enya et al., 1997; Nagy et al., 2005b). Dle mezinárodní agentury IARC se 3-NBA řadí do kategorie 2B, tj. možné lidské karcinogeny (IARC Monographs, 2014). Autoři Lamy et al. (2004) ve své studii sledovali změny ve frekvenci mikrojadern u buněk HepG2 po 1 h expozici koncentracím 12 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM. Již 12 nM koncentrace zvýšila signifikantně ( $p < 0,05$ ) počet mikrojadern oproti kontrole. Nagy et al. (2005a) ve své studii udává, že koncentrace 2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$  po dobu 24 hodin u buněčné linie A549 způsobily významné zvýšení fragmentace DNA, přičemž u koncentrace 20  $\mu\text{M}$  nastal mírný pokles. Podobné výsledky udává i studie skupiny Landvik et al. (2010), která u myších buněk Hepa1c1c7 při koncentracích 3-NBA 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  po dobu 24 hodin zjistila významné zvýšení aduktů i fragmentace DNA. Na základě těchto zjištění byly koncentrace 3-NBA v této diplomové práci určeny následovně: 28 h kultivace (1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ), 48 h kultivace (1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ), 72 h kultivace (12 nM, 25 nM, 250 nM). 3-NBA (Sigma-Aldrich) byl rozpuštěn v DMSO a ředěn médiem dle Tabulka 17, Tabulka 18 a Tabulka 19.

1-nitropyren je posledním z PAU, který byl v této diplomové práci testován. Jedná se, stejně jako u předchozích, o produkt spalování organické hmoty a v případě výfukových plynů dieselových motorů představuje nejvíce zastoupený PAU s navázanou nitroskupinou. Dle mezinárodní agentury IARC se 1-NP řadí do kategorie 2A, tj. pravděpodobné lidské karcinogeny (IARC Monographs, 2014). Práce z roku 2012 udává, že 48 h expozice 1-NP v koncentraci 0,25  $\mu\text{g/ml}$  a 0,5  $\mu\text{g/ml}$  (1  $\mu\text{M}$  a 2  $\mu\text{M}$  při  $M [\text{g/mol}] = 247,25$ ) způsobuje signifikantní ( $p < 0,05$ ) zvýšení počtu mikrojadern u lidských periferních lymfocytů (Bonney et al., 2012). Tyto výsledky potvrzuje i *in vitro* studie na lidských endoteliálních buňkách cév, kdy při 24h expozici koncentracím 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$  1-NP došlo k významnému zvýšení fragmentace DNA (Andersson et al., 2009). Ačkoli výše zmíněné studie poukazují na významné poškození DNA buněk, studie na křečcích uvádí, že pouze 2 jedinci z testované skupiny 21 měli pozitivní nález nádoru na plicích po expozici 1-NP (200  $\mu\text{l}$  v koncentraci 10  $\text{mg/ml}$  aplikováno do plic uspaným křečkům, 1x týdně, 15 týdnů) (Yamamoto et al., 1987). Na základě těchto zjištění byly koncentrace 1-NP v této diplomové práci určeny následovně: 28 h kultivace (1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ ), 48 h kultivace (1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ ), 72 h kultivace (10 nM, 200 nM, 1  $\mu\text{M}$ ).

1-NP (Sigma-Aldrich) byl rozpuštěn v DMSO a ředěn médiem dle Tabulka 17, Tabulka 18 a Tabulka 19.

### 3.1.2 Extrahovatelná organická hmota ze spalin nafty a bionafty

Spaliny z diesellových motorů byly mezinárodní agenturou IARC zařazeny mezi prokázané lidské karcinogeny (kategorie 1) (IARC Monographs, 2014). Pevná složka spalin diesellových motorů se označuje jako DEP (*angl. Diesel exhaust particles*) a představuje heterogenní směs částic o různé velikosti, na kterou adherují organické látky vznikající při spalování paliva. EOM ze spalin motorů se liší nejen typem motoru či použitým palivem, ale také způsobem extrakce.

Práce autorů Don Porto Carero (2001) se zabývala mimo jiné genotoxicitou EOM z DEP, přičemž u buněčné linie A549 došlo k signifikantnímu zvýšení fragmentace DNA ( $p < 0,05$ ) při 48 h expozici koncentraci 1,6  $\mu\text{g/ml}$ . Podobně práce skupiny Bonvallot et al. (2001) udává signifikantně ( $p < 0,05$ ) zvýšené markery zánětlivé reakce u lidských plicních buněk 16HBE při 24 h expozici 15  $\mu\text{g/ml}$  EOM z DEP. Na základě těchto zjištění byly koncentrace EOM v této diplomové práci určeny následovně: 28 h kultivace (1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ ), 48 h kultivace (1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ ), 72 h kultivace (1  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ ).

V této diplomové práci byly použity EOM ze spalin nafty (B0), nafty s 30% příměsí biosložky z řepkového oleje (B30) a 100% bionafta z řepkového oleje (B100). EOM byly získány z Vědeckotechnického parku Roztoky (VTP Roztoky), testovaným motorem byl Iveco Tector (6 válců, objem motoru 6 litrů). Částice byly zachyceny na filtry Pallflex TX40HI (přístroj HiVol 3000) a EOM byla extrahována dichlormetanem. Tento roztok obsahující organickou hmotu původně adherovanou na částicích byl odpařen dusíkem a rezidua rozpuštěna v DMSO. Koncentrace vzorků získaných z VTP Roztoky činila 0,1 g/ml DMSO. Veškeré vzorky byly uchovávány v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do doby těsně před expozicí. Záznam ředění je v Tabulka 17, Tabulka 18 a Tabulka 19. Chemická analýza koncentrací PAU, které se v jednotlivých vzorcích nachází, je přiložena jako Tabulka 20.

### 3.1.3 Nanočástice $\text{TiO}_2$ a Ag

Jak již bylo zmíněno, nanočástice  $\text{TiO}_2$  i Ag jsou jedněmi z nejpoužívanějších nanomateriálů, jejichž genotoxický vliv a mechanismus účinku na živé organismy není



plně prozkoumán. Nanomateriály pro tuto diplomovou práci byly získány z Evropského depozitáře nanomateriálů projektu NANoREG ve formě prášku či suspenze.

TiO<sub>2</sub> (NM101, výrobce Joint Research Centre) použitý v této práci má krystalickou formu anatas s velikostí částic 5 – 8 nm ve všech směrech (95% < 100 nm, 77% < 50 nm, 11% < 10 nm). Aktivní povrch činí 170 – 316 m<sup>2</sup>/g. Ve složení převládá Ti (58,78 % w/w) a O<sub>2</sub> (40,35 % w/w), přičemž dle metody ICP-OES (*angl. Inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) se NM101 skládá navíc z Al, P, S, Zr (> 0,01 % w/w), Na (> 0,1 % w/w) a dále pak z K a Ca (0,01 – 0,05 ‰ w/w). Metoda EDS (*angl. Energy dispersive spectrometer*) určila následující složení NM101 Ti: (58,78 % w/w), O<sub>2</sub> (40,35 % w/w) a Si (2,9 ‰ w/w), P (2,7 ‰ w/w), Al (0,9 ‰ w/w) a S (1,2 ‰ w/w) (Rasmussen et al., 2014). V našem případě se jednalo o práškovou formu TiO<sub>2</sub>.

Příprava NM101 pro expozici probíhala dle protokolu autorů Jensen et al. (2011) pro projekt NANoREG. Prvním krokem bylo navážení 15,36 mg NM101 do protokolem doporučené 10 ml skleněné vialky (Schott Duran), následované zvlhčením 30 µl 99% etanolu a poté byla provedena disperze v 5,97 ml roztoku bovinního sérového albuminu (0,05% w/w bovinního sérového albuminu ve sterilní deionizované vodě s odporem 18,2 MΩ). Takto připravená suspenze byla po dobu 16 minut ve vodní lázni s ledem sonikována, aby bylo dosaženo optimální disperze částic v roztoku. Finální suspenze částic měla koncentraci 2,56 mg/ml a byla dále ředěna médiem dle Tabulka 17, Tabulka 18 a Tabulka 19. Na základě výsledků cytotoxicity, které nejsou součástí této práce, byly koncentrace TiO<sub>2</sub> zvoleny následovně: 28 h kultivace (1 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml), 48 h kultivace (1 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml), 72 h kultivace (1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml). Přesné nastavení sonikátoru je obsahem protokolu autorů Jensen et al.

Ag (NM302, výrobce Fraunhofer) použité v této práci bylo dodáno ve formě suspenze tyčinek stříbra se šířkou 100 – 200 nm a délkou 5 – 10 µm o složení >99,99% w/w Ag s příměsí Ba (0,0057 ‰ w/w), Cu (0,0011 ‰ w/w), K (0,0491 ‰ w/w), Na (0,001 ‰ w/w), Ni (0,0079 ‰ w/w) a V (0,0014 ‰ w/w). Složení suspenze v deionizované vodě s odporem 18,2 MΩ je následovně: tyčinky stříbra (8,6% w/w), polyvinylpyrrolidon (<1% w/w), akryl/akrylátové kopolymery (< 2% w/w), polykarboxylát éter (< 2% w/w) (Robinson et al., 2014).

První krok přípravy nanočástic NM302 probíhal oproti NM101 odlišně díky, rozdílné formě. K 168,3 µl (185,06 mg) suspenze NM302 jsme přidali 5,8317 ml roztoku bovinního

sérového albuminu (0,05% w/w bovinního sérového albuminu ve sterilní deionizované vodě s odporem 18,2 MΩ) a takto připravená suspenze byla v doporučených skleněných vialkách sonikována po dobu 16 minut ve vodní lázni s ledem stejně jako NM101. Finální suspenze částic měla koncentraci 2,56 mg/ml a byla dále ředěna médiem dle Tabulka 17, Tabulka 18 a Tabulka 19. Na základě výsledků cytotoxicity, které nejsou součástí této práce, byly koncentrace Ag v této diplomové práci zvoleny následovně: 28 h kultivace (1 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml), 48 h kultivace (1 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml), 72 h kultivace (1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml).

### **3.2 Kultivační protokol buněčné linie BEAS-2B**

Buněčná linie BEAS-2B byla zakoupena od společnosti ATCC, dle výrobce se jedná o 38. pasáž (38P). Pro testy v rámci této diplomové práce byla rozmražena zásobní ampule (44P, 28. 3. 2015), přičemž pro testování látek byla u všech pokusů použita vždy 48. pasáž.

#### **3.2.1 Roztoky pro kultivaci buněk BEAS-2B**

Pro standardní kultivaci buněk BEAS-2B dle ATCC je potřeba kultivační médium BEGM™ BulletKit™ (Lonza), BEBM™ (*angl. Bronchial epithelial basal medium*) (Lonza), roztok 0,25% Trypsin/0,53 mM EDTA (Sigma-Aldrich) + 0,5% polyvinylpyrrolidon (PVP) (Sigma-Aldrich) a podkladové médium. Konkrétní pracovní teploty viz Tabulka 21.

#### **3.2.2 Příprava roztoků pro kultivaci buněk BEAS-2B**

Pro přípravu kultivačního media BEGM™ bylo použito 500 ml BEBM™ (*angl. Bronchial epithelial basal medium*) a růstové faktory (extrakt z hovězí hypofýzy 2 ml, lidský epidermální růstový faktor 0,5 ml, kyselina retinová 0,5 ml, hydrokortison 0,5 ml, epinefrin 0,5 ml, transferin 0,5 ml, insulin 0,5 ml, trijodthyronin 0,5 ml), které jsou součástí BEGM™ BulletKit™. Růstové faktory jsme nechali při pokojové teplotě rozmrznout a jednotlivé vialky jsme zcentrifugovali, abychom zabránili ulpění kapek na vnitřní straně víčka. Všechny růstové faktory jsme přepipetovali do 500 ml BEBM™ dle návodu výrobce. Takto připravené médium bylo skladováno při 2-8°C v lednici a temperováno bylo pouze pracovní množství media.

Pro přípravu podkladového média byly použity roztoky BEBM™ (2-8°C), fibronectin (2-8°C) (Sigma-Aldrich), kolagen typu I. (2-8°C) (Sigma-Aldrich) a bovinní sérový

albumin (BSA) (2-8°C) (Sigma-Aldrich). Do námi zvoleného množství BEBM™ jsme postupně přidali určené množství kolagenu typu I., fibronektinu a BSA. Vše jsme dobře promísili a takto připravené podkladové medium bylo skladováno maximálně 3 měsíce při 2-8°C. Konkrétní koncentrace jednotlivých složek viz Tabulka 22.

Pro přípravu roztoku 0,25% Trypsin/0,53 mM EDTA + 0,5% PVP bylo ke 12 ml 0,25% Trypsin/0,53 mM EDTA přidáno 60 µl 100% roztoku PVP.

### **3.2.3 Potažení kultivačních nádob podkladovým médiem**

Předem připravené podkladové medium bylo sterilně aplikováno do kultivačních nádob a kývavým pohybem byl pokryt celý kultivační povrch. Uzavřené nádoby byly inkubovány přes noc v termostatu při 37°C, neprodyšně zabalené, aby se omezil případný odpar podkladového media. Poté byly tyto nádoby ve vodorovné poloze skladovány v uzavřených plastových sáčkích maximálně po dobu 1 měsíce při pokojové teplotě ve tmě. Před samotným nasazením buněk bylo podkladové médium sterilně odsáto.

### **3.2.4 Rozmražení buněk BEAS-2B**

Ampuli s buňkami (1 ml o koncentraci 500 000 buněk/ml) jsme vyjmuli z kapalného dusíku a v gáze napuštěné 70% etanolem jsme ji přenesli do laminárního boxu, kde jsme pootočili závitem ampule o ¼ otáčky pro uvolnění případného tlaku. Závit byl opět utažen a ampule byla ponořena do vodní lázně (37°C) tak, aby závit nebyl v kontaktu s tekutinou v lázni. Za mírného protřepávání byl obsah ampule po 1-2 minutách rozmražen. Po rozmražení byla ampule sterilně otevřena v laminárním boxu a její obsah přepipetován do centrifugační zkumavky. K buněčné suspenzi bylo pomalu přidáno 10 ml vytemperovaného média (37°C) a poté byla centrifugována 5 minut při 800 otáčkách/min (125 g). Po odsátí supernatantu byl pelet buněk šetrně resuspendován v 10 ml nového média. Takto připravená buněčná suspenze byla rozpipetována do předem připravených kultivačních lahví v koncentraci 3000 buněk/cm<sup>2</sup> s 10 ml vytemperovaného média. Buňky byly 24 hodin kultivovány v termostatu (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), poté bylo médium kompletně vyměněno, abychom odstranili možné zbytky kryoprotektantu, a buňky byly opět vráceny do termostatu.

### **3.2.5 Kultivace a pasážování buněk BEAS-2B**

Výměna média i pasážování bylo vždy provedeno ve sterilním prostředí laminárního boxu. Výměna média byla prováděna každé dva dny, pokud nebylo dosaženo 80% konfluence buněk, v tom případě byly buňky pasážovány. Médium bylo vždy kompletně odsáto a nahrazeno stejným množstvím vytemperovaného čerstvého média. Poté byly buňky vráceny do termostatu.

Při pasážování buněčné kultury bylo kompletně odsáto kultivační médium a do kultivačních lahví s povrchem 75 cm<sup>2</sup> byly přidány 2 ml roztoku 0,25% Trypsin/0,53 mM EDTA + 0,5% PVP. Roztok byl kývavým pohybem rozprostřen po kultivační ploše a uzavřená kultivační nádoba byla umístěna do termostatu na 5-10 minut. Po 5 minutách jsme kultivační lahev vyjmuli z termostatu a pod invertovaným mikroskopem zkontrolovali, zda se už buňky uvolnily, či nikoli. Pokud ano, kultivační lahev jsme přenesli do laminárního boxu a přidali jsme 5 ml vytemperovaného media. Několikrát jsme šetrně opláchnuli kultivační plochu a resuspendovali případné shluky buněk. Takto vzniklou suspenzi jsme přepipetovali do centrifugační zkumavky a centrifugovali 5 minut při 1000 otáčkách/min (200 g). Po odsátí supernatantu jsme buňky resuspendovali v 5 ml vytemperovaného čerstvého media a rozpipetovali do předem připravených kultivačních nádob v námi zvolené koncentraci. Buňky jsme poté kultivovali v termostatu (37°C, 5% CO<sup>2</sup>).

V rámci této diplomové práce nebylo třeba buňky BEAS-2B zamrazovat, v případě zájmu čtenáře je postup popsán v textové Příloze č. 1 a Tabulka 23.

### **3.3 Protokol zpracování vzorků pro analýzu mikrojader v Lab-Tek™ Chamber Slide systému**

Nunc® Lab-Tek® Chamber Slide™ systém, který byl použit v této diplomové práci, se sestává z plastového podložního sklíčka, na němž je přichycen blok s osmi plně oddělenými komůrkami. Tyto komůrky překrývá volně položené víčko zajišťující výměnu plynů a sterilitu kultivovaných buněk. Každá komůrka má kultivační plochu 0,8 cm<sup>2</sup> a doporučený pracovní objem media je 0,2 – 0,4 ml.

### 3.3.1 Kultivace buněk BEAS-2B v Lab-Tek™ Chamber Slide systému

Při kultivaci buněk BEAS-2B v Lab-Tek™ Chamber Slide systému byl použit stejně jako u standardní kultivace v kultivačních lahvích potah kultivačního povrchu podkladovým médiem. Předem připravené podkladové medium bylo sterilně aplikováno do jednotlivých komůrek v objemu 150  $\mu$ l/komůrka a kývavým pohybem byl pokryt celý kultivační povrch. Podložní sklička byla poté inkubována přes noc v termostatu při 37°C. Před samotným nasazením buněk bylo podkladové medium ve sterilních podmínkách odsáto.

### 3.3.2 Pracovní postup pro 28, 48 a 72 hodinovou expozici

Buňky byly nasazeny do komůrek přibližně 24 h předem v koncentraci: 6000 b/komůrka (28 h expozice), 3000 b/komůrka (48 h expozice) a 1500 b/komůrka (72 h expozice) v 0,2 ml media. Buňky se nacházely v exponenciální fázi růstu a nedosáhly více než 80% konfluence.

V případě 28 h expozice bylo druhý den po nasazení buněk veškeré médium odsáto a nahrazeno 199  $\mu$ l roztoku testované látky o příslušné koncentraci (B[a]P, 3-NBA, 1-NP, EOM z B0, B30, B100 a nanočástice NM101 a NM302). K tomuto objemu byl poté přidán roztok cytochalasinu-B (1  $\mu$ l, koncentrace 200  $\mu$ g/ml), aby bylo dosaženo výsledné koncentrace 0,1  $\mu$ g/ml a celý objem komůrky byl několikrát promíchán nasátím pipetou. Po 28 h od přidání testované látky společně s cytochalinem-B byla provedena fixace vzorku a experiment byl ukončen.

Pro 48 h expozici bylo druhý den po nasazení buněk odsáto veškeré médium a v případě B[a]P, 3-NBA, 1-NP a EOM z B0, B30, B100 nahrazeno 300  $\mu$ l media s testovanou koncentrací látky. V případě nanočástic NM101 a NM302 bylo odsáté médium nahrazeno 199  $\mu$ l testované koncentrace a 101  $\mu$ l média pro doplnění na objem 300  $\mu$ l. To bylo provedeno z toho důvodu, aby se u 48 h expozice dodrželo stejné množství  $\mu$ g částic na  $\text{cm}^2$  kultivační plochy jako u 28 h expozice. U všech testovaných látek bylo po 20 h expozice z 300  $\mu$ l odebráno 1,5  $\mu$ l a nahrazeno 1,5  $\mu$ l cytochalasinu-B (koncentrace 200  $\mu$ g/ml), aby byla dosažena finální koncentrace v mediu 0,1  $\mu$ g/ml, a celý objem komůrky byl poté několikrát promíchán nasátím pipetou. Po 28 h od přidání cytochalasinu-B byla provedena fixace vzorku a experiment byl ukončen.

V případě nejdelší, tj. 72 h expozice bylo stejně jako v případě 24 h expozice veškeré médium nahrazeno 200  $\mu$ l (199  $\mu$ l pro NM101 a NM302) testované koncentrace dané látky. Po 44 hodinách expozice bylo u látek B[a]P, 3-NBA, 1-NP a EOM z B0, B30, B100 médium odsáto a vyměněno za 199  $\mu$ l čerstvého média se stejnou koncentrací testované látky jako v původním médiu. K tomuto objemu byl přidán roztok cytochalasinu-B (1  $\mu$ l, koncentrace 200  $\mu$ g/ml), aby bylo dosaženo výsledné koncentrace 0,1  $\mu$ g/ml. Celý objem komůrky byl poté promíchán nasátím pipetou jako v předchozích případech. V případě nanočástic NM101 a NM302 bylo k médiu s částicemi pouze přidáno čerstvé médium o objemu 149,25  $\mu$ l a roztok cytochalasinu-B o objemu 1,75  $\mu$ l (koncentrace 200  $\mu$ g/ml), aby bylo dosaženo výsledné koncentrace 0,1  $\mu$ g/ml v celkovém objemu 350  $\mu$ l media. Tento postup byl zvolen z důvodu vysoké sedimentace částic a rizika zvýšení jejich koncentrace na  $\text{cm}^2$  v případě kompletní výměny média. Po 28 h od přidání cytochalasinu-B byla provedena fixace všech vzorků a experiment byl ukončen.

### **3.3.3 Ukončení expozice a fixace preparátu**

Ukončení expozice bylo provedeno fixací vzorku. Po uplynutí dané expoziční doby bylo již v nesterilních podmínkách odsáto přibližně 90% média z komůrek a na 3,5 minuty bylo přidáno 200  $\mu$ l hypotonického roztoku o teplotě 37°C (0,55 g KCL ve 100 ml deionizované vody s odporem 18,2 M $\Omega$ ). Po uplynutí této doby byla odsáta veškerá tekutina v komůrce a následně bylo přidáno 0,2 ml vychlazeného (2-8°C) fixačního roztoku (metanol a kyselina octová v poměru 3:1) Po uplynutí 1-2 minut byl fixační roztok odsát a v posledním kroku fixace bylo přidáno 0,2 ml vychlazeného (2-8°C) metanolu. Po uplynutí 1-2 minut byl metanol zcela odsát, byl odstraněn blok komůrek a hotové sklíčko s osmi samostatnými ploškami fixovaných buněk bylo ponecháno alespoň 20 minut volně schnout.

Pro účely hodnocení preparátu pomocí světelného mikroskopu byly poté preparáty barveny po dobu 3,5 minuty 5% roztokem Giemsy.

## **3.4 Způsob hodnocení analýzy mikrojader**

V rámci této diplomové práce byl pro všechny testované koncentrace vytvořen buněčný triplikát, tj. v našem případě tři samostatné komůrky, které byly odděleně exponovány i fixovány. V každé z těchto komůrek bylo hodnoceno 500 dvoujaderných buněk (pokud tomu bylo jinak, je tak uvedeno v Tabulka 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15) a byl zaznamenán jak

počet buněk s mikrojádrem (ABB, aberantní dvoujaderná buňka), tak i počet mikrojader v buňce. Mikrojádra byla hodnocena dle protokolu Fenech et al. (2007) a výsledky jsou vyjádřeny jako % ABB v dvoujaderných buňkách vypočtené jako průměr ze tří hodnot získaných z buněčného triplikátu. V každé komůrce byl také určen dělicí index buněk (CBPI, *angl. Cytokinesis-block proliferation index*) u 500 buněk. Tento index byl vypočítán dle vzorce  $(M1 + 2 \times M2 + 3 \times (M3 + M4)) / N$ , kde M1 - 4 představuje počet buněk s jedním až a čtyřmi jádry a N je celkový počet hodnocených buněk. CBPI udává počet dokončených buněčných dělení během působení cytochalasinu-B (v našem případě za 28 hodin). Pro vyhodnocování frekvence mikrojader je CBPI ideálně roven 2, tzn., že všechny hodnocené buňky prodělaly právě dvě buněčná dělení.

Statistická analýza dat byla provedena pomocí testu homogenity dvou binomických rozdělení, kdy byl porovnáván průměrný pozorovaný výskyt ABB na 1000 dvoujaderných buněk při dané koncentraci testované látky vůči kontrolnímu průměrnému počtu ABB v 1000 dvoujaderných buňkách. Jako výsledek bylo považováno zvýšení počtu MN u testované koncentrace oproti negativní kontrole, tzn.  $H_0: p_1 = p_2$  a  $H_1: p_1 > p_2$ , kde  $p_1$  je počet ABB v 1000 dvoujaderných buňkách při dané koncentraci testované látky,  $p_2$  je počet ABB v 1000 dvoujaderných buňkách u negativní kontroly. Z tohoto důvodu byl vybrán jednostranný test. Tato analýza byla provedena pro všechny koncentrace oproti kontrole a dále také pro testované koncentrace dané látky mezi s sebou z důvodu určení koncentrační závislosti výskytu ABB. Ve druhém případě byl vždy porovnáván pozorovaný výskyt ABB v 1000 dvoujaderných buňkách při vyšší koncentraci testované látky vůči průměrnému počtu ABB v 1000 dvoujaderných buňkách nižší koncentrace.

Vzorec použitý pro statistický výpočet:

$$Z = \frac{p_1 - p_2}{\sqrt{p(1-p)\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}, \quad \text{kde } p = \frac{p_1 + p_2}{n_1 + n_2}$$

$n_1$  je počet hodnocených dvoujaderných buněk při dané koncentraci testované látky a  $n_2$  je počet hodnocených dvoujaderných buněk u negativní kontroly. Výsledné  $z$  bylo vzato z Tabulky 8 pro Z, a pokud platilo  $z > 1 - \alpha$ , kdy  $\alpha$  je hladina významnosti (0,05; 0,01; 0,001), tak je platná hypotéza  $H_1 : p_1 > p_2$ , tudíž testovaná koncentrace signifikantně zvýšila počet mikrojader oproti kontrole.

## 4 Výsledky

### 4.1 Polycyklické aromatické uhlovodíky

Benzo[*a*]pyren jako prokázaný lidský karcinogen byl pro buněčnou linii BEAS-2B v koncentracích 25  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  a 200  $\mu\text{M}$  aplikovaných po dobu 28 i 48 hodin genotoxický. Signifikantní zvýšení počtu mikrojader ( $p < 0,05$ ) po 28 h expozici bylo zaznamenáno u koncentrací 100  $\mu\text{M}$  a 200  $\mu\text{M}$  a u 48 h expozic bylo vysoce signifikantní zvýšení počtu mikrojader ( $p < 0,001$ ) zjištěno u všech koncentrací (viz Tabulka 1 a 2, Graf č.1). Dále pak byla zjištěna časová závislost v indukci počtu MN mezi 28 a 48 h expozicemi ( $p < 0,01$  a  $0,001$ ). Signifikantní pozitivní koncentrační závislost počtu mikrojader prokázána nebyla, ačkoli u koncentrací 25  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  při 28 h expozici k mírnému nárůstu došlo. Dělicí index CBPI negativně koreloval se zvyšující se koncentrací B[*a*]P. U 72 h expozic došlo k vysoce signifikantnímu zvýšení počtu mikrojader ( $p < 0,001$ ) u všech testovaných koncentrací, ale stejně jako u 28 h a 48 h expozice pozitivní koncentrační závislost počtu mikrojader zjištěna nebyla (viz Tabulka 1 a 2, Graf č.2).

3-nitrobenzathron stejně jako B[*a*]P působil na buňky genotoxicky. Po 28 h expozici došlo po aplikaci 1  $\mu\text{M}$  1-NBA k signifikantnímu zvýšení počtu mikrojader ( $p < 0,01$ ) a vysoce signifikantní zvýšení ( $p < 0,001$ ) bylo zaznamenáno u koncentrací 5  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ . 48 h expozice způsobila vysoce signifikantní ( $p < 0,001$ ) zvýšení počtu mikrojader oproti kontrole u všech testovaných koncentrací (viz Tabulka 3 a 4, Graf č.3). Dále pak byla zjištěna časová závislost mezi 28 a 48 h expozicemi ( $p < 0,05$  a  $0,001$ ). Signifikantní pozitivní koncentrační závislost počtu mikrojader prokázána nebyla, ačkoli u všech koncentrací při 28 h expozici a u 1  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{M}$  koncentrace při 48 h expozici k mírnému nárůstu došlo. U 72 h expozic došlo k vysoce signifikantnímu zvýšení počtu mikrojader ( $p < 0,001$ ) u všech testovaných koncentrací a zároveň byla zaznamenána pozitivní koncentrační závislost mezi 12 nM a 25 nM koncentrací ( $p < 0,05$ ) a mezi 12 nM a 250 nM koncentrací ( $p < 0,05$ ) (viz Tabulka 3 a 4, Graf č.4). Dělicí index CBPI se v průběhu zvyšující se koncentrace významně neměnil.

Aplikace 1-nitropyrenu po dobu 28 h vedla k signifikantnímu zvýšení počtu mikrojader u všech testovaných koncentrací: 1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ), 5  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ). 48 h expozice obdobně způsobila vysoce signifikantní zvýšení počtu mikrojader ( $p < 0,001$ ) při všech testovaných koncentracích (viz Tabulka 5 a 6, Graf č.5). Dále pak byla zjištěna



časová závislost mezi 28 a 48 h expozicí pro 1  $\mu\text{M}$  koncentrací ( $p < 0,01$ ), přičemž mírný nárůst počtu mikrojadér byl také u 5  $\mu\text{M}$  koncentrace. Signifikantní pozitivní koncentrační závislost počtu mikrojadér prokázána nebyla, zatímco po aplikaci nejvyšší koncentrace 1-NP došlo k poklesu procenta mikrojadér. 48 h expozice vedla k poklesu počtu mikrojadér se zvyšující se koncentrací 1-NP. U 72 h expozic došlo k vysoce signifikantnímu zvýšení počtu mikrojadér ( $p < 0,001$ ) u všech testovaných koncentrací (viz Tabulka 5 a 6, Graf č.6). Pozitivní koncentrační závislost nebyla pozorována.

## 4.2 Extrahovatelná organická hmota ze spalin dieselových paliv

Organická hmota extrahovaná ze spalin nafty (B0), nafty s 30% přídavkem biosložky (B30) a 100% bionafty prokazatelně zvýšila počet mikrojadér ve všech testovaných koncentracích při 28, 48 i 72 h expozici. EOM ze spalin již při koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$  při 28 h expozici signifikantně ( $p < 0,05$  pro B0 a B100,  $p < 0,01$  pro B30) zvýšila počet mikrojadér oproti kontrole. Při této koncentraci byla také nalezena časová závislost mezi 28 a 48 h expozicí pro B0, B30 i B100 (viz Tabulka 7, 8, 9, 10, 11, 12 a Graf č. 7-12). 72 h expozice B0, B30 i B100 ukazuje na pokles počtu mikrojadér při koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$  oproti 1  $\mu\text{g/ml}$  a opětovný vzestup při koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$ , který je srovnatelný s počtem MN při 1  $\mu\text{g/ml}$ . Dělicí index CBPI koreluje s tímto poklesem a klesá se zvyšující se koncentrací dané EOM v médiu. Souhrnný Graf č.13 pro B0, B30 a B100 ukazuje, že žádná z testovaných EOM se nijak významně ve svém působení na buňky BEAS-2B neliší.

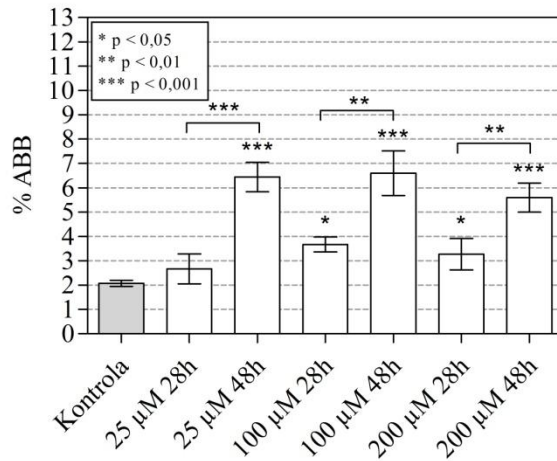
## 4.3 Nanočástice $\text{TiO}_2$ a Ag

Nanočástice titanu NM101 nejsou dle analýzy mikrojadér při 28 a 48 h expozici koncentracím 0,25  $\mu\text{g/cm}^2$ , 2,5  $\mu\text{g/cm}^2$ , 6,25  $\mu\text{g/cm}^2$  kultivační plochy genotoxické (viz Tabulka 13, 14 a Graf č.14). Naproti tomu 72 h kultivace při koncentraci 0,25  $\mu\text{g/cm}^2$  významně zvýšila ( $p < 0,001$ ) počet nalezených mikrojadér (viz Tabulka 13, 14 a Graf č.15). Vyšší koncentrace při stejné délce kultivace zvýšení počtu mikrojadér neindukovaly. Dělicí index CBPI se v průběhu zvyšující se koncentrace nijak významně neměnil.

Nanočástice stříbra NM302 při 28 h expozici koncentracím 0,25  $\mu\text{g/cm}^2$ , 2,5  $\mu\text{g/cm}^2$ , 6,25  $\mu\text{g/cm}^2$  mírně zvýšily počet mikrojadér, nejednalo se ale o statisticky významné zvýšení na 5% hladině významnosti. 48h expozice naproti tomu při koncentraci 2,5  $\mu\text{g/cm}^2$  mírně statisticky významné ( $p < 0,05$ ) zvýšení počtu mikrojadér oproti kontrole indukovala

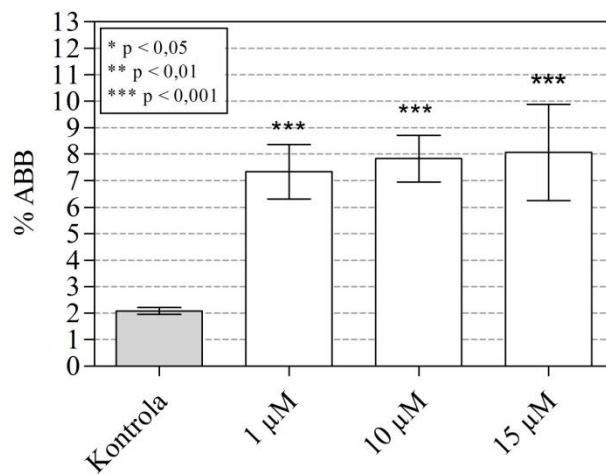
(viz Tabulka 15, 16 a Graf č.16). Při 72 h expozici došlo u koncentrace  $0,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  k velmi významnému ( $p < 0,001$ ) zvýšení počtu MN, přičemž vyšší koncentrace také vykazovaly signifikantní zvýšení počtu mikrojadér vůči kontrole ( $p < 0,01$  pro  $1,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  a  $p < 0,05$  pro  $2,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) (viz Tabulka 15, 16 a Graf č.17). Dělicí index CBPI se v průběhu zvyšující se koncentrace nijak významně neměnil.

**Graf č. 1, Mikrojádra indukovaná po expozici B[a]P, 28 a 48 hodin**



Graf znázorňuje procento mikrojadra ve vzorku, chybová úsečka udává směrodatnou odchylku SD. Hodnoty  $p$  jsou vztaheny ke kontrole, případně k nižší testované koncentraci. B[a]P (benzo[a]pyren)

**Graf č.2, Mikrojádra indukovaná po expozici B[a]P 72 hodin**



Graf znázorňuje procento mikrojadra ve vzorku, chybová úsečka udává směrodatnou odchylku SD. Hodnoty  $p$  jsou vztaheny ke kontrole. B[a]P (benzo[a]pyren)

**Tabulka 1: Analýza počtu mikrojadér po aplikaci B[a]P**

Expozice h	Koncentrace	Vzorek č.1				Vzorek č.2				Vzorek č.3				Průměrné % ABB	CBPI
		Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB	Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB	Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB		
28	0 $\mu$ M	-	-	-	-	750	16	16	2,13%	450	10	12	2,22%	2,18%	1,74
28	25 $\mu$ M	500	16	18	3,20%	500	14	14	2,80%	400	8	9	2,00%	2,67%	1,72
28	100 $\mu$ M	500	20	20	4,00%	500	17	17	3,40%	500	18	19	3,60%	3,67%	1,72
28	200 $\mu$ M	400	15	15	3,75%	400	13	13	3,25%	400	11	12	2,75%	3,25%	1,70
48	0 $\mu$ M	500	13	15	2,60%	500	12	13	2,40%	500	8	11	1,60%	2,20%	1,78
48	25 $\mu$ M	500	30	30	6,00%	500	36	41	7,20%	500	31	31	6,20%	6,47%	1,75
48	100 $\mu$ M	500	32	35	6,40%	500	38	39	7,60%	500	29	31	5,80%	6,60%	1,66
48	200 $\mu$ M	500	31	39	6,20%	500	25	26	5,00%	500	28	32	5,60%	5,60%	1,60
72	0 $\mu$ M	500	11	11	2,20%	500	10	11	2,00%	500	10	10	2,00%	2,07%	1,81
72	1 $\mu$ M	500	41	53	8,20%	500	31	35	6,20%	500	38	41	7,60%	7,33%	1,80
72	10 $\mu$ M	400	29	31	7,25%	430	38	41	8,84%	500	37	39	7,40%	7,83%	1,79
72	15 $\mu$ M	400	40	40	10,00%	500	39	39	7,80%	500	32	32	6,40%	8,07%	1,68

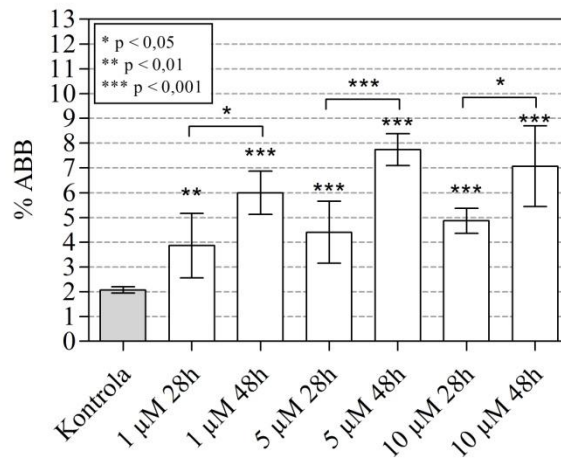
B[a]P (benzo[a]pyren), DB (dvoujaderná buňka), ABB (aberrantní dvoujaderná buňka), MN (mikrojádru), CBPI (*angl. Cytokinesis-block proliferation index*)

**Tabulka 2: Hladina statistické signifikance  $p$  pro porovnání počtu mikrojader indukovaných po působení B[a]P**

Expozice h	Koncentrace	28	28	28	28	48	48	48	48	72	72	72	72
		0 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$	0 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$	0 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	15 $\mu\text{M}$
28	0 $\mu\text{M}$												
28	25 $\mu\text{M}$	0,448											
28	100 $\mu\text{M}$	0,011	0,102										
28	200 $\mu\text{M}$	0,034	0,215	n									
48	0 $\mu\text{M}$												
48	25 $\mu\text{M}$		< 0,001			< 0,001							
48	100 $\mu\text{M}$			0,002		< 0,001	0,184						
48	200 $\mu\text{M}$				0,007	< 0,001	n	n					
72	0 $\mu\text{M}$												
72	1 $\mu\text{M}$									< 0,001			
72	10 $\mu\text{M}$									< 0,001	0,337		
72	15 $\mu\text{M}$									< 0,001	0,663	0,401	

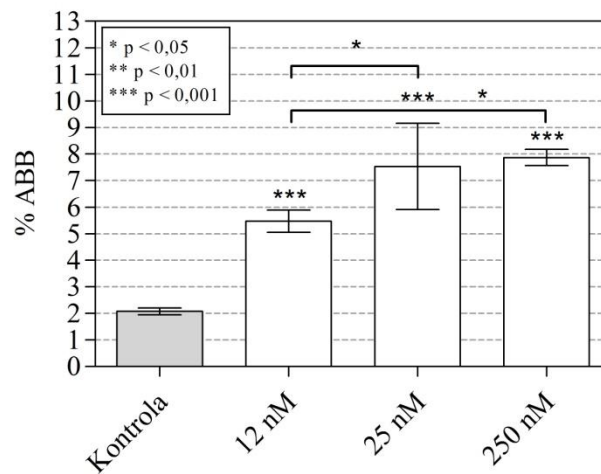
Statistická analýza byla provedena testem homogenity dvou binomických rozdělení, kdy vypočtené  $Z$  bylo porovnáno s Tabulkou č. 24 pro  $z$ . Hodnota  $p$  byla vypočítána jako  $1-z$ . B[a]P (benzo[a]pyren), n (hodnoty nesplňovaly kritéria pro jednostranný test homogenity binomického rozdělení), žlutě ( $p < 0,05$ ), zeleně ( $p < 0,01$ ), červeně ( $p < 0,001$ ).

**Graf č.3, Mikrojádra indukovaná po expozici 3-NBA 28 a 48 hodin**



Graf znázorňuje procento mikrojadra ve vzorku, chybová úsečka udává směrodatnou odchylku SD. Hodnoty  $p$  jsou vztaženy ke kontrole, případně k nižší testované koncentraci. 3-NBA (3-nitrobenzantron)

**Graf č.4, Mikrojádra indukovaná po expozici 3-NBA 72 hodin**



Graf znázorňuje procento mikrojadra ve vzorku, chybová úsečka udává směrodatnou odchylku SD. Hodnoty  $p$  jsou vztaženy ke kontrole, případně k nižší testované koncentraci. 3-NBA (3-nitrobenzantron)

**Tabulka 3: Analýza počtu mikrojadér po aplikaci 3-NBA**

Expozice h	Koncentrace	Vzorek č.1				Vzorek č.2				Vzorek č.3				Průměrné % ABB	CBPI
		Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB	Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB	Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB		
28	0 $\mu$ M	500	9	9	1,80%	500	9	9	1,80%	350	7	9	2,00%	1,87%	1,79
28	1 $\mu$ M	500	19	21	3,80%	500	26	27	5,20%	500	13	14	2,60%	3,87%	1,80
28	5 $\mu$ M	500	24	24	4,80%	500	27	27	5,40%	500	15	15	3,00%	4,40%	1,77
28	10 $\mu$ M	500	24	24	4,80%	500	22	23	4,40%	500	27	27	5,40%	4,87%	1,75
48	0 $\mu$ M	500	8	8	1,60%	500	13	13	2,60%	500	11	11	2,20%	2,13%	1,78
48	1 $\mu$ M	500	27	27	5,40%	500	28	30	5,60%	500	35	39	7,00%	6,00%	1,75
48	5 $\mu$ M	500	41	47	8,20%	500	35	38	7,00%	500	40	44	8,00%	7,73%	1,77
48	10 $\mu$ M	500	39	45	7,80%	500	26	30	5,20%	500	41	44	8,20%	7,07%	1,76
72	0 $\mu$ M	500	13	13	2,60%	500	10	10	2,00%	500	11	11	2,20%	2,27%	1,78
72	12 nM	500	28	29	5,60%	500	25	27	5,00%	500	29	31	5,80%	5,47%	1,77
72	25 nM	500	34	35	6,80%	500	47	52	9,40%	500	32	32	6,40%	7,53%	1,78
72	250 nM	500	38	40	7,60%	500	39	41	7,80%	500	41	45	8,20%	7,87%	1,76

3-NBA (3-nitrobenzantron), DB (dvoujaderná buňka), ABB (aberrantní dvoujaderná buňka), MN (mikrojádru), CBPI (*angl. Cytokinesis-block proliferation index*)

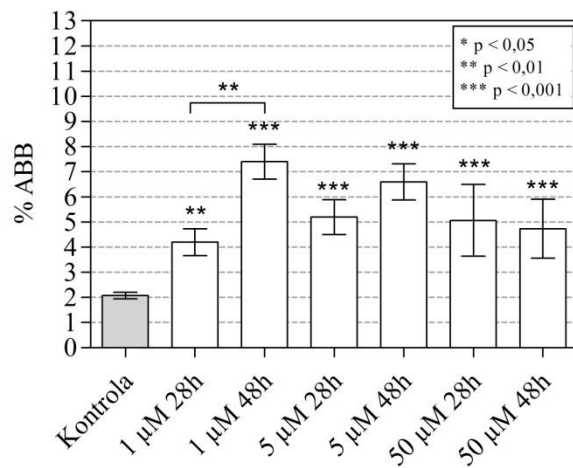
**Tabulka 4: Hladina statistické signifikance  $p$  pro porovnání počtu mikrojader indukovaných po působení 3-NBA**

Expozice h	Koncentrace	28	28	28	28	48	48	48	48	72	72	72	72
		0 $\mu$ M	1 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	0 $\mu$ M	1 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	0 $\mu$ M	12 nM	25 nM	250 nM
28	0 $\mu$ M												
28	1 $\mu$ M	0,006											
28	5 $\mu$ M	0,001	0,288										
28	10 $\mu$ M	< 0,001	0,138	0,298									
48	0 $\mu$ M												
48	1 $\mu$ M		0,0158			< 0,001							
48	5 $\mu$ M			0,001		< 0,001	0,067						
48	10 $\mu$ M				0,019	< 0,001	0,159	n					
72	0 $\mu$ M												
72	12 nM									< 0,001			
72	25 nM									< 0,001	0,035		
72	250 nM									< 0,001	0,016	0,367	

Statistická analýza byla provedena testem homogenity dvou binomických rozdělení, kdy vypočtené  $Z$  bylo porovnáno s Tabulkou č. 24 pro  $z$ . Hodnota  $p$  byla vypočítána jako  $1-z$ . 3-NBA (3-nitrobenzantron), n (hodnoty nesplňovaly kritéria pro jednostranný test homogenity binomického rozdělení), žlutě ( $p < 0,05$ ), zeleně ( $p < 0,01$ ), červeně ( $p < 0,001$ ).

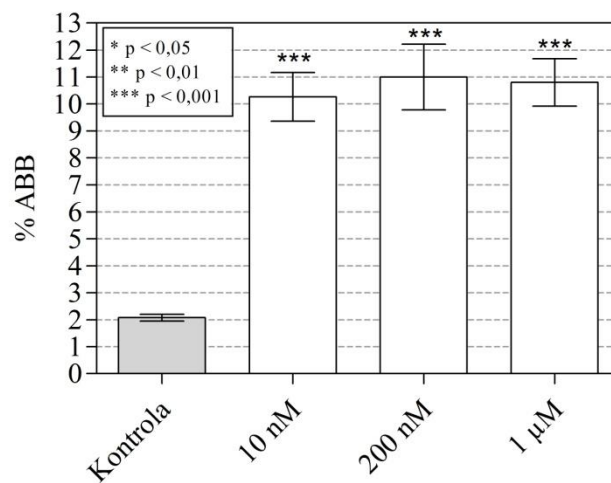


**Graf č.5, Mikrojádra indukovaná po expozici 1-NP 28 a 48 hodin**



Graf znázorňuje procento mikrojadern ve vzorku, chybová úsečka udává směrodatnou odchylku SD. Hodnoty  $p$  jsou vztaheny ke kontrole, případně k nižší testované koncentraci. 1-NP (1-nitropyren)

**Graf č.6, Mikrojádra indukovaná po expozici 1-NP 72 hodin**



Graf znázorňuje procento mikrojadern ve vzorku, chybová úsečka udává směrodatnou odchylku SD. Hodnoty  $p$  jsou vztaheny ke kontrole. 1-NP (1-nitropyren)

**Tabulka 5: Analýza počtu mikrojadér po aplikaci 1-NP**

Expozice h	Koncentrace	Vzorek č.1				Vzorek č.2				Vzorek č.3				Průměrné % ABB	CBPI
		Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB	Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB	Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB		
28	0 $\mu$ M	500	8	9	1,60%	500	9	9	1,80%	500	13	16	2,60%	2,00%	1,71
28	1 $\mu$ M	500	18	19	3,60%	500	22	22	4,40%	500	23	24	4,60%	4,20%	1,70
28	5 $\mu$ M	500	28	32	5,60%	500	22	25	4,40%	500	28	31	5,60%	5,20%	1,69
28	50 $\mu$ M	500	24	29	4,80%	500	33	33	6,60%	500	19	19	3,80%	5,07%	1,59
48	0 $\mu$ M	500	10	10	2,00%	500	9	9	1,80%	500	12	12	2,40%	2,07%	1,80
48	1 $\mu$ M	500	35	35	7,00%	500	41	41	8,20%	500	35	35	7,00%	7,40%	1,73
48	5 $\mu$ M	500	29	29	5,80%	500	36	36	7,20%	500	34	39	6,80%	6,60%	1,60
48	50 $\mu$ M	500	17	17	3,40%	500	26	28	5,20%	500	28	28	5,60%	4,73%	1,55
72	0 $\mu$ M	500	9	11	1,80%	500	10	11	2,00%	500	10	11	2,00%	1,93%	1,74
72	10 nM	500	56	56	11,20%	500	51	51	10,20%	500	47	47	9,40%	10,27%	1,75
72	200 nM	500	59	65	11,80%	500	58	60	11,60%	500	48	51	9,60%	11,00%	1,76
72	1 $\mu$ M	500	59	60	11,80%	500	51	55	10,20%	500	52	53	10,40%	10,80%	1,73

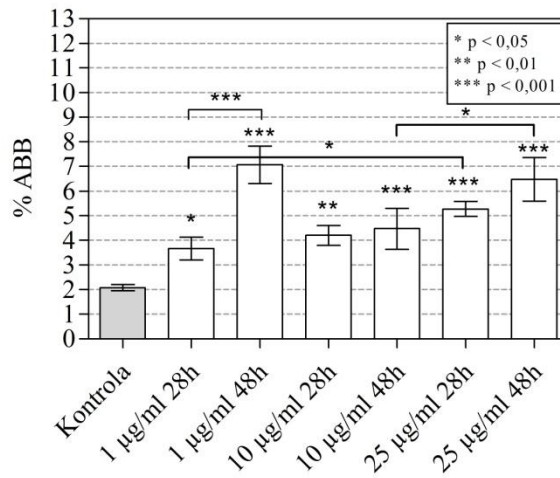
1-NP (1-nitropyren), DB (dvoujaderná buňka), ABB (aberrantní dvoujaderná buňka), MN (mikrojádru), CBPI (*angl. Cytokinesis-block proliferation index*)

**Tabulka 6: Hladina statistické signifikance  $p$  pro porovnání počtu mikrojader indukovaných po působení 1-NP**

Expozice h	Koncentrace	28	28	28	28	48	48	48	48	72	72	72	72
		0 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	0 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	0 $\mu\text{M}$	10 nM	200 nM	1 $\mu\text{M}$
28	0 $\mu\text{M}$												
28	1 $\mu\text{M}$	0,002											
28	5 $\mu\text{M}$	< 0,001	0,145										
28	50 $\mu\text{M}$	< 0,001	0,169	n									
48	0 $\mu\text{M}$												
48	1 $\mu\text{M}$		0,0011			< 0,001							
48	5 $\mu\text{M}$			0,092		< 0,001	n						
48	50 $\mu\text{M}$				0,659	< 0,001	n	n					
72	0 $\mu\text{M}$												
72	10 nM									< 0,001			
72	200 nM									< 0,001	0,305		
72	1 $\mu\text{M}$									< 0,001	0,359	n	

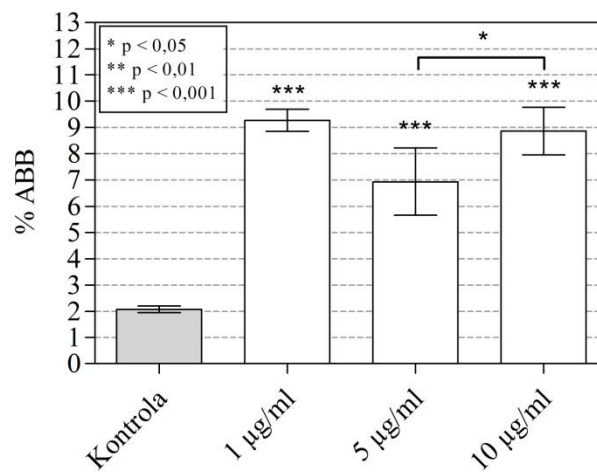
Statistická analýza byla provedena testem homogenity dvou binomických rozdělení, kdy vypočtené  $Z$  bylo porovnáno s Tabulkou č. 24 pro  $z$ . Hodnota  $p$  byla vypočítána jako  $1-z$ . 1-NP (1-nitropyren), n (hodnoty nesplňovaly kritéria pro jednostranný test homogenity binomického rozdělení), žlutě ( $p < 0,05$ ), zeleně ( $p < 0,01$ ), červeně ( $p < 0,001$ ).

**Graf č.7, Mikrojádra indukovaná po expozici B0 28 a 48 hodin**



Graf znázorňuje procento mikrojadra ve vzorku, chybová úsečka udává směrodatnou odchylku SD. Hodnoty  $p$  jsou vztaženy ke kontrole, případně k nižší testované koncentraci. B0 (extrahovatelná organická hmota ze 100% nafty)

**Graf č. 8, Mikrojádra indukovaná po expozici B0 72 hodin**



Graf znázorňuje procento mikrojadra ve vzorku, chybová úsečka udává směrodatnou odchylku SD. Hodnoty  $p$  jsou vztaženy ke kontrole, případně k nižší testované koncentraci. B0 (extrahovatelná organická hmota ze 100% nafty)

**Tabulka 7: Analýza počtu mikrojadér po aplikaci EOM z paliva B0**

Expozice h	Koncentrace	Vzorek č.1				Vzorek č.2				Vzorek č.3				Průměrné % ABB	CBPI
		Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB	Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB	Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB		
28	0 µg/ml	400	8	8	2,00%	350	7	7	2,00%	750	14	14	1,87%	1,96%	1,78
28	1 µg/ml	500	17	18	3,40%	500	17	20	3,40%	500	21	24	4,20%	3,67%	1,77
28	10 µg/ml	500	21	21	4,20%	500	23	23	4,60%	500	19	20	3,80%	4,20%	1,79
28	25 µg/ml	500	28	29	5,60%	500	25	25	5,00%	500	26	28	5,20%	5,27%	1,78
48	0 µg/ml	400	8	9	2,00%	350	5	5	1,43%	750	17	17	2,27%	1,90%	1,75
48	1 µg/ml	500	38	38	7,60%	500	31	33	6,20%	500	37	38	7,40%	7,07%	1,73
48	10 µg/ml	500	19	19	3,80%	500	27	27	5,40%	500	21	22	4,20%	4,47%	1,68
48	25 µg/ml	500	35	35	7,00%	500	27	27	5,40%	300	21	21	7,00%	6,47%	1,65
72	0 µg/ml	400	6	7	1,50%	350	7	8	2,00%	750	18	19	2,40%	1,97%	1,75
72	1 µg/ml	500	48	48	9,60%	500	44	45	8,80%	500	47	48	9,40%	9,27%	1,69
72	5 µg/ml	500	30	30	6,00%	500	32	32	6,40%	500	42	42	8,40%	6,93%	1,55
72	10 µg/ml	500	40	43	8,00%	500	49	51	9,80%	500	44	46	8,80%	8,87%	1,54

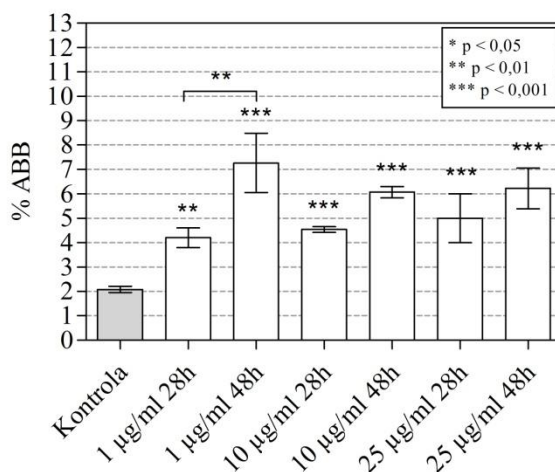
EOM B0 (extrahovatelná organická hmota ze 100% nafty), DB (dvoujaderná buňka), ABB (aberantní dvoujaderná buňka), MN (mikrojádru), CBPI (*angl. Cytokinesis-block proliferation index*)

**Tabulka 8: Hladina statistické signifikance  $p$  pro porovnání počtu mikrojadér indukovaných po působení EOM z paliva B0**

Expozice h	Koncentrace	28	28	28	28	48	48	48	48	72	72	72	72
		0 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	0 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	0 µg/ml	1 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml
28	0 µg/ml												
28	1 µg/ml	0,011											
28	10 µg/ml	0,002	0,2843										
28	25 µg/ml	< 0,001	0,042	0,123									
48	0 µg/ml												
48	1 µg/ml		< 0,001			< 0,001							
48	10 µg/ml			0,371		< 0,001	n						
48	25 µg/ml				0,127	< 0,001	n	0,025					
72	0 µg/ml												
72	1 µg/ml									< 0,001			
72	5 µg/ml									< 0,001	n		
72	10 µg/ml									< 0,001	n	0,049	

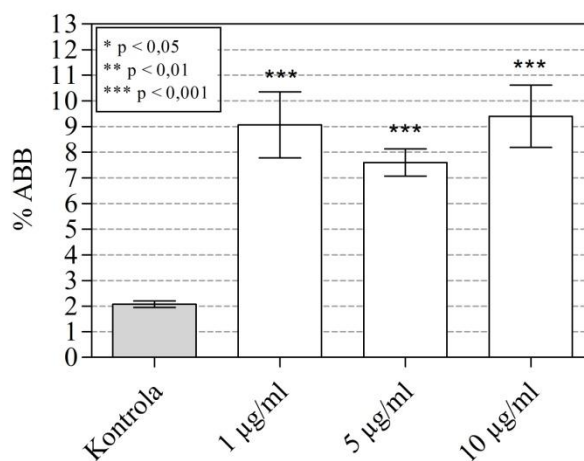
Statistická analýza byla provedena testem homogenity dvou binomických rozdělení, kdy vypočtené  $Z$  bylo porovnáno s Tabulkou č. 24 pro  $z$ . Hodnota  $p$  byla vypočítána jako 1- $z$ . EOM B0 (extrahovatelná organická hmota ze 100% nafty), n (hodnoty nesplňovaly kritéria pro jednostranný test homogenity binomického rozdělení), žlutě ( $p < 0,05$ ), zeleně ( $p < 0,01$ ), červeně ( $p < 0,001$ ).

**Graf č.9, Mikrojádra indukovaná po expozici B30 28 a 48 hodin**



Graf znázorňuje procento mikrojadern ve vzorku, chybová úsečka udává směrodatnou odchylku SD. Hodnoty  $p$  jsou vztaženy ke kontrole, případně k nižší testované koncentraci. B30 (extrahovatelná organická hmota z nafty s 30% přídavkem biosložky)

**Graf č.10, Mikrojádra indukovaná po expozici B30 72 hodin**



Graf znázorňuje procento mikrojadern ve vzorku, chybová úsečka udává směrodatnou odchylku SD. Hodnoty  $p$  jsou vztaženy ke kontrole. B30 (extrahovatelná organická hmota z nafty s 30% přídavkem biosložky)

**Tabulka 9: Analýza počtu mikrojadér po aplikaci EOM z paliva B30**

Expozice h	Koncentrace	Vzorek č.1				Vzorek č.2				Vzorek č.3				Průměrné % ABB	CBPI
		Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB	Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB	Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB		
28	0 µg/ml	450	9	9	2,00%	300	8	8	2,67%	750	17	17	2,27%	2,31%	1,77
28	1 µg/ml	500	21	21	4,20%	500	19	19	3,80%	500	23	24	4,60%	4,20%	1,80
28	10 µg/ml	500	23	23	4,60%	500	23	24	4,60%	500	23	23	4,60%	4,60%	1,78
28	25 µg/ml	500	25	25	5,00%	500	20	21	4,00%	450	27	28	6,00%	5,00%	1,80
48	0 µg/ml	500	8	8	1,60%	350	6	7	1,71%	500	14	14	2,80%	2,04%	1,83
48	1 µg/ml	500	31	33	6,20%	500	43	45	8,60%	500	35	35	7,00%	7,27%	1,83
48	10 µg/ml	500	31	31	6,20%	500	31	31	6,20%	500	29	29	5,80%	6,07%	1,70
48	25 µg/ml	500	32	32	6,40%	500	26	26	5,20%	400	28	28	7,00%	6,20%	1,69
72	0 µg/ml	400	7	9	1,75%	350	6	6	1,71%	750	20	21	2,67%	2,04%	1,79
72	1 µg/ml	500	50	54	10,00%	500	38	38	7,60%	500	48	49	9,60%	9,07%	1,77
72	5 µg/ml	500	40	41	8,00%	500	39	39	7,80%	500	35	35	7,00%	7,60%	1,60
72	10 µg/ml	500	50	51	10,00%	500	51	52	10,20%	500	40	43	8,00%	9,40%	1,62

EOM B30 (extrahovatelná organická hmota z nafty s 30% přídavkem biosložky), DB (dvoujaderná buňka), ABB (aberrantní dvoujaderná buňka), MN (mikrojádru), CBPI (angl. Cytokinesis-block proliferation index)

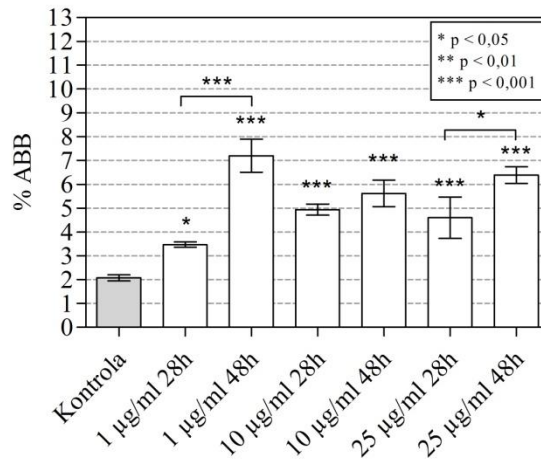


**Tabulka 10: Hladina statistické signifikance  $p$  pro porovnání počtu mikrojadér indukovaných po působení EOM z paliva B30**

Expozice h	Koncentrace	28	28	28	28	48	48	48	48	72	72	72	72
		0 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	0 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	0 µg/ml	1 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml
28	0 µg/ml												
28	1 µg/ml	0,002											
28	10 µg/ml	0,001	0,330										
28	25 µg/ml	< 0,001	0,198	0,337									
48	0 µg/ml												
48	1 µg/ml		0,0014			< 0,001							
48	10 µg/ml			0,067		< 0,001	n						
48	25 µg/ml				0,142	< 0,001	n	0,4641					
72	0 µg/ml												
72	1 µg/ml									< 0,001			
72	5 µg/ml									< 0,001	n		
72	10 µg/ml									< 0,001	0,409	0,075	

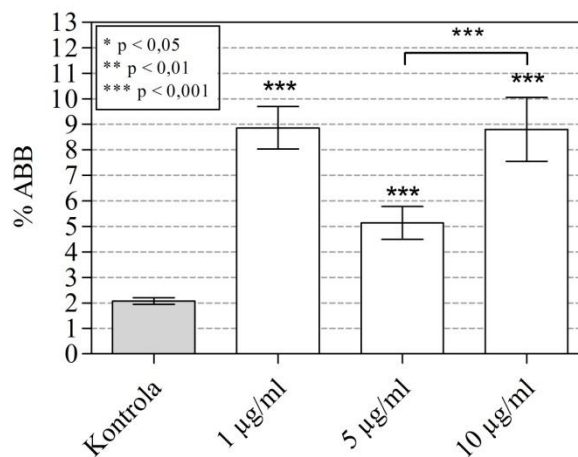
Statistická analýza byla provedena testem homogenity dvou binomických rozdělení, kdy vypočtené  $Z$  bylo porovnáno s Tabulkou č. 24 pro  $z$ . Hodnota  $p$  byla vypočítána jako  $1-z$ . B30 (extrahovatelná organická hmota z nafty s 30% přídavkem biosložky), n (hodnoty nesplňovaly kritéria pro jednostranný test homogenity binomického rozdělení), žlutě ( $p < 0,05$ ), zeleně ( $p < 0,01$ ), červeně ( $p < 0,001$ ).

**Graf č.11, Mikrojádra indukovaná po expozici B100 28 a 48 hodin**



Graf znázorňuje procento mikrojadra ve vzorku, chybová úsečka udává směrodatnou odchylku SD. Hodnoty  $p$  jsou vztaženy ke kontrole, případně k nižší testované koncentraci. B100 (extrahovatelná organická hmota ze 100% bionafty)

**Graf č.12, Mikrojádra indukovaná po expozici B100 72 hodin**



Graf znázorňuje procento mikrojadra ve vzorku, chybová úsečka udává směrodatnou odchylku SD. Hodnoty  $p$  jsou vztaženy ke kontrole, případně k nižší testované koncentraci. B100 (extrahovatelná organická hmota ze 100% bionafty)

**Tabulka 11: Analýza počtu mikrojader po aplikaci EOM z paliva B100**

Expozice h	Koncentrace	Vzorek č.1				Vzorek č.2				Vzorek č.3				Průměrné % ABB	CBPI
		Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB	Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB	Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB		
28	0 µg/ml	400	8	8	2,00%	350	8	8	2,29%	750	18	18	2,40%	2,23%	1,76
28	1 µg/ml	500	17	17	3,40%	500	17	19	3,40%	500	18	19	3,60%	3,47%	1,75
28	10 µg/ml	500	24	25	4,80%	500	24	25	4,80%	500	26	26	5,20%	4,93%	1,77
28	25 µg/ml	500	18	18	3,60%	500	25	25	5,00%	500	26	27	5,20%	4,60%	1,75
48	0 µg/ml	400	9	9	2,25%	350	5	5	1,43%	500	14	14	2,80%	2,16%	1,86
48	1 µg/ml	500	40	41	8,00%	500	34	35	6,80%	500	34	37	6,80%	7,20%	1,85
48	10 µg/ml	400	25	26	6,25%	500	26	26	5,20%	500	27	28	5,40%	5,62%	1,75
48	25 µg/ml	500	32	32	6,40%	500	30	30	6,00%	500	34	34	6,80%	6,40%	1,77
72	0 µg/ml	400	9	9	2,25%	350	8	9	2,29%	750	14	14	1,87%	2,13%	1,86
72	1 µg/ml	500	43	45	8,60%	500	41	43	8,20%	500	49	51	9,80%	8,87%	1,83
72	5 µg/ml	500	28	28	5,60%	500	27	27	5,40%	500	22	22	4,40%	5,13%	1,70
72	10 µg/ml	500	51	52	10,20%	500	42	43	8,40%	500	39	40	7,80%	8,80%	1,69

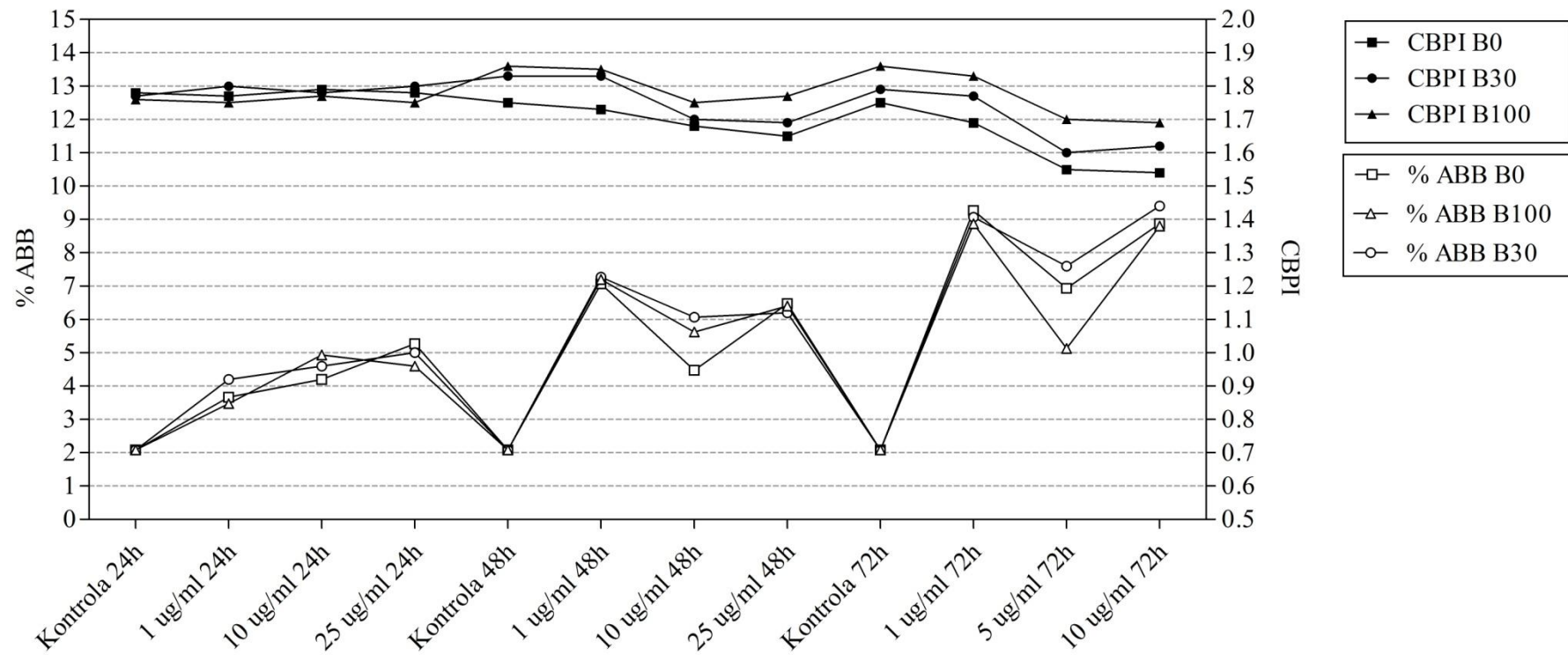
EOM B100 (extrahovatelná organická hmota ze 100% bionafty), DB (dvoujaderná buňka), ABB (aberantní dvoujaderná buňka), MN (mikrojádru), CBPI (*angl. Cytokinesis-block proliferation index*)

**Tabulka 12: Hladina statistické signifikance  $p$  pro porovnání počtu mikrojadér indukovaných po působení EOM z paliva B100**

Expozice h	Koncentrace	28	28	28	28	48	48	48	48	72	72	72	72
		0 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	0 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	0 µg/ml	1 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml
28	0 µg/ml												
28	1 µg/ml	0,019											
28	10 µg/ml	< 0,001	0,059										
28	25 µg/ml	< 0,001	0,108	n									
48	0 µg/ml												
48	1 µg/ml		< 0,001			< 0,001							
48	10 µg/ml			0,242		< 0,001	n						
48	25 µg/ml				0,038	< 0,001	n	0,227					
72	0 µg/ml												
72	1 µg/ml									< 0,001			
72	5 µg/ml									< 0,001	n		
72	10 µg/ml									< 0,001	n	0,001	

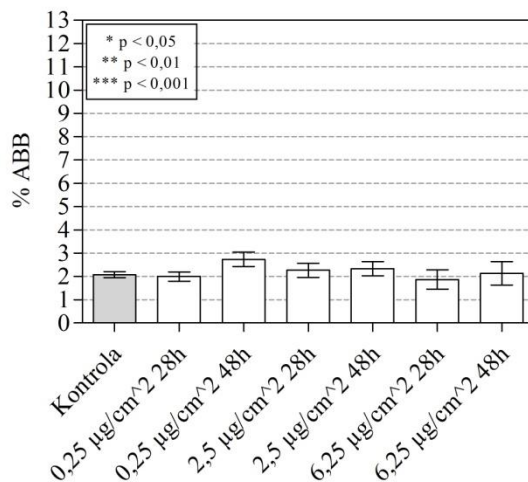
Statistická analýza byla provedena testem homogenity dvou binomických rozdělení, kdy vypočtené  $Z$  bylo porovnáno s Tabulkou č. 24 pro  $z$ . Hodnota  $p$  byla vypočítána jako  $1-z$ . EOM B100 (extrahovatelná organická hmota ze 100% bionafty), n (hodnoty nesplňovaly kritéria pro jednostranný test homogenity binomického rozdělení), žlutě ( $p < 0,05$ ), zeleně ( $p < 0,01$ ), červeně ( $p < 0,001$ ).

Graf č.13, % ABB a CBPI pro buňky BEAS-2B souhrnně po aplikaci EOM z paliv B0, B30 a B100



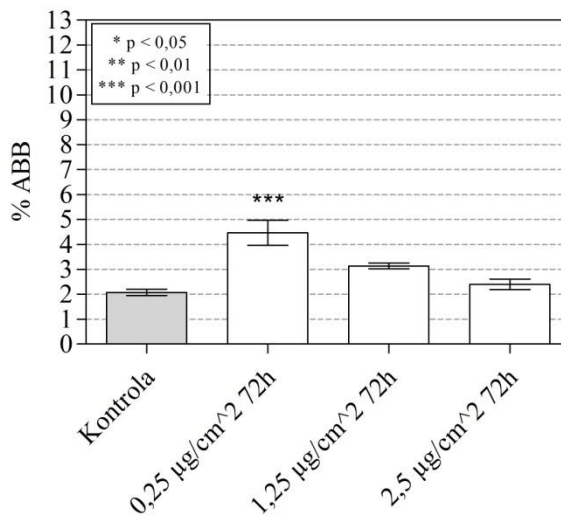
Graf znázorňuje procento mikrojadér a dělicí index ve vzorcích EOM z nafty B0, nafty s 30% přidavkem biosložky a 100% bionafty při 28, 48 a 72 h expozici. Levá osa y znázorňuje hodnoty %ABB, pravá osa y znázorňuje hodnoty dělicího indexu CBPI. EOM (angl. Extractable organic matter), ABB (aberrantní dvoujaderná buňka)

**Graf č.14, Mikrojádra indukovaná po expozici NM101 28 a 48 hodin**



Graf znázorňuje procento mikrojadern ve vzorku, chybová úsečka udává směrodatnou odchylku SD. Hodnoty *p* jsou vztaheny ke kontrole. NM101 (nanočástice TiO<sub>2</sub>)

**Graf č.15, Mikrojádra indukovaná po expozici NM101 72 hodin**



Graf znázorňuje procento mikrojadern ve vzorku, chybová úsečka udává směrodatnou odchylku SD. Hodnoty *p* jsou vztaheny ke kontrole. NM101 (nanočástice TiO<sub>2</sub>)

**Tabulka 13: Analýza počtu mikrojadér po aplikaci NM101**

Expozice h	Koncentrace	Vzorek č.1				Vzorek č.2				Vzorek č.3				Průměrné % ABB	CBPI
		Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB	Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB	Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB		
28	0 µg/cm <sup>2</sup>	500	10	10	2,00%	500	11	11	2,20%	500	8	8	1,60%	1,93%	1,83
28	0,25 µg/cm <sup>2</sup>	500	9	9	1,80%	500	11	11	2,20%	500	10	10	2,00%	2,00%	1,79
28	2,5 µg/cm <sup>2</sup>	500	13	13	2,60%	500	11	11	2,20%	500	10	11	2,00%	2,27%	1,78
28	6,25 µg/cm <sup>2</sup>	500	7	7	1,40%	500	11	11	2,20%	500	10	10	2,00%	1,87%	1,80
48	0 µg/cm <sup>2</sup>	500	10	10	2,00%	500	11	11	2,20%	500	9	9	1,80%	2,00%	1,81
48	0,25 µg/cm <sup>2</sup>	500	15	15	3,00%	500	12	12	2,40%	500	14	14	2,80%	2,73%	1,78
48	2,5 µg/cm <sup>2</sup>	500	12	12	2,40%	500	13	14	2,60%	500	10	10	2,00%	2,33%	1,75
48	6,25 µg/cm <sup>2</sup>	500	13	13	2,60%	500	11	11	2,20%	500	8	12	1,60%	2,13%	1,80
72	0 µg/cm <sup>2</sup>	500	11	11	2,20%	500	9	10	1,80%	500	10	10	2,00%	2,00%	1,73
72	0,25 µg/cm <sup>2</sup>	500	25	29	5,00%	500	22	23	4,40%	500	20	23	4,00%	4,47%	1,75
72	1,25 µg/cm <sup>2</sup>	500	15	15	3,00%	500	16	16	3,20%	500	16	18	3,20%	3,13%	1,74
72	2,5 µg/cm <sup>2</sup>	500	11	11	2,20%	500	13	14	2,60%	500	12	12	2,40%	2,40%	1,82

NM101 (nanočástice TiO<sub>2</sub>), DB (dvoujaderná buňka), ABB (aberrantní dvoujaderná buňka), MN (mikrojádru), CBPI (*angl. Cytokinesis-block proliferation index*)

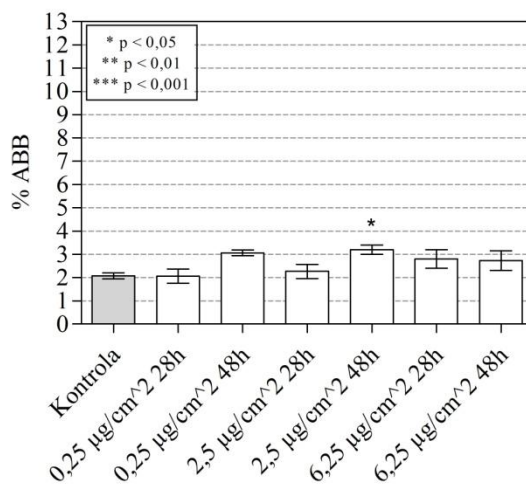
**Tabulka 14: Hladina statistické signifikance  $p$  pro porovnání počtu mikrojadér indukovaných po působení NM101**

Expozice h	Koncentrace	28	28	28	28	48	48	48	72	72	72
		0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	2,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	6,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	2,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	1,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
28	0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$										
28	0,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0,500									
28	2,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0,319	0,319								
28	6,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	n	n	n							
48	0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$										
48	0,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$		0,154			0,154					
48	2,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$			0,480		0,323	n				
48	6,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$				0,356	0,436	n	n			
72	0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$										
72	0,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$								< 0,001		
72	1,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$								0,061	n	
72	2,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$								0,271	n	n

Statistická analýza byla provedena testem homogenity dvou binomických rozdělení, kdy vypočtené  $Z$  bylo porovnáno s Tabulkou č. 24 pro  $z$ . Hodnota  $p$  byla vypočítána jako  $1-z$ . NM101 (nanočástice  $\text{TiO}_2$ ), n (hodnoty nesplňovaly kritéria pro jednostranný test homogenity binomického rozdělení), žlutě ( $p < 0,05$ ), zeleně ( $p < 0,01$ ), červeně ( $p < 0,001$ ).

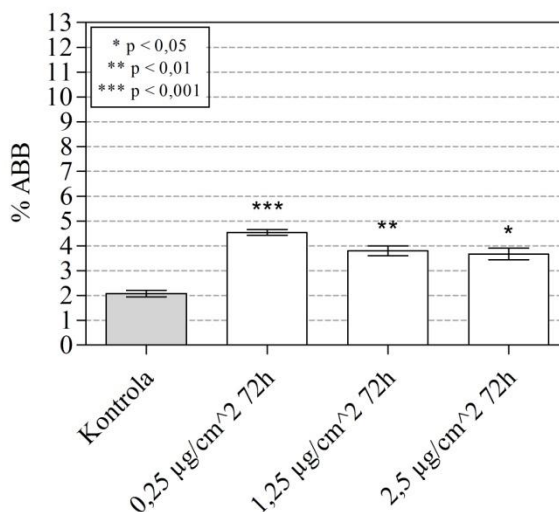


**Graf č.16, Mikrojádra indukovaná po expozici NM302 28 a 48 hodin**



Graf znázorňuje procento mikrojadra ve vzorku, chybová úsečka udává směrodatnou odchylku SD. Hodnoty  $p$  jsou vztaheny ke kontrole. NM302 (nanočástice Ag)

**Graf č.17, Mikrojádra indukovaná po expozici NM302 72 hodin**



Graf znázorňuje procento mikrojadra ve vzorku, chybová úsečka udává směrodatnou odchylku SD. Hodnoty  $p$  jsou vztaheny ke kontrole. NM302 (nanočástice Ag)

**Tabulka 15: Analýza počtu mikrojadér po aplikaci NM302**

Expozice h	Koncentrace	Vzorek č.1				Vzorek č.2				Vzorek č.3				Průměrné % ABB	CBPI
		Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB	Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB	Počet DB	Počet ABB	Počet MN	% ABB		
28	0 µg/cm <sup>2</sup>	500	9	9	1,80%	500	11	11	2,20%	500	9	9	1,80%	1,93%	1,79
28	0,25 µg/cm <sup>2</sup>	500	12	12	2,40%	500	10	10	2,00%	500	9	9	1,80%	2,07%	1,77
28	2,5 µg/cm <sup>2</sup>	500	13	13	2,60%	500	10	10	2,00%	500	11	12	2,20%	2,27%	1,83
28	6,25 µg/cm <sup>2</sup>	500	16	17	3,20%	500	14	14	2,80%	500	12	12	2,40%	2,80%	1,76
48	0 µg/cm <sup>2</sup>	500	11	11	2,20%	500	10	10	2,00%	500	9	9	1,80%	2,00%	1,78
48	0,25 µg/cm <sup>2</sup>	500	15	16	3,00%	500	15	16	3,00%	500	16	16	3,20%	3,07%	1,75
48	2,5 µg/cm <sup>2</sup>	500	17	17	3,40%	500	15	15	3,00%	500	16	16	3,20%	3,20%	1,77
48	6,25 µg/cm <sup>2</sup>	500	12	12	2,40%	500	13	13	2,60%	500	16	17	3,20%	2,73%	1,76
72	0 µg/cm <sup>2</sup>	500	11	11	2,20%	500	9	9	1,80%	500	10	10	2,00%	2,00%	1,82
72	0,25 µg/cm <sup>2</sup>	500	23	23	4,60%	500	23	23	4,60%	500	22	22	4,40%	4,53%	1,80
72	1,25 µg/cm <sup>2</sup>	500	18	19	3,60%	500	20	20	4,00%	500	19	19	3,80%	3,80%	1,79
72	2,5 µg/cm <sup>2</sup>	500	19	20	3,80%	500	19	20	3,80%	500	17	17	3,40%	3,67%	1,74

NM302 (nanočástice Ag), DB (dvoujaderná buňka), ABB (aberrantní dvoujaderná buňka), MN (mikrojádru), CBPI (*angl. Cytokinesis-block proliferation index*)

**Tabulka 16: Hladina statistické signifikance *P* pro porovnání počtu mikroader indukovaných po působení NM302**

Expozice h	Koncentrace	28	28	28	28	48	48	48	72	72	72
		0 µg/cm <sup>2</sup>	0,25 µg/cm <sup>2</sup>	2,5 µg/cm <sup>2</sup>	6,25 µg/cm <sup>2</sup>	0 µg/cm <sup>2</sup>	0,25 µg/cm <sup>2</sup>	2,5 µg/cm <sup>2</sup>	0 µg/cm <sup>2</sup>	0,25 µg/cm <sup>2</sup>	1,25 µg/cm <sup>2</sup>
28	0 µg/cm <sup>2</sup>										
28	0,25 µg/cm <sup>2</sup>	0,436									
28	2,5 µg/cm <sup>2</sup>	0,319	0,319								
28	6,25 µg/cm <sup>2</sup>	0,121	0,142	0,224							
48	0 µg/cm <sup>2</sup>										
48	0,25 µg/cm <sup>2</sup>		0,074			0,057					
48	2,5 µg/cm <sup>2</sup>			0,099		0,046	0,433				
48	6,25 µg/cm <sup>2</sup>				n	0,154	n	n			
72	0 µg/cm <sup>2</sup>										
72	0,25 µg/cm <sup>2</sup>								< 0,001		
72	1,25 µg/cm <sup>2</sup>								0,008	n	
72	2,5 µg/cm <sup>2</sup>								0,011	n	n

Statistická analýza byla provedena testem homogenity dvou binomických rozdělení, kdy vypočtené *Z* bylo porovnáno s Tabulkou č. 24 pro *z*. Hodnota *p* byla vypočítána jako 1-*z*. NM302 (nanočástice Ag), n (hodnoty nesplňovaly kritéria pro jednostranný test homogenity binomického rozdělení), žlutě (*p* < 0,05), zeleně (*p* < 0,01), červeně (*p* < 0,001).

## 5 Diskuze

Používání *in vitro* testů genotoxicity u buněčných linií má svá omezení a nejdůležitějším bodem při plánování experimentů je vhodný výběr buněčného modelu. *In vitro* testy nedokážou plně simulovat děje odehrávající se v organismu vystaveného škodlivinám, ale velmi podstatnou charakteristikou je schopnost metabolizovat testované látky, stejně jako cílová tkáň *in vivo*. Buněčný model s těmito vlastnostmi pak může sloužit k testování i takových látek, jejichž genotoxicita vyžaduje metabolickou aktivaci. Buněčná linie BEAS-2B se dle předchozích studií jevila jako vhodný nenádorový model pro testování genotoxicity látek vyskytujících se v ovzduší (Longhin et al., 2013; Seriani et al., 2016; Zhou et al., 2016). Bylo otázkou, zda bude tato linie stabilní za dodržení doporučených kultivačních metod a zda ji bude možné úspěšně kultivovat v Lab-Tek™ Chamber Slide systému.

Z výsledků naší práce vyplývá, že buňky BEAS-2B získané z ATCC (38. pasáž) je možné úspěšně kultivovat v Lab-Tek™ Chamber Slide systému, přičemž jejich basální hladina počtu mikrojader v dvoujaderných buňkách byla  $2,08 \pm 0,35$  %. Od těchto hodnot jsme se nijak významně neodklonili ani u jiných pasáží, které byly použity pro pilotní studii a dodatečnou kontrolu stability. Buňky byly po morfologické stránce u kontrol stálé. Potvrdili jsme tak výsledky skupiny Agen et al. (1997), která své práci uvádí 2% basální hladinu ABB při kultivaci buněk v bezsérovém médiu a tuto hodnotu potvrzuje i studie Prasad et al. (2014). Naproti tomu studie Nymark et al. (2013) uvádí basální hladinu počtu aberantních buněk  $< 1,5\%$  a práce Oh et al. (2011) udává počet mikrojader v 1000 dvoujaderných buňkách jako  $7,38 \pm 3,66$ .

Analýza mikrojader u buněčné linie BEAS-2B byla provedena u 28, 48 a 72 kultur s koncentrací cytochalasinu-B  $0,1 \mu\text{g/ml}$  media. Tato koncentrace byla oproti jiným studiím používajícím cytochalasin-B u buněčné linie BEAS-2B mnohem nižší. Příkladem může být koncentrace  $6 \mu\text{g/ml}$  v práci skupiny Agen et al. (1997),  $4 \mu\text{g/ml}$  v práci, kde buňky byly kultivovány s 10 % séra (Gurr et al., 2005),  $9 \mu\text{g/ml}$  v práci Ruosaari et al. (2008) či  $3 \mu\text{g/ml}$  v práci Jung et al. (2012). Důvodem použití naší nízké koncentrace byly výsledky pilotního testu cytotoxicity (výsledky nejsou součástí této diplomové práce), kdy koncentrace vyšší než  $1,2 \mu\text{g/ml}$  cytochalasinu-B negativně ovlivňovaly viabilitu buněk. Koncentrace nižší než  $0,8 \mu\text{g/ml}$  byly pak již nedostatečné pro zablokování cytokineze. Jedním z možných vysvětlení takovéto citlivosti buněk k cytochalasinu-B jsou odlišné

kultivační podmínky v jednotlivých studiích, respektive například absence potahu kultivační plochy směsí fibronektinu, kolagenu typu I a bovinního sérového albuminu, který hraje významnou roli v signalizaci adherentních buněk (Wadsworth et al., 2004). Dalším možným vysvětlením mohou být změny v buňkách indukované přítomností séra, které prokazatelně iniciuje terminální diferenciaci buněk BEAS-2B (Lechner et al., 1984; Zhao & Klimecki, 2014), či nedodržení kultivačních podmínek jako je maximální 80% konfluence.

B[a]P, 3-NBA i 1-NP jsou pro buněčnou linii BEAS-2Bv námi testovaných koncentracích genotoxické. B[a]P i 3-NBA vykazovaly mírné, statisticky nevýznamné koncentrační zvýšení počtu ABB jak u 28 tak u 48 h expozice. Naproti tomu časová závislost byla prokazatelně signifikantní ( $p < 0,05$ ) u všech koncentrací, přičemž byl zaznamenán mírný pokles ABB u nejvyšší (200  $\mu\text{M}$ ) koncentrace B[a]P. Tento pokles pozitivně koreloval s poklesem dělicího indexu CBPI (1,78 kontrola, 1,6 pro 200  $\mu\text{M}$ ), což značí mírný inhibiční vliv této koncentrace B[a]P na buněčnou proliferaci. Dělicí index 3-NBA se nijak významně se zvyšující se koncentrací neměnil, tudíž zde žádný inhibiční účinek zaznamenán nebyl. Na základě těchto výsledků byla z větší části potvrzena hypotéza H2, tj. že B[a]P a 3-NBA jsou pro buněčnou linii BEAS-2B genotoxické, přičemž vyvolávají především časově závislou tvorbu MN při námi testovaných koncentracích a koncentrační závislost nebyla potvrzena u všech vzorků. 1-NP vykazoval mírné, avšak opětovně statisticky nevýznamné koncentrační zvýšení počtu ABB při 28 h expozici. 48 h expozice indukovala sestupnou tendenci počtu ABB, tudíž časově závislé signifikantní zvýšení ( $p < 0,05$ ) ABB bylo zaznamenáno pouze u nejnižší testované koncentrace, tj. při 1  $\mu\text{M}$ . Snížení počtu ABB se zvyšující se koncentrací u 48 h expozice pozitivně korelovalo s poklesem dělicího indexu, tudíž tyto koncentrace měly již mírný inhibiční efekt. Na základě těchto výsledků byla částečně potvrzena hypotéza H3, tj. že 1-NP představuje genotoxickou látku pro buňky BEAS-2B, ale nebyla potvrzena časová ani koncentrační závislost.

Výsledky ze 72 h expozice B[a]P ukazují, že i 25x nižší koncentrace po dostatečně dlouhou dobu vysoce signifikantně ( $p < 0,001$ ) zvyšuje procento ABB oproti 28 h expozici. Obdobně i 3-NBA a 1-NP vykazují vyšší procento ABB při 72 h expozici nižším koncentracím, než tomu bylo u 28 a 48 h expozic. Můžeme tedy říct, že buněčná linie BEAS-2B je senzitivní i k nízkým koncentracím PAU při dlouhodobé kultivaci.

Extrahovatelná organická hmota ze spalin nafty B0, nafty s 30% přídavkem biosložky B30 a 100% bionafty B100 je pro buněčnou linii BEAS-2B v testovaných koncentracích genotoxická, čímž byla potvrzena druhá část hypotézy H3. Celkově vzato, EOM ze spalin všech tří typů diesellového paliva měly velmi podobné účinky, přestože jejich složení není totožné (viz Graf č.13). Celkové množství PAU, které jsou z hlediska genotoxicity nejdůležitější součástí EOM ze spalin paliv, stoupalo s podílem biosložky v palivu: B0 35 769,3 ng/mg DEP, B30 40 107,5 ng/mg DEP, B100 41 164,7 ng/mg DEP. 28 h expozice vykazovala u všech tří paliv mírnou, v případě B0 statisticky významnou ( $p < 0,05$ ) koncentrační závislost. Naproti tomu časová závislost mezi 28 a 48h expozicemi ukazuje zajímavé, statisticky významné ( $p < 0,01$ ) zvýšení počtu ABB jen u nejnižší testované koncentrace 1  $\mu\text{g/ml}$  u všech paliv a mírné zvýšení ( $p < 0,05$ ) při koncentraci 25  $\mu\text{g/ml}$  u B100. Propad v počtu ABB u 48 h expozice při koncentraci vyšší než 1  $\mu\text{g/ml}$  je zjevný u všech testovaných paliv a je doprovázen poklesem dělicího indexu CBPI. Tudiž koncentrace vyšší než 1  $\mu\text{g/ml}$  měly při delší než 28 h expozici mírně inhibiční vliv na proliferaci buněk, který vyústil ve snížení celkové hladiny ABB při zachování detekovatelné koncentrační závislosti.

Všechny testované koncentrace EOM ze všech tří paliv při 72 h expozici byly vysoce genotoxické ( $p < 0,001$ ). U 72 h expozice byl výše popsán pokles počtu ABB při koncentraci vyšší než 1  $\mu\text{g/ml}$  také zaznamenán a opět pozitivně koreluje s poklesem dělicího indexu CBPI. Vzhledem k výše zmíněnému byl prokázán vysoce signifikantní nárůst počtu ABB při expozici buněk BEAS-2B EOM ze všech testovaných paliv bez významného rozdílu mezi nimi.

Testování genotoxicity nanočástic titanu a stříbra pomocí analýzy mikrojadernaráželo na určité problémy, kterým se v následující části budeme jednotlivě věnovat. Prvním z problémů, při plánování experimentu byl fakt, že obě testované nanočástice v tekutině velmi dobře sedimentovaly, tudíž nebylo možné vždy použít identického postupu expozice jako u látek rozpustných. Při 28 h expozici byla aplikace nanočástic provedena stejně jako u látek rozpustných, tj. k 199  $\mu\text{l}$  média s částicemi byl přidán 1  $\mu\text{l}$  cytochalasinu-B, aby bylo dosaženo výsledné koncentrace 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , a celý objem komůrky byl několikrát promíchán. Hlavním cílem 48 h expozice bylo testovat stejné koncentrace látek jako při 28 h expozici a sledovat tak případnou časovou závislost. Proto, aby byla zachována stejná koncentrace nanočástic na  $\text{cm}^2$  kultivační plochy, bylo do komůrky postupně napipetováno

199  $\mu\text{l}$  média s částicemi a 101  $\mu\text{l}$  média pro doplnění na celkový objem 300  $\mu\text{l}$ . Po 20 h expozice bylo z celkového objemu 300  $\mu\text{l}$  odebráno 1,5  $\mu\text{l}$  a nahrazeno 1,5  $\mu\text{l}$  cytochalasinu-B, aby byla dosažena finální koncentrace v mediu 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , a celý objem komůrky byl poté několikrát promíchán. Tímto způsobem byla zachována koncentrace nanočástic na  $\text{cm}^2$  kultivační plochy při udržení vhodných kultivačních podmínek při delší expozici. Podobně jako 48 h expozice byla vyřešena i 72 h expozice, a to tak, že k 199  $\mu\text{l}$  média s částicemi bylo přidáno po 44 h kultivace čerstvé médium o objemu 149,25  $\mu\text{l}$  a roztok cytochalasinu-B o objemu 1,75  $\mu\text{l}$ , aby bylo dosaženo výsledné koncentrace 0,1  $\mu\text{g/ml}$  v celkovém objemu 350  $\mu\text{l}$  media.

Druhým a velmi významným problémem byla především u nanočástic titanu přítomnost těchto částic v preparátu. Vzhledem k principu analýzy mikrojader, kdy hodnotitel opticky kontroluje přítomnost mikrojádra v dvoujaderné buňce, jsou shluky nanočástic nashromážděné na povrchu buněk a pravděpodobně i uvnitř velkým problémem. Na Obrázku 3 můžeme vidět, jak shluky částic znemožňují určit případnou přítomnost mikrojádra. Tento problém byl velice patrný obzvláště u NM101 při koncentracích vyšších než 1  $\mu\text{g/cm}^2$ .

Na základě našich výsledků lze shrnout, že titanové nanočástice NM101 nejsou v testovaných koncentracích při 28 a 48 h genotoxické, nicméně je možné, že mírný genotoxický efekt nebyl zachycen kvůli výše uvedeným komplikacím. Dělicí index buněk nijak významně nekolísá a buňky byly po morfologické stránce stabilní. Naproti tomu 72 h expozice při nejnižší testované koncentraci 0,25  $\mu\text{g/cm}^2$  vykazuje vysoce signifikantně ( $p < 0,001$ ) zvýšený počet ABB oproti kontrole a potvrzuje hypotézu H4. U dalších koncentrací je evidentní pokles počtu ABB se zvyšující se koncentrací. Tento efekt si vysvětlujeme sníženou zachytitelností mikrojader z důvodu vyššího počtu shluků nanočástic kolem jader buňky.

V případě stříbrných nanočástic NM302 byla hodnotitelnost při koncentracích porovnatelných s NM101 lepší z důvodu jiného tvaru a absence lomu světla na povrchu částic (viz Obrázek 4). Zřejmě i proto byl zaznamenán mírný nárůst počtu ABB u dávky 2,5  $\mu\text{g/cm}^2$  při 48 h expozici. 72 h expozice vykazuje sestupný, přesto ve všech koncentracích signifikantní ( $p < 0,05$ ) trend počtu ABB. Dělicí index buněk nijak významně nekolísá a buňky byly po morfologické stránce stabilní stejně jako u NM101. Na základě těchto výsledků byla potvrzena částečně hypotéza H5, tj. že nanočástice

NM302 jsou genotoxickou látkou pro buňky BEAS-2B, ale nebyla prokázána koncentrační ani časová závislost. Přítomnost nanočástic vně či uvnitř buněk BEAS-2B bude v budoucích experimentech prověřena pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

Vzhledem k výsledkům této diplomové práce můžeme říci, že přestože jsou koncentrace testovaných látek vysoké ve srovnání s reálnými podmínkami (např. 1  $\mu\text{M}$  B[a]P odpovídá koncentraci 251,31  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , přičemž např. koncentrace naměřené v Praze-Spořilově mezi lety 2000-2012 činily 1,23  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) (Rychlikova, 2014), tato buněčná linie může posloužit i při testování reálných dlouhodobých expozic či k testování genotoxicity potenciálně škodlivých látek. Byla tak potvrzena hypotéza H1. Významným zjištěním této práce jsou výsledky genotoxicity EOM ze spalin paliv B0, B30 a B100, kdy nebyly zjištěny žádné významné rozdíly mezi jednotlivými palivy, i když současně probíhající testy v naší laboratoři naznačují jisté rozdíly na úrovni dalších analyzovaných markerů.

Podobné problémy, které byly popsány v této práci ve spojení s testováním nanočástic, jsou obsaženy i v článku skupiny Oostingh et al. (2011), kdy se skupina potýkala se shluky nanočástic ve vzorku, které způsobovaly chyby ve stanovení počtu mikrojadern. Rozdílem oproti této práci je ale fakt, že jednalo o shluky v mediu, zatímco v našem případě byly nanočástice na a možná i uvnitř buněk, ale v okolním mediu byly rovnoměrně dispergované. Problematikou používání tradičních toxikologických testů pro nanomateriály se podrobně zabývá i článek skupiny Kroll et al. (2012) a Doak et al. (2009), které uvádí, že je nutné všechny druhy nanočástic testovat samostatně a hledat konkrétní řešení problémů pro danou částici. Díky velké variabilitě těchto látek ve tvaru, povrchu a reaktivitě totiž není možné vytvořit pouze jeden společný protokol pro testování toxicity nanomateriálů. Dále pak na základě našich výsledků můžeme říci, že vystavení nízkým koncentracím nanočástic NM101 i NM302 po dobu delší než 48 h může být potenciální genotoxické účinky.



## 6 Závěr

Hlavní náplní této diplomové práce bylo otestování využití buněčné linie BEAS-2B pro analýzu mikrojader v genetické toxikologii. Analýza byla provedena pomocí 28, 48 a 72 h expozice PAU, EOM ze tří typů dieselových paliv a nanočásticím titanu a stříbra. Nejdůležitější závěry této práce lze shrnout do následujících bodů:

- 1) Buněčná linie BEAS-2B je při dodržení doporučených kultivačních podmínek stabilní buněčnou linií s charakterizovaným genotypem a morfologií lidského plicního epitelu.
- 2) Analýza mikrojader je vhodnou metodou pro testování genotoxicity vybraných látek u buněčné linie BEAS-2B v systému Lab-Tek® Chamber Slide™.
- 3) B[a]P, 3-NBA a 1-NP jsou pro buněčnou linii BEAS-2B genotoxické látky, které za určitých podmínek velmi významně ( $p < 0,001$ ) zvyšují procento ABB ve vzorku a v případě vyšších koncentrací dokážou mírně inhibovat buněčnou proliferaci.
- 4) EOM ze spalin nafty B0, nafty s 30% přídavkem biosložky B30 a 100% bionafty B100 jsou pro buněčnou linii BEAS-2B za určitých podmínek velmi významně ( $p < 0,001$ ) genotoxické.
- 5) Nanočástice TiO<sub>2</sub> NM101 a Ag NM302 jsou za daných experimentálních podmínek pro buněčnou linii BEAS-2B genotoxické, ale analýza mikrojader není vhodným testem určení této genotoxicity z důvodu optických vlastností těchto nanočástic.

## 7 Seznam použité literatury

- Abruzzo M. A., Mayer M. & Jacobs P. A. (1985). Aging and aneuploidy: evidence for the preferential involvement of the inactive X chromosome. *Cytogenetic and Genome Research*, 39(4), 275–278.
- Agen B. V, Maas L. M., Zwingmann I. H., Van Schooten F. J. & Kleinjans J. C. (1997). B[a]P-DNA adduct formation and induction of human epithelial lung cell transformation. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30, 287–292.
- Ahmad J., Alhadlaq H. A., Alshamsan A., Siddiqui M. A., Saquib Q., Khan S. T., Wahab R., Al-Khedhairi A. A., Musarrat J., Akhtar M. J. & Ahamed M. (2016). Differential cytotoxicity of copper ferrite nanoparticles in different human cells. *Journal of Applied Toxicology : JAT*, (October 2015).
- Aizawa K., Liu C., Veeramachaneni S., Hu K.-Q., Smith D. E. & Wang X.-D. (2013). Development of ferret as a human lung cancer model by injecting 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 82(3), 390–6.
- Andersson H., Piras E., Demma J., Hellman B. & Brittebo E. (2009). Low levels of the air pollutant 1-nitropyrene induce DNA damage, increased levels of reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress in human endothelial cells. *Toxicology*, 262(1), 57–64.
- Andley U. P., Rhim J. S., Chylack L. T. & Fleming T. P. (1994). Propagation and immortalization of human lens epithelial cells in culture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 35(7), 3094–102.
- Balajee A. S., Bertucci A., Taveras M. & Brenner D. J. (2014). Multicolour FISH analysis of ionising radiation induced micronucleus formation in human lymphocytes. *Mutagenesis*, 29(6), 447–455.
- Barrett E. G., Rudolph K., Bowen L. E., Muggenburg B. A. & Bice D. E. (2003). Effect of inhaled ultrafine carbon particles on the allergic airway response in ragweed-sensitized dogs. *Inhalation Toxicology*, 15(2), 151–65.
- Beelen R., Raaschou-Nielsen O., Stafoggia M., Andersen Z. J., Weinmayr G., Hoffmann B., Wolf K., Samoli E., Fischer P., ... Hoek G. (2014). Effects of long-term exposure to air pollution on natural-cause mortality: An analysis of 22 European cohorts within the multicentre ESCAPE project. *The Lancet*, 383, 785–795.
- Bolton J. L., Huff N. C., Smith S. H., Mason S. N., Foster W. M., Auten R. L. & Bilbo S. D. (2013). Maternal stress and effects of prenatal air pollution on offspring mental health outcomes in mice. *Environmental Health Perspectives*, 121(9), 1075–1082.
- Bonassi S., Fenech M., Lando C., Lin Y. ping, Ceppi M., Peter Chang W., Holland N., Kirsch-Volders M., Zeiger E., Ban S., Barale R., Bigatti M. P., Bolognesi C., Jia C., Di Giorgio M., Ferguson L. R., Fucic A., Lima O. G., Hrelia P., Krishnaja A. P., Lee T. K., Migliore L., Mikhalevich L., Mirkova E., Mosesso P., Müller W. U., Odagiri Y., Scarffi M. R., Szabova E., Vorobtsova I., Vral A. & Zijno A. (2001). Human micronucleus project: International database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei.

- Bonassi S., Norppa H., Ceppi M., Strömberg U., Vermeulen R., Znaor A., Cebulska-Wasilewska A., Fabianova E., Fucic A., Gundy S., Hansteen I. L., Knudsen L. E., Lazutka J., Rossner P., Sram R. J., Boffetta P., Strömberg U., Vermeulen R., Znaor A., Cebulska-Wasilewska A., Fabianova E., Fucic A., Gundy S., Hansteen I. L., Knudsen L. E., Lazutka J., Rossner P., Sram R. J. & Boffetta P. (2008). Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: Results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries. *Carcinogenesis*, 29(6), 1178–1183.
- Bonassi S., Znaor A., Norppa H. & Hagmar L. (2004). Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. *Cytogenetic and Genome Research*, 104(1-4), 376–82.
- Bonnefoy A., Chiron S. & Botta A. (2012). Environmental nitration processes enhance the mutagenic potency of aromatic compounds. *Environmental Toxicology*, 27(6), 321–31.
- Bonvallot V., Baeza-Squiban a, Baulig a, Brulant S., Boland S., Muzeau F., Barouki R. & Marano F. (2001). Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression. *American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology.*, 25(17), 515–521.
- Burri P. H. (1974). The postnatal growth of the rat lung. 3. Morphology. *The Anatomical Record*, 180(1), 77–98.
- Cohen A. J., Anderson H. R., Ostro B., Pandey K. D., Krzyzanowski M., Künzli N., Gutschmidt K., Iii C. A. P., Romieu I., Samet J. M. & Smith K. R. (2004). Urban Air Pollution. In *Comparative Quantification of Health Risks* (Vol. 77, pp. 1353–1434).
- Cook M. B., Dawsey S. M., Freedman N. D., Inskip P. D., Wichner S. M., Quraishi S. M., Devesa S. S. & McGlynn K. A. (2009). Sex disparities in cancer incidence by period and age. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 18(4), 1174–1182.
- Countryman P. I. & Heddle J. A. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 41(2-3), 321–331.
- Cross S. E., Innes B., Roberts M. S., Tsuzuki T., Robertson T. A. & McCormick P. (2007). Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. *Skin Pharmacology and Physiology*, 20(3), 148–54.
- ČHMÚ. (2015a). Grafická ročenka - Znečištění ovzduší na území České republiky v roce 2014.
- ČHMÚ. (2015b). Tabulární přehled - Znečištění ovzduší a chemické složení srážek v ČR 2014.
- Deutschle T., Porkert U., Reiter R., Keck T. & Riechelmann H. (2006). In vitro genotoxicity and cytotoxicity of benzalkonium chloride. *Toxicology in Vitro*, 20(8), 1472–7.
- Doak S. H., Griffiths S. M., Manshian B., Singh N., Williams P. M., Brown a. P. &

- Jenkins G. J. S. (2009). Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. *Mutagenesis*, 24(4), 285–293.
- Dockery D. W., Pope III. C., Xu X., Spengler J., Ware J., Fay M., Ferris Jr. B. & Speizer F. (1993). An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *The New England Journal of Medicine*, 329(24), 1753–1759.
- Don Porto Carero A., Hoet P. H. M., Verschaeve L., Schoeters G. & Nemery B. (2001). Genotoxic effects of carbon black particles, diesel exhaust particles, and urban air particulates and their extracts on a human alveolar epithelial cell line (A549) and a human monocytic cell line (THP-1). *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 37(2), 155–63.
- Dostal M., Pastorkova A., Rychlik S., Rychlikova E., Svecova V., Schallerova E. & Sram R. J. (2013). Comparison of child morbidity in regions of Ostrava, Czech Republic, with different degrees of pollution: a retrospective cohort study. *Environmental Health : A Global Access Science Source*, 12(1), 74.
- Dunnill M. S. (1962). Postnatal Growth of the Lung. *Thorax*, 17(4), 329–333.
- EEA. (2015). *Air quality in Europe - 2015 report (EEA Report N° 5/2015)*.
- Enya T., Suzuki H., Watanabe T., Hirayama T. & Hisamatsu Y. (1997). 3-Nitrobenzanthrone, a powerful bacterial mutagen and suspected human carcinogen found in diesel exhaust and airborne particulates. *Environmental Science and Technology*, 31(10), 2772–2776.
- Evans M. J., Fanucchi M. V, Baker G. L., Van Winkle L. S., Pantle L. M., Nishio S. J., Schelegle E. S., Gershwin L. J., Miller L. A., Hyde D. M., Sannes P. L. & Plopper C. G. (2003). Atypical development of the tracheal basement membrane zone of infant rhesus monkeys exposed to ozone and allergen. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285(4), 931–939.
- Fenech M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084–1104.
- Fenech M. & Morley A. (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, 43(172-173), 233–46.
- Filipe P., Silva J. N., Silva R., Cirne De Castro J. L., Marques Gomes M., Alves L. C., Santos R. & Pinheiro T. (2009). Stratum corneum is an effective barrier to TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticle percutaneous absorption. *Skin Pharmacology and Physiology*, 22(5), 266–275.
- Gulson B., McCall M., Korsch M., Gomez L., Casey P., Oytam Y., Taylor A., McCulloch M., Trotter J., Kinsley L. & Greenoak G. (2010). Small amounts of zinc from zinc oxide particles in sunscreens applied outdoors are absorbed through human skin. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 118(1), 140–9.
- Gurbani D., Bharti S. K., Kumar A., Pandey A. K., Ana G. R. E. E., Verma A., Khan A. H., Patel D. K., Mudiam M. K. R., Jain S. K., Roy R. & Dhawan A. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons and their quinones modulate the metabolic profile and induce DNA damage in human alveolar and bronchiolar cells. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216(5), 553–565.

- Gurr J. R., Wang A. S. S., Chen C. H. & Jan K. Y. (2005). Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, 213(1-2), 66–73.
- Hando J. C., Nath J. & Tucker J. D. (1994). Sex chromosomes, micronuclei and aging in women. *Chromosoma*, 103(3), 186–92.
- Hanzalova K., Rossner P. & Sram R. J. (2010). Oxidative damage induced by carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons and organic extracts from urban air particulate matter. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 696(2), 114–121.
- \*Heddle J. A. & Salamone M. F. (1981). Chromosomal aberrations and bone marrow toxicity. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 39, 23–27.
- Hislop A. A., Wigglesworth J. S. & Desai R. (1986). Alveolar development in the human fetus and infant. *Early Human Development*, 13(1), 1–11.
- Challen P. J. R., Hickish D. E., Bedford J., Challen A. P. J. R., Hickish D. E., Bedford J., Challen P. J. R. & Bedford J. (1958). An Investigation of Some Health Hazards in an Inert-Gas Tungsten-Arc Welding Shop. *British Journal of Industrial Medicine*, 15(4), 276–282.
- IARC. (2010). *Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. Iarc Monographs On The Evaluation Of Carcinogenic Risks To Humans* (Vol. 92). Lyon.
- IARC. (2013). *Air Pollution and Cancer. IARC scientific publications*. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- IARC Monographs. (2014). *Diesel and gasoline engine exhausts*. (Vol. 105).
- Isaka T., Nestor A. L., Takada T. & Allison D. C. (2003). Chromosomal variations within aneuploid cancer lines. *J Histochem Cytochem*, 51(10), 1343–1353.
- Jensen K. A., Kembouche Y., Christiansen E., Jacobsen N. R., Wallin H., Guiot C., Spalla O. & Witschger O. (2011). *Final protocol for producing suitable manufactured nanomaterial exposure media*.
- Jin C., Tang Y., Yang F. G., Li X. L., Xu S., Fan X. Y., Huang Y. Y. & Yang Y. J. (2011). Cellular toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in anatase and rutile crystal phase. *Biological Trace Element Research*, 141(1-3), 3–15.
- Joksic G., Stasic J., Filipovic J., Sobot A. V. & Trtica M. (2016). Size of silver nanoparticles determines proliferation ability of human circulating lymphocytes in vitro. *Toxicology Letters*, 247, 29–34.
- Jung M. H., Kim H. R., Park Y. J., Park D. S., Chung K. H. & Oh S. M. (2012). Genotoxic effects and oxidative stress induced by organic extracts of particulate matter (PM<sub>10</sub>) collected from a subway tunnel in Seoul, Korea. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 749(1-2), 39–47.
- Karlsson H. L., Cronholm P., Gustafsson J. & Möller L. (2008). Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical Research in Toxicology*, 21(9), 1726–1732.
- Kazerouni N., Sinha R., Hsu C. H., Greenberg a. & Rothman N. (2001). Analysis of 200

- food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food and Chemical Toxicology*, 39(5), 423–436.
- Kim H. H., Lee C. S., Yu S. Do, Lee J. S., Chang J. Y., Jeon J. M., Son H. R., Park C. J., Shin D. C. & Lim Y. W. (2016). Near-Road Exposure and Impact of Air Pollution on Allergic Diseases in Elementary School Children : A Cross-Sectional Study, 57(3), 698–713.
- Kim H. R., Kim M. J., Lee S. Y., Oh S. M. & Chung K. H. (2011). Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. *Mutation Research*, 726(2), 129–35.
- Kirsch-Volders M., Sofuni T., Aardema M., Albertini S., Eastmond D., Fenech M., Ishidate M., Kirchner S., Lorge E., Morita T., Norppa H., Surralles J., Vanhauwaert A. & Wakata A. (2003). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 540(2), 153–163.
- Konaka R., Kasahara E., Dunlap W. C., Yamamoto Y., Chien K. C. & Inoue M. (2001). Ultraviolet irradiation of titanium dioxide in aqueous dispersion generates singlet oxygen. *Redox Report : Communications in Free Radical Research*, 6(5), 319–25.
- Kroll A., Pillukat M. H., Hahn D. & Schnekenburger J. (2012). Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Archives of Toxicology*, 86(7), 1123–1136.
- Lamy E., Kassie F., Gminski R., Schmeiser H. H. & Mersch-Sundermann V. (2004). 3-Nitrobenzanthrone (3-NBA) induced micronucleus formation and DNA damage in human hepatoma (HepG2) cells. *Toxicology Letters*, 146(2), 103–109.
- Landsiedel R., Kapp M. D., Schulz M., Wiench K. & Oesch F. (2009). Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations - many questions, some answers. *Mutation Research*, 681(2-3), 241–58.
- Landvik N. E., Arlt V. M., Nagy E., Solhaug A., Tekpli X., Schmeiser H. H., Refsnes M., Phillips D. H., Lagadic-Gossman D. & Holme J. a. (2010). 3-Nitrobenzanthrone and 3-aminobenzanthrone induce DNA damage and cell signalling in Hepa1c1c7 cells. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 684(1-2), 11–23.
- Leclere M., Lavoie-Lamoureux A. & Lavoie J.-P. (2011). Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 16(7), 1027–46.
- Lee B. H. & Lee S. J. (1998). In vitro chromosome aberration assay using human bronchial epithelial cells. *J Toxicol Environ Health A*, 55(5), 325–329.
- Lechner A. J. & Banchemo N. (1982). Advanced pulmonary development in newborn guinea pigs (*Cavia porcellus*). *The American Journal of Anatomy*, 163(3), 235–46.
- Lechner J. F., Haugen A., McClendon I. A. & Shamsuddin A. M. (1984). Induction of squamous differentiation of normal human bronchial epithelial cells by small amounts of serum. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 25(3), 229–37.
- Lelieveld J., Evans J. S., Fnais M., Giannadaki D. & Pozzer A. (2015). The contribution of outdoor air pollution sources to premature mortality on a global scale. *Nature*, 525(7569), 367–71.

- Longhin E., Holme J. A., Gutzkow K. B., Arlt V. M., Kucab J. E., Camatini M. & Gualtieri M. (2013). Cell cycle alterations induced by urban PM2.5 in bronchial epithelial cells: characterization of the process and possible mechanisms involved. *Particle and Fibre Toxicology*, 10(63), 1–19.
- Lyman S. & Tran T. (2015). Inversion structure and winter ozone distribution in the Uintah Basin, Utah, U.S.A. *Atmospheric Environment*, 123, 156–165.
- Massaro D., Teich N., Maxwell S. & Whitney P. (1985). Postnatal development of alveoli. Regulation and evidence for a critical period in rats. *Journal of Clinical Investigation*, 76(4), 1297–1305.
- Mathew H., Dittus C., Malek A. & Negroiu A. (2015). Howell-Jolly bodies on peripheral smear leading to the diagnosis of congenital hyposplenism in a patient with septic shock. *Clinical Case Reports*, 3(8), 714–7.
- Matthews J. B., Green T. R., H. Stone M., Mike Wroblewski B., Fisher J. & Ingham E. (2000). Comparison of the response of primary human peripheral blood mononuclear phagocytes from different donors to challenge with model polyethylene particles of known size and dose. *Biomaterials*, 21(20), 2033–2044.
- Minissi S., Gustavino B., Degrassi F., Tanzarella C. & Rizzoni M. (1999). Effect of cytochalasin B on the induction of chromosome missegregation by colchicine at low concentrations in human lymphocytes. *Mutagenesis*, 14(1), 43–49.
- Muccitelli R. M., Tucker S. S., Hay D. W., Torphy T. J. & Wasserman M. A. (1987). Is the guinea pig trachea a good in vitro model of human large and central airways? Comparison on leukotriene-, methacholine-, histamine- and antigen-induced contractions. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 243(2), 467–473.
- Nagy E., Johansson C., Zeisig M. & Möller L. (2005a). Oxidative stress and DNA damage caused by the urban air pollutant 3-NBA and its isomer 2-NBA in human lung cells analyzed with three independent methods. *Journal of Chromatography B*, 827(1), 94–103.
- Nagy E., Zeisig M., Kawamura K., Hisamatsu Y., Sugeta A., Adachi S. & Möller L. (2005b). DNA adduct and tumor formations in rats after intratracheal administration of the urban air pollutant 3-nitrobenzanthrone. *Carcinogenesis*, 26(10), 1821–1828.
- \*Nemery B., Hoet P. H. M. & Nemmar A. (2001). The Meuse Valley fog of 1930: An air pollution disaster. *Lancet*, 357(9257), 704–708.
- Nevalainen J. & Pekkanen J. (1998). The effect of particulate air pollution on life expectancy. *The Science of the Total Environment*, 217(1-2), 137–141.
- Noah T. L., Paradiso A. M., Madden M. C., McKinnon K. P. & Devlin R. B. (1991). The response of a human bronchial epithelial cell line to histamine: intracellular calcium changes and extracellular release of inflammatory mediators. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 5(5), 484–92.
- Nowack B., Krug H. F. & Height M. (2010). 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers. *Environmental Science and Technology*, 45, 1177–1183.
- Nymark P., Catalán J., Suhonen S., Järventaus H., Birkedal R., Clausen P. A., Jensen K.

- A., Vippola M., Savolainen K. & Norppa H. (2013). Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells. *Toxicology*, 313(1), 38–48.
- OECD. (2010). In vitro mammalian cell micronucleus test. In *OECD guideline for the testing of chemicals - Proposal for updating Test Guideline 487* (pp. 1–23).
- Oh S. M., Kim H. R., Park Y. J., Lee S. Y. & Chung K. H. (2011). Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM<sub>2.5</sub>)-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells). *Mutation Research*, 723(2), 142–151.
- Ohnuki Y., Reddel R. R., Bates S. E., Lehman T. A., Lechner J. F. & Harris C. C. (1996). Chromosomal changes and progressive tumorigenesis of human bronchial epithelial cell lines. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 92(2), 99–110.
- Onul A., Elseth K. M., De Vitto H., Paradise W. a, Vesper B. J., Tarjan G., Haines G. K., Rumjanek F. D. & Radosevich J. a. (2012). Long-term adaptation of the human lung tumor cell line A549 to increasing concentrations of hydrogen peroxide. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 33(3), 739–748.
- Oostingh G. J., Casals E., Italiani P., Colognato R., Stritzinger R., Ponti J., Pfaller T., Kohl Y., Ooms D., Favilli F., Leppens H., Lucchesi D., Rossi F., Nelissen I., Thielecke H., Puntès V. F., Duschl A. & Boraschi D. (2011). Problems and Challenges in the Development and Validation of Human Cell-Based Assays To Determine Nanoparticle-Induced Immunomodulatory Effects. *Particle and Fibre Toxicology*, 8(8), 1–21.
- Pavlik T., Majek O., Buchler T., Vyzula R., Petera J., Ryska M., Ryska A., Cibula D., Babjuk M., Abrahamova J., Vorlicek J., Muzik J. & Dusek L. (2014). Trends in stage-specific population-based survival of cancer patients in the Czech Republic in the period 2000-2008. *Cancer Epidemiology*, 38(1), 28–34.
- Pelclova D., Zdimal V., Fenclova Z., Vlckova S., Turci F., Corazzari I., Kacer P., Schwarz J., Zikova N., Makes O., Syslova K., Komarc M., Belacek J., Navratil T., Machajova M. & Zakharov S. (2016). Markers of oxidative damage of nucleic acids and proteins among workers exposed to TiO<sub>2</sub> (nano) particles. *Occupational and Environmental Medicine*, 73(2), 110–118.
- Peng K.-Z., Wang J.-H., Su W.-T., Wang X.-C., Yang F.-T. & Nie W.-H. (2010). Characterization of two human lung adenocarcinoma cell lines by reciprocal chromosome painting. *Zoological Research*, 31(2), 113–121.
- Pope III. C. A., Thun M. J., Namboodiri M. M., Dockery D. W., Evans J. S., Speizer F. E. & Heath C. W. (1995). Particulate Air Pollution as a Predictor of Mortality in a Prospective Study of U.S. Adults. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 151, 669–674.
- Poumay Y. & Pittelkow M. R. (1995). Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *The Journal of Investigative Dermatology*, 104(2), 271–276.
- Prasad R. Y., Simmons S. O., Killius M. G., Zucker R. M., Kligerman A. D., Blackman C. F., Fry R. C. & Demarini D. M. (2014). Cellular interactions and biological responses



- to titanium dioxide nanoparticles in HepG2 and BEAS-2B cells: role of cell culture media. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 55(4), 336–342.
- Raaschou-Nielsen O., Andersen Z. J., Beelen R., Samoli E., Stafoggia M., Weinmayr G., Hoffmann B., Fischer P., Nieuwenhuijsen M. J., ... Hoek G. (2013). Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: Prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *The Lancet Oncology*, 14(9), 813–822.
- Raaschou-Nielsen O., Beelen R., Wang M., Hoek G., Andersen Z. J., Hoffmann B., Stafoggia M., Samoli E., Weinmayr G., ... Vineis P. (2016). Particulate matter air pollution components and risk for lung cancer. *Environment International*, 87(Feb 2016), 66–73.
- Ramirez R. D., Sheridan S., Girard L., Sato M., Kim Y., Pollack J., Peyton M., Zou Y., Kurie J. M., Dimairo J. M., Milchgrub S., Smith A. L., Souza R. F., Gilbey L., Zhang X., Gandia K., Vaughan M. B., Wright W. E., Gazdar A. F., Shay J. W. & Minna J. D. (2004). immortalization of human bronchial epithelial cells in the absence of viral oncoproteins. *Cancer Research*, 64(24), 9027–9034.
- Rasmussen K., Mast J., Temmerman P.-J. De, Verleysen E., Waegeneers N., Steen F. Van, Pizzolon J. C., Temmerman L. De, Doren E. Van, Jensen K. A., Birkedal R., Levin M., Nielsen S. H., Koponen I. K., Clausen P. A., Kofoed-Sørensen V., Kembouche Y., Thieriet N., Spalla O., Guiot C., Rousset D., Witschger O., Bau S., Bianchi B., Motzkus C., Shivachev B., Dimowa L., Nikolova R., Nihtianova D., Tarassov M., Petrov O., Bakardjieva S., Gilliland D., Pianella F., Ceccone G., Spampinato V., Cotogno G., Gibson N., Gaillard C. & Mech A. (2014). *Titanium Dioxide, NM-100, NM-101, NM-102, NM-103, NM-104, NM-105: Characterisation and Physico-Chemical Properties*.
- Reddel R. R., Ke Y., Gerwin B. I., McMenamin M. G., Lechner J. F., Su R. T., Brash D. E., Park J. B., Rhim J. S. & Harris C. C. (1988). Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Research*, 48(7), 1904–1909.
- Ressmeyer A. R., Larsson A. K., Vollmer E., Dahlèn S. E., Uhlig S. & Martin C. (2006). Characterisation of guinea pig precision-cut lung slices: Comparison with human tissues. *European Respiratory Journal*, 28(3), 603–611.
- Robinson K., Tantra R., Fry T., Sarantaridis D., Gohli D., Allen C., Quincy P. & Minelli C. (2014). *Global NanoMapp Report: Physico-Chemical Properties of NM 302 Nano-silver Reference Material*.
- Rossner P., Mrhalkova A., Uhlirova K., Spatova M., Rossnerova A., Libalova H., Schmuzerova J., Milcova A., Topinka J. & Sram R. J. (2013a). Nucleotide excision repair is not induced in human embryonic lung fibroblasts treated with environmental pollutants. *PLoS ONE*, 8(7).
- Rossner P., Rossnerova A., Beskid O., Tabashidze N., Libalova H., Uhlirova K., Topinka J. & Sram R. J. (2014). Nonhomologous DNA end joining and chromosome aberrations in human embryonic lung fibroblasts treated with environmental pollutants. *Mutation Research*, 763-764, 28–38.

- Rossner P., Svecova V., Schmuczerova J., Milcova A., Tabashidze N., Topinka J., Pastorkova A. & Sram R. J. (2013b). Analysis of biomarkers in a Czech population exposed to heavy air pollution. Part I: bulky DNA adducts. *Mutagenesis*, 28(1), 89–95.
- Rossnerova A., Spatova M., Pastorkova A., Tabashidze N., Veleminsky M., Balascak I., Solansky I. & Sram R. J. (2011). Micronuclei levels in mothers and their newborns from regions with different types of air pollution. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 715(1-2), 72–78.
- Rossnerova A., Spatova M., Rossner P., Solansky I. & Sram R. J. (2009). The impact of air pollution on the levels of micronuclei measured by automated image analysis. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 669(1-2), 42–47.
- Rubes J., Rybar R., Prinosilova P., Veznik Z., Chvatalova I., Solansky I. & Sram R. J. (2010). Genetic polymorphisms influence the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 683(1-2), 9–15.
- Ruosaari S. T., Nymark P. E. H., Aavikko M. M., Kettunen E., Knuutila S., Hollmén J., Norppa H. & Anttila S. L. I. (2008). Aberrations of chromosome 19 in asbestos-associated lung cancer and in asbestos-induced micronuclei of bronchial epithelial cells in vitro. *Carcinogenesis*, 29(5), 913–917.
- Rychlikova E. (2014). *Hodnocení zdravotního rizika znečištění ovzduší na Spořilově podle zákona č. 258 / 2000 Sb . , o ochraně veřejného zdraví.*
- \*Sack G. H. (1981). Human cell transformation by simian virus 40: A review. *In Vitro*, 17(1), 1–19.
- Scott J. a. (1953). Fog and deaths in London, December 1952. *Public Health Reports*, 68(5), 474–479.
- Seriani R., de Souza C. E. C., Krempel P. G., Frias D. P., Matsuda M., Correia A. T., Ferreira M. Z. J., Alencar A. M., Negri E. M., Saldiva P. H. N., Mauad T. & Macchione M. (2016). Human bronchial epithelial cells exposed in vitro to diesel exhaust particles exhibit alterations in cell rheology and cytotoxicity associated with decrease in antioxidant defenses and imbalance in pro- and anti-apoptotic gene expression. *Environmental Science and Pollution Research International*.
- Sharma S., Venkatesan V., Prakhya B. M. & Bhonde R. (2014). Human mesenchymal stem cells as a novel platform for simultaneous evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals. *Mutagenesis*, (9), 1–9.
- Shi J. P., Evans D. E., Khan A. A. & Harrison R. M. (2001). Sources and concentration of nanoparticles (<10nm diameter) in the urban atmosphere. *Atmospheric Environment*, 35(7), 1193–1202.
- Shi J. P., Khan A. a. & Harrison R. M. (1999). Measurements of ultrafine particle concentration and size distribution in the urban atmosphere. *Science of The Total Environment*, 235, 51–64.
- Shvedova A. A., Yanamala N., Kisin E. R., Khailullin T. O., Birch M. E. & Fatkhutdinova L. M. (2016). Integrated Analysis of Dysregulated ncRNA and mRNA Expression

- Profiles in Humans Exposed to Carbon Nanotubes. *Plos One*, 11(3), 1–32.
- Schell K., Lane W. T., Casey M. J. & Huebner R. J. (1966). Potentiation of oncogenicity of adenovirus type 12 grown in African green monkey kidney cell cultures preinfected with SV40 virus. Persistence of both T antigens in the tumors and evidence for possible hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 55(1), 81–88.
- Siegel R., Miller K. & Jemal A. (2015). Cancer statistics , 2015. *CA Cancer J Clin*, 65(1), 29.
- Spector D. L., Goldman R. D. & Leinwand L. A. (1998). *Cells : A Laboratory Manual Volume 1: Culture and Biochemical Analysis of Cells*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sram R. J., Beskid O., Binkova B., Chvatalova I., Lnenickova Z., Milcova A., Solansky I., Tulupova E., Bavorova H., Ocadlikova D. & Farmer P. B. (2007). Chromosomal aberrations in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair genes polymorphisms. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 620(1-2), 22–33.
- Sram R. J., Binkova B., Dostal M., Merkerova-Dostalova M., Libalova H., Milcova A., Rossner P., Rossnerova A., Schmuczerova J., Svecova V., Topinka J. & Votavova H. (2013). Health impact of air pollution to children. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216(5), 533–40.
- Sram R. J., Binkova B., Rössner P., Rubes J., Topinka J. & Dejmek J. (1999). Adverse reproductive outcomes from exposure to environmental mutagens. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 428(1-2), 203–215.
- Stapleton P. A., McBride C. R., Yi J. & Nurkiewicz T. R. (2015). Uterine microvascular sensitivity to nanomaterial inhalation: An in vivo assessment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 288(3), 420–428.
- Sung J. H., Ji J. H., Park J. D., Yoon J. U., Kim D. S., Jeon K. S., Song M. Y., Jeong J., Han B. S., Han J. H., Chung Y. H., Chang H. K., Lee J. H., Cho M. H., Kelman B. J. & Yu I. J. (2009). Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 108(2), 452–461.
- Thurlbeck W. M. (1982). Postnatal human lung growth. *Thorax*, 37(8), 564–571.
- Topinka J., Milcova A., Schmuczerova J., Mazac M., Pechout M. & Vojtisek-Lom M. (2012). Genotoxic potential of organic extracts from particle emissions of diesel and rapeseed oil powered engines. *Toxicology Letters*, 212(1), 11–17.
- Turner M. C., Chen Y., Krewski D., Calle E. E. & Thun M. J. (2007). Chronic obstructive pulmonary disease is associated with lung cancer mortality in a prospective study of never smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 176(3), 285–290.
- Vakhrushev I. V., Vdovin A. S., Strukova L. A. & Yarygin K. N. (2016). Variability of the Phenotype and Proliferation and Migration Characteristics of Human Mesenchymal Stromal Cells Derived from the Deciduous Teeth Pulp of Different Donors. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 160(4), 525–529.
- Vance M. E., Kuiken T., Vejerano E. P., McGinnis S. P., Hochella M. F. & Hull D. R.

- (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6(1), 1769–1780.
- Wadsworth S. J., Freyer A. M., Corteling R. L. & Hall I. P. (2004). Biosynthesized matrix provides a key role for survival signaling in bronchial epithelial cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286(3), 596–603.
- Wang L., Wang L., Ding W. & Zhang F. (2010). Acute toxicity of ferric oxide and zinc oxide nanoparticles in rats. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10(12), 8617–8624.
- Webber M. M., Bello D., Kleinman H. K., Wartinger D. D., Williams D. E. & Rhim J. S. (1996). Prostate specific antigen and androgen receptor induction and characterization of an immortalized adult human prostatic epithelial cell line. *Carcinogenesis*, 17(8), 1641–1646.
- Werner E., Wang H. & Doetsch P. W. (2014). Opposite roles for p38MAPK-driven responses and reactive oxygen species in the persistence and resolution of radiation-induced genomic instability. *PloS One*, 9(10).
- Werner E., Wang H. & Doetsch P. W. (2015). Role of Pro-inflammatory Cytokines in Radiation-Induced Genomic Instability in Human Bronchial Epithelial Cells. *Radiation Research*, 184(6), 621–629.
- WHO Regional Office for Europe. (2010). *WHO guidelines for indoor air quality: Selected pollutants*. Copenhagen.
- Yamamoto A., Inamasu T., Kitamori S. & Ishinishi N. (1987). Comparative Study on the Carcinogenicity of 1-Nitropyrene and Benzo[a]pyrene to the Lung of Syrian Golden Hamsters Induced by Intermittent Intratracheal Instillations. *Journal of Japan Society of Air Pollution*, 22(1), 29–35.
- Yang X., Gondikas A. P., Marinakos S. M., Auffan M., Liu J., Hsu-Kim H. & Meyer J. N. (2012). Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved silver and surface coating in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Science & Technology*, 46(2), 1119–1127.
- Zákon č. 201/2012 Sb., o ochraně ovzduší (2012). Česká republika: Sbirka zákonů.
- Zhao F. & Klimecki W. T. (2014). Culture conditions profoundly impact phenotype in BEAS-2B, a human pulmonary epithelial model. *Journal of Applied Toxicology*, 282.
- Zhou W., Tian D., He J., Wang Y., Zhang L., Cui L., Jia L., Zhang L., Li L., Shu Y., Yu S., Zhao J., Yuan X. & Peng S. (2016). Repeated PM2.5 exposure inhibits BEAS-2B cell P53 expression through ROS-Akt-DNMT3B pathway-mediated promoter hypermethylation. *Oncotarget*.

\* sekundární citace

## 8 Přílohy

### Příloha č. 1, Zamrazovací protokol buněk BEAS-2B

Roztoky: BEGM<sup>TM</sup> (37°C), BEGM<sup>TM</sup> (2-8°C), DMSO (PT), PBS (37°C), PVP (2-8°C), isopropanol (RT)

Postup: Den před zamrazením u buněčné kultury byla u buněčné kultury provedena výměna media. Byly zamrazovány dobře narostlé buněčné kultury v exponenciální fázi růstu. Buňky byly zamrazeny ve speciálním čerstvě připraveném mediu, které se skládá z media A a media B (viz Tabulka 23).

Buňky byly sklizeny stejným způsobem jako při pasážování a výsledná buněčná suspenze byla zředěna na koncentraci  $1 \times 10^6$  buněk/ml. K tomuto množství bylo pomalu, kapku po kapce přidáno vychlazené medium B v poměru 1:1 a vše dobře promíseno. Maximální doba od prvního kontaktu buněk s mediem B do zamrazení nesměla být delší než 40 minut. Vzniklá suspenze měla koncentraci  $5 \times 10^5$  buněk/ml. Byla rozdělena po 1 ml do kryozkumavek a umístěna do mrazicího kontejneru s isopropanolem o pokojové teplotě. Kontejner byl uložen do -70°C, kde byl ponechán minimálně 4 hodiny (nejlépe přes noc). Poté byly zkumavky převedeny do kapalného dusíku.

Pozn. pro zvýšení viability zamrazených buněk je možné použít místo čerstvého BEGM<sup>TM</sup> 50% kondiciované medium.

**Tabulka 17: Rozpis ředění testovaných látek pro 24 h kultivaci**

Látka		V [ml]	% DMSO
B[a]P	Zásobní roztok 200 mM		100 %
	1,5 µl (200 mM) + 1498,5 µl media = 200 µM	1,5	0,10 %
	500 µl (200 µM) + 500 µl media = 100 µM	1	0,05 %
	250 µl (100 µM) + 750 µl media = 25 µM	1	0,01 %
3-NBA	Zásobní roztok 5 mM		100 %
	4 µl (5 mM) + 1996 µl media = 10 µM	2	0,20 %
	600 µl (10 µM) + 600 µl media = 5 µM	1,2	0,10 %
	200 µl (5 µM) + 800 µl media = 1 µM	1	0,02 %
1-NP	Zásobní roztok 10 mM		100 %
	5,5 µl (10 mM) + 1094,6 µl media = 50 µM	1,1	0,50 %
	120 µl (50 µM) + 1080 µl media = 5 µM	1,2	0,05 %
	200 µl (5 µM) + 800 µl media = 1 µM	1	0,02 %
B0, B30, B100	Zásobní roztok 0,1 g/ml		100 %
	1 µl (0,1 g/ml) + 999 µl media = 100 µg/ml	1	0,10 %
	350 µl (100 µg/ml) + 350 µl media = 50 µg/ml	0,7	0,05 %
	14 µl (50 µg/ml) + 686 µl media = 1 µg/ml	0,7	< 0,01 %
	250 µl (100 µg/ml) + 750 µl media = 25 µg/ml	1	0,02 %
	100 µl (100 µg/ml) + 900 µl media = 10 µg/ml	1	< 0,01 %
NM101, NM302	Zásobní roztok 2560 µg/ml		×
	78,13 µl (2560 µg/ml) + 921,87 µl media = 200 µg/ml	1	×
	87,5 µl (200 µg/ml) + 612,5 µl media = 25 µg/ml	0,7	×
	35 µl (200 µg/ml) + 665 µl media = 10 µg/ml	0,7	×
	3,5 µl (200 µg/ml) + 696,5 µl media = 1 µg/ml	0,7	×

B[a]P (benzo[a]pyren), 3-NBA (3nitrobenzathron), 1-NP (1-nitropyren), B0 (extrahovatelná organická složka z nafty), B30 (extrahovatelná organická složka z nafty s 30 % biosložky), B100 (extrahovatelná organická hmota ze 100% bionafty), NM101 (nanočástice TiO<sub>2</sub>), NM302 (nanočástice Ag) DMSO (dimethylsulfoxid)

**Tabulka 18: Rozpis ředění testovaných látek pro 48 h kultivaci**

Látka		V [ml]	% DMSO
B[a]P	Zásobní roztok 200 mM		100 %
	1,6 µl (200 mM) + 1598,4 µl media = 200 µM	1,6	0,10 %
	600 µl (200 µM) + 600 µl media = 100 µM	1,2	0,05 %
	250 µl (100 µM) + 750 µl media = 25 µM	1	0,01 %
3-NBA	Zásobní roztok 5 mM		100 %
	4 µl (5 mM) + 1996 µl media = 10 µM	2	0,20 %
	600 µl (10 µM) + 600 µl media = 5 µM	1,2	0,10 %
	200 µl (5 µM) + 800 µl media = 1 µM	1	0,02 %
1-NP	Zásobní roztok 10 mM		100 %
	5,5 µl (10 mM) + 1094,6 µl media = 50 µM	1,1	0,50 %
	120 µl (50 µM) + 1080 µl media = 5 µM	1,2	0,05 %
	200 µl (5 µM) + 800 µl media = 1 µM	1	0,02 %
B0, B30, B100	Zásobní roztok 0,1 g/ml		100 %
	1,5 µl (0,1 g/ml) + 1498,5 µl media = 100 µg/ml	1,5	0,10 %
	500 µl (100 µg/ml) + 500 µl media = 50 µg/ml	1	0,05 %
	20 µl (50 µg/ml) + 950 µl media = 1 µg/ml	1	<0,01 %
	250 µl (100 µg/ml) + 750 µl media = 25 µg/ml	1	0,02 %
	100 µl (100 µg/ml) + 900 µl media = 10 µg/ml	1	<0,01 %
NM101, NM302	Zásobní roztok 2560 µg/ml		×
	78,13 µl (2560 µg/ml) + 921,87 µl media = 200 µg/ml	1	×
	125 µl (200 µg/ml) + 875 µl media = 25 µg/ml	1	×
	50 µl (200 µg/ml) + 950 µl media = 10 µg/ml	1	×
	5 µl (200 µg/ml) + 995 µl media = 1 µg/ml	1	×

B[a]P (benzo[a]pyren), 3-NBA (3nitrobenzathron), 1-NP (1-nitropyren), B0 (extrahovatelná organická složka z nafty), B30 (extrahovatelná organická složka z nafty s 30 % biosložky), B100 (extrahovatelná organická hmota ze 100% bionafty), NM101 (nanočástice TiO<sub>2</sub>), NM302 (nanočástice Ag) DMSO (dimethylsulfoxid)

**Tabulka 19: Rozpis ředění testovaných látek pro 72 h kultivaci**

Látka		V [ml]	% DMSO
B[a]P	Zásobní roztok 10 mM		100 %
	2,25 µl (10 mM) + 1497,75 µl media = 15 µM	1,5	0,15%
	666,6 µl (15 µM) + 333,4 µl media = 10 µM	1	0,10%
	70 µl (10 µM) + 630 µl media = 1 µM	0,7	0,01%
3-NBA	Zásobní roztok 5 µM		1%
	50 µl (5 µM) + 950 µl media = 250 nM	1	0,05%
	100 µl (250 nM) + 900 µl media = 25 nM	1	0,01%
	336 µl (25 nM) + 364 µl media = 12 nM	0,7	<0,01%
1-NP	Zásobní roztok 0,01 mM		1%
	80 µl (10 µM) + 620 µl media = 1 µM	0,8	0,10%
	140 µl (1 µM) + 560 µl media = 200 nM	0,7	0,02%
	35 µl (200 nM) + 665 µl media = 10 nM	0,7	<0,01%
B0, B30, B100	Zásobní roztok 0,1 g/ml		100%
	1 µl (0,1 g/ml) + 1999 µl media = 50 µg/ml	2	0,05%
	140 µl (50 µg/ml) + 560 µl media = 10 µg/ml	0,7	0,01%
	70 µl (10 µg/ml) + 630 µl media = 1 µg/ml	0,7	<0,01%
	50 µl (100 µg/ml) + 950 µl media = 5 µg/ml	1	<0,01%
NM101, NM302	Zásobní roztok 2560 µg/ml		×
	78,13 µl (2560 µg/ml) + 921,87 µl media = 200 µg/ml	1	×
	35 µl (200 µg/ml) + 665 µl media = 10 µg/ml	0,7	×
	17,5 µl (200 µg/ml) + 682,5 µl media = 5 µg/ml	0,7	×
	3,5 µl (200 µg/ml) + 696,5 µl media = 1 µg/ml	0,7	×

B[a]P (benzo[a]pyren), 3-NBA (3nitrobenzathron), 1-NP (1-nitropyren), B0 (extrahovatelná organická složka z nafty), B30 (extrahovatelná organická složka z nafty s 30 % biosložky), B100 (extrahovatelná organická hmota ze 100% bionafty), NM101 (nanočástice TiO<sub>2</sub>), NM302 (nanočástice Ag) DMSO (dimethylsulfoxid)



**Tabulka 20: Chemická analýza EOM ze spalín nafty (B0), nafty s 30% příměsí biosložky z řepkového oleje (B30) a 100% bionafta z řepkového oleje (B100)**

PAU	B0 (ng/mg DEP)	B30 (ng/mg DEP)	B100 (ng/mg DEP)
Fenanthren	60,9	25,8	18,3
Antracen	6,4	4,0	2,1
4H-cyklopenta[def]fenanthren	2,8	3,8	4,3
Fluoranthren	41,9	109,7	117,0
Pyren	67,7	151,8	144,4
Benzo[c]fenanthren	1,9	3,8	4,0
Trifenylen	9,0	3,6	4,0
4-methylpyren	10,0	13,4	12,0
1-methylpyren	5,1	7,2	3,9
Benz[a]antracen	6,6	9,8	26,1
Chrysen	5,1	60,8	126,1
Benzo[j]fluoranthren	2,4	2,8	6,4
Benzo[e]pyren	0,7	0,6	3,6
7-methylbenz[a]antracen	0,3	n.d.	n.d.
Benzo[b]fluoranthren	1,2	1,4	7,0
1-methylchrysen	0,3	0,3	1,2
Benzo[k]fluoranthren	n.d.	n.d.	2,6
Benzo[c]chrysen	n.d.	n.d.	0,2
Benzo[a]pyren	0,6	0,9	1,7
Benzo[g,h,i]perylen	2,2	2,8	3,8
Indeno[1,2,3-cd]pyren	0,7	0,8	1,8
Koronen	0,8	0,7	0,7
Oxidované PAU	B0 (ng/mg DEP)	B30 (ng/mg DEP)	B100 (ng/mg DEP)
Anhydrid 1,8-naftalendikarboxylové kyseliny	25417	29454	29669
Fenanthren -9,10-dion	1264	771	839
9H-fluoren-9-on	4321	2754	1714
Antracen-9,10-dion	2675	4460	3984
7H-Benz[de]antracen-7-on	1358	1502	2373
9-hydroxybenzo[a]pyren	60	71	93
Benz[a]antracen-7,12-dion	24	39	151
3-hydroxybenzo[a]pyren	47	47	100
Nitro- PAU	B0 (ng/mg DEP)	B30 (ng/mg DEP)	B100 (ng/mg DEP)
1-nitropyren	314	539	1504
2-nitropyren	25	12	23
4-nitropyren	18	16	44
3-nitrofluoranthren	7	16	41

Dinitro- PAU	B0 (ng/mg DEP)	B30 (ng/mg DEP)	B100 (ng/mg DEP)
1,3-dinitropyren	1,6	2,4	17,7
1,6-dinitropyren	1,2	5,6	65,0
1,8-dinitropyren	0,9	4,6	48,0
Celkový součet všech PAU	35769,3	40107,5	41164,7

B0 (extrahovatelná organická složka z nafty), B30 (extrahovatelná organická složka z nafty s 30 % biosložky), B100 (extrahovatelná organická hmota ze 100% bionafty), DEP (*angl. Diesel exhaust particles*), n. d. (koncentrace látky byla pod detekčním limitem přístroje).

**Tabulka 21: Roztoky pro kultivaci BEAS-2B**

Roztok	Skladování	Pracovní teplota
BEGM <sup>TM</sup> BulletKit <sup>TM</sup>	2-8°C	37°C
BEBM <sup>TM</sup>	2-8°C	2-8°C
0,25% Trypsin + 0,53 mM EDTA + 0,5% PVP	2-8°C	PT
Podkladové medium	2-8°C	PT

BEGM (*angl. Bronchial epithelial cell growth medium*), EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), PVP (polyvinylpyrrolidon), PT (pokojová teplota)

**Tabulka 22: Roztoky pro přípravu podkladového média pro kultivaci BEAS-2B**

Podkladové medium	Skladování	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace v roztoku	V = 45 ml
BEBM <sup>TM</sup>	2-8 °C			44,2785 ml
Fibronectin	2-8 °C	1 mg/ml	0,01 mg/ml	450 µl
Kolagen typu I.	2-8 °C	5 mg/ml	0,03 mg/ml	270 µl
BSA	2-8 °C	300 mg/ml	0,01 mg/ml	1,5 µl

BEBM (*angl. Bronchial epithelial basal medium*), BSA (bovinní sérový albumin)

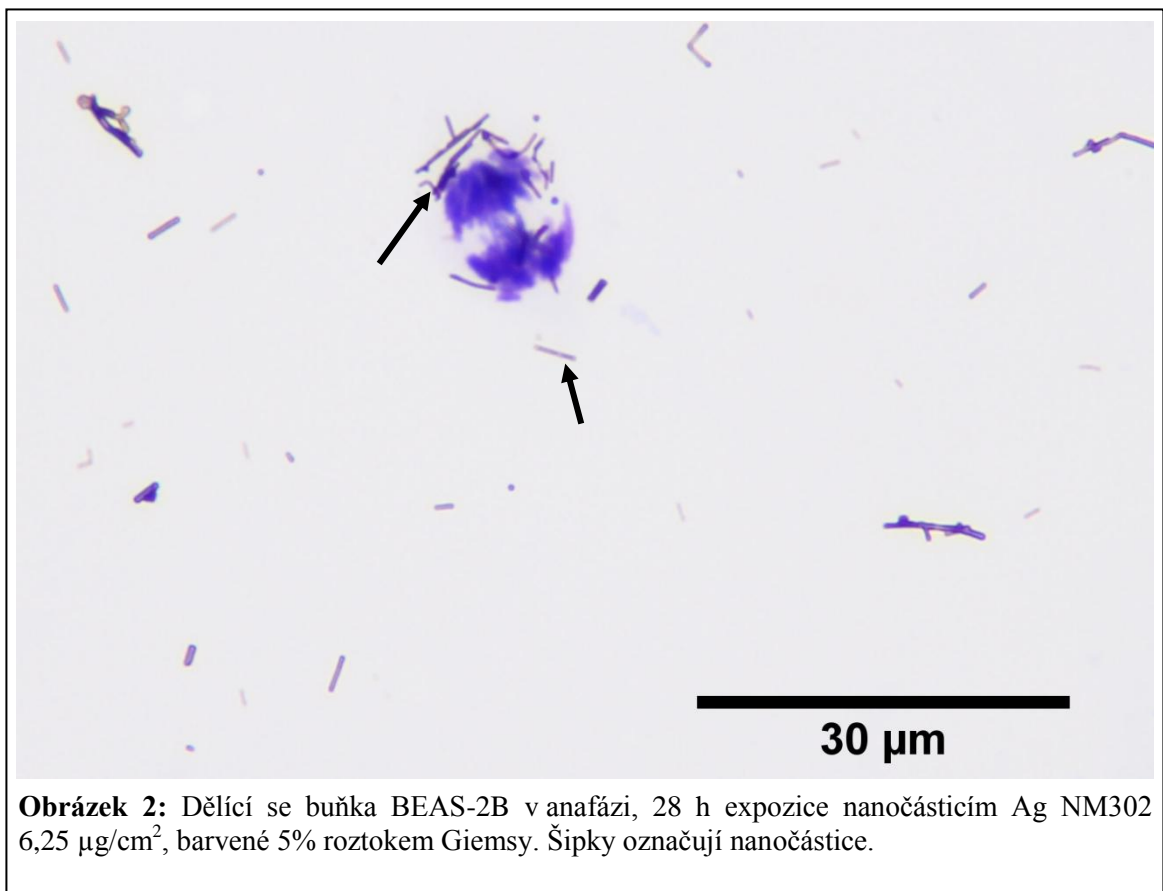
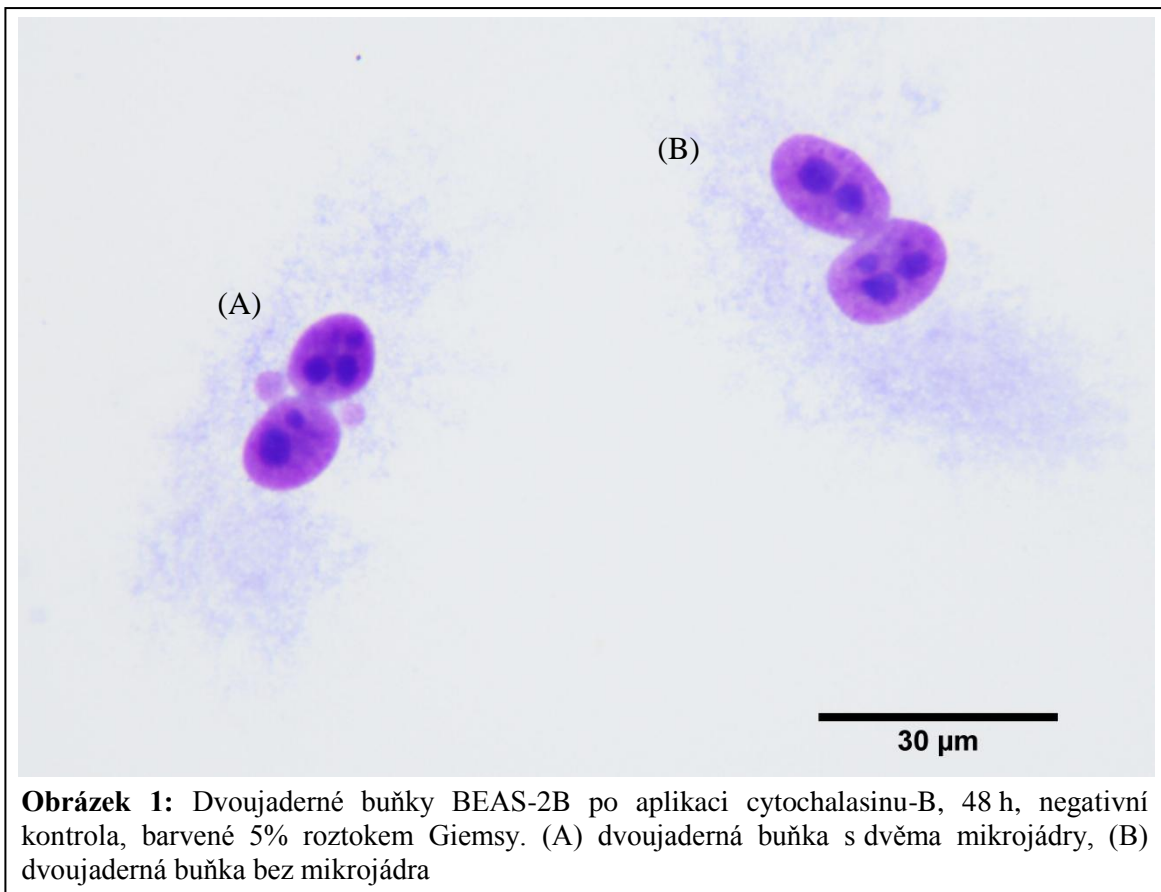
**Tabulka 23: Roztoky pro zamrazování buněk BEAS-2B**

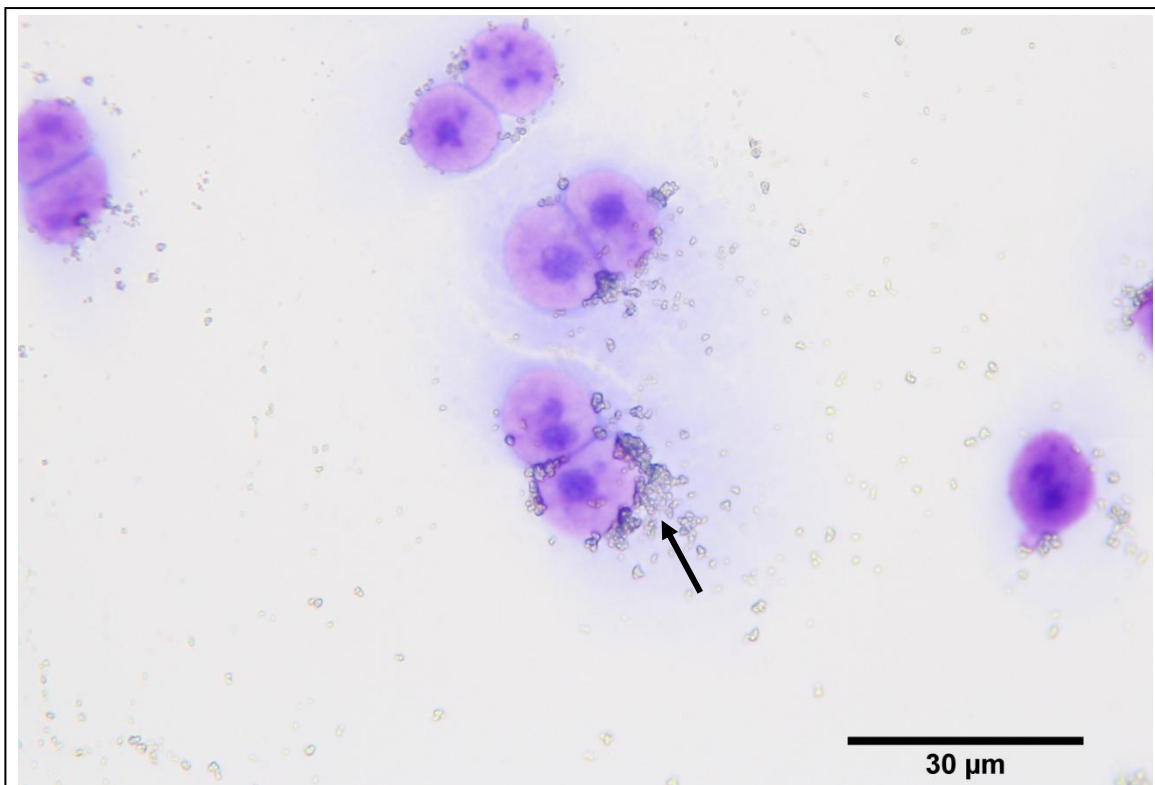
MEDIUM a = BEGM <sup>TM</sup> (37°C) + buňky (1x10 <sup>6</sup> buněk/ml)	50%	2,5 ml
MEDIUM B = BEGM <sup>TM</sup> (2-8°C) + 15% DMSO (PT) + 2% PVP (2-8°C)	50%	2,5 ml
BEGM <sup>TM</sup> (2-8°C)	83%	2,075 ml
DMSO (PT)	15%	375 µl
PVP (2-8°C)	2%	50 µl
Celkový objem k zamrazení		5 ml
Počet kryozkumavek s 5x10 <sup>5</sup> buněk/ml		5

BEGM (*angl. Bronchial epithelial cell growth medium*), DMSO (dimethylsulfoxid), PVP (polyvinylpyrrolidon), PT (pokojová teplota)

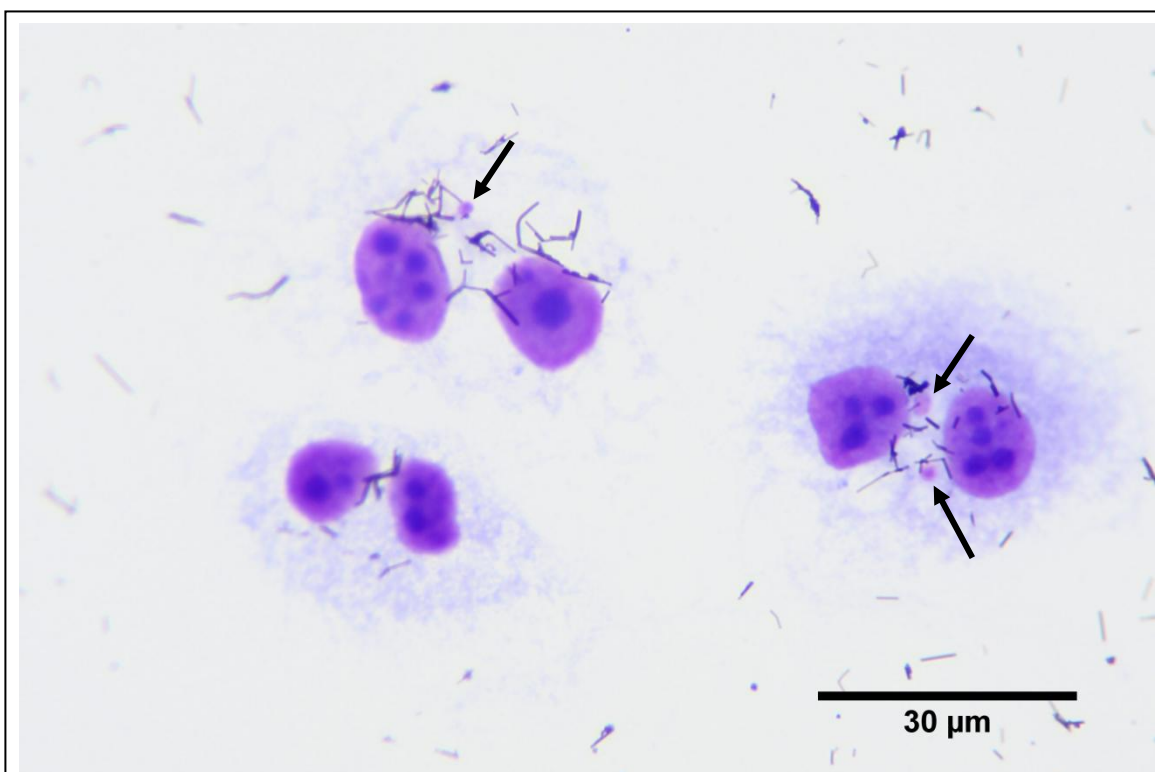
**Tabulka 24: Tabulka hodnot z pro Z skóre**

Z skóre	0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0	0,5000	0,5040	0,5080	0,5120	0,5160	0,5199	0,5239	0,5279	0,5319	0,5359
0,1	0,5398	0,5438	0,5478	0,5517	0,5557	0,5596	0,5636	0,5675	0,5714	0,5753
0,2	0,5793	0,5832	0,5871	0,5910	0,5948	0,5987	0,6026	0,6064	0,6103	0,6141
0,3	0,6179	0,6217	0,6255	0,6293	0,6331	0,6368	0,6406	0,6443	0,6480	0,6517
0,4	0,6554	0,6591	0,6628	0,6664	0,6700	0,6736	0,6772	0,6808	0,6844	0,6879
0,5	0,6915	0,6950	0,6985	0,7019	0,7054	0,7088	0,7123	0,7157	0,7190	0,7224
0,6	0,7257	0,7291	0,7324	0,7357	0,7389	0,7422	0,7454	0,7486	0,7517	0,7549
0,7	0,7580	0,7611	0,7642	0,7673	0,7704	0,7734	0,7764	0,7794	0,7823	0,7852
0,8	0,7881	0,7910	0,7939	0,7967	0,7995	0,8023	0,8051	0,8078	0,8106	0,8133
0,9	0,8159	0,8186	0,8212	0,8238	0,8264	0,8289	0,8315	0,8340	0,8365	0,8389
1	0,8413	0,8438	0,8461	0,8485	0,8508	0,8531	0,8554	0,8577	0,8599	0,8621
1,1	0,8643	0,8665	0,8686	0,8708	0,8729	0,8749	0,8770	0,8790	0,8810	0,8830
1,2	0,8849	0,8869	0,8888	0,8907	0,8925	0,8944	0,8962	0,8980	0,8997	0,9015
1,3	0,9032	0,9049	0,9066	0,9082	0,9099	0,9115	0,9131	0,9147	0,9162	0,9177
1,4	0,9192	0,9207	0,9222	0,9236	0,9251	0,9265	0,9279	0,9292	0,9306	0,9319
1,5	0,9332	0,9345	0,9357	0,9370	0,9382	0,9394	0,9406	0,9418	0,9429	0,9441
1,6	0,9452	0,9463	0,9474	0,9484	0,9495	0,9505	0,9515	0,9525	0,9535	0,9545
1,7	0,9554	0,9564	0,9573	0,9582	0,9591	0,9599	0,9608	0,9616	0,9625	0,9633
1,8	0,9641	0,9649	0,9656	0,9664	0,9671	0,9678	0,9686	0,9693	0,9699	0,9706
1,9	0,9713	0,9719	0,9726	0,9732	0,9738	0,9744	0,9750	0,9756	0,9761	0,9767
2	0,9772	0,9778	0,9783	0,9788	0,9793	0,9798	0,9803	0,9808	0,9812	0,9817
2,1	0,9821	0,9826	0,9830	0,9834	0,9838	0,9842	0,9846	0,9850	0,9854	0,9857
2,2	0,9861	0,9864	0,9868	0,9871	0,9875	0,9878	0,9881	0,9884	0,9887	0,9890
2,3	0,9893	0,9896	0,9898	0,9901	0,9904	0,9906	0,9909	0,9911	0,9913	0,9916
2,4	0,9918	0,9920	0,9922	0,9925	0,9927	0,9929	0,9931	0,9932	0,9934	0,9936
2,5	0,9938	0,9940	0,9941	0,9943	0,9945	0,9946	0,9948	0,9949	0,9951	0,9952
2,6	0,9953	0,9955	0,9956	0,9957	0,9959	0,9960	0,9961	0,9962	0,9963	0,9964
2,7	0,9965	0,9966	0,9967	0,9968	0,9969	0,9970	0,9971	0,9972	0,9973	0,9974
2,8	0,9974	0,9975	0,9976	0,9977	0,9977	0,9978	0,9979	0,9979	0,9980	0,9981
2,9	0,9981	0,9982	0,9982	0,9983	0,9984	0,9984	0,9985	0,9985	0,9986	0,9986
3	0,9987	0,9987	0,9987	0,9988	0,9988	0,9989	0,9989	0,9989	0,9990	0,9990
3,1	0,999	0,9991	0,9991	0,9991	0,9992	0,9992	0,9992	0,9992	0,9993	0,9993
3,2	0,9993	0,9993	0,9994	0,9994	0,9994	0,9994	0,9994	0,9995	0,9995	0,9995
3,3	0,9995	0,9995	0,9995	0,9996	0,9996	0,9996	0,9996	0,9996	0,9996	0,9997
3,4	0,9997	0,9997	0,9997	0,9997	0,9997	0,9997	0,9997	0,9997	0,9997	0,9998





**Obrázek 3:** Dvoujaderné buňky BEAS-2B po aplikaci cytochalasinu-B, 28 h expozice nanočásticím TiO<sub>2</sub> NM101 2,5 μg/cm<sup>2</sup>, barvené 5% roztokem Giemsy. Šipka označuje nanočástice.



**Obrázek 4:** Dvoujaderné buňky BEAS-2B po aplikaci cytochalasinu-B, 28 h expozice nanočásticím Ag NM302 6,25 μg/cm<sup>2</sup>, barvené 5% roztokem Giemsy. Šipky označují mikrojádra.