

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FAKULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VLIV NANOČÁSTIC PbO A CdO NA VYBRANÉ FYZIOLOGICKÉ FUNKCE MYŠI.

Influence of PbO and CdO nanoparticles on particular physiological functions in mouse.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Eva Svozilová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Zbyněk Večeřa, CSc.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0904/2014** Akademický rok: **2014/2015**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Eva Svozilová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)
Vedoucí práce **Ing. Zbyněk Večeřa, CSc.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Vliv nanočástic PbO a CdO na vybrané fyziologické funkce myši.

Zadání bakalářské práce:

Cílem práce je vyhodnotit dlouhodobý vliv inhalace nanočástic PbO a CdO na vybrané orgány pokusných bílých myší. Vzorky budou odebírány v určených časových intervalech a bude sledována kauzalita mezi inhalací výše uvedených nanočástic a změnami hmotnosti a morfologie testovaných orgánů.

Obsah práce:

1. Literární rešerše zaměřená na následující okruhy:

- Příjem, transport a mechanismus působení těžkých kovů na organismus.
- Změny v organismu po působení těžkých kovů.
- Biochemické procesy a vylučování kovů v jednotlivých orgánech.
- Generování nanočástic PbO a CdO.
- Bílá pokusná myš (*Mus musculus* var. *Alba*).
- Histologická stavba orgánů (slezina, játra, ledviny, plíce, mozek).

2. Experimentální část

- Odběr, zpracování vzorků orgánů, příprava vzorků.
- Analýza stanovených parametrů.

3. Vyhodnocení výsledků a diskuse.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Eva Svozilová
Student(ka)

Ing. Zbyněk Večeřa, CSc.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cílem bakalářské práce je vyhodnotit dlouhodobý vliv inhalace nanočástic oxidu olovnatého a oxidu kademnatého na hmotnost vybraných orgánů pokusných bílých myší. Vybrané orgány (slezina, játra, ledvina, plíce, mozek) byly postupně odebírány po dobu třinácti týdnů. V obou experimentech (PbO a CdO) byl zkoumán vztah mezi hmotností jednotlivých orgánů a dobou inhalace, vztah mezi hmotností jednotlivých orgánů a inhalací rozdílné početní koncentrace nanočástic kovů a statisticky byl vyhodnocen vliv inhalace oxidů obou kovů na hmotnost orgánů. Výsledky obou experimentů byly porovnány.

ABSTRACT

The aim of this bachelor's thesis is to assess the long-term effects of inhalation of nanoparticles of lead oxide and cadmium oxide on the weight of selected organs of experimental white mice. The selected organs (spleen, liver, kidney, lungs, brain) were successively collected during a period of thirteen weeks. The effect of inhalation of both metal oxides was statistically evaluated. In both study groups of the experiment (PbO and CdO), the relation between organs weight and the length of inhalation and the relation between organs weight and inhalation of differing metal concentrations were evaluated, and results both of the study groups were compared to each other.

KLÍČOVÁ SLOVA

Nanočástice, oxid olovnatý, oxid kademnatý, inhalace, slezina, játra, ledvina, plíce, mozek, myš.

KEYWORDS

Nanoparticles, lead oxide, cadmium oxide, inhalation, spleen, liver, kidney, lungs, brain, mouse.

SVOZILOVÁ, E. *Vliv nanočástic PbO a CdO na vybrané fyziologické funkce myši*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 36 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Zbyněk Večeřa, CSc..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce panu Ing. Zbyňku Večeřovi, CSc., za odborné rady, cenné připomínky a trpělivost při zpracování zadané problematiky. Dále bych ráda poděkovala svým rodičům, celé rodině a nejbližším za podporu a porozumění během celého studia.

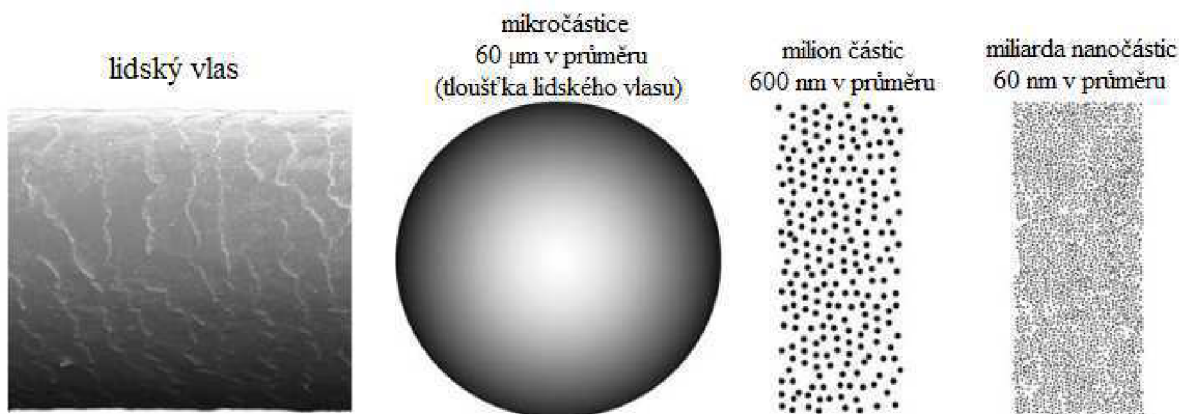
OBSAH

1. Úvod.....	6
2. Teoretická část.....	7
2.1. Laboratorní myš (<i>Mus musculus</i> var. <i>Alba</i>).....	7
2.2. Histologická stavba orgánů	8
2.2.1. Slezina	9
2.2.2. Játra	10
2.2.3. Ledviny.....	11
2.2.4. Plíce	12
2.2.5. Mozek.....	12
2.3. Generování nanočástic PbO a CdO	13
2.4. Vliv těžkých kovů na organismus	13
2.4.1. Příjem, transport a mechanismus působení těžkých kovů na organismus	15
3. Cíle práce.....	17
4. Experimentální část	18
4.1. Odběr, zpracování orgánů a příprava vzorků	19
5. Výsledky a Diskuse	21
5.1. Hodnocení výsledků pro PbO	22
5.1.1. Regrese u vyšší koncentrace nanočástic (Pb2) – ledvina	24
5.1.2. Regrese u vyšší koncentrace nanočástic (Pb2) - plíce.....	25
5.2. Hodnocení výsledků pro CdO	25
5.2.1. Regrese u nižší koncentrace nanočástic (Cd1) - slezina	27
5.2.2. Regrese u nižší koncentrace nanočástic (Cd1) - játra	28
5.2.3. Regrese u nižší koncentrace nanočástic (Cd1) - plíce.....	28
5.2.4. Regrese u nižší koncentrace nanočástic (Cd1) - mozek	29
5.2.5. Regrese u vyšší koncentrace nanočástic (Cd2) - slezina.....	30
5.2.6. Regrese u vyšší koncentrace nanočástic (Cd2) – plíce	30
5.3. Porovnání PbO a CdO	31
6. Závěr.....	32
7. Použitá literatura	34

1. ÚVOD

Přestože byli lidé vystaveni vzduchu s nanočásticemi, které se tvoří při spalovacích procesech např. lesní požáry a sopečná činnost, po celou dobu jejich vývoje, průmyslová revoluce vedla k dramatickému vzestupu expozice nanočásticím pocházejících z antropogenních zdrojů, jako jsou spalovací motory, elektrárny atp. (tryskové motory, spalovny komunálního odpadu, svařování) [12].

Jako nanočástice označujeme takové objekty, jejichž rozměry jsou alespoň v jednom rozměru menší než 100 nm. Pro představu o velikosti nanočástic a jejich počtu, jenž vzniká pouhým dělením původního materiálu, můžeme použít srovnání s běžnými objekty, kterým může být například lidský vlas. Lidský vlas má v průměru 60 μm . Pokud bychom měli kulovou částici o tomto průměru, mohli bychom jejím postupným dělením získat jeden milion stejných kulových částic o průměru 600 nm, tedy jednu miliardu částic s průměrem 60 nm, viz obr. 1.



Obr. 1: Porovnání velikostí částic vzniklých dělením lidského vlasu o průměru 60 μm [11].

Zkoumáním nanomateriálů a jejich vlastností se zabývá nanověda. Nanotechnologie se následně zabývají praktickým využitím vlastností nanomateriálů při tvorbě nových materiálů, konstrukci nových struktur a zařízení. Využití nanotechnologií je rozsáhlé a uplatňuje se od stavebnictví, textilního průmyslu přes ukládání a přenos informací, nanobiotechnologie a nanomedicínu až po využití např. kvantových teček, což jsou ohraničené oblasti polovodiče (v průměru 30 nm, 8 nm na výšku) schopné vázat elektrony, a které se využívají ve speciálních součástkách pracujících s jednotlivými elektrony nebo fotony [8].

Dnes je již zřejmé, že nanočástice mají negativní vliv na zdraví. Zejména ty nanočástice, jejichž velikost je menší než 30 nm, protože jsou schopny přecházet po inhalaci do krevního oběhu. Poté, co jsou nanočástice přeneseny do krevního řečiště, mohou být transportovány do celého těla a do orgánů jako jsou ledviny, mozek a kosti atd., přičemž játra jsou významným místem jejich kumulace [9] [19] [21]. Při dýchání jsou v nose odfiltrovány částice větší než 5 μm , které se nedostanou do plic. Částice menší než 1 - 2 μm se převážně ukládají v plicních alveolách, a z nich 60 - 80 % přechází do krevního oběhu a posléze do tělních orgánů [13]. Kromě velikosti částic hraje důležitou roli při vzniku zdravotních rizik jejich chemické složení a zejména jejich povrchová morfologie. Při translokaci do krevního

řečiště mohou nanočástice vyvolávat alveolární zánětlivé procesy, které mohou být provázeny kardiovaskulárními problémy. Nanočástice, jenž se dostanou do organismu, mohou být v důsledku jejich vysoké povrchové energie, zdrojem volných radikálů vytvářejících oxidační stres, při kterém dochází k akumulaci ROS nebo ke snížení hladiny antioxidantů v lidském těle. Některým nanočásticím, pokud jsou dostatečně malé, se podaří proniknout i do buněk, kde mohou působit neurotoxicky, nebo mohou vyvolávat i změnu složení genů v průběhu přepisu DNA. Nejčastější mechanismy toxicity nanočástic jsou genotoxicita, indukce oxidačního stresu a buněčná toxicita/tvorba zánětu [15].

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Laboratorní myš (*Mus musculus* var. *Alba*)

Laboratorní myš patří k nejčastěji používaným zvířatům určených pro pokusné účely. Bílá myš je speciálně chována k laboratorním účelům a jedná se o albinotickou formu myši domácí, která špatně snáší zajetí. Myš domácí (*Mus musculus*) patří do čeledi myšovitých (*Muridae*), řádu hlodavců (*Rodentia*) a třídy savců (*Mammalia*) [4]. Jako první myš domácí chovali Číňané a Japonci, kteří z ní získali postupně stálý typ bílé myši. Oproti jiným laboratorním zvířatům je celkem plachá. V průběhu dne střídavě spí, nebo zase rychle běhá a šplhá po stěnách klece [3].



Obr. 2: Laboratorní myš.

Bílá myš, na obr. 2, má válcovité tělo, které je vpředu zúžené. Jednotlivé části těla, což je hlava, krk, trup, ocas, přední a zadní končetiny jsou od sebe velmi dobře rozlišeny. Na přední končetině rozlišujeme rameno, předloktí, zápěstí, zápěstí a prsty. Zadní noha je rozdělena na stehno, bérce, zánártí, nárt a prsty. Přední nohy mají čtyři prsty, protože první prst (vnitřní) je redukován. Na zadní nožce je pět prstů. Končetiny jsou krátké s ostrými drápkami. Lehkou hlavu, vybíhající ve špičatý čenich, nese krátký a pohyblivý krk. Nevýrazný zevní nos tvoří s dolními čelistmi zhruba tvar protáhlého komolého kužele. Bezchlupý

chrupavčitý čenich ukončuje mezinozdrovou přepážku, hřbet a nosní křídla. Z horního pysku přestupuje na čenich mělká brázdička. Bílá myš má velké oči a úzká víčka. Ve vnitřním koutku oka je uložený malý val, jenž je pozůstatek z rudimentálního třetího víčka. Po stranách hlavy jsou nápadné velké a téměř lysé ušní boltce. Blízká oblast kolem nosu je vybavena hmatovými (sinusovými) chlupy, které jsou velmi důležité pro orientaci v prostoru. Aby horní pysk nepřekážel a nedošlo k jeho poranění při hryzáni je horní pysk rozpolcený [2].

V každé čelisti se nacházejí dva dlátkovité řezáky zvané hlodáky. Špičáky nejsou vyvinuté, proto je mezi hlodáky a stoličkami s kořeny, velká mezera.

Tělo je pokryto bílou srstí, jež má na hřbetě výrazně vyvinuté elastické podkoží, takže se dá snadno vytáhnout v kožní řasu. Uši, cévnatka, duhovka, kůže a konec nožek mají růžovou barvu, protože jim chybí pigment. Dlouhý válcovitý ocas dosahuje délky až 9 cm a je kryt jemnou holou kůží. Kůže ocasu nese šupinovité prstence a skrz ni se rýsují ocasní žíly. Pod kořenem ocasu se nachází řitní otvor a pod řitním otvorem je otvor urogenitální. Úzká hrázka (perineum) odděluje od sebe řitní a urogenitální otvor. Po stranách řitního a urogenitálního otvoru ústí anální aromatické (pachové) žlázy, jež mají význam při vyhledávání partnera v době rozmnožování. Dospělí samci mají varlata uložena v šourku na bocích penisu. Samice mají na břicho pět párů mléčných bradavek uložených laterálně od střední linie [2].

Jako živočišný model v experimentech se většinou využívají inbrední nebo outbrední kmeny myší. Inbrední zvířata jsou získána křížením navzájem příbuzných rodičů, většinou bratrů a sester, po více než 20 generací. Tyto kmeny myší: BALB/c, C3H, FVB, DBA/1 atd. se používají v experimentech, ve kterých se sleduje vliv genetického pozadí zvířete a převážně k cílené modifikaci genomu v podmínkách živého organismu a zpětnému sledování dopadů této změny. Do geneticky nedefinované linie patří outbrední linie myší. Tyto linie jsou geneticky heterogenní a nemají zvýšený podíl homozygotů, tak jako je tomu u inbredních kmenů. Outbrední linie nejsou cíleně připravovány příbuzenskou plemenitbou, čímž jsou také levnější. Jejich charakteristickými fenotypovými vlastnostmi je dosažení větší tělesné hmotnosti, vyšší plodnosti a časného odstavení mláďat. Tyto linie ICR (CD-1), NMRI, MF1 se nejvíce využívají v předběžných experimentech před nasazením inbredních linií a v experimentech, kde velikost a plodnost zvířete je důležitější než definovaný genotyp [5].

2.2. Histologická stavba orgánů

Základními stavebními jednotkami orgánů těla jsou tkáně. Tkáň je definována jako soubor morfologicky podobných buněk a jejich derivátů se shodnou nebo velmi podobnou funkční specializací. Všechny tkáně se vyvíjejí ze zárodečných listů a z mezenchymu procesem označovaným histogeneze.

Na základě strukturních a funkčních znaků se tkáně rozdělují na čtyři základní typy: tkáň epitelovou, pojivovou, svalovou a nervovou tkáň.

Tkáň epitelová se skládá z těsně na sebe naléhajících buněk a z nepatrného množství mezibuněčné hmoty. Spojení buněk je velmi pevné. Epitely plní mnoho funkcí jako je funkce krycí, resorpční, sekreční a smyslová. Epitely se dělí podle tvaru na epitely trámčité, plošné a retikulární. Dle funkce se epitely rozdělují na krycí, žlázové, resorpční, respirační, smyslové

a svalové. Buňky trámčitého epitelu jsou seřazeny po jedné nebo dvou do buněčných trámců, které mezi sebou často anastomozují. Mezi trámci se nacházejí sinusoidní kapiláry, které stejně jako trámce tvoří složité sítě. Trámčitý epitel se vyskytuje v játrech a některých žlázách s vnitřní sekrecí. Epitely plošné jsou složeny z buněk seskupených do plochy v jedné či více vrstvách. Charakter plošných epitelů mají všechny epitely krycí, resorpční, respirační i smyslové. Mezi pojivovou tkáň patří vazivo, chrupavka a kost. Pojiva se skládají z buněk a mezibuněčné hmoty, která obsahuje vlákna a základní amorfni hmotu. Pojivová tkáň má funkci mechanickou, reguluje vodní a iontové hladiny, chrání proti škodlivým vlivům. Tkáň svalová se skládá ze svalových buněk, které v cytoplazmě obsahují vlákénka označována jako myofibrily. Díky těmto vláknům je svalová tkáň schopna kontraktility. Nervová tkáň se skládá ze dvou druhů buněk. Jsou to neurony neboli gangliové buňky s dlouhými cytoplazmatickými výběžky a z podpůrných buněk označovaných jako neuroglie. Nervové buňky mají dráždivou a vodivostní funkci [6].

2.2.1. Slezina

Slezina (spleen, lien) je opouzdřený lymfatický orgán. Skládá se z několika stavebních složek, kterými je vazivo, krevní cévy a dřeň neboli pulpa.

Na povrchu sleziny vytváří vazivo tuhé pouzdro, složené hlavně z kolagenních vláken s příměsí elastických vláken a výjimečně z hladkých svalových buněk. Pouzdro je kryto jednovrstevným plochým epitelem. Z vazivového pouzdra odstupují po celém obvodu do středu orgánu vazivové pruhy, které mezi sebou anastomozují a vytváří prostorovou trámčinu, uvnitř které je dřeň. Celý orgán se díky přítomnosti elastických vláken ve vazivových pružích může dle potřeby zvětšovat či zmenšovat [1].

Do sleziny přivádí krev arterie lienalis, jež vstupuje do vazivových pruhů a spolu s nimi za stálého větvení pronikají hlouběji do sleziny už jako arteriae trabeculares. Středem lymfatických uzlíků probíhají arteriální větévky označované jako arteriae centrales, které se dále větví na arteriolae penicillatae [1].

Slezinné sinusy jsou kanálky s nepravidelným průsvitem, které jsou široké 80-150 μm . Jejich stěna je tvořena retikulárními buňkami vřetenovitěho tvaru. Buňky k sobě volně přisedají a jejich dlouhé cytoplazmatické výběžky mohou přepažovat lumen sinusu. Bazální lamina je fenestrována a zevně na výstelkové retikulární buňky naléhají retikulární vlákna, která jsou uspořádána cirkulárně. Díky této řídké architektuře se snadno krev navrácí z červené pulpy do cévního systému. Sinusy pak přechází v krátké vény pulpy, kterými krev proudí do vén trabekulárních, jež tvoří v hilu sleziny věnu lienalis [1].

Dřeň neboli pulpa sleziny je tvořena tkání dvojího typu, která se liší uspořádáním i složením. Ve slezině tedy rozeznáváme pulpu bílou a ji obklopující pulpu červenou. Bílá pulpa je typickou lymfatickou tkání. Její stroma tvoří retikulární vazivo, v němž jsou vloženy T- a B- lymfocyty, jejich aktivované formy, makrofágy a dendritické buňky. Bílá pulpa jako obal obklopuje větévky arterie lienalis. Tento obal se označuje jako periarteriolární lymfatická pochva (PALS). PALS je oblast thymodependentní, obsahuje T-lymfocyty a místy ztlušťuje v lymfatické uzlíky. Mezi bílou a červenou pulpou se nachází marginální zóna. Marginální zóna spolu s lymfatickými uzlíky tvoří periferní bílou pulpu, ve které se vyskytují převážně

B-lymfocyty. V marginální zóně se dostávají lymfocyty do kontaktu s antigeny a také tu opouštějí krevní cirkulaci a pronikají do pulpy bílé. Aktivované B-lymfocyty pak putují do centra lymfatických uzlíků a mění se v imunoblasty, plazmatické nebo paměťové buňky. Červená pulpa je tvořena z retikulární tkáně, která je uložena v okolí sinusů, a volných buněk. Z volných buněk jsou zastoupeny hlavně erytrocyty, které představují charakteristické zabarvení této složky sleziny, a dále pak lymfocyty, granulocyty a makrofágy. Kromě funkčních červených krvinek se zde nacházejí také poškozené a funkčně méněcenné erytrocyty, které jsou fagocytovány, odbourávány a odstraňovány z krevního řečiště [1].

U bílé myši má slezina červenohnědou barvu, jazykovitý tvar a trojúhelníkovitý průřez. U různých jedinců bývá rozdílně velká. Její váha dosahuje přibližně 0,2 g. Pro dospělou myš se udávají nejmenší rozměry 0,7 x 0,5 x 0,3 cm. Myš má uloženou slezinu šikmo, přibližně ve směru posledního žebra. Přední úsek útrobní plochy (*facies gastrica*) přisedá k velkému zakřivení žaludku, zadní úsek (*facies pancreatica*) přiléhá ke kličkám tenkého střeva a k ocasu pankreatu. Brázda slezinná (*hilus lienalis*) odděluje od sebe obě plošky [2].

2.2.2. Játra

Játra (hepar) jsou největší žlázou těla, která svojí exokrinní i endokrinní funkcí hraje nejdůležitější roli v metabolických procesech organismu.

Povrch jater pokrývá tenká capsula fibrosa hepatis, která je složená z hustého plst'ovitého kolagenního vaziva, které se zhušťuje v oblasti porta hepatis. Z porta hepatis vstupuje málo řídké intersticiální vazivo do jaterního parenchymu a nezřetelně ohraničuje jaterní lalůčky. Místa, kde se setkávají jaterní lalůčky (většinou 3-4) se na histologických řezech vyznačují přibližně trojúhelníkovitým tvarem a nazývají se portobiliární či periportální oblasti. V každé portobiliární oblasti se ve vazivu nachází interlobulární arterie, interlobulární vena a interlobulární žlučovod. Tyto tři složky spolu dohromady představují tzv. trias hepatis [1].

Základní morfologickou jednotkou žlázového parenchymu jater je lobulus venae centralis neboli lalůček centrální vény, útvar podobný šestibokému hranolu. V podélné ose lalůčku probíhá centrální žíla. Každý lalůček se skládá z jaterních buněk neboli hepatocytů, které jsou spojeny do jedno-nebo dvouvrstevnatých, prostorově navzájem anastomozujících, jaterních trámců. Trámce hepatocytů vykazují vzhledem k centrální véně charakteristické radiální uspořádání. Mezi trámci probíhají jaterní sinusoidy. Uvnitř trámců jsou tenké intercelulární žlučovody (žlučové kapiláry) [1].

Jaterní buňky jsou buňky polygonálního tvaru s hojnou cytoplazmou a jedním či více kulatými jádry s nápadnými jádérky. Hepatocyty jsou bohaté na organely, což dokazuje vysokou metabolickou aktivitu [1].

Intercelulární žlučovody jsou tenké kanálky, které probíhají mezi dvěma sousedními hepatocyty. Vypadají jako oválná rozšíření mezibuněčného prostoru. Povrchy jaterních buněk, jež ohraničují žlučovou kapiláru, vybíhají v krátké mikrokly. Na tyto mikrokly je vázána alkalická fosfomonoesteráza a ATP-áza [1].

Funkce hepatocytů jsou velmi rozličné. Kromě tvorby žluči zaujímají klíčovou úlohu v intermediárním metabolismu nejen všech základních živin, tj. bílkovin, lipidů, glycidů, ale i v přeměně steroidů a purinů. Vyznačují se také schopností skladovat vitamíny (D, B₁₂),

ukládat železo ve formě feritinu a produkovat plazmatické bílkoviny pro krevní srážení (fibrinogen, protrombin). Jaterní buňky mají výraznou detoxikační funkci a regenerační schopnost [1].

Jaterní sinusoidy vytváří mohutnou anastomozující síť v lalůčku centrální vény. Stěna jaterních sinusoid je tvořena speciálními endotelovými buňkami nepravidelného tvaru, mezi které, se vkládají Kupfferovy buňky. Kupfferovy buňky mají na rozdíl od endotelových buněk hvězdicovitý tvar, vystupňovanou schopnost fagocytózy a strádání [1].

Laboratorní myši mají vytvořený velký žlučový měchýř, který je uložen mezi pravým a levým středním lalokem (lobus sinister medialis et lobus dexter medialis). Mikroskopický obraz jater je trochu odlišný od jiných savců. Vazivová tkáň mezi hepatocyty je slabě vyvinuta, takže nejsou od sebe téměř ohraničeny. Ve vazivové tkáni se kolem cév nalézají lymfoidní buňky. Protoplasma jaterních buněk má hrudkovitou stavbu. Žlučovody mají nízký epitel, proto připomíná spíše endotel. Teprve až ve žlučovém měchýři se mění v epitel cylindrický. Za normálních podmínek se u dospělé myši tvorba krve v játrech nevyskytuje [2].

2.2.3. Ledviny

Ledvina (lat. ren, řec. nephros) je párový orgán tvořící moč, který odstraňuje z organismu vodu a v ní rozpuštěné rozpadové produkty látkové výměny [1].

Ledvina má červenohnědou barvu a obvyklý fazolovitý tvar s hladkým povrchem. Povrch ledviny kryje tenké a pevné vazivové pouzdro. U dobře živěných jedinců obaluje ledviny také tukové vazivo, které tvoří tzv. tukový polštář. Ledviny mají délku cca 0,9 cm, šířku 0,5 cm a tloušťku 0,4 cm. Levá ledvina se nachází níž než pravá. Dolní pól pravé ledviny dosahuje asi do výše horního pólu levé ledviny. Játra svou renální prohloubeninou přiléhají k horní části pravé ledviny [2].

Tkáň ledviny je uspořádána tak, že již pouhým okem můžeme rozlišit dvě základní složky a těmi jsou kůra a dřev. Dřev je složena z několika ledvinných pyramid, jejichž báze jsou obráceny k povrchu ledviny a jejich vrcholy vyčnívají jako jediná papila ledvinná, která ční do ledvinné pánvičky [1] [2]. Kůra tvoří vrstvu mezi bázemi dřevových pyramid a pouzdrém.

Parenchym ledviny lze rozlišit na dvě rozdílné složky, které se rozlišují jak vývojem, tak stavbou i funkcí. Těmito složkami jsou vlastní žlázočná exkretční složka a na ni navazující vývodní složka. Základní stavební a funkční jednotkou exkretční žlázočné tkáně je nefron. Nefron se skládá z ledvinného tělíska, proximálního a distálního tubulu a Henleovy kličky. Na nefron navazuje sběrací kanálek [1].

V ledvině je poměrně málo vazivové tkáně, pouze v kůře je trochu bohatší. Za normálních podmínek se v epiteliálních buňkách močových kanálků neukládá tuk. Oproti tomu se zde hojně ukládá glykogen, hlavně u mladých zvířat [2].

2.2.4. Plíce

Plíce (lat. pulmo, řec. pneumón) jsou párový orgán, který vyplňuje velkou část dutiny hrudní [1].

Průdušnice se v dutině hrudní větví na dvě hlavní průdušky, z nichž každá vstupuje do příslušné plíce. Pravá průduška je krátká a probíhá nad plicní tepnou. Levá průduška směřuje strmě dolů pod plicní tepnu. Levá plíce má pouze jeden lalok. Pravá plíce je větší a je rozdělena na čtyři laloky. K oběma spodním lalokům (levému laloku a bráničnímu) je od bránice připojeno jemné, blanité ligamentum pulmonale. Zvláštností je pleurální vak pro srdeční lalok, který vznikl zdvojením poplicnice. Průdušinky se dělí ve dvě, někdy tři, průdušinky vrcholové (bronchioli terminales), které pokračují jako průdušinky dechové (bronchioli respiratorii), které jsou ojedinele ukončeny plicními sklípky. Většinou se však na dechové průdušinky připojují další alveolární chodbičky (ductus alveolares), ze kterých vychází alveolární váčky a alveoly. V alveolárních stěnách jsou póry, které spojují sousední alveoly, i přesto že nepatří ke stejné průdušince. Ve sliznici velkých bronchů jsou ojedinele hlenové žlázy a ve sliznici malých bronchů hlenové žlázy nejsou. Ve stěnách žil jsou svazky příčně pruhovaných svalových vláken. Plicní tepny mají silnou svalovou vrstvu. V plicích hlodavců hraje velmi důležitou roli lymfatická tkáň, která je velmi reaktivní na různé podněty. Lymfatická tkáň se vyskytuje buď v podobě kompaktních ohraničených uzlíků kolem cév a průdušek, nebo je rozptýlena ve formě shluků v jemných alveolárních přepážkách. Uzlíky lymfatické tkáně se často vyskytují pod poplicnicí. Četnými mízními cévami jsou obklopeny průdušky i cévy [2].

2.2.5. Mozek

Centrální nervový systém se skládá ze hřbetní míchy, mozkového kmene, mozečku a koncového mozku. Všechny části jsou chráněny vazivovými obaly a kostními strukturami, jimiž jsou páteřní kanál a lebka. Základním stavebním materiálem všech částí centrální nervové soustavy je šedá a bílá hmota, která se odlišuje vzhledem i stavbou [1].

Mozek (cerebrum) je dopředu značně protáhlý a ukončený výraznými čichovými laloky. Týlní laloky vzadu nedosahují k relativně velkému čtverhrbolí. Mozek se skládá z prodloužené míchy, mozečku, středního mozku, mezimozku a předního mozku [2].

Prodloužená mícha (medula oblongata) leží na týlní kosti. Po stranách ji obklopuje malý lalůček nazývaný vločka mozečku (paraflocculus). Mozeček (cerebellum) je rozčleněn do šesti příčně rozbrázděných laloků, které jsou po třech uloženy po stranách středního úseku zvaného pyramida. Na každé straně se zevně připojuje vločka mozečku, která tvoří ventrální mozečkovou obrubu. Pod mozečkem se nachází most (pons cerebri). Střední mozek (mesencephalon) je tvořen ventrálně dvěma mozkovými stonky a dorzálně čtverhrbolím (corpora quadrigemina). Mezimozek (diencephalon) není shora vidět. Jeho boční stěny jsou tvořeny vejčitými útvary (thalamy), jež jsou zakryty polokoulemi předního mozku. Hypothalamus, spodní část mezimozku, je v prostoru mezi křížením zrakových nervů s mozkovými stonky zakryt hypofýzou. Přední mozek (telencephalon) je nejmohutnější část mozku, který je velmi protažený předozadním směrem. Avšak nekryje mozeček. Polokoule

telencephalonu mají hladký povrch bez závitů (lissencephalon). Na přední póly hemisfér se vyvíjejí mohutné čichové laloky. Polokoule se vzadu dotýkají mozečku, takže není vidět střední mozek, jehož zadní část tvoří čtverohrbolí. Na spodní straně mozku jsou viditelné stonky mozkové, které náleží ke střednímu mozku [2].

Centrální nervová soustava se dá poměrně snadno vypreparovat. Mozek i mícha jsou obklopeny poměrně slabými kostmi, které lze snadno přestříhnout [2].

2.3. Generování nanočástic PbO a CdO

Nanočástice oxidu kadmnatého byly generovány v průtokovém reaktoru na základě odpařovacího-oxidačně-kondenzačního postupu. Postup je založen na odpařování kovových pelet p.a. kadmia v keramickém žíhacím kelímku, zavěšeném v keramické trubici ve vertikálně orientované peci (Carbolite TZF 15/50/610). Kadmium se odpařovalo při teplotě 340 °C. Vytvořené kovové výpary byly unášeny ven z pece pomocí proudu inertního dusíku, a zředěny proudem vzduchu, který zoxidoval kadmium na oxid kadmnatý. Obě objemové rychlosti dusíku byly nastaveny na 3 l/min pomocí hmotových regulátorů průtoku (MFS). Takto připravené nanočástice oxidu kadmnatého byly smíchány s proudem vzduchu o průtoku 20 l/min a poté po celou dobu experimentu používány k inhalaci v dávkovacích koncentračních komorách. V koncentrační dávce byl geometrický průměr nanočástic oxidu kadmnatého $14,4 \pm 1,76$ nm. Rozložení nanočástic, s ohledem na jejich velikost, bylo měřeno pomocí přístroje Scanning Mobility Particle Sizer™ spectrometer, model 3936L72 (TSI). Koncentrace nanočástic CdO byla v průběhu pokusu v kleci s nižší koncentrací $1,22 \times 10^6$ částic/cm³ a v kleci s vyšší koncentrací $3,03 \times 10^6$ částic/cm³.

Nahrazením kadmia za olovo a zvýšením teploty pece na 840 °C lze v proudu dusíku (2,5 l/min) obsahujícího maximálně 5 ppb (v/v) kyslíku a následnou oxidaci nanočástic vzduchem (3,0 l/min) dlouhodobě generovat polydisperzní aerosol nanočástic PbO o koncentraci $7,0 \pm 0,5 \times 10^6$ částic/cm³. Tento „primární aerosol“ se pro potřeby inhalačního experimentu dělil do dvou větví v poměru 1 (1 litr/min) : 4,5 (4,5 l/min) a v dalším stupni se ředil 22 l/min čistého vzduchu o konstantní teplotě a vlhkosti. Geometrický průměr nanočástic olova během experimentu byl $17 \pm 7,6$ nm. Naměřená koncentrační stabilita aerosolu nanočástic PbO v průběhu experimentu byla $1,80 \pm 0,2 \times 10^6$ částic/cm³ a $0,40 \pm 0,07 \times 10^6$ částic/cm³.

2.4. Vliv těžkých kovů na organismus

V životním prostředí se v posledních sto letech výrazně zvyšuje koncentrace těžkých kovů. Přestože je jejich negativní vliv na lidské zdraví znám již několik let, stále jsou hojně využívány v průmyslu a zemědělství (fungicidy, insekticidy, fosfátová hnojiva atd.) [16].

Těžké kovy, již ve velmi nízkých koncentracích, hlavně olovo a kadmium mají schopnost akumulovat se v různých orgánech a výrazně ovlivňovat zdraví jedince. Jejich chronická, subakutní nebo akutní toxicita může vést až k neurotoickým, karcinogenním nebo mutagenním efektům [17].

Toxické těžké kovy, mezi které patří i kadmium a olovo, se označují také jako enzymatické jedy. V metaloenzymech nahrazují původní kofaktor a nabourávají tak funkci a strukturu enzymu. Takto mohou zasahovat do mnoha buněčných dějů a mohou tímto mechanismem způsobit vznik nádorového onemocnění. Olovo může nahrazovat vápník v kostech, ve kterých se následně kumuluje a kadmium nahrazuje zinek v některých enzymech [18]. Nejvýznamnější negativní vlivy těžkých kovů na buněčné procesy jsou uvedeny na obrázku 3.

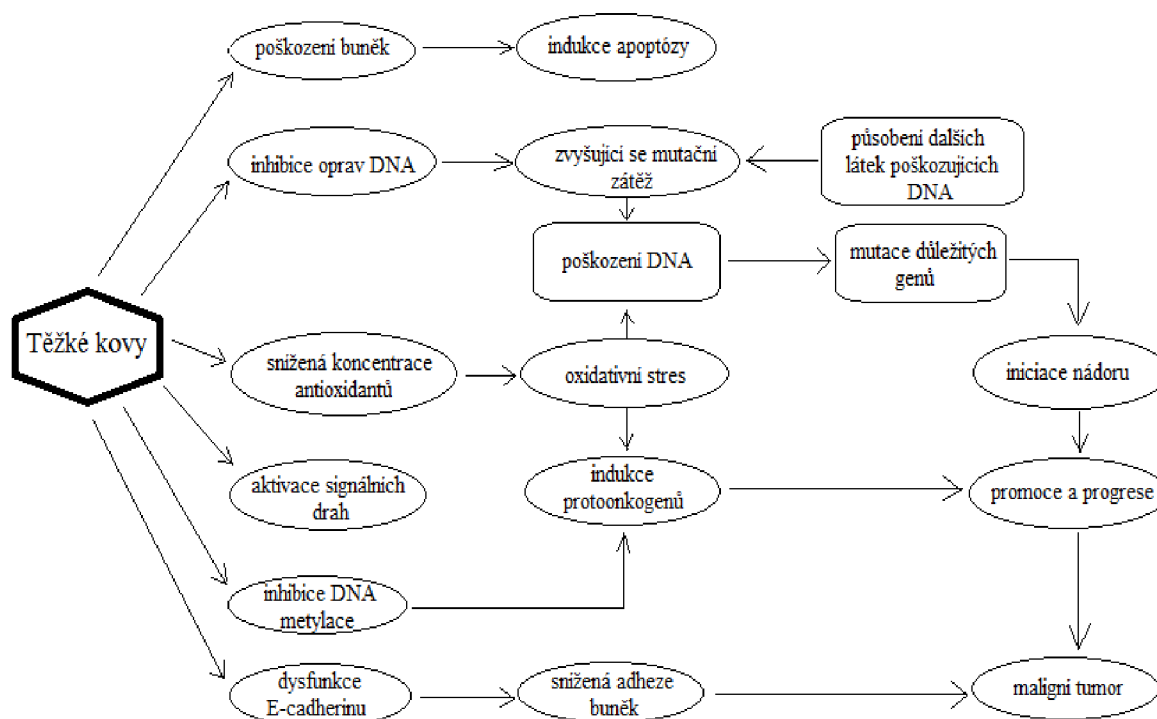
Nervový systém slouží jako cíl pro mnoho cizorodých sloučenin z životního prostředí, mezi které patří těžké kovy olova, kadmia a hořčíku. Tyto kovy stejně jako jejich slitiny a sloučeniny jsou využívány v průmyslových procesech, při kterých se vytváří částice oxidů jejich kovů. Vdechování vzduchu obsahujícího kovový prach nebo kouř z prostředí je hlavní cesta způsobující akutní a chronické nemoci jako je horečka z kovového kouře a chronická obstrukční plicní nemoc. Při vdechování těchto částic je rozhodující jejich velikost. Nanočástice, které vždy nacházíme v kovovém kouři, mají obrovský povrch vzhledem k jejich hmotě a mohou pronikat skrz tkáňové vazby jako je alveolární stěna a hematoencefalická bariéra. Přes tuto bariéru se pravděpodobně dostávají nanočástice přímo do centrální nervové soustavy [10].

Pracovní vystavení kouři s kovy kadmia způsobuje snížení visuomotorických reakcí, tedy koordinaci pohybů očí a končetin, problémy s koncentrováním a pohybovou rovnováhou [9].

Zpracování a recyklace olova spolu s používáním olovnatého benzínu jsou hlavní zdroje znečištění vzduchu. Olovo se nejprve ukládá v kůře mozku a hippokampu. U pracovníků vystavených expozici olova bylo pozorováno ovlivnění senzorického vnímání a rychlosti nervového vzruchu [9].

I přes vzrůstající využívání nanočástic kadmia, existuje nedostatek údajů o účincích inhalace těchto NPs (nanočástic). Navíc, dvě předchozí studie byly zaměřeny jen na krátkodobou expozici po dobu 7 dnů. Přestože inhalační experimenty s CdO již existují, testované nanočástice (20-40 μm) byly sférické, což není pravděpodobně jejich reálný tvar [23]. Navíc, exponovaná zvířata (potkani) byla opakovaně vystavena CdO pouze 6 hodin denně. Tato krátkodobá expozice vedla ke zvýšení obsahu kadmia v játrech a ledvinách, a k rozvoji multifokálního alveolárního zánětu v den nula a jeden den po šesti-hodinové inhalaci (550 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Blum ve své studii zjistil, že dokonce krátkodobá inhalace nanočástic CdO může způsobit zánět, poškození buněk a přestavbu tkání a může poškozovat imunitní funkce v plicích. Ve studii bylo jeden den po expozici zjištěno významné zvýšení hladiny celkového proteinu, aktivity laktát-dehydrogenázy, zánětlivých cytokinů (interleukinu-1 β , tumor nekrotizujícího faktoru- α , a interferonu- γ), metaloproteinů způsobujících přestavbu tkáňové matrix a fagocytární aktivity [24].

Kadmium je také jedním ze známých činitelů vyvolávajících oxidační stres působením reaktivních forem kyslíku (ROS, Reactive Oxygen Species). Kromě jídla je hlavním zdrojem vystavení se kadmii vdechování (cigaretový kouř, pracoviště). Okolo 50 % inhalované dávky kadmia je absorbováno v plicích a může vyvolat plicní emfyzém a chronickou obstrukční plicní nemoc [24].



Obr. 3: Vliv těžkých kovů na buněčné procesy [10].

2.4.1. Příjem, transport a mechanismus působení těžkých kovů na organismus

Expozicí je nazývána situace, která je charakterizována objektivními parametry, při které je člověk vystaven působení biologickému agens, fyzikálnímu faktoru nebo chemické látky.

V případě expozice aerosolům nebo chemickým látkám dochází k interakci organismu se škodlivinou, jakmile se částice či látka po proniknutí do těla dostane do krevního řečiště. Škodlivé látky vstupují do organismu dýchacím ústrojím (inhalační expozice), trávicím ústrojím (perorální expozice), kůží a sliznicemi (dermální expozice) nebo přímo do krevního oběhu poškozenou tkání nebo vpichem (intravenózní expozice).

Hlavními způsoby vstřebání těžkých kovů do těla jsou absorpce kůží, inhalace a ingesce. Jestliže není vdechnutá látka rozpustná v mukózních hlenách přechází do alveol a difúzí nebo aktivním transportem se dostává do krve. Při ingesci závisí toxicita na formě kovu, jeho pH, biotransformaci střevními organismy, rychlosti průchodu trávicím ústrojím a množstvím komplexotvorných organických látek a proteinů (metalothioneiny). Metalothioneiny jsou kov-vázající peptidy, které pomáhají při detoxikaci organismu. Při vstřebání se uplatňuje pasivní transport – difúze a také aktivní transport – vazba na specifické bílkoviny. Za účasti krevních bílkovin probíhá transport krví. Hlavními centry detoxikace těžkých kovů jsou játra a ledviny. Ke kumulaci kovů dochází, ale i v mozku a kostech. Několik studií již prokázalo, že kadmium a olovo vázané na metalothioneiny jsou pro organismus méně toxické, než stejné kovy ve volném stavu [19] [20] [21].

Při perorální a dermální expozici narůstá koncentrace dané látky v krvi pomalu, ale při dlouhodobější expozici se naopak jejich koncentrace v krvi snižuje pomaleji. U inhalační a intravenózní expozice je tomu právě naopak. Nejsnadněji a nejčastěji vstupují nanočástice

do těla trávicím ústrojím a plícemi [7]. Některé ultra jemné částice mohou projít přes epitel a proniknout až do intersticiálních tkání. Tento průnik částic je výraznější v případě vyšších savců (např. psi a opice), než v případě hlodavců [8]. Projdou-li částice přes epitel, část z nich je schopna proniknout i do lymfatických uzlin prostřednictvím mezibuněčného transportu.

Jsou známy další dva mechanismy pronikání v případě ultra jemných částic. Ultra jemné částice mohou pronikat do mimoplicních orgánů přes krevní oběh a určité částice mohou být transportovány přes axony senzitivních nervů do centrální nervové soustavy. Výše uvedené dva mechanismy by mohly hrát významnou roli při rozvoji některých onemocnění srdce a centrální nervové soustavy. Katz a kol., již v roce 1984 popsal neurální přenos částic o velikosti 20 nm až 200 nm z nosu do mozku. Inhalace radioaktivních uhlíkových částic o velikosti 35 nm vedla k akumulaci těchto částic v olfaktorickém bulbu krys sedm dní po expozici. Bylo také prokázáno, že u krys vystavených nanočásticím nebo svařovacím dýmům obsahujícím mangan, dochází k přenosu částic přes hematoencefalickou bariéru přímo z nosu do mozku prostřednictvím olfaktorických nervů. Již byly provedeny další studie zaměřené na přenos rozpustných kovů s obdobnými výsledky [8] [22].

Dýchací systém představuje pro různé nanomateriály nejsnadnější a nejpravděpodobnější cestu vstupu do organismu. Vdechování částic probíhá stejným způsobem jako při vystavení se působení par či plynů. Plíce absorbují nanočástice velmi rychle, protože jsou svojí stavbou uzpůsobeny k efektivní výměně plynů mezi vdechovaným vzduchem a krví. Celkové vystavení částicím z ovzduší závisí na velikosti vdechovaných částic, na jejich koncentraci, dechové frekvenci exponovaného jedince a na způsobu dýchání (ústy nebo nosem). V jaké části dýchacího ústrojí se částice usazují, závisí i na vlastnostech inhalovaných částic [25].

3. CÍLE PRÁCE

Experiment s inhalací PbO:

- Vyhodnotit zda dlouhodobá inhalace vzduchu s nanočásticemi oxidu olovnatého ovlivní hmotnost vybraných orgánů (slezina, játra, ledvina, plíce, mozek).
- Stanovit jak inhalace nanočástic oxidu olovnatého souvisí se změnou hmotnosti daného orgánu (přírůstek nebo úbytek hmotnosti).
- Porovnat rozdíly v hmotnostech daných orgánů po inhalaci vzduchu s nižší nebo vyšší koncentrací oxidu olovnatého.

Experiment s inhalací CdO:

- Vyhodnotit zda dlouhodobá inhalace vzduchu s nanočásticemi oxidu kadmennatého ovlivní hmotnost vybraných orgánů (slezina, játra, ledvina, plíce, mozek).
- Zhodnotit jak inhalace nanočástic oxidu kadmennatého ovlivnila hmotnost sledovaného orgánu.
- Posoudit rozdíl změny hmotnosti orgánu po inhalaci vzduchu s nižší nebo vyšší koncentrací oxidu olovnatého.

Dopady experimentu s nanočásticemi PbO a CdO vyhodnotit s ohledem na změny hmotností vybraných orgánů myši ICR (CD-1) mus musculus var. alba, navzájem porovnat a zjistit zda je statistický rozdíl ve změnách hmotností stanovovaných orgánů při dýchání nanočástic oxidu olovnatého a kadmennatého. Pokud rozdíl v inhalaci těchto kovů je, tak vyhodnotit, který z těchto dvou kovů způsobuje větší změnu v hmotnosti sledovaných orgánů.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V našem experimentu byla použita outbrední linie myši ICR (CD-1). Myši samice byly dovezeny z Masarykovy univerzity (Brno, Česká republika). Zvířata byla ponechána k aklimatizaci na laboratorní podmínky nejméně 1 týden před experimenty. Komerční krmivo, ve formě granulí schválené Ministerstvem zemědělství, a voda byla poskytována dle libosti. Experimenty byly provedeny v souladu s etickým souhlasem Ústavu živočišné fyziologie a genetiky (no. 081/2010).

V práci jsou použity hmotnosti vybraných orgánů ze dvou experimentů. První experiment na inhalaci oxidu olovnatého v době od 12. 8. do 11. 11. 2014 a druhý experiment s inhalací oxidu olovnatého v době od 13. 12. 2014 do 10. 3. 2015. V každém experimentu bylo na začátku projektu chováno 120 myších samic s průměrnou hmotností do 24 g. Myši samice byly po týdenní aklimatizaci vystaveny nanočásticím oxidu olovnatého v jednom experimentu a oxidu kadmnatého v druhém experimentu, na 24 hodin denně, 7 dní v týdnu, po dobu 13 -ti týdnů. Z celkového počtu myši bylo náhodně 40 samic umístěno do kontrolní klece, 40 myši bylo umístěno do klece 1, s nižší koncentrací nanočástic a 40 myši do klece 2, s vyšší koncentrací nanočástic. Kontrolní skupina myši inhalovala vzduch o stejném složení jako myši v kleci 1 a 2, ale bez nanočástic.



Obr. 4: Inhalační komora, která obsahuje čtyři nerezové inhalační klece.

Inhalační komora byla vyrobena ze skla a nerezové oceli a obsahovala čtyři nerezové inhalační klece, viz obr. 4. Pomocí klimatizace, byly udržovány stálé parametry vzduchu, který proudil přes inhalační klece (tj. teplota, relativní vlhkost a tlak). Aktuální hladiny parametrů vzduchu byly měřeny a zaznamenávány v jedno-minutových intervalech. Doba

osvětlení byla nastavena na 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Chování a zdravotní stav myší byl průběžně monitorován pomocí kamerového systému po celou dobu experimentu. Distribuce nanočástic s ohledem na velikost a počet částic na jednotku objemu byly měřeny přímo pomocí Scanning Mobility Particle Sizeru 3936L72, TSI (DMA 3080L, CPC model 3772 a nanoDMA 3085, CPC model 3775).

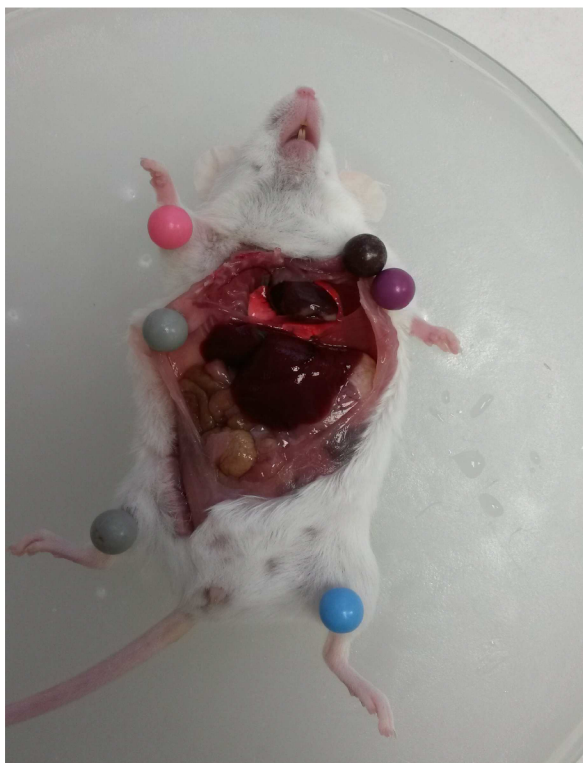
Koncentrace nanočástic oxidu olovnatého v inhalovaném vzduchu během pokusu byla v kleci 1 (Pb1) cca $4 \cdot 10^5$ částic v cm^3 a v kleci 2 (Pb2) cca $2 \cdot 10^6$ částic v cm^3 .

Koncentrace nanočástic oxidu kademnatého v inhalovaném vzduchu byla v kleci 1 (Cd1) $1,22 \cdot 10^6$ částic v cm^3 a v kleci 2 (Cd2) $3,03 \cdot 10^6$ částic v cm^3 .

4.1. Odběr, zpracování orgánů a příprava vzorků

V každém inhalačním pokusu byly vybrány orgány (slezina, játra, ledvina, plíce, mozek) odebírány vždy od pěti myší z kontrolní skupiny, od pěti myší z klece s nižší koncentrací nanočástic a od pěti myší z klece s vyšší koncentrací nanočástic. Tedy při každém odběru, bylo usmrceno 15 myší a od každé myši byly odebrány vybrané orgány (slezina, játra, ledvina, plíce, mozek). Tyto odběry byly prováděny po jednom týdnu trvání inhalace nanočástic, poté po druhém týdnu inhalace, následně po třetím, pátém, sedmém, devátém, jedenáctém a třináctém týdnu inhalace nanočástic oxidu olovnatého v jednom pokusu a oxidu kademnatého v druhém pokusu.

Na konci expozice daného týdne byly myši usmrceny cervikální dislokací po krátké anestezii chloroformem v souladu s projektem pokusů č. 214/2011 dle vyhlášky č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat. Na obrázku 5 je vyfocena usmrcená myš s odkrytou břišní a hrudní dutinou, kde můžeme dobře vidět velká červenohnědá játra, nad nimi jsou světlé plíce, na kterých leží červenohnědé srdce. Pod játry můžeme pozorovat část tenkého a tlustého střeva.



Obr. 5: Usmrcená myš s orgány.

Sledované orgány byly vyjmuty z těla myši a zváženy na analytických vahách Sartorius analytic, viz obr. 6, s přesností na čtyři desetinná místa. Tyto analytické váhy jsou nejpřesnější používané váhy, vážící s přesností na 0,0001 g a váživostí do 200 g. Jsou určeny pro přesnou chemickou práci. Váhy byly umístěny na stabilním laboratorním stole, chráněny před prouděním vzduchu a přímým slunečním světlem, aby nedocházelo k přenosu tepla. Vybrané orgány byly z myši odebírány s velkou opatrností, aby se zabránilo vnější kontaminaci, která by zkreslovala výsledky. Pracovalo se tak, aby chirurgické nástroje přišly co nejméně do kontaktu s odebíraným orgánem. Orgán byl opatrně opláchnut destilovanou vodou, osušen filtračním papírem a položen na vytvárované analytické váhy s malou skleněnou miskou, aby opět nedošlo ke kontaminaci od kovových nástrojů a misek.



Obr. 6: Analytické váhy Sartorius analytic.

Pro práci s laboratorními zvířaty jsem byla řádně proškolená a absolvovala jsem Kurz odborné přípravy k získání osvědčení odborné způsobilosti podle § 17 odst. 3 zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů, na Veterinární a farmaceutické univerzitě v Brně. Všechny pokusné myši byly usmrceny standardizovaným postupem Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

Zjištěné hmotnosti vybraných orgánů ze dvou různých pokusů byly získány v průběhu srpna až listopadu 2014 po inhalaci oxidu olovnatého a v průběhu prosince 2014 až března 2015 po inhalaci oxidu kademnatého.

Cílem práce bylo zjistit, zda doba inhalace nanočástic oxidu olovnatého a oxidu kademnatého souvisí se vzrůstající hmotností námi vybraných orgánů, jedná se tedy o slezinu, játra, ledvinu, plíce a mozek. Dalším cílem bylo zjistit, zda je rozdíl v nárůstu hmotnosti orgánů při inhalaci vyšší či nižší koncentraci daného kovu. Pokud inhalace nanočástic souvisí s nárůstem hmotnosti daného orgánu, tak jak a jestli je rozdíl v nárůstu hmotnosti orgánu mezi inhalací oxidu kademnatého a oxidu olovnatého. Pokud souvislost je, tak jestli hmotnost orgánu roste více u inhalace PbO nebo u inhalace CdO.

Každý vzorek byl změřen jednou a pro kontrolu sloužilo porovnání stejného orgánu od ostatních myší při odběru a posouzení hmotnosti orgánu k celkové stavbě usmrcené myši. Získali jsme tak pro každý orgán pět hodnot od pěti různých myší při každém odběru. Odběrů bylo celkem osm, stejně pro PbO i CdO, první týden, druhý týden, třetí týden, pátý týden, sedmý týden, devátý týden, jedenáctý týden a poslední odběr byl třináctý týden inhalace. Dohromady, pro oba experimenty, bylo získáno 400 hodnot hmotností pro pět sledovaných orgánů. Pro slezinu 80 hodnot, 80 hodnot pro játra, 80 hodnot pro levou ledvinu, 80 hodnot pro plíce a 80 hodnot pro mozek. Tedy 40 hodnot hmotností pro každý sledovaný orgán u oxidu olovnatého a 40 hodnot hmotností pro každý sledovaný orgán u oxidu kademnatého.

Oba experimenty byly hodnoceny zvlášť a nakonec byly porovnány navzájem. Pro každý experiment byla zvlášť hodnocena slezina, zvlášť hodnoceny játra, zvlášť hodnocena ledvina, zvlášť hodnoceny plíce i mozek. Tyto orgány byly hodnoceny následovně: kontrolní skupina se skupinou, která inhalovala nižší koncentraci nanočástic daného kovu (pro první experiment kontrola a Pb1; pro druhý experiment kontrola a Cd1); kontrolní skupina se skupinou, která inhalovala vyšší koncentraci nanočástic daného kovu (pro první experiment kontrola a Pb2; pro druhý experiment kontrola a Cd2); skupina, která inhalovala nižší koncentraci daného kovu se skupinou, která inhalovala vyšší koncentraci daného kovu (pro první experiment Pb1 s Pb2; pro druhý experiment Cd1 s Cd2); skupina, která inhalovala nižší koncentraci oxidu kademnatého se skupinou, která inhalovala nižší koncentraci oxidu olovnatého (Pb1 s prvního experimentu s Cd1 s druhého experimentu); skupina, která inhalovala vyšší koncentraci oxidu kademnatého se skupinou, která inhalovala vyšší koncentraci oxidu olovnatého (Pb2 s prvního experimentu s Cd2 s druhého experimentu).

Pro hodnocení daného orgánu v každém experimentu byl nejprve zvolen dvouvýběrový t-test s rovností rozptylů, protože se předpokládalo, že výsledky měření se v jedné skupině (kontrolní) budou výrazně lišit od výsledků měření ve druhé skupině (exponované). Tento test byl také zvolen proto, že na začátku každého experimentu byly použity myši stejné outbrední linie, stejného pohlaví, staří i hmotnosti, které se náhodně rozdělily do kontrolní skupiny, do skupiny, jež inhalovala vzduch s nižší koncentrací nanočástic a do skupiny myší, které inhalovaly vzduch s vyšší koncentrací nanočástic. Dvouvýběrovým t-testem s rovností rozptylů jsme porovnávali dvě skupiny myší a chtěli jsme dokázat, že jedna skupina myší

má hmotnost orgánů v průměru vyšší než druhá skupina myší. V tomto testu nás zajímala p-hodnota, která popisuje statistickou významnost a pokud je menší než 5 %, tak se hmotnosti daného orgánu statisticky významně lišily. Dále nás v testu zajímaly průměrné hodnoty daného orgánu u testované skupiny. V tomto dvouvýběrovém t-testu s rovností rozptylů jsme porovnávali první a poslední týden inhalace nanočástic, abychom zjistili, zda nějaká závislost existuje, protože jsme předpokládali, že největší rozdíl v hmotnostech orgánů by měl být právě mezi prvním a posledním odběrem.

Pokud jsme dvouvýběrovým t-testem s rovností rozptylů závislost, mezi kontrolní skupinou a skupinou, která inhalovala určitou koncentraci nanočástic, našli, tak jsme dané hodnoty podrobili regresi, abychom tuto závislost ukázali v závislosti na délce inhalace daného kovu.

Úplně nakonec jsme porovnali navzájem oba experimenty dvouvýběrovým párovým t-testem na střední hodnotu, u těch orgánů, kde byl nárůst hmotností orgánů s přibývajícím dobou inhalace statisticky významný. Tento test jsme zvolili, abychom zjistili, zda nárůst hmotností daného orgánu více ovlivňuje inhalace oxidu olovnatého nebo oxidu kademnatého. V testu nás opět zajímala hlavně p-hodnota a průměr hmotností daného orgánu. P-hodnota byla statisticky významná, pokud byla pod 5 %.

5.1. Hodnocení výsledků pro PbO

Na začátku experimentu bylo 120 bílých laboratorních myší rozděleno stejným počtem do tří klecí. Tedy v kontrolní kleci bylo 40 myší, v kleci 1 (Pb1) inhalovalo 40 myší vzduch s nižší koncentrací nanočástic a 40 myší inhalovalo vzduch s vyšší koncentrací nanočástic (Pb2). V průběhu třinácti týdnů bylo provedeno 8 odběrů, kdy při každém odběru bylo usmrceno 5 myší z každé klece, dohromady 15 myší. U každé myši se vážila slezina, játra, levá ledvina, plíce a mozek.

Podle předpokladu nanočástice vstupovaly do laboratorních myší dýcháním. Z plic přecházely do krve, kterou byly transportovány do ostatních orgánů. Předpokládalo se, že by se měla zvýšit hmotnost hlavně jater, jakožto centra detoxikace, pak u plic, ledvin, mozku a nakonec sleziny.

Získané hodnoty hmotností sledovaných orgánů byly podrobeny nejprve dvouvýběrovému t-testu s rovností rozptylů (tabulka č. 1) a u statisticky významného nárůstu průměrné hmotnosti daného orgánu byla provedena regrese, abychom tuto závislost nárůstu hmotnosti ukázali na délce inhalace (graf č. 1 a 2).

V některých grafech regresní přímky jsou vidět velké rozdíly v hmotnostech orgánů (graf č. 1 i 2), tyto rozdíly mohou být způsobeny odběrem orgánu, protože někdy i přes velkou pečlivost odběru, se orgán mohl vážít i s vazivem orgánu, někdy jen přesně daný orgán, ale hlavně tyto rozdíly byly způsobeny celkovou hmotností dané myši hlavně v pokročilém stádiu experimentu. I přesto, že všechny myši měly stejný přístup k potravě i vodě, některé již na první pohled byly větší či menší než ostatní, tento jev je způsoben biologickou variabilitou.

Jedním z cílů práce bylo zjistit, zda zvyšující se hmotnost námi vybraných orgánů lze korelovat s dobou inhalační expozice nanočásticím oxidu olovnatého. Tento předpoklad se nepotvrdil u žádného orgánu, u skupiny myší, která inhalovala nižší koncentraci nanočástic

oxidu olovnatého. Tedy žádná souvislost s nárůstem hmotnosti daného orgánů s dobou inhalace se nepotvrdila. Právě naopak, u všech sledovaných orgánů se průměrná hmotnost snížila, viz tabulka č. 1. To může být způsobeno celkovou metabolickou poruchou, kvůli oxidativnímu stresu způsobenému olovem, a tím přítomnosti volných radikálů. Výše uvedený cíl se potvrdil u skupiny myší, které inhalovali vyšší koncentraci PbO, viz tabulka č. 1, orgány zvýrazněny červenou barvou. Jedná se tedy o ledvinu a plíce. Tyto dva orgány (ledvina, plíce) u vyšší koncentrace nanočástic olova byly podrobeny regresi (graf č. 1 a 2).

Dalším cílem práce bylo zjistit, zda je rozdíl v nárůstu hmotnosti orgánů při inhalaci nižší a vyšší koncentrace nanočástic olova. Pomocí dvouvýběrového t-testu s rovností rozptylů se tento rozdíl potvrdil u sleziny, ledviny a plic (tabulka č. 2), orgány zvýrazněny zeleně. U těchto orgánů se potvrdilo, že při inhalaci vzduchu s vyšší koncentrací nanočástic se výrazně zvýšila i hmotnost orgánů. U sleziny z průměrné hmotnosti 0,1141 g na 0,1277 g, u ledviny z 0,1941 g na 0,2089 g a u plic z 0,2347 g na 0,2771 g. U zbývajících dvou orgánů, jater a plic se jejich průměrná hmotnost u inhalace vyšší koncentrace nanočástic zvýšila také, ale tento nárůst nebyl statisticky významný.

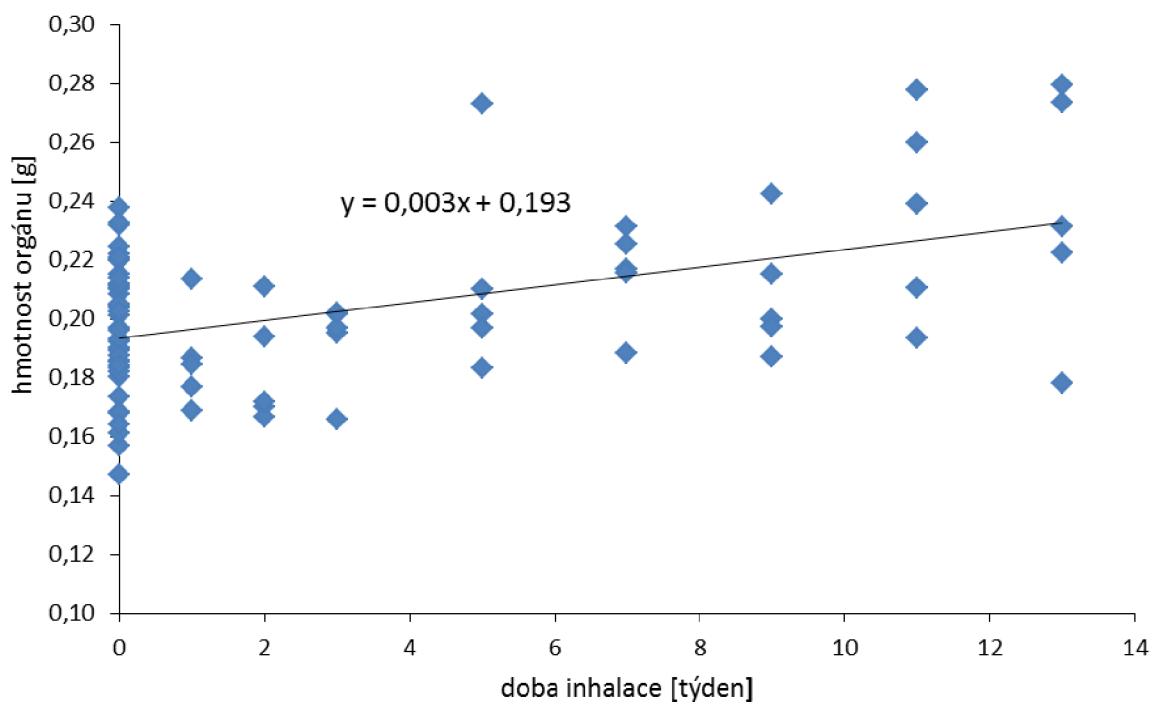
Tabulka č. 1: Výsledné průměrné hmotnosti orgánů u olova.

Dvouvýběrový t-test s rovností rozptylů			průměrná hmotnost [g]			
			kontrola		olovo	
	orgán	p-hodnota	hmotnost	SD	hmotnost	SD
Kontrola + Pb1	slezina	$1,80 \cdot 10^{-1}$	0,1201	0,0325	0,1141	0,0252
	játra	$1,06 \cdot 10^{-1}$	1,5809	0,2117	1,5220	0,2065
	ledvina	$2,42 \cdot 10^{-1}$	0,1973	0,0220	0,1941	0,0189
	plíce	$1,07 \cdot 10^{-1}$	0,2461	0,0512	0,2347	0,0266
	mozek	$4,89 \cdot 10^{-1}$	0,5219	0,0313	0,5221	0,0348
Kontrola + Pb2	slezina	$1,51 \cdot 10^{-1}$	0,1201	0,0325	0,1277	0,0329
	játra	$4,94 \cdot 10^{-1}$	1,5809	0,2117	1,5817	0,2589
	ledvina	$2,99 \cdot 10^{-2}$	0,1973	0,0220	0,2089	0,0313
	plíce	$6,05 \cdot 10^{-4}$	0,2461	0,0512	0,2771	0,0278
	mozek	$1,71 \cdot 10^{-1}$	0,5219	0,0313	0,5282	0,0277

Tabulka č. 2: Porovnání výsledků hmotností orgánů mezi Pb1 a Pb2.

Dvouvýběrový t-test s rovností rozptylů			průměrná hmotnost [g]			
			Pb1		Pb2	
Pb1 + Pb2	orgán	p-hodnota	hmotnost	SD	hmotnost	SD
	slezina	$2,08 \cdot 10^{-2}$	0,1141	0,0252	0,1277	0,0329
	játra	$1,29 \cdot 10^{-1}$	1,522	0,2065	1,5817	0,2589
	ledvina	$6,28 \cdot 10^{-3}$	0,1941	0,0189	0,2089	0,0313
	plíce	$4,51 \cdot 10^{-10}$	0,2347	0,0266	0,2771	0,0278
	mozek	$1,94 \cdot 10^{-1}$	0,5221	0,0348	0,5282	0,0277

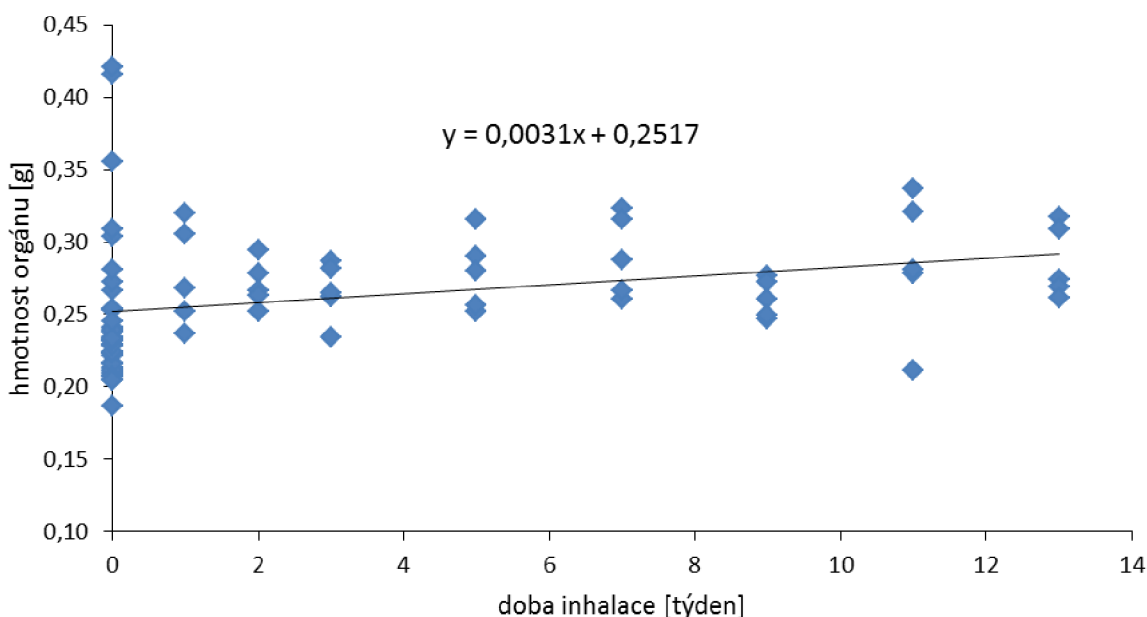
5.1.1. Regrese u vyšší koncentrace nanočástic (Pb2) – ledvina



Graf č. 1: Závislost hmotnosti ledviny na době inhalace v kleci Pb2.

Ledviny jsou druhým detoxikačním centrem, hned po játrech, u kterých se ale souvislost vzrůstající hmotnosti s dobou inhalace neprojevila. Na základě regrese, jsme zjistili, že na začátku experimentu byla hmotnost levé ledviny v průměru 0,193 g a v každém následujícím týdnu se její hmotnost zvýšila v průměru o 0,003 g (graf č. 1).

5.1.2. Regrese u vyšší koncentrace nanočástic (Pb2) - plíce



Graf č. 2: Závislost hmotnosti plic na době inhalace v kleci Pb2.

Plíce absorbují nanočástice velmi rychle, protože jsou svojí stavbou uzpůsobeny k efektivní výměně plynů mezi vdechovaným vzduchem a krví. Předpokládalo se, že při inhalaci se hmotnost plic musí zvýšit a tento předpoklad jsme potvrdili. Zjistili jsme, že na začátku experimentu byla hmotnost plic v průměru 0,252 g a v každém následujícím týdnu se její hmotnost zvýšila v průměru o 0,003 g (graf č. 2).

5.2. Hodnocení výsledků pro CdO

Na začátku experimentu bylo 120 bílých pokusných myší rozděleno do tří klecí. V kontrolní kleci bylo 40 myší, v kleci 1 (Cd1) inhalovalo 40 myší vzduch s nižší koncentrací nanočástic kadmia a 40 myší inhalovalo vzduch s vyšší koncentrací nanočástic kadmia (Cd2). V průběhu 13-ti týdnů bylo provedeno 8 odběrů, kdy při každém odběru bylo usmrceno pět myší z každé klece, dohromady 15 myší. U každé myši se vážila slezina, játra, levá ledvina, plíce a mozek.

Získané hodnoty hmotností sledovaných orgánů byly stejně jako u experimentu s oxidem olovinatým, podrobeny nejprve dvouvýběrovému t-testu s rovností rozptylů (tabulka č. 3) a u statisticky významného nárůstu průměrné hmotnosti daného orgánu byla provedena regrese, abychom tuto závislost nárůstu hmotnosti ukázali na délce inhalace (graf č. 3 až 8).

Ve všech grafech regresní přímky jsou vidět velké rozdíly v hmotnostech orgánů (graf č. 3 až 8), tyto rozdíly mohou být způsobeny nepřesným odběrem orgánu, ale hlavně tyto rozdíly mohou být způsobeny celkovou hmotností dané myši hlavně v pokročilém stádiu experimentu. I přesto, že všechny myši měly stejný přístup k potravě i vodě, některé již na první pohled byly větší či menší než ostatní, tento jev je způsoben biologickou variabilitou.

Jedním z cílů práce bylo zjistit, zda doba inhalace nanočástic oxidu kademnatého souvisí se vzrůstající hmotností námi vybraných orgánů. Tento předpoklad se potvrdil jak u inhalace vzduchu s nižší koncentrací nanočástic oxidu kademnatého, tak i inhalace vzduchu s vyšší koncentrací nanočástic oxidu kademnatého. V případě inhalace vzduchu s nižší koncentrací kovu se potvrdila závislost vzrůstající hmotnosti s dobou inhalace u sleziny, jater, plic i mozku, viz tabulka 3, orgány zvýrazněny červeně. U inhalace vzduchu s vyšší koncentrací CdO se tato závislost potvrdila u sleziny a plic (tabulka č. 3). Výše uvedené orgány, tedy u Cd1: slezina, játra, plíce, mozek a u Cd2: slezina a plíce, byly vyhodnoceny pomocí regrese (graf č. 3 a 4).

Tabulka č. 3: Výsledné průměrné hmotnosti orgánů u kadmia.

Dvouvýběrový t-test s rovností rozptylů			průměrná hmotnost [g]			
			kontrola		kadmium	
Kontrola + Cd1	orgán	p-hodnota	hmotnost	SD	hmotnost	SD
	slezina	$1,30 \cdot 10^{-3}$	0,1174	0,0217	0,1336	0,0247
	játra	$1,76 \cdot 10^{-2}$	1,5615	0,1861	1,6658	0,2451
	ledvina	$3,12 \cdot 10^{-1}$	0,1886	0,0271	0,1915	0,0259
	plíce	$1,54 \cdot 10^{-4}$	0,2189	0,0334	0,2517	0,0435
	mozek	$4,91 \cdot 10^{-3}$	0,5048	0,0336	0,5233	0,0289
Kontrola + Cd2	slezina	$6,80 \cdot 10^{-3}$	0,1174	0,0217	0,1385	0,0480
	játra	$1,94 \cdot 10^{-1}$	1,5615	0,1860	1,5214	0,2244
	ledvina	$2,34 \cdot 10^{-1}$	0,1886	0,0271	0,1844	0,0238
	plíce	$5,93 \cdot 10^{-12}$	0,2189	0,0334	0,3397	0,0902
	mozek	$2,65 \cdot 10^{-1}$	0,5048	0,0336	0,5093	0,0311

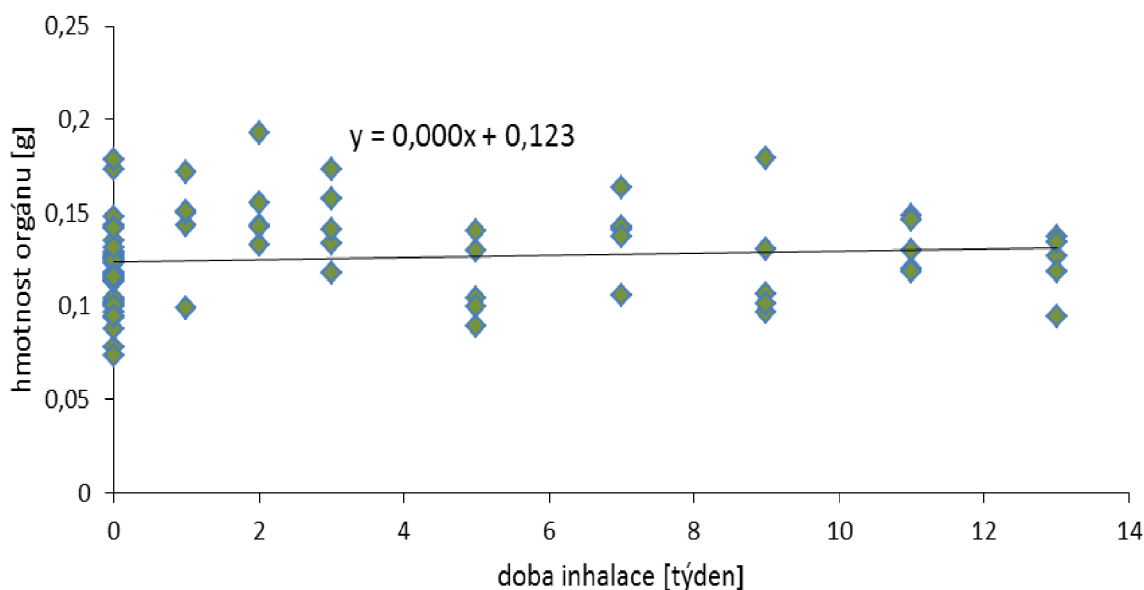
Dalším cílem práce bylo zjistit, zda je rozdíl v nárůstu hmotnosti orgánu při inhalaci nižší a vyšší koncentrace nanočástic kadmia. Pomocí dvouvýběrového t-testu s rovností rozptylů se tento rozdíl potvrdil u jater, plic a mozku (tabulka č. 4), orgány zvýrazněny zeleně. U těchto orgánů bylo zjištěno, že záleží na koncentraci oxidu kademnatého v inhalovaném vzduchu. Z průměrných hodnot, ale vyplynulo, že v kleci 1 měla játra průměrnou hmotnost 1,6658 g a v kleci 2 1,5214 g, z čehož plyne, že při inhalaci vyšší koncentrace kadmia se průměrná hmotnost jater snížila. Může to být způsobeno metabolickými poruchami, při otravě kadmíem. U plic došlo k zvýšení průměrné hmotnosti z 0,2517 g v kleci 1 na 0,3397 g

v kleci 2. Tyto hodnoty hmotnosti plic lze vysvětlit tak, že v plicích mohl v důsledku požití cizorodých nanočástic oxidu kadmického makrofágy, buňkami imunitního systému, vzniknout zánět. Plíce postižené zánětem mají větší hmotnost v důsledku poškození funkční tkáně a nahromadění buněk imunitního systému, které se snaží odstranit cizorodé nanočástice z plic. Při vyšší koncentraci v inhalovaném vzduchu je i vyšší koncentrace těchto nanočástic CdO v plicích [14]. U mozku došlo stejně jako u jater k snížení hmotnosti z 0,5233 g v kleci 1 na 0,5093 g v kleci 2. U ledvin nedošlo k statisticky významnému zvýšení jejich hmotnosti v závislosti na době inhalace, proto usuzujeme, že se nanočástice přetrvávají v těle a nejsou z těla vylučovány. Snížení hmotnosti u jater a sleziny při inhalaci vyšších koncentrací nanočástic tak může být způsobeno toxicitou těchto vyšších dávek kadmia pro organismus.

Tabulka č. 4: Porovnání výsledků hmotností orgánů mezi Cd1 a Cd2.

Dvouvýběrový t-test s rovností rozptylů			průměrná hmotnost [g]			
			Cd1		Cd2	
Cd1 + Cd2	orgán	p-hodnota	hmotnost	SD	hmotnost	SD
	slezina	$2,85 \cdot 10^{-1}$	0,1336	0,0247	0,1385	0,0480
	játra	$3,72 \cdot 10^{-3}$	1,6658	0,2451	1,5214	0,2244
	ledvina	$1,04 \cdot 10^{-1}$	0,1915	0,0259	0,1844	0,0238
	plíce	$1,78 \cdot 10^{-7}$	0,2517	0,0435	0,3397	0,0902
	mozek	$2,04 \cdot 10^{-2}$	0,5233	0,0289	0,5093	0,0311

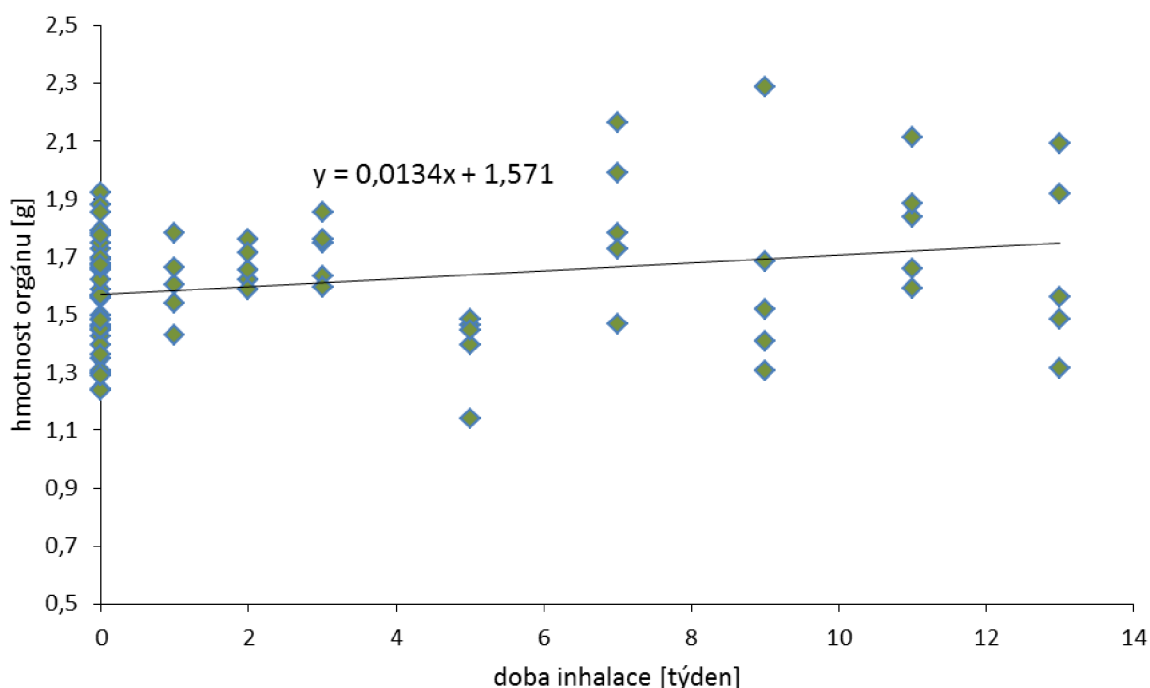
5.2.1. Regrese u nižší koncentrace nanočástic (Cd1) - slezina



Graf č. 3: Závislost hmotnosti sleziny na době inhalace v kleci Cd1.

Slezina slouží jako krevní filtr, tak by se dalo předpokládat, že se její hmotnost v průběhu inhalace zvýší a dvouvýběrový t-test s rovností rozptylů nám to potvrdil. Přímka regrese nám však ukázala, že souvislost mezi nárůstem hmotnosti s dobou inhalace není. Zjistili jsme jen, že hmotnost sleziny na začátku experimentu byla v průměru 0,123 g a následující týdny se její hmotnost nezvyšovala (graf č. 3). Tento rozpor ve výsledku může být způsoben podstatou statistického testování, že vzhledem k nastavení 5% hladiny významnosti se stane, že v pěti procentech případů objevíme závislost někde, kde vůbec není. Dvouvýběrový t-test nám nesprávně vyhodnotil závislost, ale přímka regrese nám tuto závislost vyvrátila.

5.2.2. Regrese u nižší koncentrace nanočástic (Cd1) - játra

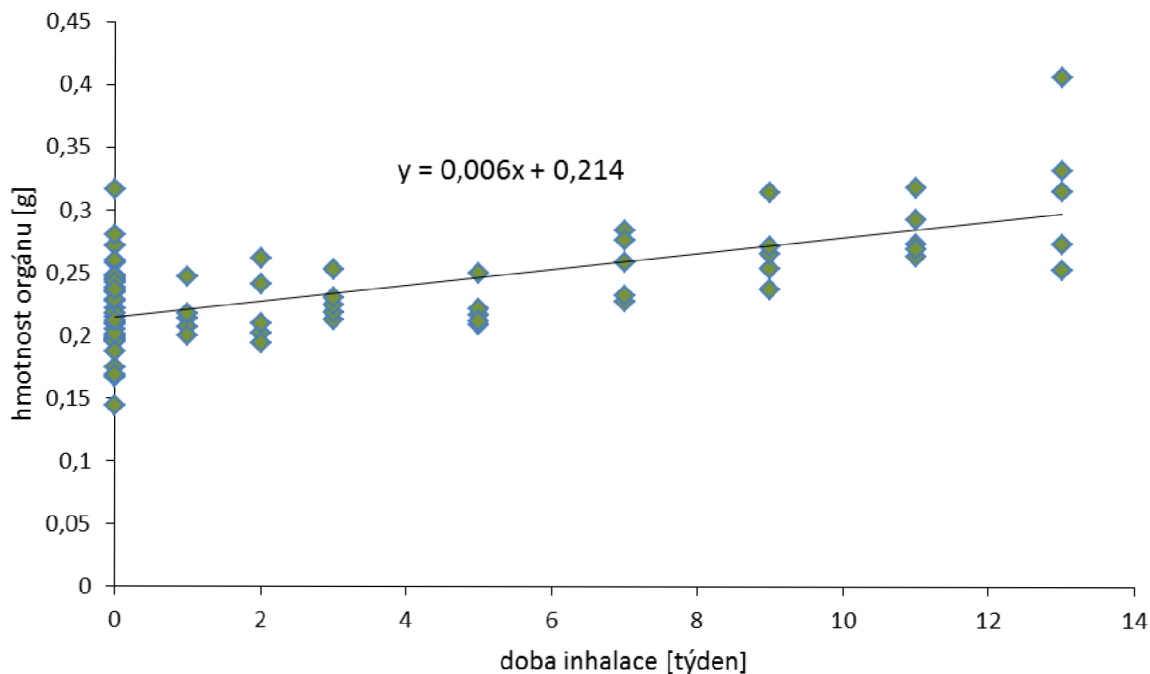


Graf č. 4: Závislost hmotnosti jater na době inhalace v kleci Cd1.

Játra slouží jako hlavní detoxikační centrum, takže se dalo předpokládat, že se jejich hmotnost v průběhu inhalace zvýší, což jsme také potvrdili. Na začátku experimentu byla hmotnost jater v průměru 1,571 g a každý následující týden se s dobou inhalace zvyšovala hmotnost jater v průměru o 0,0134 g (graf č. 4).

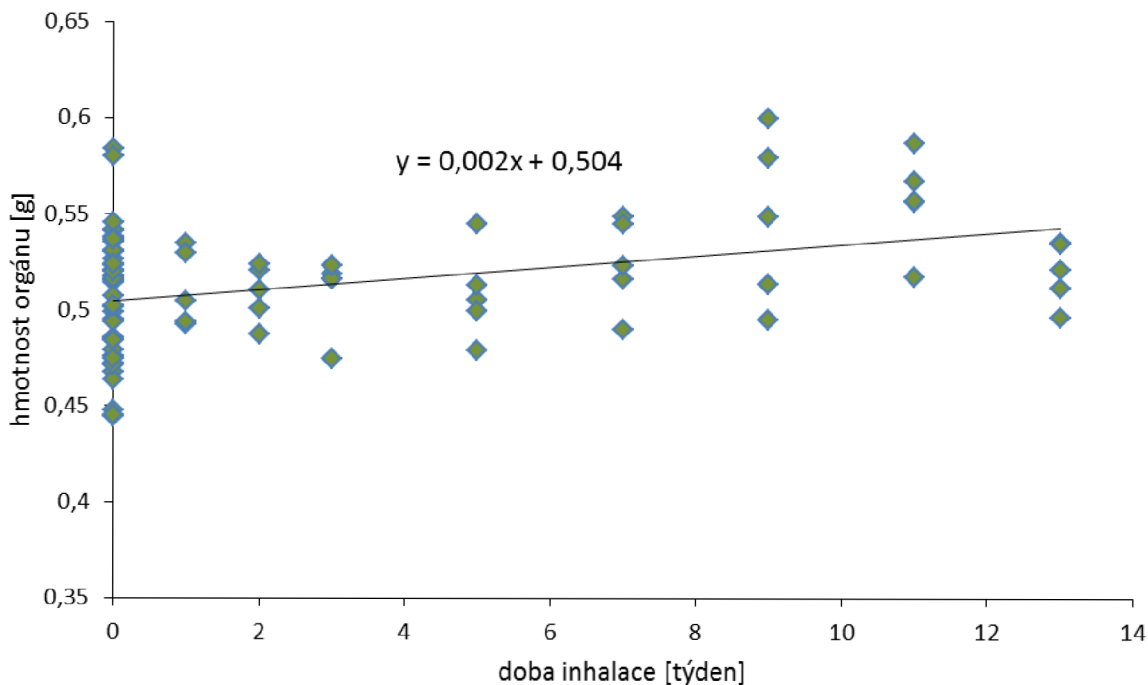
5.2.3. Regrese u nižší koncentrace nanočástic (Cd1) - plíce

Dýchací systém jako první bariéra vstupu nanočástic do organismu potvrdil, že se v něm nanočástice kadmia usazovali, tak jak jsme předpokládali. Plíce měli v průměru na začátku experimentu hmotnost 0,214 g a jejich hmotnost se v každém následujícím týdnu zvýšila o 0,006 g (graf č. 5).



Graf č. 5: Závislost hmotnosti plic na době inhalace v kleci Cd1.

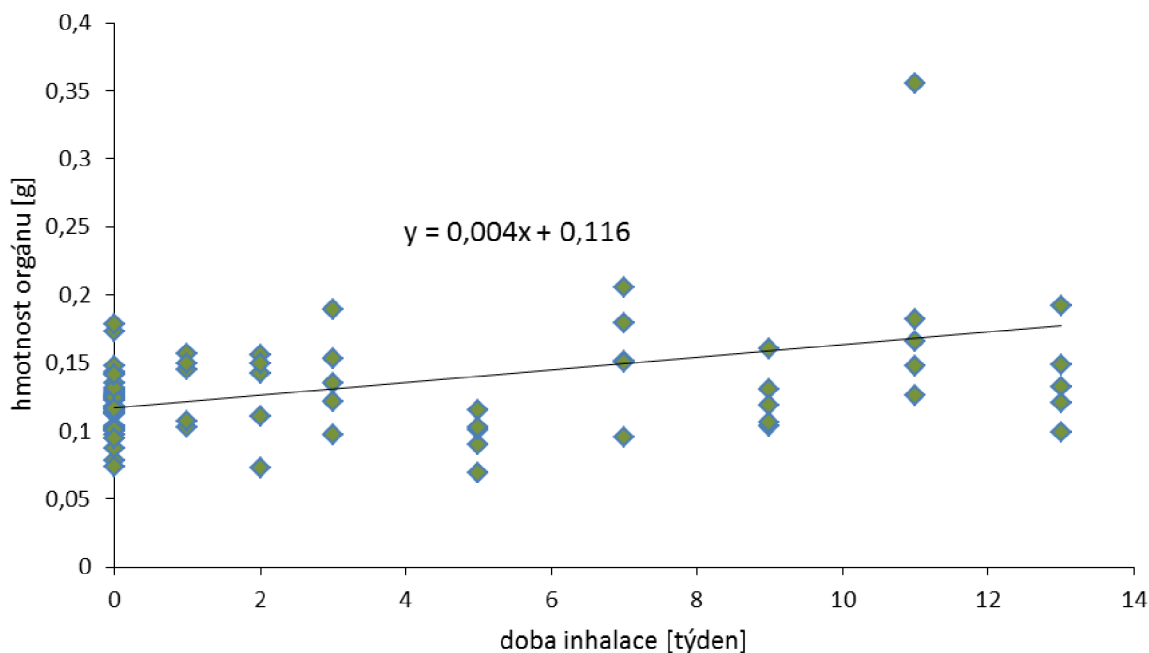
5.2.4. Regrese u nižší koncentrace nanočástic (Cd1) - mozek



Graf č. 6: Závislost hmotnosti mozku na době inhalace v kleci Cd1.

U mozku se předpokládalo, že se jeho hmotnost zvýší také, protože jak ukázali dřívější studie [22] [8], nanočástice se mohou dostat skrz čichové nervy do mozku. Na začátku experimentu byla průměrná hmotnost mozku 0,504 g a každý následující týden se jeho hmotnost zvýšila o 0,002 g.

5.2.5. Regrese u vyšší koncentrace nanočástic (Cd2) - slezina



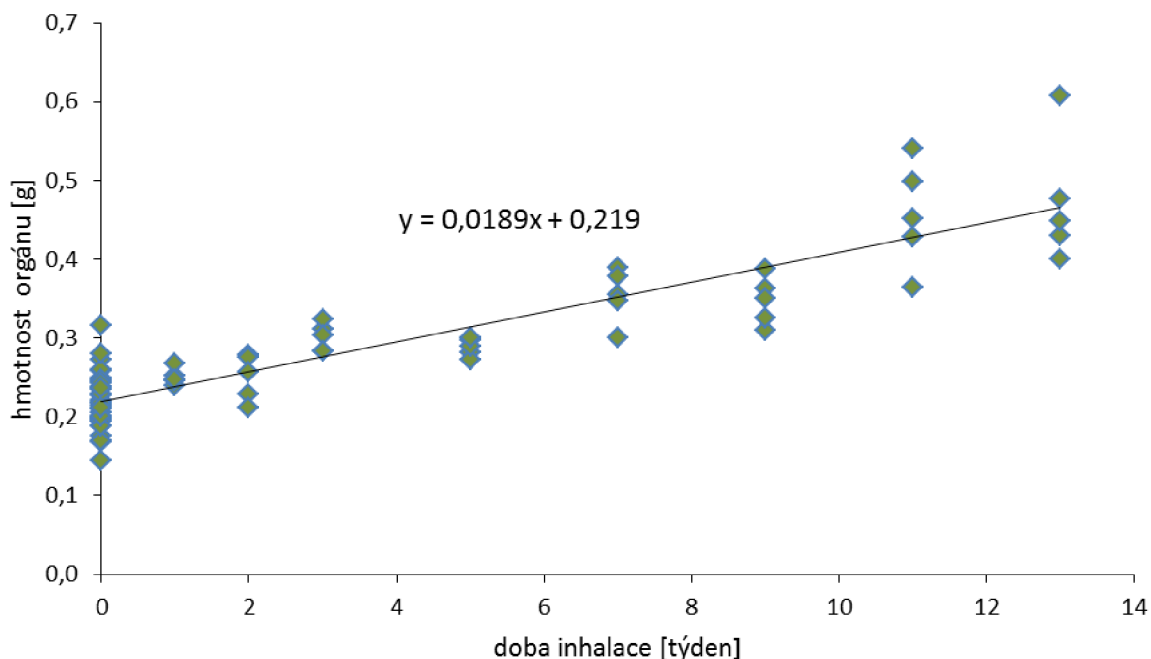
Graf č. 7: Závislost hmotnosti sleziny na době inhalace v kleci Cd2.

Tak jako u inhalace vzduchu s nižší koncentrací nanočástic kadmia, tak i u inhalace vzduchu s vyšší koncentrací CdO se předpokládal nárůst hmotnosti u exponované skupiny oproti skupině kontrolní. U nižší koncentrace se tato závislost nepotvrdila, ale u vyšší koncentrace ano. Na začátku experimentu byla hmotnost sleziny v průměru 0,116 g a v každém následujícím týdnu se její hmotnost zvýšila o 0,004 g (graf č. 7).

V grafu je navíc patrné, že v jedenáctém týdnu se hmotnost jedné sleziny výrazně lišila od ostatních. Tato odlišnost byla způsobena, již na první pohled viditelnou splenomegalií.

5.2.6. Regrese u vyšší koncentrace nanočástic (Cd2) – plíce

Hlavně u plic, jakožto brány vstupu inhalovaných nanočástic, se předpokládal nárůst hmotnosti v průběhu experimentu, který se potvrdil také při inhalaci vzduchu s vyšší koncentrací nanočástic oxidu kademnatého. V průměru na začátku experimentu byla hmotnost plic 0,219 g a v každém následujícím týdnu se jejich hmotnost zvýšila v průměru o 0,0189 g (graf č. 8).



Graf č. 8: Závislost hmotnosti plic na době inhalace v kleci Cd2.

5.3. Porovnání PbO a CdO

Z výsledků získaných jak pro nanočástice oxidu olovnatého tak pro nanočástice oxidu kademnatého plyne, že současně statisticky významná souvislost mezi nárůstem hmotnosti daného orgánu a dobou inhalace, je pouze u vyšších koncentrací obou kovů u plic (tabulka č. 5). U ostatních orgánů současná závislost jak pro olovo, tak i pro kadmium není.

Z testu je patrné, že v průměru byla hmotnost plic vyšší u inhalování vyšších koncentrací kadmia než při inhalování vyšších koncentrací olova. To může být způsobeno tím, že nanočástice kadmia vytvářely aglomeráty, které se usadily v plicích a kvůli své velikosti se nedostaly přes hemato-alveolární bariéru do krevního řečiště. Podle studie Bluma [24], se přibližně polovina inhalované dávky kadmia absorbuje v plicích, kde může vyvolat plicní emfyzém nebo chronickou obstrukční plicní nemoc, kdy je funkční plicní tkáň nahrazována kolagenním vazivem.

Tabulka č. 5: Porovnání PbO a CdO u plic.

Dvouvýběrový párový t-test na střední hodnotu			průměrná hmotnost [g]			
			Pb2		Cd2	
Pb2 + Cd2	orgán	p-hodnota	hmotnost	SD	hmotnost	SD
	plíce	$4,95 \cdot 10^{-5}$	0,2771	0,0278	0,3397	0,0902

6. ZÁVĚR

V této bakalářské práci byl sledován dlouhodobý, 13 -ti týdenní, vliv inhalace vzduchu s nanočásticemi oxidu olovnatého a oxidu kademnatého na hmotnost vybraných orgánů bílé laboratorní myši. Oba experimenty se uskutečnily na Ústavu analytické chemie a Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR v Brně. Pokusné myši byly chovány v akreditovaném zvěřinci a v každém experimentu bylo použito 120 myši. Myši byly rozděleny náhodně do tří skupin: kontrolní, nižší koncentrace daného kovu a vyšší koncentrace daného kovu. V průběhu obou experimentů nebyl zaznamenán rozdíl v chování a celkovém zdravotním stavu pokusných zvířat mezi exponovanými skupinami a kontrolní skupinou. V žádném experimentu nedošlo k úhynu zvířete.

Vybrané orgány (slezina, játra, ledvina, plíce, mozek) byly pečlivě zváženy na analytických vahách s přesností na čtyři desetinná místa. Hodnoty hmotností byly nejprve podrobeny dvouvýběrovému t-testu s rovností rozptylů, kdy se v každém experimentu porovnávala kontrolní skupina s oběma koncentracemi nanočástic, pak obě koncentrace navzájem a nakonec se porovnávaly oba těžké kovy navzájem dvouvýběrovým párovým t-testem na střední hodnotu. Pokud byla souvislost nárůstu hmotnosti orgánu s dobou inhalace statisticky významná, byly tyto orgány podrobeny regresi.

Myším, které inhalovali nanočástice oxidu olovnatého byla zjištěna statisticky významná souvislost mezi nárůstem hmotnosti a dobou inhalace jen u vyšší koncentrace, a to u ledvin a plic. Hmotnost ledvin se v průměru zvýšila z 0,1973 g na 0,2089 g a hmotnost plic z 0,2461 g na 0,2771 g. Statisticky významný nárůst hmotnosti nebyl u sleziny, jater a mozku. U skupiny myší, která inhalovala nižší koncentraci nanočástic olova bylo zjištěno snížení hmotnosti u všech orgánů. Mohlo to být způsobeno celkovou otravou organismu olovem a přítomností volných radikálů. Při porovnání obou koncentrací olova bylo zjištěno, že u sleziny, ledvin a plic je nárůst hmotnosti orgánu větší u skupiny myší, které inhalovaly vyšší koncentraci nanočástic než u skupiny myší, které inhalovaly nižší koncentraci nanočástic. U sleziny se tudíž hmotnost zvýšila v průměru z 0,1141 g na 0,1277 g, u ledvin z 0,1941 g na 0,2089 g a u plic z 0,2347 g na 0,2771 g.

Myši, které inhalovali nanočástice oxidu kademnatého byla zjištěna statisticky významná souvislost mezi nárůstem hmotnosti a dobou inhalace u nižší koncentrace kadmia u sleziny, jater, plic a mozku a u vyšší koncentrace u sleziny a plic. Při inhalaci nižší koncentrace kadmia se zvýšila v průměru hmotnost sleziny z 0,1174 g na 0,1336 g, u jater z 1,5615 g na 1,6658 g, u plic z 0,2189 g na 0,2517 g a mozku z 0,5048 g na 0,5233 g. Při inhalaci vyšší koncentrace kadmia se zvýšila hmotnost sleziny v průměru z 0,1174 g na 0,1385 g. Při porovnání obou koncentrací kadmia bylo zjištěno, že u jater, plic a mozku je nárůst hmotnosti orgánu statisticky významný v souvislosti s inhalací rozdílné koncentrace nanočástic. Hmotnost jater se v průměru snížila při inhalaci vyšší koncentrace z 1,6658 g u nižší koncentrace na 1,5214 g. U plic se hmotnost v průměru zvýšila u inhalace vyšší koncentrace, a to z 0,2517 g na 0,3397 g. Hmotnost mozku se při inhalaci vyšší koncentrace kadmia snížila z 0,5233 g u nižší koncentrace na 0,5093 g.

Pro porovnání obou kovů se mohly použít jen plíce u vyšších koncentrací, protože pouze u nich se projevila statisticky významná souvislost mezi nárůstem hmotnosti orgánu a dobou inhalace. Bylo zjištěno, že nárůst hmotnosti byl vyšší u kadmia. Při inhalaci vyšší koncentrace oxidu kademnatého byla hmotnost plic v průměru 0,3397 g a při inhalaci oxidu olovnatého 0,2771 g. Je však otázkou čím je tato změna hmotnosti způsobena, a proto nelze určit, který kov je pro organismus nebezpečnější. Vyšší hmotnost plic u inhalace vyšší koncentrace CdO než u inhalace vyšší koncentrace PbO může být způsobena tím, že oxid kademnatý více proniká do plicní tkáně, kde způsobuje nahrazování funkční plicní tkáně kolagenním vazivem. U kadmia bylo také zjištěno, že nárůst hmotnosti ledvin není statisticky významný jak u inhalace vzduchu s vyšší koncentrací CdO, tak i u inhalace vzduchu s nižší koncentrací CdO. Tělo takto exponovaných myší se nezbavuje nebezpečných oxidů kadmia, které se musí hromadit v těle. U nanočástic olova, byl zjištěn statisticky významný nárůst hmotnosti ledvin, proto se dá předpokládat, že se organismus exponovaný vzduchu s nanočásticemi PbO, snažil inhalací přijaté olovo vyloučit.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] HORKÝ, Drahomír a Svatopluk ČECH. *Mikroskopická anatomie*. 2. nezm. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 353 s. ISBN 80-210-3775-X.
- [2] LANE-PETTER, William. *Laboratorní zvířata: zásady chovu a ošetřování*. 1. vyd. Praha: Academia, 1969, 678 s.
- [3] NEJEDLÝ, Karel. *Biologie a soustavná anatomie laboratorních zvířat*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1965, 629 s.
- [4] REICHHOLF, Josef. *Savci*. Ilustrace Fritz Wendler. Praha: Knižní klub, 1996, 287 s. Průvodce přírodou (Ikar). ISBN 80-859-4437-5.
- [5] DOLEŽAL, Dalibor. *Práce s laboratorními zvířaty: laboratorní myš, potkan a králík*. 1.vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011. 119 s. ISBN 978-802-4429-472.
- [6] ČECH, Svatopluk a Drahomír HORKÝ. *Přehled obecné histologie*. 1.vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 140 s. ISBN 80-210-3854-3.
- [7] SKŘEHOT, Petr A. a Marcela RUPOVÁ. *Nanobezpečnost*. Vyd. 1. Praha: Výzkumný ústav bezpečnosti práce, 2011, 240 s. ISBN 978-808-6973-890.
- [8] OSTIGUY, C. ...et al..*Nanoparticles: Actual Knowledge About Occupational Health and Safety Risks and Prevention Measures* [online]. Institut de recherche Robert Sauvé en santé et en sécurité du travail. 2006. [cit. 2015-01-05]. Dostupný z www: <http://www.irsst.qc.ca/media/documents/pubirsst/r-470.pdf>.
- [9] OSLÁNCZI, Gábor, Horváth EDINA and Szabó ANDREA. Subacute exposure of rats by metal oxide nanoparticles through the airways: general toxicology and neuro-functional effects. *Acta Biologica Szegediensis*. 2010, roč. 54, (2), s. 165-170. Dostupný z www: <http://www.sci.u-szeged.hu/ABS>.
- [10] HORVÁTH, Edina, Gábor OSZLÁNCZI and Zsuzsanna MÁTÉ. Nervous system effects of dissolved and nanoparticulate cadmium in rats in subacute exposure. *Journal of Applied Toxicology*. 2011, vol. 31, issue 5, s. 471-476. DOI: 10.1002/jat.1664. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jat.1664>
- [11] BUZEA, Cristina, Ivan PACHECO a Kevin ROBBIE. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007, vol. 2, issue 4, MR17-. DOI: 10.1116/1.2815690. Dostupné z: <http://scitation.aip.org/content/avs/journal/bip/2/4/10.1116/1.2815690>
- [12] MAYNARD, Andrew D., Robert J. AITKEN a Tilman BUTZ. Safe handling of nanotechnology. *Nature*. 2006-11-16, vol. 444, issue 7117, s. 267-269. DOI: 10.1038/444267a. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/444267a>
- [13] FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, M. TERNERO Rodríguez, A.J. FERNÁNDEZ Espinosa. Physical speciation of arsenic, mercury, lead, cadmium and nickel in inhalable atmospheric particles. *Analytica Chimica Acta*. 2004, vol. 524, 1-2, s. 33-40. DOI: 10.1016/j.aca.2004.02.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267004001825>

- [14] GEISER, Marianne. Update on Macrophage Clearance of Inhaled Micro- and Nanoparticles. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*. 2010, vol. 23, issue 4, s. 207-217. DOI: 10.1089/jamp.2009.0797.
Dostupné z: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089>
- [15] OBERDÖRSTER, Eva. Manufactured Nanomaterials (Fullerenes, C60) Induce Oxidative Stress in the Brain of Juvenile Largemouth Bass. *Environmental Health Perspectives*. 2004-04-07, vol. 112, issue 10, s. 1058-1062. DOI: 10.1289/ehp.7021.
Dostupné z: <http://www.ehponline.org/ambra-doi-resolver/10.1289/ehp.7021>
- [16] AL-SALEH, Iman, Neptune SHINWARI a Abdullah MASHHOUR. Heavy metals (lead, cadmium and mercury) in maternal, cord blood and placenta of healthy women. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2011, vol. 214, issue 2, s. 79-101. DOI: 10.1016/j.ijheh.2010.10.001.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438463910001240>
- [17] JARUP, L. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*. 2003-12-01, vol. 68, issue 1, s. 167-182. DOI: 10.1093/bmb/ldg032. Dostupné z: <http://bmb.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/bmb/ldg032>
- [18] HU, Howard. Bone Lead as a New Biologic Marker of Lead Dose: Recent Findings and Implications for Public Health. *Environmental Health Perspectives*. 1998, vol. 106, s. 961-. DOI: 10.2307/3434138.
Dostupné z: <http://www.jstor.org/stable/3434138?origin=crossref>
- [19] CHAN, H. Mobilization of Hepatic Cadmium in Pregnant Rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. vol. 120, issue 2, s. 308-314. DOI: 10.1006/taap.1993.1116.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/doi/10.1006/taap.1993.1116>
- [20] QU, Wei, Bhalchandra A. DIWAN, Jie LIU a Robert A. GOYER. The Metallothionein-Null Phenotype Is Associated with Heightened Sensitivity to Lead Toxicity and an Inability to Form Inclusion Bodies. *The American Journal of Pathology*. 2002, vol. 160, issue 3, s. 1047-1056. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64925-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010649255>
- [21] WAALKES, Michael P., Michael J. HARVEY a Curtis D. KLAASSEN. Relative in vitro affinity of hepatic metallothionein for metals. *Toxicology Letters*. 1984, vol. 20, issue 1, s. 33-39. DOI: 10.1016/0378-4274(84)90179-6.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378427484901796>
- [22] KATZ, L. C., A. BURKHALTER a W. J. DREYER. Fluorescent latex microspheres as a retrograde neuronal marker for in vivo and in vitro studies of visual cortex. *Nature*. 1984-8-9, vol. 310, issue 5977, s. 498-500. DOI: 10.1038/310498a0. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/310498a0>
- [23] TAKENAKA, S., E. KARG, W. G. KREYLING, B. LENTNER, H. SCHULZ, A. ZIESENIS, P. SCHRAMEL a J. HEYDER. Fate and Toxic Effects of Inhaled Ultrafine Cadmium Oxide Particles in the Rat Lung. *Inhalation Toxicology*. 2004, vol. 16, s1, s. 83-92. DOI: 10.1080/08958370490443141.
Dostupné: <http://www.informapharmacology.com/doi/abs/10.1080/08958370490443141>

- [24] BLUM, Jason L., Lauren K. ROSENBLUM a Gabriele GRUNIG. Short-term inhalation of cadmium oxide nanoparticles alters pulmonary dynamics associated with lung injury, inflammation, and repair in a mouse model. *Inhalation Toxicology*. 2014, vol. 26, issue 1, s. 48-58. DOI: 10.3109/08958378.2013.851746. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/08958378.2013.851746>
- [25] BAEZA-SQUIBAN, Armelle a Sophie LANONE. Exposure, Uptake, and Barriers. *Nanoethics and Nanotoxicology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, s. 37. DOI: 10.1007/978-3-642-20177-6_2. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-20177-6_2