

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie



**Vliv grafen oxidu na transkripční aktivitu receptoru pro  
vitamin D (VDR)**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Eliška Zgarbová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.</b>
Rok:	2017

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

.....

### **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli, docentu Vrzalovi, za odborné vedení, vstřícný přístup, podporu a v neposlední řadě také za trpělivost a čas, který mi věnoval. Poděkování patří také všem pracovníkům Katedry buněčné biologie a genetiky za ochotu a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat za finanční podporu projektu IGA PrF-2016-003. Velký dík patří také mé rodině za nemalou podporu v průběhu studia.

## **Bibliografická identifikace:**

<b>Jméno a příjmení autora</b>	Eliška Zgarbová
<b>Název práce</b>	Vliv grafen oxidu na transkripční aktivitu receptoru pro vitamin D (VDR)
<b>Typ práce</b>	Bakalářská
<b>Pracoviště</b>	Katedra biochemie
<b>Vedoucí práce</b>	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
<b>Rok obhajoby práce</b>	2017

### **Abstrakt**

Tato práce se zabývá vlivem látky grafen oxidu na transkripční aktivitu jaderného receptoru pro vitamín D (VDR). V teoretické části bakalářské práce je nastíněn současný stav dané problematiky. Je zde popsána funkce vitamínu D, jeho izoformy a význam pro lidský organismus. Další kapitola je věnována rodině jaderných receptorů a nalezneme zde podrobnější informace o studovaném jaderném receptoru, čili receptoru pro vitamín D. Následující kapitola se věnuje nanomateriálům, grafenu a samotnému grafen oxidu, jeho struktuře a významu. Experimentální část je rozdělena na dva soubory experimentů. V první části bylo pomocí MTT testu zjišťováno cytotoxické působení částic grafen oxidu na VDR-responzivní buněčnou linii. Výsledky dokázaly, že žádná z použitých koncentrací grafen oxidu nemá na VDR-responzivní buněčnou linii toxické účinky a tudíž mohou být pro další část experimentů použity všechny testované koncentrace. Ve druhé části byla zjišťována schopnost těchto částic aktivovat nebo inhibovat transkripční aktivitu VDR metodou Gene reporter assay. Aktivita VDR byla stanovována pomocí reportérového genu pro luciferázu, který je pod kontrolou VDR responzivních elementů.

<b>Klíčová slova</b>	grafen oxid, jaderný receptor, VDR, kalcitriol
<b>Počet stran</b>	46
<b>Počet příloh</b>	0
<b>Jazyk</b>	Český

## **Bibliographical identification**

<b>Author's first name and surname</b>	Eliška Zgarbová
<b>Title</b>	The effect of graphene oxide on transcription activity of vitamin D receptor (VDR)
<b>Type of thesis</b>	Bachelor
<b>Department</b>	Department of Biochemistry
<b>Supervisor</b>	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
<b>The year of presentation</b>	2017

### **Abstract**

This bachelor thesis deals with influence of graphene oxide nano-platelets on the transcriptional activity of the nuclear receptor for vitamin D (VDR). The theoretical part of this thesis defines the current statement of this problematics. Vitamin D functions are described, also its isoforms and its importance for human organism. The next chapter is dedicated to the family of nuclear receptors and we can find here also more information about the studied nuclear receptor, the vitamin D receptor. The following chapter deals with nanomaterials, graphene and graphene oxide itself, its structure and significance. The experimental part is divided into two sets of experiments. In the first part, the cytotoxic effect of the graphene oxide nano-platelets on the VDR-responsive cell line was detected by the MTT test. The results demonstrated that none of used concentrations of graphene oxide had toxic effect on the VDR-responsive cell line and therefore all tested concentrations could be used for all other experiments. In the second part, it was determined the ability of these particles to activate or inhibit the transcriptional activity of VDR using the Gene reporter assay. VDR activity was determined using a reporter gene for luciferase, which is under the control of VDR responsive elements.

<b>Keywords</b>	graphene oxide, nuclear receptor, VDR, calcitriol
<b>Number of pages</b>	46
<b>Number of appendices</b>	0
<b>Language</b>	Czech

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>2</b>
2.1	VITAMÍN D.....	2
2.1.1	Chemická struktura .....	4
2.1.2	Vitamín D <sub>3</sub> .....	4
2.2	JADERNÉ RECEPTORY .....	6
2.2.1	Receptor pro vitamín D.....	6
2.3	NANOČÁSTICE.....	8
2.3.1	Aplikace nanomateriálů v medicíně.....	9
2.3.2	Grafen.....	11
2.3.2.1	Grafen oxid.....	13
2.4	INTERAKCE NANOČÁSTIC GRAFENU S JADERNÝMI RECEPTORY .....	15
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>18</b>
3.1	MATERIÁL A METODY .....	18
3.1.1	Biologický materiál.....	18
3.1.2	Materiál .....	18
3.1.3	Chemikálie .....	18
3.1.4	Přístroje .....	19
3.1.5	Metodika práce.....	20
3.1.5.1	Příprava kultivačního média .....	20
3.1.5.2	Pasážování buněk.....	20
3.1.5.3	Počítání buněk a vysetí na kultivační destičku .....	21
3.1.5.4	Treatment .....	22
3.1.5.5	MTT test.....	24
3.1.5.6	Gene reporter assay .....	25
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>27</b>
4.1	MTT TEST.....	27
4.2	MIKROSKOPICKÉ POZOROVÁNÍ ČÁSTIC GO .....	28
4.3	GENE REPORTER ASSAY.....	30
4.3.1	Agonistický mód – aktivace transkripční aktivity VDR.....	30
4.3.2	Antagonistický mód – inhibice transkripční aktivity VDR .....	31
<b>5</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>39</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>44</b>

## **CÍLE PRÁCE:**

### **Teoretická část**

Vypracování rešerše na téma bakalářské práce

Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace

### **Experimentální část**

Stanovení cytotoxického působení grafen oxidu na VDR-responzivní linii metodou MTT

Stanovení transkripční aktivity VDR v přítomnosti grafen oxidu metodou Gene reporter assay

# 1 ÚVOD

V souvislosti se stále se zrychlujícím technickým pokrokem dochází v dnešní době k rozkvětu řady vědeckých oblastí. Pokud srovnáme technologické možnosti dnes a v dobách před například dvaceti lety, zjistíme, že věda za tento relativně krátký časový úsek učinila velké pokroky a neustále otevírá nové a nové možnosti. Rozmach pozorujeme na poli medicíny, elektrotechniky či genového inženýrství. Pozadu nezůstává ani rozvoj nanotechnologií, které se stále více uplatňují v různých vědních odvětvích a získávají tak interdisciplinární charakter. Svě místo nanočástice nalezly v konstrukcích mikroskopů, kde se využívají struktury nanotrubiček pro zlepšení rozlišovací schopnosti, v oblasti nanofotoniky, což je obor zabývající se vlastnostmi a využitím fotonů, v elektrotechnice nebo farmacii či medicíně. Nanočástice mohou mít různý původ – vznikají přírodní cestou nebo důsledkem specifických procesů. Příkladem přírodních nanočástic majících vliv na životní prostředí může být sopečný prach, který vzniká při vulkanické činnosti. Větší problém však představují nanočástice vznikající při antropogenní činnosti – jako důsledek svařování, spalování či při nanotechnologických aplikacích, které využívají syntetické nanomateriály – pigmenty, aditiva, léčiva apod. Je tedy zřejmé, že se nanočástice vyskytují všude okolo nás, ve velké míře také jako součást aerosolů v ovzduší a mohou lehce proniknout do lidského organismu. Se zvyšujícím se průmyslovým využitím nanomateriálů, a tedy i s jejich zvyšující se přítomností v prostředí, vyvstává několik důležitých otázek. Do jaké míry tyto komponenty ovlivňují živé organismy? Jaká je míra jejich nebezpečnosti pro člověka? Mohou být dokonce toxické? Aby bylo možné tyto otázky zodpovědět, musíme blíže proniknout do molekulární podstaty jak konkrétních nanomateriálů, tak lidského organismu. Lidskému tělu tyto komponenty nejsou vlastní, a proto je řadíme mezi xenobiotika. Účinky xenobiotik na náš organismus jsou podrobně studovány již desítky let. Je však jasné, že nemůžeme otestovat účinky všech nanočástic na lidské buňky najednou, proto je nutné provést celou řadu experimentů s různými látkami. Cílovou skupinou pro tyto látky mohou být také ligandem aktivované transkripční faktory. Tato práce se věnuje jednomu z nich, konkrétně receptoru pro vitamín D, který řadíme do rodiny jaderných receptorů a velkou mírou se podílí na udržování homeostázy vápníku a fosforu v těle. Cílem této práce je zjistit, zda zkoumaný nanomateriál, čili grafen oxid, působí na lidské buňky toxicky či nikoli a následně stanovit jeho schopnost aktivovat či inhibovat daný receptor.



## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

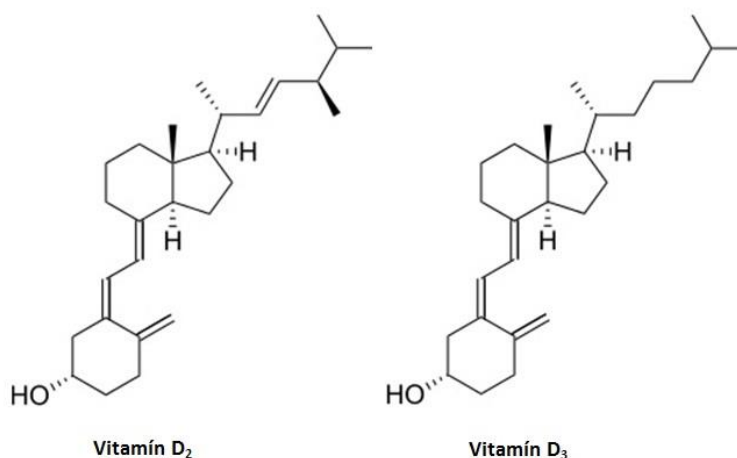
### 2.1 Vitamín D

Vitamín D je souhrnný název pro hormonální prekurzory steroidní povahy, které můžeme souhrnně označit jako kalciferoly. Vitamín D je prekurzorem hormonu kalcitriolu, který patří, spolu s peptidovými hormony, jako je parathormon (PTH) či kalcitonin (CT), mezi nejdůležitější regulátory vápníku a fosforu v lidském těle (Murray *et al.*, 2012). Vitamín D ovlivňuje metabolismus těchto dvou minerálů a tím i jejich správnou funkci a tvorbu kostí. Metabolická dráha vápníku a fosforu začíná ve střevě, kde jsou tyto minerály absorbovány střevní sliznicí, následně jsou transportovány krví do tkání, ukládají se v kostech a jejich přebytky jsou poté odváděny močí a výkaly z těla ven. Lidské tělo obsahuje 1-1,5kg  $\text{Ca}^{2+}$ , jehož největší část je uložena v kostech, cca 99% (Koolman a Röhm). V kostech se vápník nachází ve formě hydroxyapatitových krystalů, které tvoří anorganickou strukturní složku kostry (Murray *et al.*, 2012). K zajištění správných funkcí  $\text{Ca}^{2+}$  je nutné jeho hladinu v těle přesně regulovat. Ionty  $\text{Ca}^{2+}$  fungují také jako enzymové kofaktory a jsou nepostradatelnou součástí procesu srážení krve. Peptid parathormon a steroid kalcitriol přímo či nepřímo podporují procesy zvyšující hladinu  $\text{Ca}^{2+}$ . Kalcitriol stimuluje indukci transportérů resorpci  $\text{Ca}^{2+}$  a má pozitivní vliv na uvolňování  $\text{Ca}^{2+}$  z kostí. Kalcitonin jako antagonist PTH působí na tyto procesy v opačném smyslu (Koolman a Röhm, 2012).

Vitamín D ve své podstatě nepatří mezi vitamíny, jelikož si jej organismus dokáže sám vytvářet (Dastych *et al.*, 2015). Můžeme ho však přijímat také z potravy. Mezi hlavní zdroje vitamínu D pro živý organismus můžeme zařadit v první řadě slunce, z potravinových zdrojů potom vaječný žloutek či rybí tuk. Pokud je ozáření kůže sluncem nedostatečné a vitamín D chybí také v potravě, objeví se kareční příznaky, které se u dětí projeví jako rachitida a u dospělých jako osteomalacie. V obou případech je zhoršena mineralizace kostí (Koolman a Röhm, 2012). Nedostatek se může také projevit zvýšenou kazivostí zubů. Zvýšení hladiny vitamínu D lze dosáhnout ozařováním kůže UV světlem o vlnové délce 230-313nm. Vysoké hladiny vitamínu D vedou k intoxikaci, narušuje se metabolismus vápníku a fosforu. Dochází ke kalcifikaci měkkých tkání, tvoří se ledvinové kameny. Pigmentace do jisté míry chrání před intoxikací. Vzhledem k regulačním mechanismům velké vystavení slunečnímu záření nikdy nevede k hypervitaminóze (Murray *et al.*, 2002). Horní hranice doporučeného denního příjmu vitamínu D je pro dospělého člověka 100 $\mu\text{g}$  (4000IU). Symptomy

hypervitaminózy se projeví po delší době, cca po 3 měsících užívání vysokých dávek vitamínu D (Ross *et al.*, 2011). Bylo zjištěno, že u lidí s tmavší barvou pleti, kteří žijí v oblasti rovníku, je mnohem vyšší riziko deficiencie vitamínu D, jelikož jejich potřeba vitamínu D je 5-10x vyšší, než u lidí s bílou pletí, kteří žijí v mírném podnebném pásu (Aloia *et al.*, 2005; Clemens *et al.*, 1982). Vitamín D a jeho analogy našly velké uplatnění na poli medicíny při léčbě nemocí. Například pro léčbu hyperproliferativních nemocí, jako je osteoporóza či svrab, byly připraveny různé syntetické formy vitamínu D (Nakamura *et al.*, 2013; van Geel *et al.*, 2014). Osteoporózu vyvolanou nedostatkem pohlavních hormonů lze léčit podáváním steroidních hormonů nebo modulátorů jejich receptorů, tzv. SERM (Koolman a Röhm, 2012).

Vitamín D se vyskytuje ve dvou formách – vitamín D<sub>2</sub>, neboli ergokalciferol a vitamín D<sub>3</sub>, neboli cholekalciferol (obr. 1). Zásadní rozdíl mezi vitamíny D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub> můžeme pozorovat již v procesu biosyntézy. Vitamín D<sub>3</sub> vzniká v kůži živočichů přeměnou 7-dehydro-cholesterolu, zatímco vitamín D<sub>2</sub> vzniká přeměnou ergosterolu v rostlinách. Ergosterol je steroidní látka obsažená jen v rostlinách, nikoli v živočišném organismu (Murray *et al.*, 2012). Vitamín D<sub>2</sub> se tedy nachází pouze v rostlinách, a proto jej můžeme získat jedině z potravy. Vysoký obsah vitamínu D<sub>2</sub> mají například obilniny (Holick, 2007). Vysoké množství ergosterolu je obsaženo také v houbách. Ten se při vystavení světlu o vlnové délce cca 315nm přeměňuje na vitamín D<sub>2</sub> (Havinga *et al.*, 1960). Zdrojem vitamínu D<sub>2</sub> mohou být také vitaminové doplňky (např. Calcidol),



Obrázek č. 1: **Struktura vitamínu D<sub>2</sub> a vitamínu D<sub>3</sub>**. Schéma vlevo znázorňuje chemickým vzorcem ergokalciferol, čili vitamín D<sub>2</sub> a struktura vpravo znázorňuje chemickým vzorcem cholekalciferol, čili vitamín D<sub>3</sub> (obrázek převzat z Zhu a DeLuca, 2012).

kteře, jak bylo prokázáno, mají srovnatelnou účinnost, jako vitaminové doplňky obsahující vitamin D<sub>3</sub> (Holick *et al.*, 2011). Další rozdíl spočívá v jejich chemické struktuře.

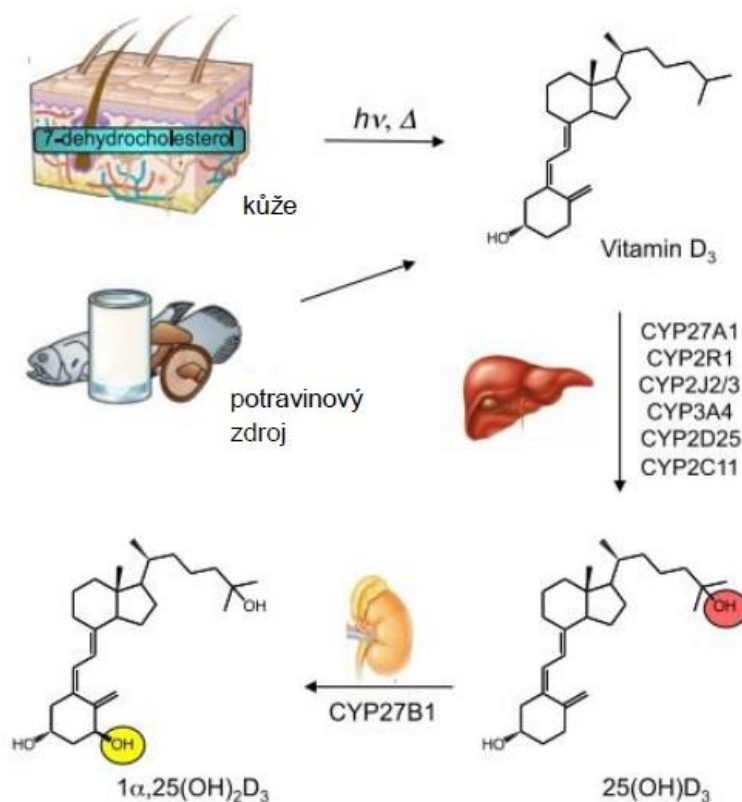
### 2.1.1 Chemická struktura

Chemická struktura vitaminu D byla objasněna na začátku minulého století (Cuppari *et al.*, 2011). Vitamin D patří k nejstarším známým hormonům na zemi a svou strukturou je velmi podobný steroidním hormonům, jako je například testosteron, kortizon či aldosteron. Prekurzorem steroidních hormonů je cholesterol. Struktura vitaminu D<sub>2</sub> je prakticky shodná se strukturou vitaminu D<sub>3</sub>, až na postranní řetězec v poloze 17. Postranní řetězec vitaminu D<sub>2</sub> je nasycený a navíc obsahuje vedlejší methylovou skupinu, kdežto postranní řetězec vitaminu D<sub>3</sub> je nenasycený a neobsahuje žádnou další vedlejší skupinu (Murray *et al.*, 2012). Díky své molekulární struktuře a konformaci se vitamin D vyznačuje unikátními vlastnostmi, které se však od vlastností klasických steroidních hormonů liší. V současné době je známo asi 40 metabolitů a 220 analogů vitaminu D (O'Malley a Birnbaumer, 1978).

### 2.1.2 Vitamin D<sub>3</sub>

Vitamin D<sub>3</sub> vzniká přeměnou 7-dehydro-cholesterolu, který se vytváří v kůži účinkem ultrafialového záření. Štěpením 7-dehydrocholesterolu vzniká nejprve provitamin D<sub>3</sub>. Tato forma je však vysoce nestabilní, proto se samovolně přeměňuje na izomer cholekalciferol, čili vitamin D<sub>3</sub>. Syntéza a koncentrace vitaminu D<sub>3</sub> v krvi je závislá na ročním období. V krvi je transportován vazbou se specifickým proteinem, kterým je tzv. VDBP, čili vitamin D binding protein, do jater, kde dochází k jeho dalšímu zpracování. V játrech se jak z vitaminu D<sub>3</sub>, tak z vitaminu D<sub>2</sub> tvoří působením hydroxyláz 25-hydroxyvitaminy [25(OH)D<sub>2</sub>] a [25(OH)D<sub>3</sub>]. Koncentrace těchto 25-hydroxyvitaminů je určujícím znakem pro zjištění hladiny vitaminu D v organismu (Dastych M. *et al.*, 2015). Vitamin D<sub>3</sub> je specificky hydroxylován na pozici 25 pomocí mikrosomálních enzymů P450 – CYP2R1, CYP2J2, CYP2J3, CYP3A4, CYP2D25 a CYP2C11 a jednoho mitochondriálního enzymu CYP27A1 (Zhu a DeLuca, 2012). Následně je metabolizován v ledvinách působením enzymu CYP27B1 na biologicky aktivní formy. Aktivní forma vitaminu D<sub>3</sub> nese označení jako 1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol, neboli kalcitriol (Dastych M. *et al.*, 2015). Kalcitriol již přímo ovlivňuje metabolismus vápníku a jeho syntéza je znázorněna na obrázku č. 2.

Ve střevě indukuje tvorbu vápník vazebného proteinu (CBP). CBP poté funguje jako transportér vápníku v těle. Biosyntéza kalcitriolu je značně odlišná od biosyntézy ostatních steroidních hormonů, které jsou všechny odvozeny od pregnenolonu či progesteronu (Koolman a Röhm, 2012). Studie prokázaly, že kalcitriol zvyšuje hmotnost kostí a má příznivý vliv na jejich tvorbu. Bylo také ověřeno, že kalcitriol může inhibovat nebo podněcovat osteoklastogenezi, neboli vznik osteoklastů (velké rozvětvené kostí buňky, jejich funkcí je odbourávání kostní tkáně) z hematopoetických prekurzorů (Kogawa *et al.*, 2010). Kalcitriol může potlačit resorpci kostí přímou inhibicí osteoklastogeneze nebo snížením funkce regulátorů osteoklastogeneze. Příkladem regulátoru osteoklastogeneze může být např. RANKL (receptor aktivovaný ligandem kappab). Díky této vlastnosti může být kalcitriol využit jako součást léčiv proti osteoporóze. V dnešní době se také testuje použití kalcitriolu a jeho analogů při léčbě rakoviny či kardiovaskulárních onemocněních (Li A. *et al.*, 2017).



Obr. 2: **Syntéza kalcitriolu.** V první části je vitamín D<sub>3</sub>, který vzniká v kůži působením UV záření nebo jej můžeme přijímat z potravy, přeměněn na aktivní metabolit [25(OH)D<sub>3</sub>] hydroxylací na pozici 25 pomocí enzymů P450. Následně dochází k 1 $\alpha$ -hydroxylaci pomocí enzymu CYP27B1 a vzniká 1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol, neboli kalcitriol (obrázek převzat z Zhu a DeLuca, 2012).

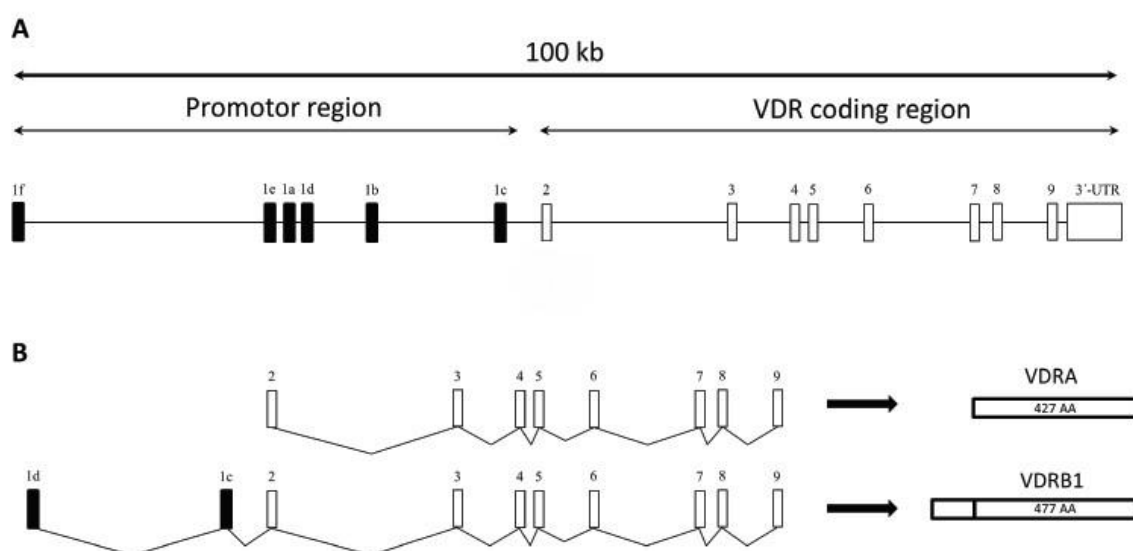
## 2.2 Jaderné receptory

Jaderné receptory, jiným názvem také nukleární receptory (NR), řadíme mezi ligandem aktivované transkripční faktory. Mezi ligandy můžeme zahrnout steroidní hormony – progestageny (progesteron, připravuje dělohu na přijetí vajíčka), androgeny (testosteron, vývoj sekundárních pohlavních znaků u mužů), estrogeny (estron, vývoj sekundárních pohlavních znaků u žen), glukokortikoidy (kortisol, metabolismus sacharidů nebo proteinů) a mineralokortikoidy (aldosteron, regulace vylučování vody a solí). Dalšími ligandy jsou například vitamín D<sub>3</sub>, kyselina retinová či prostaglandiny. Nomenklatura se určuje podle DNA a ligand vazebné domény, čili na příkladu NR1H1 reprezentuje první číslo podrodinu, následuje písmeno skupiny a číslo genu (Germain *et al.*, 2006). Celkem existuje 6 podrodin a 26 skupin (Koolman a Röhm, 2012). Tyto receptory po navázání ligandu změní svou konformaci. Umožní se tak jejich přímá vazba na DNA a to vede k ovlivnění genové exprese. Ligandy rozdělujeme na hydrofilní a hydrofobní. Receptory dělíme na povrchové a intracelulární. Odlišné typy ligandů se váží na odlišné typy receptorů. Lipofilní hormon se váže na intracelulární receptor a reguluje expresi. Hydrofilní ligand se váže na povrchový receptor. V lidském organismu se vyskytuje 48 receptorů, které se podílejí na nejrůznějších procesech, např. udržování homeostázy (Pawlak *et al.*, 2015). Funkce jaderných receptorů, stejně jako biologické pochody jejich ligandů, může být narušena různými chemikáliemi (Heindel *et al.*, 2015). Tyto chemikálie mohou patřit do skupiny environmentálních polutantů. Správná funkce může být narušena také užíváním specifických léčiv či drog (Moreau *et al.*, 2007).

### 2.2.1 Receptor pro vitamín D

Receptor pro vitamín D, taktéž známý pod označením NR1H1 (nuclear receptors subfamily 1, group I, member 1) či VDR, řadíme do rodiny jaderných receptorů. Hraje významnou roli při biologických procesech vitamínu D. Objeven byl roku 1969 (Haussler *et al.*, 1969). VDR reguluje expresi řady genů, které se podílejí na udržování homeostázy vápníku a fosforu v těle (Wang *et al.*, 2012), ale hraje roli i při dalších regulačních procesech, například v imunitním systému, kde reguluje expresi některých látek s antimykotickými či antibakteriálními účinky (Kodíček *et al.*, 2015). Dále také podporuje diferenciaci a inhibuje proliferaci určitých buněk, což otevírá nové možnosti studia léčby rakoviny (Koolman a Röhm, 2012). Jedná se o ligandem aktivovaný transkripční faktor, který je kódován genem v oblasti centromery na chromozomu 12 (Taymans *et al.* 1999). Ligandem tohoto receptoru je 1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol,

čili kalcitriol. Může být však také aktivován kyselinou lithocholovou, která je součástí střevní mikroflóry (Masuno *et al.*, 2013). VDR hraje klíčovou roli v regulaci biologických pochodů vitamínu D. K vývoji nových terapeutických metod je však nutné znát přesnou funkci VDR a jeho lokalizaci ve tkáních (Haussler *et al.*, 1998). Předchozí studie prokázaly, že VDR je přítomný v buňkách střevního epitelu, kůži, hypofýze či slinivce břišní. Receptory pro vitamín D jsou přítomny prakticky všude v těle. Dokonce i ve tkáních, které nemají přímý vztah k udržování homeostázy vápníku a fosforu. Mezi tkáně s nejvyšším obsahem VDR patří střeva, ledviny, žlázy s vnitřní sekrecí a kosti (Wang *et al.* 2012). Svou strukturou se podobá dalším receptorům, jako je PXR (pregnane X receptor) či FXR, farnesoid X receptor (Bouillon *et al.*, 2008). Jak již bylo řečeno, tento transkripční faktor je kódován centromerickým genem na chromozomu 12. Skládá se z celkem 14-ti exonů. Alternativním sestřihem genu pro VDR vznikne 14 transkriptů (Tymans *et al.*, 1999). Z těchto 14-ti transkriptů byly prokázány jen dvě izoformy VDR, konkrétně VDRA a VDRB1 (obr. 3). Nejčastěji se vyskytující izoformou je izoforma VDRA, která obsahuje 427 aminokyselin (Sun *et al.*, 2001). Izoforma VDRB1 však obsahuje celkem 477 aminokyselin. Různá velikost obou izoform a také jejich výskyt v odlišných tkáních jsou důvodem jejich rozdílné reakce na ligand, většinou kalcitriol. Nejdůležitější část struktury VDR představuje



Obr. 3: **VDR**. Schéma A znázorňuje gen pro lidský VDR o velikosti asi 100kb. VDR gen se skládá ze 14-ti exonů, z toho 6 z nich jsou varianty exonu 1, který se podílí na alternativním sestřihu. Exony 2-9 jsou společné všem známým izoformám VDR. Schéma B znázorňuje kompozici proteinu VDR a jeho izoformou, VDRA a VDRB1. Izoforma VDRB1 je prodloužena na N-terminálním konci o dva exony, 1d a 1c (obrázek převzat z Ženata a Vrzal, 2017).

DNA vazebná doména (DBD, z anglického DNA-binding domain). Tato doména umožňuje navázání na DNA vitamín D responzivního elementu, VDRE, a obsahuje zinkové prsty. Další významnou část struktury VDR představuje ligand-vazebná doména (LBD, z anglického ligand-binding domain), která umožňuje navázání ligandu. Dále obsahuje struktura VDR také dimerizační doménu a transaktivační doménu. Dimerizační doména umožňuje asociaci VDR s receptorem kyseliny retinové (RXR). Komplex VDR s RXR se následně váže na VDRE pomocí DBD (Hsieh *et al.*, 1998). Poté, co se ligand naváže na receptor, dochází ke konformačním změnám, které mají za následek umlčení mediátoru pro receptory retinoidních a tyroidních hormonů, tzv. SMRT (z anglického silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors), a aktivaci VDR (Haussler *et al.*, 1998). Po navázání ligandu na DBD je komplex VDR/ligand stabilizován pomocí fosforylace na serinu 51 (S51). Tato fosforylace je způsobena enzymem proteinkinázou C, PKC (Hsieh *et al.*, 1991). Další fosforylace, která také slouží ke stabilizaci komplexu VDR/ligand, je lokalizována na pozici serinu 208 (S208) a je zprostředkována enzymem kasein kinázou II, CK-II (Jurutka *et al.*, 1993).

### 2.3 Nanočástice

Jako nanočástice (NP, nanoparticles) se označují struktury o velikosti 1nm až 100nm. Nanotechnologie představují interdisciplinární vědu, která se zabývá výrobou, zpracováním a využíváním nanomateriálů, což jsou objekty o velikosti v řádech nanometrů, tedy  $10^{-9}$ m. Samotný pojem nanotechnologie je odvozen od řeckých slov *nanos*, čili trpaslík, a *techné*, čili dovednost či zkušenost. Historie využívání nanomateriálů sahá až do starověkého Říma ve 4. století našeho letopočtu. Nejstarším známým příkladem využití nanomateriálů je tzv. Lykurgův pohár (obr. č. 4). Jedná se o skleněný pohár, který ve své struktuře obsahuje nanokrystaly zlata a stříbra o velikosti cca 70nm. Zajímavou vlastností těchto pohárů, která je způsobena právě přítomnými nanočásticemi, je jejich schopnost měnit barvu v závislosti na osvětlení. Pokud jsou poháry osvětlovány denním světlem, má pohár zelenou barvu. Pokud však umístíme zdroj světla dovnitř poháru, náhle se jeví jako červený (Freestone *et al.*, 2007). Nanostruktury se rozdělují na 0D struktury (tzv. fullerény), 1D struktury (např. nanotrubičky), 2D struktury (např. nanofilmy či grafen) a 3D struktury (běžné objemové materiály, které se neřadí k nanostrukturám) (Li *et al.*, 2014). V dnešní době se interdisciplinární povaha nanotechnologií čím dál více prohlubuje. Nanočástice



Obr. č. 4: **Lykurgův pohár**. Vlevo pohled na pohár v denním světle, kdy má jasně zelenou barvu a vpravo pohled na pohár, umístíme-li zdroj světla dovnitř. Pozorujeme změnu zbarvení ze zelené na červenou (obrázek převzat z Freestone *et al.*, 2007).

se využívají v medicíně a farmacii jako kontrastní látky při nejrůznějších vyšetřeních či jako katalyzátory v chemickém průmyslu (Ozin a Arsenault, 2005). Konkrétnímu využití nanočástic však předchází jejich důkladná analýza. Ideální metodu pro analýzu nejrůznějších nanočástic představuje kapilární elektroforéza (Baron *et al.*, 2017). S širokospektrálním využitím nanomateriálů je také spojena celá řada možných rizik, např. environmentálních. Příkladem přírodních nanočástic, které mají vliv na životní prostředí, může být sopečný prach, který vzniká při vulkanické činnosti. Větší problém však představují nanočástice vznikající při antropogenní činnosti – jako důsledek svařování, spalování či při nanotechnologických aplikacích, které využívají syntetické nanomateriály – pigmenty, aditiva, léčiva apod. Vědeckou disciplínou, ve které se můžeme setkat s širokým využitím nanomateriálů, je medicína. Průlomovým okamžikem v historii nanomateriálů bylo objevení grafenu v roce 2004.

### **2.3.1 Aplikace nanomateriálů v medicíně**

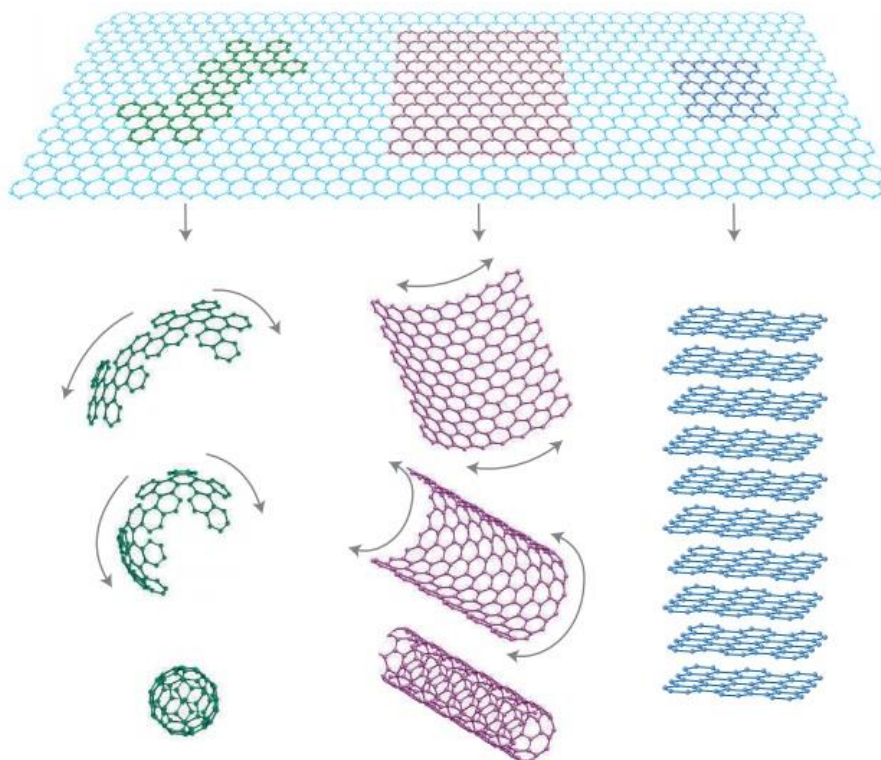
Stejně jako v případě nanotechnologií, i medicínské technologie se neustále rozvíjejí a zdokonalují a vzájemně se propojují. Nanomedicína může být definována jako monitorování, oprava konstrukce a kontrola lidského biologického systému na molekulární úrovni pomocí nanozařízení nebo nanočástic (Šrámek, 2009). Můžeme ji také chápat jako další vývojový stupeň, který navazuje na molekulární medicínu a na biotechnologii. Jedná se o přímou aplikaci nanotechnologií a nanočástic v oblasti



medicíny (Jain, 2008). Příkladem může být nanodiagnostika věnující se přímé molekulární diagnostice pomocí nanosenzoru, nanofarmakologie a s ní spojený vývoj tkáňově specifických léků, či použití různých implantátů, včetně umělých orgánů (Šrámek, 2009). Velký potenciál na poli medicíny představuje také využití magnetických nanočástic, které slouží jako nosiče specifických léčiv. Tyto nanočástice jsou nasměrovány ke specifickým tkáním prostřednictvím vnějšího magnetického pole (Tietze *et al.*, 2015). Tyto magnetické nosiče ve svých strukturách obsahují kov případně oxid kovu, nebo tzv. SPIONs, což jsou superparamagnetické nanočástice oxidu železa. Jádrem SPIONs tvoří oxid železa a bývá potaženo organickým materiálem, jako například mastnou kyselinou či polysacharidy (Laurent S. *et al.*, 2014). Kovové nanočástice jsou hojně využívány nejen v medicínských aplikacích, jelikož disponují unikátními optickými, elektronickými a katalytickými schopnostmi. Jako nosič pro nazální aplikaci léčiv byl vyvinut termostabilní gel, který byl připraven smícháním N-[(2-hydroxy-3-trimethylamonium)propyl]chitosan chloridu (HTCC), polyethylenglykolu (PEG) a  $\alpha$ - $\beta$ -glycerofosfátu ( $\alpha$ - $\beta$ -GP). Léčiva s nazální aplikací jsou často tvořena proteiny nebo peptidy. Takováto léčiva jsou však velice citlivá k enzymatické degradaci (Wu *et al.*, 2007) a při jejich použití docházelo k jejich rozložení enzymy a terapeutický účinek byl minimální, proto bylo nutné využít jiný nosič, než termostabilní gel tvořený HTCC, PEG a  $\alpha$ - $\beta$ -GP. Za tímto účelem byl vyvinut s využitím polyakrylamidových nanočástic stabilní nosič, který nepodléhá enzymatické degradaci a zefektivňuje účinek konkrétního léčiva (Wang *et al.*, 2014). Se zvyšujícím se využitím nanočástic v lékařské diagnostice narůstají také obavy ohledně jejich kompatibility s krví. Interakce nanočástic a krve může vést k agregaci krevních destiček či k endoteliální dysfunkci. V medicínských aplikacích se používají zejména nanočástice zlata (AuNP), které vykazují vysokou stabilitu a biokompatibilitu (Santos-Martinez *et al.*, 2014). Mezi slibné výzvy do budoucna patří také použití nanočástic při léčbě nádorů pomocí magnetické hypertermie. Jedná se o metodu založenou na zahřívání maligních nádorů na teplotu 42-45°C. Docílí se tím ireversibilních změn v rakovinných buňkách, ale zdravá tkáň zůstává nepoškozena. Touto metodou je možné eliminovat i hluboké nádory. Pro tento účel se vyvíjí stále více a více termostabilních nanomateriálů, které zlepšují tvorbu tepla v použitém roztoku (Di Corato *et al.*, 2014).

### 2.3.2 Grafen

Grafen představuje 2D krystalickou formu uhlíku a jedná se o nejtenčí dvojrozměrnou strukturu na světě. Můžeme říci, že grafen tvoří jedna vrstva grafitu. Uhlíky v grafitu jsou spojeny pomocí kovalentní vazby a vytvářejí strukturu šestiúhelníku podobnou medové plástvi (Wallace, 1947). Jelikož má grafen 2D strukturu, je každý atom zároveň vrchním i spodním a svými rozměry je mnohonásobně tenčí, než list papíru. V přírodě se však běžně nevyskytuje. Před více než 70ti lety přišli vědci Landau a Peierls s tvrzením, že krystaly zaujímající 2D struktury jsou termodynamicky nestabilní a proto nemohou existovat (Landau *et al.*, 1980). Toto tvrzení bylo vyvráceno až roku 2004 s objevem grafenu (Novoselov *et al.*, 2005). Grafen objevili ruští vědci Andre Geime a Konstantin Novoselov za pomoci metody exfoliace a lepicí pásky. Za svůj objev si roku 2010 vysloužili Nobelovu cenu za fyziku. Dnes můžeme grafen připravit například pomocí CVD (chemical vapor deposition), čili chemické depozice v plynné fázi. Tato metoda je založena na reakci plynného vodíku s methanem (Wonbong *et al.*, 2011). Struktura grafenu byla však teoreticky předpovězena již ve 40. letech 20. století.



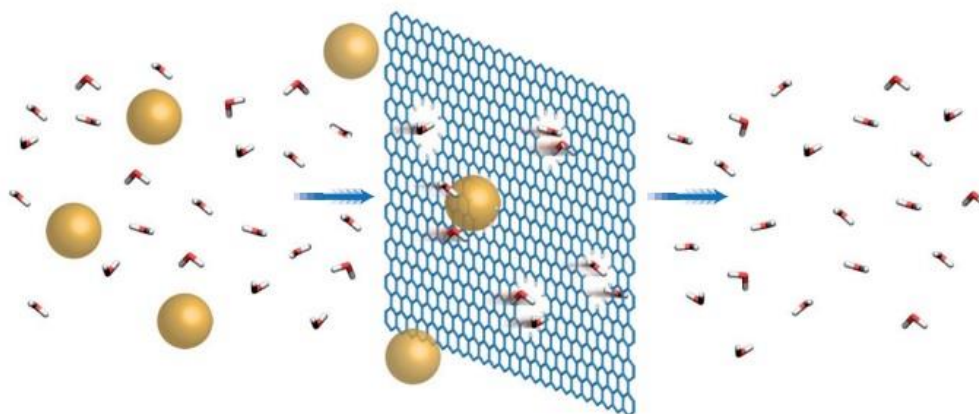
Obr. č. 5: **Různé struktury grafenu.** V horní části obrázku je světle modrou barvou znázorněna samotná 2D struktura grafenu. Z této výchozí struktury můžeme vytvořit 0D, 1D i 3D komponenty. Zelenou barvou je znázorněna 0D struktura tzv. fullerenu. Fialovou barvou je znázorněna 1D struktura nanotrubičky a skládáním jednotlivých vrstev grafenu na sebe docílíme vytvoření 3D struktury grafitu, což je znázorněno tmavě modrou barvou (obrázek převzat z Geim a Novoselov, 2007).

Tehdy se tento materiál teoreticky používal jako model v kvantové elektrodynamice. Řadí se mezi nejpevnější materiály na světě. Díky  $sp^2$  hybridizaci vykazuje grafen řadu specifických vlastností. Jedná se například o vlastnosti související s interakcemi s magnetickým polem, tepelnou vodivostí či nábojem. Tyto vlastnosti však mohou být výrazně zhoršeny přítomností různých nečistot. Proto je pro spotřebitelské aplikace vyžadován grafen o vysoké kvalitě a čistotě (Wonbong *et al.*, 2011). Může zaujímat různé prostorové struktury (znázorněno na obrázku č. 5), které byly popsány v přecházející kapitole a tvoří základ pro další uhlíkové materiály. Grafen může být sbalen do 0D struktury a tvoří takzvané fullereny, v 1D struktuře zaujímá tvar nanotrubiček. Spojením více vrstev grafen získáme 3D strukturu známou jako grafit (Geim a Novoselov, 2007). Konkrétní struktura má také vliv na bod tání grafenu. Jelikož grafen může zaujímat čtyři různé prostorové struktury, má také čtyři různé body tání v závislosti na tom, ve které struktuře se nachází (Zhu *et al.*, 2017). Objev grafenu představuje průlomový moment v oblasti nanotechnologií. Jedná se totiž o sloučeninu s vysokým potenciálem pro využití, které se očekává například v elektrotechnice. Součástky vyrobené z grafenu by měly být podstatně rychlejší, než ty, které se používají dnes a jsou na bázi křemíku. Měly by mít také menší spotřebu a delší výdrž. Uvádí se například, že rychlost internetu by s použitím takovýchto součástek mohla vzrůst až stokrát. Mnoho patentů týkajících se výzkumu grafenu vlastní Samsung, který se zabývá využitím grafenu v dotykových displejích, kde se v současné době používá indium (informace z internetového zdroje č. 1). Díky své mechanické pevnosti, specifickému povrchu a vysoké pohyblivosti elektronů uvnitř své struktury představuje grafen ideální materiál pro různé oblasti výzkumu (Geim a Novoselov, 2007). Nově našel grafen své využití také v oblasti tkáňového inženýrství (Xie *et al.*, 2015). Cena grafenu je i v současné době stále hodně vysoká a odhaduje se, že do roku 2020 se bude obrát trhu s grafenem blížít 675 milionům dolarů. Především vysoká cena je velkým limitem jeho využití (Wei a Kivioja, 2013). V dnešní době tvoří grafen a jeho deriváty novou třídu uhlíkových nanomateriálů s velkým potenciálem pro širokospektrální využití ve spotřebitelských aplikacích. Vzhledem k tomu, že jsou tyto komponenty stále více využívané, jsou na místě obavy, zda jejich zpracovávání nevede k uvolnění drobných částí těchto materiálů do ovzduší. V ovzduší by poté mohly interagovat s chemickými polutanty, pozměnit svou strukturu a získat toxický potenciál (Lammel *et al.*, 2014). Příkladem takovýchto spotřebitelských aplikací může být například využití technologií na bázi grafenu při čištění odpadních vod nebo v různých odsolovacích

zařizování (Wang a Karnik, 2012; Xu *et al.*, 2012). K odsolování vody se ve většině případů využívá jev zvaný jako reverzní osmóza. Znečištěná voda protéká přes speciálně upravenou membránu s póry. Tato membrána je semipermeabilní a propouští skrz pouze molekuly vody, nikoli nabitě solné ionty. Jedná se o nejvíce energeticky výhodnou a využívanou metodu odsolování vod (Shannon *et al.*, 2008). Vědci z Technologického Institutu v Massachusetts přišli s inovativním řešením, jak tuto metodu dvakrát až třikrát zefektivnit. Spočítali totiž, že samotný grafen ve své struktuře obsahuje póry v řádech nanometrů, které propouští molekuly vody daleko lépe, než syntetická polymerová membrána (Cohen-Tanugi a Grossman, 2012). Grafenová membrána je zobrazena na obrázku č. 6. Existují však také různé další deriváty grafenu, které se běžně využívají ve spotřebitelských aplikacích. Především se jedná o hydrogenované, fluorované a oxidované sloučeniny grafenu. Patří mezi ně například fluorografen, grafyn, grafdien či grafen oxid (Inagaki a Kang, 2014).

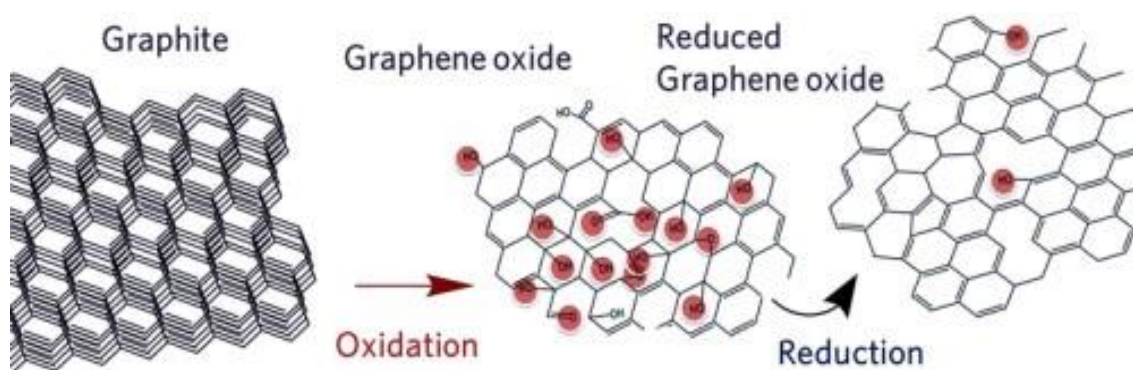
### 2.3.2.1 Grafen oxid

Grafen oxid je sloučenina získaná oxidací grafitu nebo grafenu. Pokud je výchozí sloučeninou grafit, vzniká nejdříve grafit oxid. Grafen oxid je tvořen jednou vrstvou grafitu oxidu (Dreyer *et al.*, 2010). Ve většině případů se pro syntézu grafenu oxidu využívá grafit a tzv. Hummersova-Offemanova metoda. Tato metoda je založena na oxidaci grafitu koncentrovanou kyselinou sírovou  $H_2SO_4$  s přidavkem oxidačního činidla, jímž může být dusičnan sodný  $NaNO_3$  nebo manganistan draselný  $KMnO_4$ . (Hummers a Offeman, 1958). Další používanou metodou k syntéze grafenu oxidu je také Brodieho metoda, při které dochází k oxidaci grafitu v plynném prostředí v přítomnosti



Obr. č. 6: **Grafenová membrána.** Na slanou vodu (vlevo) je aplikován velký tlak, který nasměruje molekuly na membránu. Molekuly vody (bíločervené) snadno procházejí skrz grafenovou membránu, zatímco solné ionty (žluté kuličky) propouštěny nejsou (obrázek převzat z Wang a Karnik, 2012).

kyseliny dusičné  $\text{HNO}_3$  a chlorečnanu draselného  $\text{KClO}_3$  (Brodie, 1859). Obě metody jsou založeny na principu oxidace silnou kyselinou v prostředí oxidačního činidla. Častěji je však využívána Hummersova-Offemanova metoda, jelikož je časově méně náročná než Brodieho metoda (Inagaki a Kang, 2014). Proces syntézy grafen oxidu lze shrnout do třech kroků. Prvním krokem je konverze reakčních sloučenin, druhým krokem je samotný proces oxidace zakončený třetím krokem, čímž je konečné promytí vodným roztokem (Dimiev a Tour, 2014). Oxidovaný grafen má na své struktuře navázány atomy kyslíku, které ovlivňují jeho elektrické vlastnosti (Park a Ruoff, 2010). Obsahuje velké množství kyslíkových a hydroxylových radikálů a také může obsahovat různé nežádoucí chemické sloučeniny, které je nutné eliminovat a purifikovat. Obsah těchto sloučenin závisí na čistotě a složení výchozího materiálu a také na podmínkách syntézy. Redukcí grafen oxidu vzniká rGO, čili redukovaný grafen oxid (Pei a Cheng, 2012). Proces oxidace grafitu a následné redukce grafen oxidu je znázorněn na obrázku č. 7. Optické a elektronické vlastnosti grafen oxidu mohou být upravovány dle potřeby pro konkrétní aplikace. Může být například použit jako polovodič nebo také jako izolátor, v závislosti na stupni oxidace (Kim *et al.* 2012). Atomové a elektronové struktury grafen oxidu mohou být studovány pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM), mikroskopie atomových sil (AFM) anebo pomocí spektroskopie ztrát energie elektronů (EELS) (Mkhoyan *et al.* 2009). Struktura grafen oxidu je amorfni a jeho tloušťka je průměrně 0,6nm (Li *et al.*, 2008). Působením poly(sodium4-styrernsulfonátu) dochází ke kompletní exfoliaci grafen oxidu a jeho jednotlivé vrstvy tvoří s vodou koloidní směs (Stankovich *et al.*, 2007). Filtrací této koloidní směsi přes membránový filtr a následným vysušením dostaneme grafen oxidový film (Gómez-



Obr. č. 7: **Proces oxidace.** Obrázek znázorňuje proces oxidace grafen oxidu, kdy je výchozí komponentou grafit. Oxidací grafitu vzniká grafit oxid (není uvedeno) a jeho jednu vrstvu označujeme jako grafen oxid. Následnou redukcí grafen oxidu vzniká redukovaný grafen oxid. Červeně jsou označené oxidované skupiny ve struktuře (obrázek převzat z Pei a Cheng, 2012).

Navarro *et al.*, 2007). Pro přípravu transparentních vodivých filmů grafen oxidu byly filmy ponořeny do vodného roztoku 55% kyseliny jodovodíkové HI při teplotě 100°C na dobu 30s. Poté byly opakovaně promyty ethanolem, aby byly důkladně odstraněny zbytky HI. Takto připravené filmy mají vysoké hodnoty odporu a mohou být využity v různých spotřebitelských aplikacích, např. v elektrotechnice (Zhao *et al.*, 2010). Grafen oxid nachází stále větší využití ve výrobě léků a také v oblasti biomedicíny, především díky své dobré biokompatibilitě (Shi *et al.*, 2013).

## 2.4 Interakce nanočástic grafenu s jadernými receptory

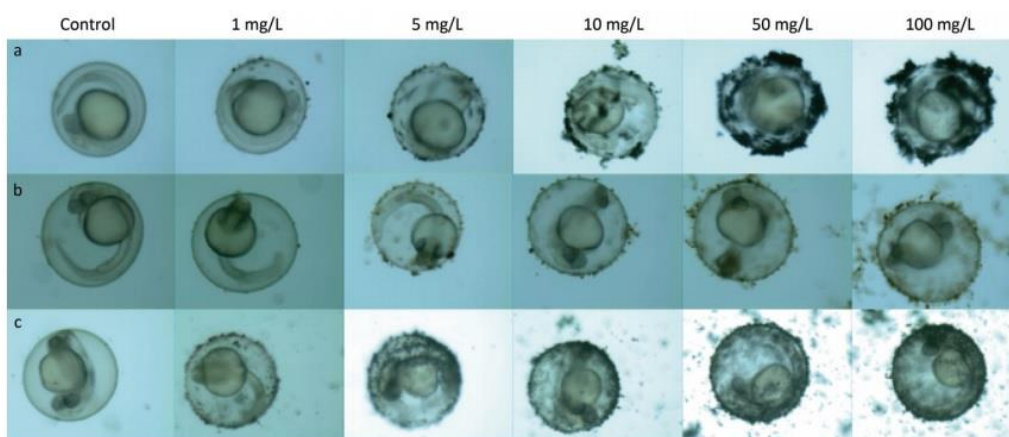
Zvyšující se využití nanomateriálů v průmyslu vedlo k vytvoření nové třídy antropogenních kontaminantů, které pronikají do ovzduší (Gottschalk a Nowack, 2011). Grafen oxid se řadí do kategorie uhlíkových nanomateriálů, které mají velký potenciál pro spotřebitelské aplikace a také se stále rozšiřuje jejich průmyslové využití. Vzhledem k jeho stále se zvyšující produkci a využití se mohou zpracováním uvolňovat nanočástice grafen oxidu do ovzduší, interagovat s chemickými polutanty, ty mohou pozměnit jejich strukturu a charakter a takovéto částice se pak mohou stát toxickými (Lammel *et al.*, 2015). K uvolňování nanočástic grafenu může docházet v procesu jeho syntézy, při výrobě produktů obsahujících grafen či při jeho degradaci (Xu *et al.*, 2012). Vzhledem ke svým hydrofobním vlastnostem jsou uhlíkové nanomateriály špatně rozpustné ve vodě, proto se očekává, že by se mohly při vyšších koncentracích hromadit na vodním povrchu (Handy *et al.*, 2008) V současné době je koncentrace grafenových nanočástic v prostředí relativně zanedbatelná a skutečné riziko pro lidský organismus zatím nehrozí (Farré *et al.*, 2009). S narůstajícím využitím grafenu a jeho derivátů ve spotřebitelských aplikacích se však bude koncentrace těchto nanočástic v prostředí v průběhu času zvyšovat, proto je nutné prokázat, zda mohou či nemohou mít cytotoxické účinky na živé organismy.

Studie, při které byly použity embrya Dánia pruhovaného (*Danio rerio*), sledovala vliv toxického působení derivátů uhlíkových nanomateriálů. Použity byly uhlíkové nanotrubičky (MWCNTs), grafen oxid (GO) a nanočástice redukovaného grafen oxidu (rGO). Embrya byly vystaveny působení těchto nanočástic v šesti různých koncentracích (0, 1, 5, 10, 50 a 100mg.l<sup>-1</sup>) po dobu 24h. Následně bylo zjišťováno toxické působení použitých nanomateriálů. Toxicita byla zjišťována na základě pozorování malformací v průběhu embryonálního vývoje, v larvárním stádiu byla sledována srdeční frekvence, schopnost pohybu a velikost larev. Následně byla



stanovena průměrná úmrtnost. Získané výsledky dokazují, že nanočástice rGO významně inhibují vylíhnutí embryí, MWCNTs a GO významně snižují velikost vylíhnutých larev. Ve všech třech případech vystavení embryí vysokým koncentracím nanočástic byla pozorována výrazná mortalita i malformace (viz obr. 8). Výsledky prokázaly, že všechny tři typy použitých nanočástic (MWCNTs, GO a rGO) vykazovaly toxické účinky vůči studovaným embryím. Míra mortality a vzniklých malformací byla přímo úměrná zvyšujícím se koncentracím použitých nanočástic (Liu *et al.*, 2014).

Jedna z nedávných studií sledovala vliv působení grafenových nanočástic na aryluhlovodíkový receptor (AhR) buněčné linie PLHC-1, která byla odvozena z hepatomu ryby Živoroděnky lesklé (*Poeciliopsis lucida*). Tato buněčná linie byla vystavena působení dvou typů grafenových nanočástic, konkrétně grafen oxidu (GO) a grafen karboxylu (CXYG) (Lammel *et al.*, 2015). Tyto dva použité deriváty grafenu byly studovány již v minulosti, kdy bylo prokázáno, že mohou spontánně procházet plasmatickou membránou a akumulovat se v cytosolu buněk. K tomuto experimentu byla také použita buněčná linie PLHC-1 (Lammel a Navas, 2014). Výsledky studie potvrdily schopnost GO a CXYG procházet plasmatickou membránou i jejich akumulaci v cytosolu. Také byla prokázána jejich schopnost ovlivnit expresi cytochromu CYP1A. Výsledky dokazují, že účinek těchto grafenových derivátů závisí na chemické povaze agonisty AhR. Jako agonista AhR byl použit benzo(k)fluoranthen (BkF) a 3,3',4,4',5,5'-hexachlorbifenyl (PCB169). Jejich přítomnost vedla ke zvýšení indukce CYP1A mRNA a CYP1A katalytické aktivity v přítomnosti GO ve srovnání s agonisty samotnými (Lammel *et al.*, 2015).



Obr. č. 8: **Působení uhlíkových nanomateriálů na embrya *Danio rerio*.** Řádek *a* zobrazuje vystavení embryí působení MWCNTs, řádek *b* působení GO a řádek *c* působení rGO. Míra malformací je přímo úměrná zvyšujícím se koncentracím konkrétních nanočástic (obrázek převzat z Liu *et al.*, 2014).

Jelikož se AhR řadí, stejně jako VDR, mezi ligandem aktivované transkripční faktory a také se účastní důležitých fyziologických pochodů v lidském těle, vyvstává otázka, zda nanočástice GO neovlivňují funkci VDR podobně jako u AhR. V této bakalářské práci bylo cílem experimentů prokázat, zda mohou nanočástice GO ovlivnit funkci jaderného receptoru pro vitamín D.



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál a metody

#### 3.1.1 Biologický materiál

VDR-responzivní buněčná linie (IZ-VDR), která byla odvozena z buněk lidského karcinomu tlustého střeva. Výchozím materiálem při odvozování této linie byla střevní linie LS 180 (ECACC; 87021202), do které byl přenesen plasmid VDREI3\_SV40.pINL2.1[Nluc/Hygro]. Tento plasmid obsahoval tři kopie VDREs, gen pro luciferázu (NanoLuc) a gen rezistence na hygromycin (Bartoňková *et al.*, 2016).

#### 3.1.2 Materiál

- 96 jamkové kultivační destičky (TPP, Švýcarsko)
- 96 jamkové černé destičky pro měření luminiscence (NUNC, Dánsko)
- sérologické pipety 0,1 – 2ml, 1 – 5ml, 1 – 10ml, 1 – 25ml (TPP, Švýcarsko)
- automatické pipety 0,1 – 2,5μl, 0,5 - 10μl, 2 - 20μl, 20 - 200μl, 10 - 100μl, 100 - 1000μl (Eppendorf, Německo)
- multikanálové pipety 0,5 - 10μl, 30 - 300μl, 20 - 200μl (Eppendorf, Německo)
- plastové špičky 0,1 - 10μl, 10 - 200μl, 100 - 1000μl (Eppendorf, Německo)
- pipetor FastPette (Labnet, USA)
- buničina (Tork, Švédsko)
- kultivační lahev o obsahu 15ml (TPP, Švýcarsko)
- kultivační lahev o obsahu 165ml (TPP, Švýcarsko)
- Petriho misky (TPP, Švýcarsko)
- Bürkerova komůrka (Assistent, Německo)
- krycí sklíčka 22x22mm (Menzel Gläser, Německo)
- plastové zkumavky o objemech 15 a 50ml (TPP, Švýcarsko)
- plastové mikrozukavky o objemech 0,5ml, 1,5ml, 2ml (BIOplastics, Holandsko)
- plastové stojany na zkumavky a mikrozukavky (TPP, Švýcarsko)

#### 3.1.3 Chemikálie

- komerční médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma Aldrich, D6546, Česká republika)
- fetální bovinní sérum (Sigma Aldrich, F6178, Česká republika)

- fetální bovinní sérum charcoal stripped (Sigma Aldrich, F6765, Česká republika)
- antibiotika penicilin a streptomycin (Sigma Aldrich, P4333, Česká republika)
- L-glutamin (Sigma Aldrich, F6178, Česká republika)
- neesenciální aminokyseliny (Gibco, 11140-035, Velká Británie)
- 0,25% trypsin-EDTA (Sigma Aldrich, T4049, Česká republika)
- fosfátový pufr PBS (Gibco, 10010031, USA)
- dimethylsulfoxid (Lach-Ner s.r.o., 20022-CT0, Česká republika)
- 75% ethanol (Sigma Aldrich, 459844, Česká republika)
- deionizovaná voda (dH<sub>2</sub>O)
- Triton X-100 (Serva, 37240, Velká Británie)
- dimethylsulfoxid (Sigma Aldrich, D8418, Česká republika)
- trypanová modř (0,4% Trypan blue v PBS)
- antibiotikum hygromycin B 50mg.l<sup>-1</sup> (Sigma Aldrich, H7772, Česká republika)
- Reporter Lysis Buffer (Promega, E3971, USA)
- Nano-Glo® Luciferase Assay Substrate (Promega, N1113A, USA)
- Nano-Glo® Luciferase Assay Buffer (Promega, N112A, USA)
- grafen oxid o velikosti částic 50-200nm, 200-500nm a >500nm (Bimake, B51211, B51221, B51231, Německo)
- 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (Sigma, D1530-10UG, Česká republika)
- MTT činidlo (Sigma Aldrich, M2128, Česká republika)
- Isorapid Spray (Schafferová s.r.o., OC21025, Česká republika)

### 3.1.4 Přístroje

- laminární box Labculture® (ESCO, Singapur)
- digitální mikroskop (Novel Optics, Čína)
- vodní lázeň LCB22D (Daihan LabTech, Jižní Korea)
- spektrofotometr Infinite M200 (Tecan Trading AG, Švýcarsko)
- hlubokomrazicí box MDF-U53V (Sanyo, Japonsko)
- vortex Reax top (Heidolph, Německo)
- inkubátor Mitre 4000 (Conterm, Nový Zéland)
- aspirátor FTA-1 (Biosan, Litva)
- třepačka Mini-Rocker Shaker MR-1 (Biosan, USA)
- Software Scope Image 9.0

### **3.1.5 Metodika práce**

V experimentální části byla zjišťována hodnota cytotoxického působení grafen oxidu na VDR-responzivní buněčnou linii metodou MTT. Následně byla stanovena transkripční aktivita VDR v přítomnosti grafen oxidu metodou Gene reporter assay. Buňky VDR-responzivní buněčné linie byly udržovány v nativním stavu v kultivačních lahvích při 37°C, CO<sub>2</sub> 5% a vlhkosti 95%.

#### **3.1.5.1 Příprava kultivačního média**

Pro začátek experimentu je nutné připravit živná média pro buňky. Do komerčního DMEM média o objemu 500ml přidáme 5ml L-gluaminu (-20°C), 5ml směsi antibiotik penicilin/streptomycin (-20°C), 5ml neesenciálních aminokyselin a 50ml FBS (-20°C). Všechny komponenty je potřeba předeřhát ve vodní lázni na teplotu 37°C. Druhou zásobní láhev s médiem připravíme stejným způsobem, jen s tím rozdílem, že přidáme místo obyčejného FBS 50ml FBS-CS, čili charcoal stripped. Toto FBS bylo přečištěno aktivním uhlím, čímž byly odstraněny hormony, které by mohly ovlivnit výsledek experimentu. Jedná se o FBS, které bylo hormonálně inaktivováno. Médium s takto přečištěným sérem používáme při celém průběhu experimentu. Při pouhém udržování buněk v kultivační lahvi používáme obyčejné sérum, které nebylo přečištěno aktivním uhlím. Po celou dobu pracujeme ve sterilním laminárním boxu.

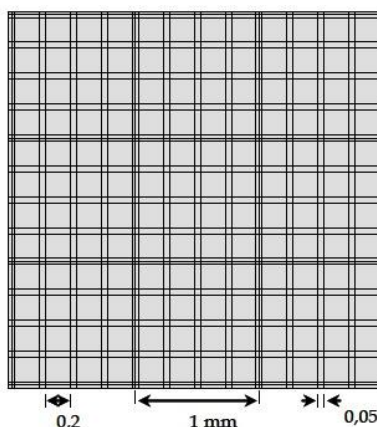
#### **3.1.5.2 Pasážování buněk**

Pasážování je proces, který se využívá k naředění buněčné suspenze a zabraňuje tak přemnožení buněk v kultivačním médiu. Buňky byly pasážovány zpravidla každý třetí den a celý proces se prováděl sterilně v laminárním boxu. Před začátkem samotného pasážování je nutné předeřhát DMEM médium, PBS a trypsin ve vodní lázni na 37°C. Kultivační lahev s buněčnou suspenzí přeneseme z inkubátoru do sterilního laminárního boxu. Pomocí odsávačky odsajeme staré kultivační médium. Buňky promyjeme přidáním 5ml PBS a následně roztok opět odsajeme. Přidáme 1ml 0,25% trypsinu, kultivační lahev uzavřeme a přeneseme do inkubátoru. Trypsin necháme působit na buňky po dobu 4 minut, aby došlo k rozrušení kontaktu adherentních buněk se dnem kultivační lahve. Po uplynutí této doby přeneseme kultivační lahev zpět do laminárního boxu a přidáme k buňkám 9ml nového kultivačního média. Opětovným nasáváním a vypouštěním suspenze pipetou rozsuspendujeme shluky buněk. Celý objem přeneseme do sterilní 50ml zkumavky. Ze suspenze odebereme do plastové

mikrozkumavky 10 $\mu$ l pro následné počítání buněk a 3ml, které přeneseme na dno kultivační lahve. Doplníme 17ml nového kultivačního média, kultivační lahev přeneseme zpět do inkubátoru a necháme inkubovat při teplotě 37°C, vlhkosti 95% a CO<sub>2</sub> 5%. Proces opakujeme opět po třech dnech. Jednou za týden přidáme k buněčné suspenzi také selekční antibiotikum hygromycin B (HgB) o výsledné koncentraci v roztoku 0,2mg.l<sup>-1</sup>.

### 3.1.5.3 Počítání buněk a vysetí na kultivační destičku

Při procesu počítání buněk pracujeme mimo sterilní laminární box. K odebraným 10 $\mu$ l buněčné suspenze v mikrozkumavce přidáme 90 $\mu$ l roztoku trypanové modři a celou suspenzi propipetujeme. Na Bürkerovu komůrku (obr. 9) nanese přibližně 10 $\mu$ l roztoku a pod mikroskopem spočítáme počet živých buněk v deseti čtvercích podle následujícího obrázku. Živé buňky nejsou schopny do svého intracelulárního prostoru vpustit barvivo (trypanovou modř) a tím pádem zůstávají neobarveny. Naopak mrtvé buňky trypanová modř zabarví. Pod mikroskopem tedy počítáme bílé (živé) buňky. Spočítáme množství buněk v 1ml suspenze a vypočítáme množství buněčné suspenze potřebné pro experiment. K vysetí buněk na jednu 96 jamkovou destičku budeme potřebovat na každou jamku 25000 buněk v objemu 200 $\mu$ l, čili na celou destičku budeme potřebovat 2,5 milionu buněk, pokud připočítáme i rezervu. Buňky vysejeme na destičku v potřebném objemu dle výpočtů.



Obrázek č. 9: **Bürkerova komůrka**. Počítací síť tvoří devět velkých čtverců, jejichž hrana měří 1mm (plocha 1mm<sup>2</sup>). Každý z velkých čtverců je rozdělen dvojitými čarami na skupinu malých čtverců o ploše 0,04mm<sup>2</sup>. Přikrytím komůrky krycím sklem vznikne prostor hluboký 0,1mm. Při počítání počítáme buňky v 10ti velkých čtvercích, spočítáme aritmetický průměr a následně vypočítáme množství buněk v 1ml suspenze. Pokud se buňky nacházejí na dvojitých čarách, počítáme jen ty, které se nacházejí na levé a horní hraně čtverce (převzato z Frébertová, 2016).

Příklad výpočtu:

- počet buněk v jednotlivých čtvercích:  
24, 26, 27, 28, 22, 28, 11, 27, 23, 21 = 237
- aritmetický průměr 23,7

Průměr  $23,7 \times 10^4$  určuje množství buněk v 1ml suspenze. Výsledek posuneme o jedno desetinné místo a získáme  $2,4 \cdot 10^5$ . Hodnotu vynásobíme faktorem ředění (10) a výsledkem je  $2,4 \times 10^6$ .

Jedna destička se skládá z 96 jamek a v každé jamce potřebujeme mít 25000 buněk. Připočteme relativní chybu pipetování a budeme počítat s množstvím 120 jamek. Na množství 120 jamek budeme potřebovat  $3 \cdot 10^6$  buněk. Do jedné jamky aplikujeme objem 200 $\mu$ l, čili celkový objem pro 120 jamek bude 24ml. Potřebné množství buněčné suspenze a nového FBS-CS DMEM média vypočítáme pomocí trojčlenky (obr. č. 10).

$$x = \frac{2,4 \cdot 10^6}{3 \cdot 10^6} = 1,25ml$$

Obr. č. 10: Výpočet objemu buněčné suspenze potřebné k experimentu

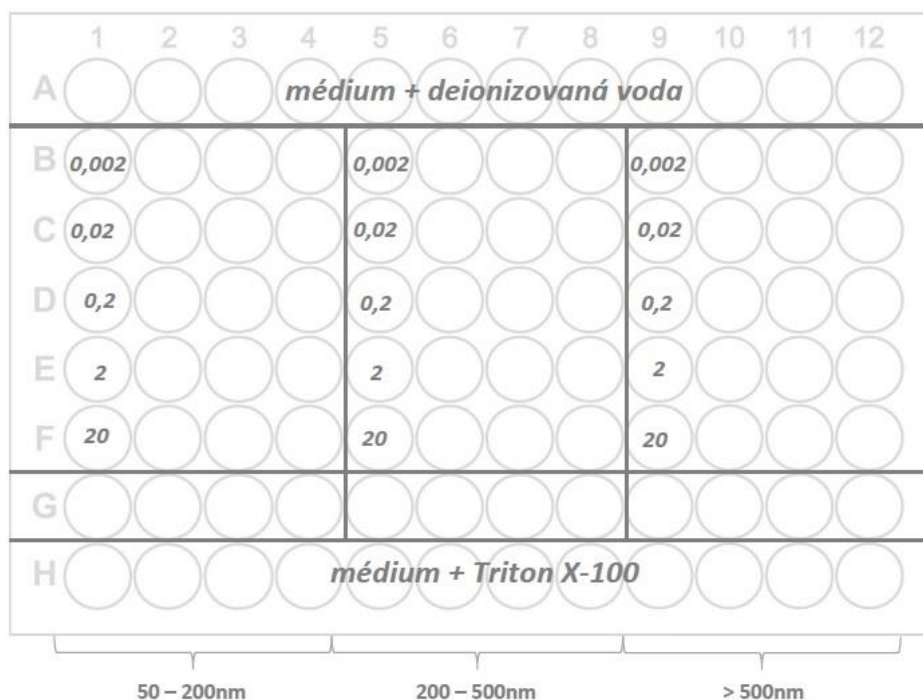
Pomocí výpočtu jsem zjistila, že v tomto experimentu bude potřeba 1,25ml buněčné suspenze. Toto množství odečtu od celkového objemu 24ml, což se rovná 22,7ml. Spočítala jsem množství buněčné suspenze potřebné k experimentu a množství potřebného FBS-CS DMEM média.

V laminárním boxu smícháme daný obsah buněčné suspenze a FBS-CS DMEM média. Pomocí serologické pipety rozsuspendujeme shluky buněk. Celou suspenzi připravenou k nanášení na kultivační destičku přelijeme do Petriho misky a pomocí multikanálové pipety nanášíme do každé jamky 200 $\mu$ l. Následně destičku uzavřeme a přeneseme do inkubátoru. Stabilizujeme 24h při 37°C, 5% CO<sub>2</sub> a vlhkosti 95%.

### 3.1.5.4 Treatment

Po 24h stabilizaci buněk v inkubátoru přichází na řadu tzv. treatment, čili přidání chemikálií k buňkám. Celkem budeme pracovat se třemi různými velikostmi částic grafen oxidu a pěti různými koncentracemi. Použijeme částice grafen oxidu (GO) o velikosti 50 – 200nm, 200 – 500nm a částice větší než 500nm. Nejdříve si naředíme

potřebné koncentrační řady GO. Pracovat budeme s koncentracemi  $0,002\mu\text{g.ml}^{-1}$ ,  $0,02\mu\text{g.ml}^{-1}$ ,  $0,2\mu\text{g.ml}^{-1}$ ,  $2\mu\text{g.ml}^{-1}$ , a  $20\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Každý zásobní roztok GO ( $0,2\mu\text{g.ml}^{-1}$ ,  $2\mu\text{g.ml}^{-1}$ ,  $20\mu\text{g.ml}^{-1}$ ,  $200\mu\text{g.ml}^{-1}$  a  $2000\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) nejdříve zvortexujeme a poté naředíme na potřebnou koncentraci přidáním FBS-CS DMEM média. Ředění provádíme tak, že pro jednotlivé koncentrace přidáme  $891\mu\text{l}$  FBS-CS DMEM média k  $9\mu\text{l}$  zásobního roztoku GO a každou koncentraci vysejeme v kvadruplikátu. Kultivační destičku přeneseme z inkubátoru do laminárního boxu. Pomocí odsávačky odsajeme staré médium a do každé jamky přidáme  $200\mu\text{l}$  předehřátého média s rozpuštěnými látkami o příslušných koncentracích (viz obrázek č. 11). Jako negativní kontrolu použijeme čisté FBS-CS DMEM médium s deionizovanou vodou v poměru 100:1. K negativní kontrole nepřidáváme žádné látky, proto zde předpokládáme normální růst buněk. Jako pozitivní kontrolu použijeme FBS-CS DMEM médium s přidáním látky triton X-100 (oktylfenol etoxylát) o koncentraci 2%. Tato látka má na buňky toxický účinek a způsobuje jejich úmrtí. Po přidání chemikálií kultivační destičky uzavřeme, přeneseme zpět do inkubátoru a inkubujeme 24h při  $37^{\circ}\text{C}$ , vlhkosti 95% a  $\text{CO}_2$  5%.



Obrázek č. 11: **Kultivační destička s nanesenými látkami.** V prvním řádku (A) je negativní kontrola nanesená ve 12ti jamkách a v posledním řádku (H) je nanášena kontrola pozitivní (2% Triton X-100), taktéž ve 12ti jamkách. Jednotlivé koncentrace GO byly nanášeny v kvadruplikátu (řádky B, C, D, E a F). Sloupce 1-4 označují oblast, kde byly nanášeny koncentrace GO o velikosti částic 50-200nm, sloupce 5-8 označují oblast, kde byly nanášeny koncentrace GO o velikosti částic 200-500nm a sloupce 9-12 označují oblast, kde byly nanášeny koncentrace GO o velikosti částic >500nm. K buňkám v řádku G nebyly přidány žádné látky. Koncentrace GO jsou uvedeny v  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ .

### 3.1.5.5 MTT test

Nejdříve je nutné zjistit, zdali testovaná látka, v mém případě grafen oxid, nemá na použitou buněčnou linii toxické účinky. Jediná část práce, ke které je nutné sterilní prostředí a práce v laminárním boxu, je příprava MTT činidla. Připravíme jej v 15ml plastové zkumavce smícháním 1ml zásobního MTT o koncentraci  $3\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a 9ml předeřátého FBS-CS DMEM média. Poté plastovou zkumavku s připraveným roztokem uzavřeme, vyjmeme z laminárního boxu a další kroky již provádíme v nesterilním prostředí mimo laminární box.

Z inkubátoru vyjmeme kultivační destičku, opatrně vyklepneme staré médium do výlevky. Vzhledem k tomu, že buňky jsou adherovány na dně jamek, kde zůstávají přichyceny, odstraníme vyklepnutím pouze staré médium a ne buňky samotné. Destičku opatrně osušíme buničinou. Multikanálovou pipetou promyjeme buňky  $100\mu\text{l}$  PBS. PBS neaplikujeme přímo na buňky, aby nedošlo k jejich poškození, ale necháme stékat volně po stěnách. Po promytí PBS opět vyklepneme do výlevky a destičku osušíme buničinou. Multikanálovou pipetou napipetujeme do každé jamky  $100\mu\text{l}$  připraveného MTT činidla, kultivační destičku uzavřeme, přeneseme do inkubátoru a necháme inkubovat  $\frac{1}{2}$  až 1h při  $37^\circ\text{C}$ , 95% vlhkosti a 5%  $\text{CO}_2$ , dokud se nevytvoří modrofialové krystalky formazanu. Tento kolorimetrický test je založen na tom, že v živých buňkách fungují mitochondriální dehydrogenázy, které redukují žlutý solubilní 3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) na nerozpustný formazan, který se projeví tvorbou modrofialových krystalků. Tyto krystalky následně rozpustíme přidáním  $30\mu\text{l}$  rozpouštědla DMSO, které necháme působit po dobu 5 minut. Výsledky vyhodnocujeme spektrofotometricky při vlnové délce 565nm pomocí přístroje Tecan I-Control (Infinite 200). Čím je naměřená hodnota absorbance nižší, tím vyšší je toxicita přidaných látek, čili grafen oxidu. Při negativní kontrole, pouze čisté médium s deionizovanou vodou, předpokládáme přežití prakticky všech buněk, tím pádem bude hodnota naměřené absorbance vyšší a propustnost minimální. Naopak v případě pozitivní kontroly bude naměřená hodnota absorbance nízká a propustnost velká, což nám značí, že přidaná látka je pro buněčnou linii toxická. V průběhu MTT testu bylo také provedeno mikroskopické pozorování buněk VDR-responzivní buněčné linie a přidaných nanočástic GO. Fotografie byly zachyceny pomocí digitálního mikroskopu a programu Scope Image 9.0.

### 3.1.5.6 Gene reporter assay

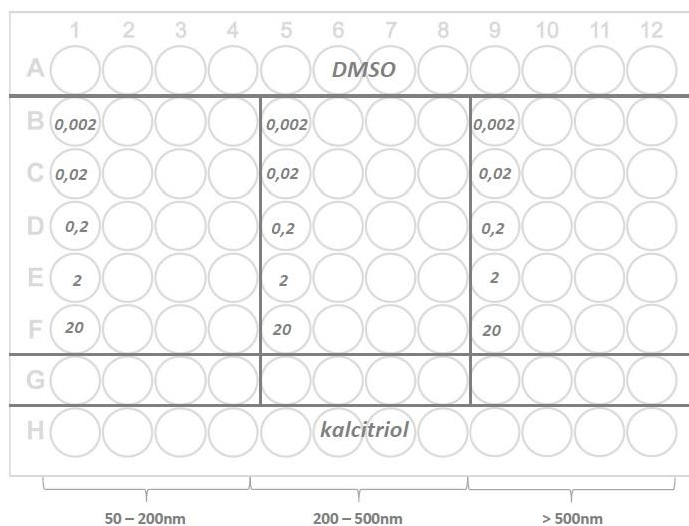
Metoda Gene reporter assay představuje druhou část experimentů. Touto metodou bylo prováděno testování transkripční aktivity příslušného receptoru, čili receptoru pro vitamín D. Testování bylo prováděno pomocí měření aktivity luciferázy, která přímo souvisí s aktivitou VDR. Reportérový plasmid má ve své struktuře zakódován specifickou vazebnou sekvenci pro VDR a gen pro luciferázu (NanoLuc). Tento reportérový plasmid je následně vložen do buňky. Reportérové geny jsou geny, jejichž expresi lze snadno detekovat a kvantitativně vyhodnocovat. Sekvence reportérového genu bývá umístěna za promotor studovaného genu. Reportérovým genem pro luciferázovou gene reporter assay je NanoLuc (Nluc). Po přidání substrátu (v tomto případě furimazinu) a ATP k buněčné suspenzi dochází k enzymatické reakci, jejímž výsledkem je viditelné záření. Hladina exprese reportérového genu přímo souvisí s transkripční aktivitou receptoru.

Postup při přípravě médií, pasážování i kultivaci buněk je shodný s předchozí přípravou na MTT test. Rozdíl však přichází ve fázi treatmentu, jelikož tento experiment budeme provádět ve dvou módech. Jedná se o mód agonistický, kdy testujeme pouze schopnost nanočástic GO aktivovat VDR receptor, a antagonistický, kdy k částčkám grafen oxidu přidáváme také aktivovanou formu vitamínu D<sub>3</sub> (1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, dále uváděn pod označením kalcitriol), který je přirozeným ligandem VDR a tento receptor aktivuje. Při antagonistickém působení sledujeme schopnost nanočástic GO inhibovat daný aktivovaný receptor. Při přípravě testování agonistického působení látek postupujeme stejně jako v předcházejícím případě při přípravě vzorků pro MTT test. Pro přípravu antagonistického módu postupujeme obdobně, ale navíc přidáme ke každé koncentraci GO kalcitriol (finální koncentrace 50 $\mu$ mol.l<sup>-1</sup>) pro aktivaci receptoru. Pro každý mód použijeme jednu kultivační destičku. Jako negativní kontrolu použijeme čisté FBS-CS DMEM médium s přidaným DMSO v poměru 1000:1 a jako pozitivní kontrolu použijeme čisté FBS-CS DMEM médium s přidaným syntetickým kalcitriolem (50 $\mu$ mol.l<sup>-1</sup>) také v poměru 1000:1. Kultivační destička s nanosenými látkami je zobrazena na obrázku č. 12. Po tomto treatmentu vložíme uzavřenou kultivační destičku do inkubátoru a kultivujeme 24h při teplotě 37°C, vlhkosti 95% a CO<sub>2</sub> 5%. Celá práce až do tohoto bodu probíhá ve sterilních podmínkách v laminárním boxu. Následně bude provedena lýze buněk a měření luciferázové aktivity, kdy již není potřeba pracovat ve sterilních podmínkách.



Pro lyzování buněk je nutno připravit lyzační pufr smícháním zásobního roztoku 5x Reporter Lysis Buffer s deionizovanou vodou v poměru 1:4.

Kultivační destičku vyjmeme z inkubátoru, vyklepneme staré médium, osušíme buničinou a pomocí multikanálové pipety aplikujeme do každé jamky 30 $\mu$ l připraveného lyzačního pufru. Destičku uzavřeme, přelepíme lepicí páskou a vložíme do -80°C na minimálně 20min. Jakmile dojde k úplnému zmražení lyzačního pufru, vyjmeme destičku a přeneseme ji z -80°C na kývačku a při pokojové teplotě necháme volně roztát. Mezitím si připravíme substrát pro měření luciferázové aktivity. Nano-Glo® Luciferase Assay buffer necháme rozmrazit při pokojové teplotě, následně zvortexujeme a smícháme 5ml Assay bufferu a 100 $\mu$ l Nano-Glo® Luciferase Assay substrátu. Připravíme si černou destičku pro měření luciferázové aktivity a do každé jamky napipetujeme 10 $\mu$ l lyzátu buněčné linie a přidáme 10 $\mu$ l připraveného substrátu pro měření luciferázové aktivity. Pomocí přístroje Tecan I-Control (Infinite 200) měříme úroveň luminiscence, která určuje aktivitu luciferázy. Enzym luciferáza patří mezi oxidoreduktázy. Konkrétně tento typ luciferázy označovaný jako NanoLuc (Nluc) katalyzuje oxidaci substrátu furimazinu za tvorby viditelného světla. Tvoří se světelný signál, který je detekován luminometrem. Emise světla je přímo úměrná aktivitě luciferázy. Měřením zjistíme, jak aplikované látky působily na aktivitu luciferázy a také jak byl aktivní VDR.

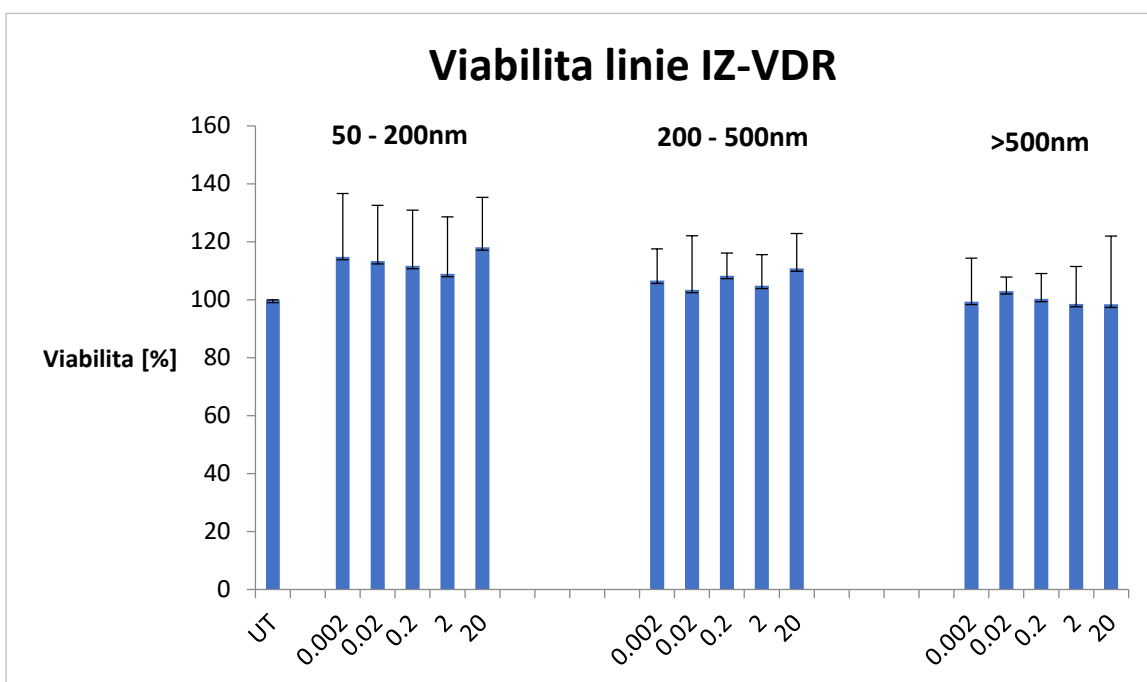


Obrázek č. 12: **Kultivační destička s nanesenými látkami.** V prvním řádku (A) je nanasena negativní kontrola, kterou představuje DMSO s FBS-CS médiem v poměru 1:1000. V posledním řádku (H) se nachází pozitivní kontrola, syntetický kalcitriol s FBS-CS DMEM médiem v poměru 1:1000. Jednotlivé koncentrace GO byly nanášeny obdobně, jako při MTT testu. Tento obrázek znázorňuje nanasení látek při agonistickém módu. V případě antagonistického módu nanášíme látky stejným způsobem s tím rozdílem, že k jednotlivým koncentracím GO přidáme příslušné množství syntetického kalcitriolu.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 MTT test

Pomocí MTT testu byla zjišťována cytotoxicita zkoumaných sloučenin. Testovány byly buňky VDR-responzivní buněčné linie (IZ-VDR), které byly vystaveny působení jednotlivých koncentrací grafen oxidu ( $0,002\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) o různé velikosti částic (50 – 200nm, 200 – 500nm, >500nm). Vyhodnocení experimentu probíhalo po 24h působení látek na buňky pomocí spektrofotometru. Měření bylo prováděno při vlnové délce 565nm. Z výsledků jednotlivých experimentů byla stanovena procentuální viabilita buněk. Výsledky ukazují, že ani v jednom případě použitých koncentrací nepozorujeme žádný výrazný pokles životnosti buněk. Viabilita buněk VDR-responzivní buněčné linie není ve většině případů nižší než 100%. Hodnotu 100% představuje negativní kontrola, čili čisté FBS-CS DMEM médium a deionizovaná voda, v grafu označená jako UT (untreated). K negativní kontrole nebyly přidávány žádné látky, které by ovlivňovaly životnost buněk. U použitých částic grafen oxidu o velikosti 50-200nm je pozorovatelné mírné zvýšení viability buněk. Toto zvýšení však

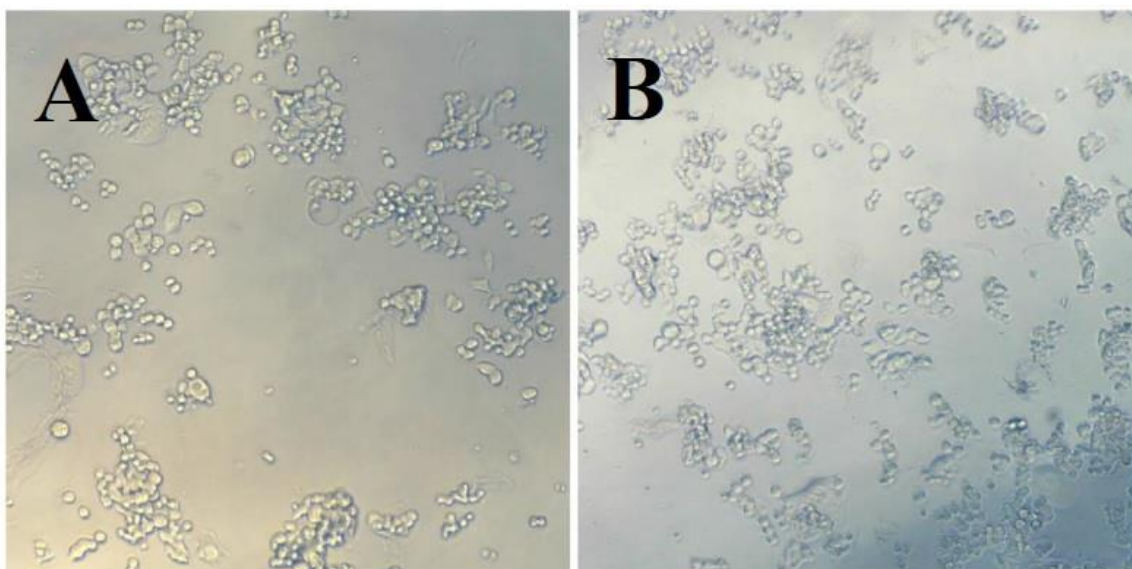


Graf 1: **Výsledky MTT testu.** Tento graf znázorňuje procentuální viabilitu buněk VDR-responzivní buněčné linie po vystavení účinku nanočástic GO. Výsledky jsou vztažené k negativní kontrole (médium a  $\text{dH}_2\text{O}$ ), která, vzhledem k tomu, že k ní nebyly přidávány žádné látky a tudíž zde předpokládáme přežití všech buněk, představuje hodnotu 100% viability. Koncentrace použitých nanočástic GO jsou uvedeny v jednotkách  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

nebylo vyhodnoceno jako statisticky významné. Z výsledků můžeme usoudit, že žádná z použitých koncentrací částic grafen oxidu nepůsobí na VDR-responzivní buněčnou linii toxicky a tudíž mohou být pro další metodu použity všechny testované koncentrace. Celkem bylo s každou koncentrací GO provedeno sedm nezávislých experimentů a ze získaných hodnot byl sestrojen graf (graf č. 1).

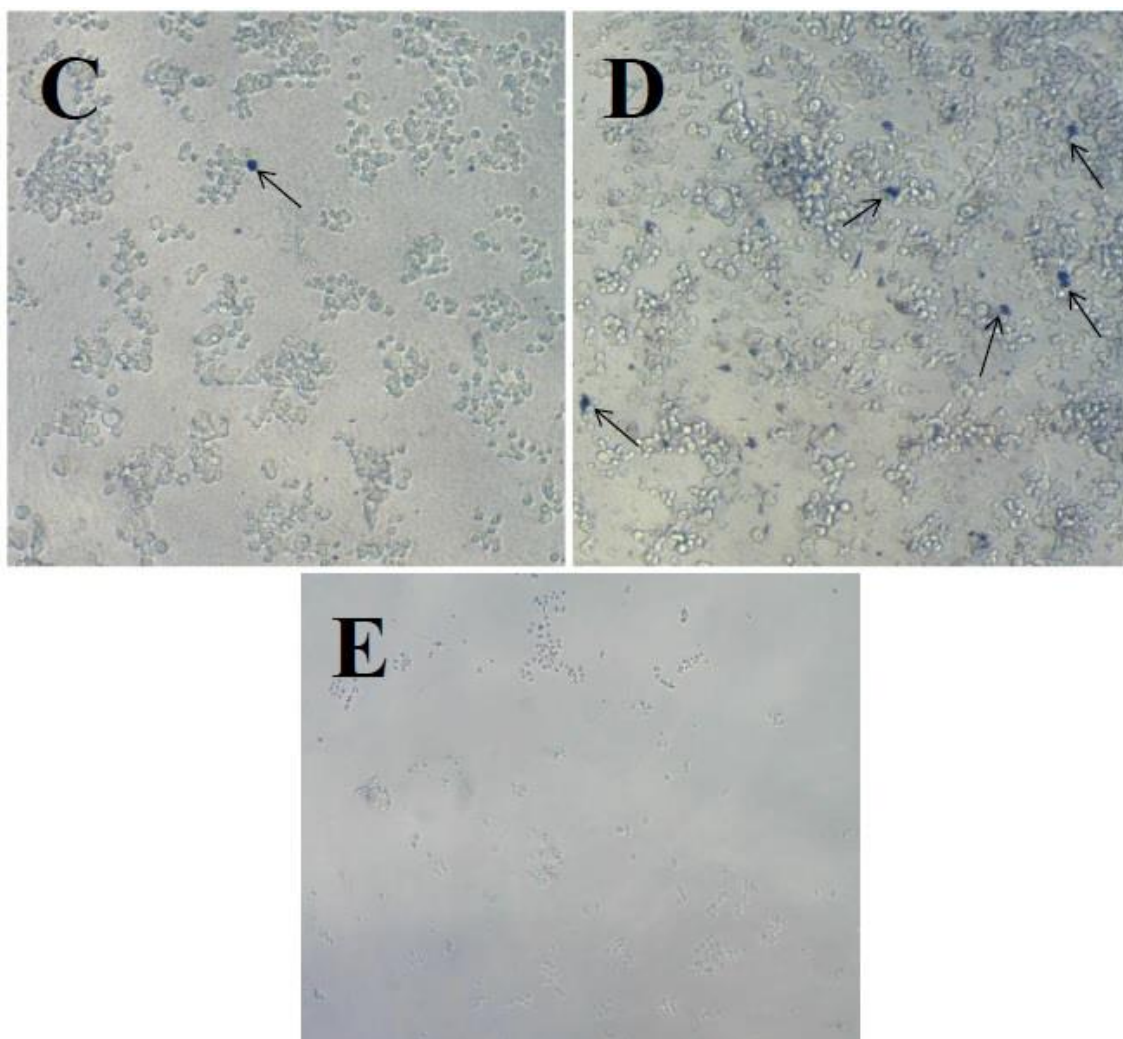
## 4.2 Mikroskopické pozorování částic GO

V průběhu experimentů bylo zjištěno, že větší velikosti částic GO (>500nm) jsou dobře viditelné pod mikroskopem. Tyto částice byly vyfotografovány pomocí digitálního mikroskopu a programu Software Scope Image 9.0. Fotografie byly pořízeny v průběhu MTT testu po 24h působení nanočástic GO na buňky. Obrázek č. 13 zachycuje negativní kontrolu (A), čili čisté FBS-CS DMEM médium s dH<sub>2</sub>O v poměru 100:1. Vidíme pouze adherované buňky VDR-responzivní buněčné linie. Část B zachycuje buňky vystavené působení nanočástic GO o velikosti 50-200nm a koncentraci 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Také zde vidíme pouze adherované buňky použité buněčné linie. Část C na obrázku č. 14 zachycuje buňky vystavené působení nanočástic GO o velikosti 50-200nm a koncentraci 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Zde jsou již patrné malé tmavě modré struktury GO. Část D zobrazuje buňky, které byly vystaveny nejvyšším použitým koncentracím GO, čili částicím o velikosti >500nm



Obr. č. 13: **VDR-responzivní buněčná linie vystavená působení nanočástic GO.** Část A zachycuje negativní kontrolu, kde vidíme pouze adherované buňky bez GO. Část B zachycuje buňky vystavené působení nanočástic GO o velikosti 50-200nm a koncentraci 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , avšak nanočástice GO ještě nejsou pozorovatelné.

a koncentraci  $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Na tomto obrázku je již jasně viditelné velké množství nanočástic GO. Poslední část E znázorňuje pozitivní kontrolu, čili buňky vystavené působení látky Triton X-100 o koncentraci 2%. Tato látka působí na buňky toxicky, proto vidíme již v podstatě rozložené buňky. Tyto fotografie dokazují, že po vystavení buněk působení nanočástic GO nebyla jejich morfologie nijak pozměněna. Potvrzuje se tím tvrzení získané experimentálně pomocí MTT testu, že žádné testované koncentrace GO nepůsobí na buňky toxicky a pro metodu Gene reporter assay mohou být použity všechny testované koncentrace.



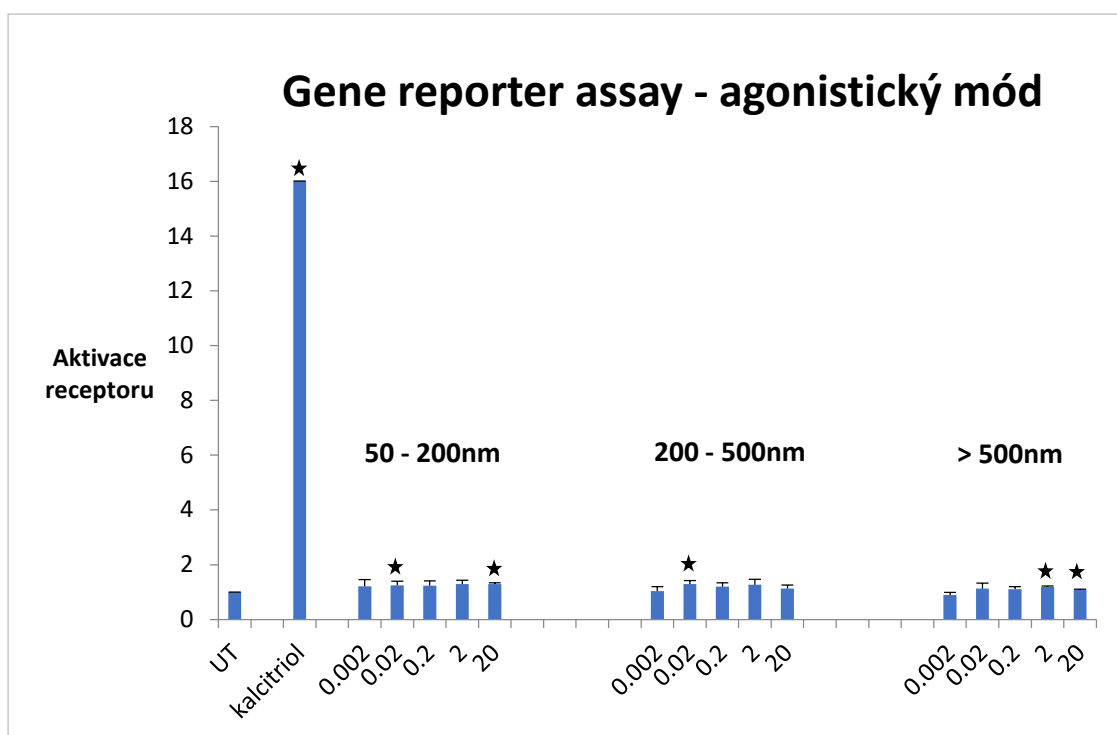
Obr. č. 14: **VDR-responzivní buněčná linie vystavená působení nanočástic GO.** Část C znázorňuje buňky vystavené částicím GO o velikosti 200-500nm a koncentraci  $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Zde již pozorujeme struktury GO označené šipkou. Část D zachycuje buňky vystavené působení částic GO o velikosti  $>500\text{nm}$  a koncentraci  $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a zde jsou jasně pozorovatelné částice GO označené šipkou. Část E zobrazuje pozitivní kontrolu a v podstatě rozložené buňky.

### 4.3 Gene reporter assay

Měření luciferázové aktivity řadíme k nepřímým metodám měření aktivace receptorů. Nejedná se tudíž o testování aktivity receptorů, ale testuje se aktivita luciferázy. Úroveň aktivace receptoru pro vitamín D určíme jako poměr luciferázové aktivity v konkrétním vzorku k negativní kontrole, čili k čistému FBS-CS DMEM médiu s DMSO v poměru 1000:1. Buňky VDR-responzivní buněčné linie byly vystaveny působení nanočástic GO o velikosti 50 – 200nm, 200 – 500nm a >500nm a koncentracích  $0,002\mu\text{g.ml}^{-1}$ ,  $0,02\mu\text{g.ml}^{-1}$ ,  $0,2\mu\text{g.ml}^{-1}$ ,  $2\mu\text{g.ml}^{-1}$ ,  $20\mu\text{g.ml}^{-1}$ . V agonistickém módu byla testována schopnost nanočástic GO aktivovat receptor VDR. V antagonistickém módu byla testována schopnost GO ovlivňovat již aktivovaný receptor zvoleným agonistou, čili kalcitriolem. Výsledky byly vyhodnocovány po 24h působení látek na buňky VDR-responzivní buněčné linie. Statisticky významné hodnoty byly stanovovány z výsledků experimentů na základě Studentova T-testu. Aby mohla být daná hodnota považována za statisticky významnou, musí být výsledek T-testu  $p < 0,05$ .

#### 4.3.1 Agonistický mód – aktivace transkripční aktivity VDR

Při agonistických měřeních byla sledována schopnost grafen oxidu aktivovat VDR. Negativní kontrolu představuje DMSO v FBS-CS DMEM médiu v poměru 1:1000. Jako pozitivní kontrola byl zvolen syntetický kalcitriol o koncentraci  $50\mu\text{mol.l}^{-1}$  v FBS-CS DMEM médiu v poměru 1:1000. Byly provedeny celkem čtyři nezávislé experimenty. Výsledky jednotlivých experimentů byly zprůměrovány a vyneseny do grafu (graf č. 2). Výsledky jsou uvedeny v násobcích negativní kontroly (FI; fold induction), která představuje pro negativní kontrolu (UT) hodnotu 1. Následně byl proveden Studentův T-test, aby prokázal, které hodnoty mohou být považovány za statisticky významné. Ze získaných dat lze vyčíst, že použité nanočástice GO signifikantně aktivují VDR receptor v pěti různých koncentracích, ale ve srovnání s pozitivní kontrolou je aktivace zanedbatelná. Signifikantní aktivace byla zaznamenána v případě působení nanočástic GO o velikosti 50-200nm při koncentracích  $0,2\mu\text{g.ml}^{-1}$  a  $20\mu\text{g.ml}^{-1}$ , dále při působení nanočástic GO o velikosti 200-500nm při koncentraci  $0,02\mu\text{g.ml}^{-1}$  a při působení nanočástic GO o velikosti >500nm při koncentracích  $2\mu\text{g.ml}^{-1}$  a  $20\mu\text{g.ml}^{-1}$ . V ostatních případech použitých koncentrací nebyla signifikantní aktivace VDR zaznamenána a hodnoty se pohybovaly na úrovni negativní kontroly. Pozitivní kontrola, syntetický kalcitriol, průkazně zvýšil aktivitu luciferázy, což značí aktivaci VDR. Hodnoty pozitivní kontroly dosahují FI 16.

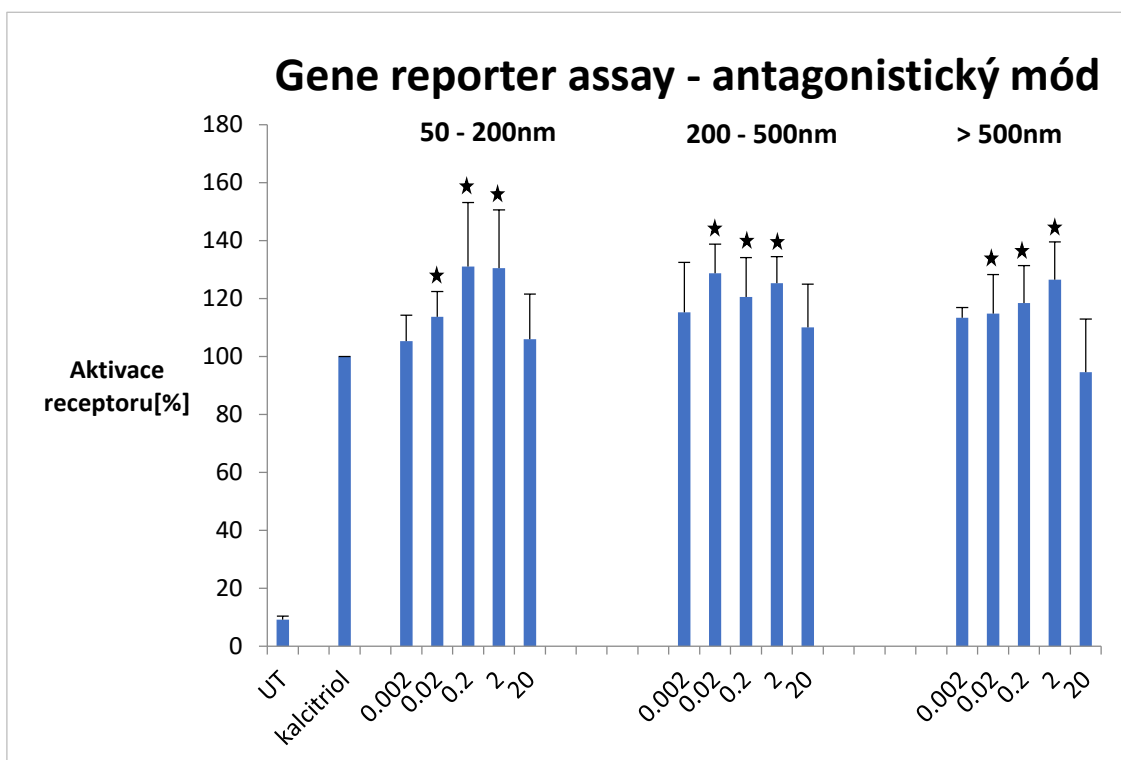


Graf č. 2: **Agonistické působení látek.** VDR-responzivní buněčná linie byla vystavena působení nanočástic GO o různé velikosti a různých koncentracích. Po 24h působení této látky byla měřena aktivita luciferázy, která je přímo úměrná míře aktivace VDR. Výsledky jsou průměry čtyř nezávislých experimentů a jsou vztaženy vzhledem k negativní kontrole označené UT, která představuje hodnotu 1. Ostatní hodnoty jsou jejími násobky. Pozitivní kontrolu představuje kalcitriol. Pomocí Studentova T-testu byly určeny statisticky významné hodnoty ( $p < 0,05$ ), které jsou označeny symbolem \*. Koncentrace částic GO jsou uvedeny v jednotkách  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ .

#### 4.3.2 Antagonistický mód – inhibice transkripční aktivity VDR

Při antagonistických měřeních byla sledována schopnost látek inhibovat již aktivovaný VDR v přítomnosti syntetického kalcitriolu, který působí jako přirozený ligand VDR a tento receptor aktivuje. Pokud by použité látky vykazovaly antagonistickou aktivitu, způsobily by inhibici aktivovaného VDR. Jako pozitivní kontrola byl zvolen syntetický kalcitriol o koncentraci  $50\mu\text{mol.l}^{-1}$  v FBS-CS DMEM médiu v poměru 1:1000. Jako negativní kontrola byl použit DMSO v FBS-CS DMEM médiu v poměru 1:1000. Celkem bylo provedeno sedm nezávislých experimentů antagonistického působení nanočástic GO na VDR-responzivní buněčnou linii. Výsledky byly vyhodnocovány po 24h působení látek, zprůměrovány a vyneseny do grafu (graf č. 3). Výsledky jsou uvedeny v procentech a jsou vztažené k pozitivní kontrole, čili kalcitriolu, která





Graf č. 3: **Antagonistické působení látek.** VDR-responzivní buněčná linie byla vystavena působení nanočástic GO o různé velikosti a různých koncentracích s přidáním syntetického kalcitriolu pro aktivaci receptoru. Po 24h působení látek byla měřena aktivita luciferázy. Výsledky jsou průměry sedmi nezávislých experimentů a jsou vztaženy vzhledem k pozitivní kontrole (kalcitriol), která představuje hodnotu 100% aktivace. Negativní kontrola je označena jako UT. Pomocí Studentova T-testu byly určeny statisticky významné hodnoty ( $p < 0,05$ ), které jsou označeny symbolem \*. Koncentrace částic GO jsou uvedeny v jednotkách  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

představuje hodnotu 100% aktivace VDR. Následně byl proveden Studentův T-test, aby prokázal, které hodnoty mohou být považovány za statisticky významné a signifikantně ovlivňují aktivitu receptoru. Z výsledků lze usoudit, že jen určité použité koncentrace signifikantně ovlivňují funkci aktivovaného VDR. U všech použitých velikostí nanočástic GO (50-200nm, 200-500nm a >500nm) byl zaznamenán podobný trend – signifikantně ovlivňují aktivitu receptoru střední použité koncentrace GO  $0,02 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,  $0,2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  a  $2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  – signifikantní působení zbývajících použitých koncentrací ( $0,002 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  a  $20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) nebylo prokázáno. Výsledky ukazují, že žádná z použitých koncentrací GO signifikantně neinhibuje aktivitu VDR, naopak dochází k nárůstu jeho aktivace. Míra aktivace u středních koncentrací GO ( $0,02 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,  $0,2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  a  $2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) se pohybuje v rozmezí 120-130% vzhledem k pozitivní kontrole. Při použití nanočástic

GO o velikosti 50-200nm a koncentraci  $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  bylo zaznamenáno zvýšení aktivity VDR o 13%, v případě koncentrace  $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  o 31% a v případě koncentrace  $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  o 30%. Při použití nanočástic GO o velikosti 200-500nm a koncentraci  $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  bylo zaznamenáno zvýšení aktivity VDR o 29%, v případě koncentrace  $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  o 20% a v případě koncentrace  $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  o 25%. Při použití nanočástic GO o velikosti  $>500\text{nm}$  a koncentraci  $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  bylo zaznamenáno zvýšení aktivity VDR o 15%, v případě koncentrace  $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  o 18% a v případě koncentrace  $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  o 26%. Při sledování antagonistického působení nanočástic GO na VDR-responzivní buněčnou linii byl zaznamenán synergický efekt u všech použitých koncentrací. Výsledky ukazují, že žádná z použitých koncentrací nevykazuje antagonistickou aktivitu vůči aktivovanému VDR.



## 5 DISKUZE

Tato práce se zabývá účinkem nanočástic grafenu oxidu na aktivitu receptoru pro vitamin D (VDR). Tento receptor zaujímá významnou roli při určitých fyziologických pochodech, jako je nejen udržování homeostázy vápníku a fosforu v těle, ale také při regulačních procesech týkajících se např. imunitního systému. Testovány byly účinky částic GO o různé velikosti (50-200nm, 200-500nm a >500nm) s různými koncentracemi ( $0,002\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a  $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) na stabilně transfekovanou VDR-responzivní buněčnou linii (IZ-VDR). Cílem práce bylo prokázat, zda nanočástice GO mohou ovlivnit funkci tohoto receptoru a tím i významné regulační procesy, do kterých je zapojen. Experimentálně bylo zjišťováno pouze cytotoxické působení na VDR a schopnost daných látek tento receptor aktivovat či inhibovat na VDR-responzivní buněčné linii. Získané výsledky jsou specifické pouze pro použitou buněčnou linii, nikoli pro celý lidský organismus, jelikož nezahrnuje kompletní metabolické procesy probíhající v celém těle, které by mohly mít případný vliv na aktivitu daného receptoru. Tato otázka zůstává předmětem dalšího studia. Pokud by bylo prokázáno, že nanočástice GO negativně ovlivňují VDR, mohla by být narušena homeostáza vápníku či fosforu v lidském těle. Narušení takto významného fyziologického procesu by mohlo vést k hypovitaminóze, která by se mohla projevit jako rachitida či osteoporóza. V obou případech by byla zhoršena mineralizace kostí, jelikož vápník má pro jejich růst nezaměnitelný význam.

Jedním z modelových organismů pro studium toxického účinku nanočástic GO byly embrya získané z ryby Dánia pruhovaného (*Danio rerio*). Embrya byla vystavena účinkům nanočástic GO po dobu 24h. Statistická analýza získaných výsledků ukázala, že nanočástice GO mají na použítá embrya prokazatelně toxický účinek. Míra mortality byla přímo úměrná zvyšujícím se koncentracím použitých nanočástic. Toxický účinek byl prokázán jak experimentálně, tak pomocí mikroskopického pozorování, kdy byla jasně pozorovatelná změna morfologie použitých embryí při vystavení působení GO (Liu *et al.*, 2014). V této práci byl sledován cytotoxický účinek nanočástic GO na buňky VDR-responzivní buněčné linie, která byla odvozena z buněk lidského karcinomu tlustého střeva. Buňky byly vystaveny působení GO také po dobu 24h. Výsledky ukazují, že žádné použité koncentrace nanočástic GO nevykázaly toxický účinek vůči použité buněčné linii. Toto tvrzení bylo potvrzeno jak experimentálně pomocí MTT testu, tak následným mikroskopickým pozorováním, kdy nebyla pozorovatelná žádná

změna morfologie buněk. Různé toxické působení grafenových nanočástic může být dáno například tím, že jejich účinek byl sledován na různých organismech a také za použití různých typů buněk. Zatímco v případě ryby *Dania pruhoaná* byl sledován toxický účinek na embryích, v případě mé bakalářské práce byl toxický účinek sledován na lidských buňkách. V obou organismech probíhají různé metabolické procesy, které případně mohou toxické účinky jednotlivých látek ovlivňovat. To, že použité nanočástice GO nevykazují toxický účinek na buňky VDR-responzivní buněčné linie však neznamená, že nemohou působit toxicky na další buňky lidského těla. Předmětem dalšího studia může být například sledování vlivu působení grafenových nanočástic na buňky jiných buněčných liniích.

V předcházejících studiích již byla prokázána interakce mezi grafenovými deriváty a buňkami buněčné linie PLHC-1, která byla odvozena z hepatomu ryby Živoroděnky lesklé (*Poeciliopsis lucida*). Bylo zjištěno, že tyto částice spontánně procházejí plazmatickou membránou a akumulují se v cytosolu kultivovaných buněk (Lammel a Navas, 2014). Další navazující studie, při které byla také použita buněčná linie PLHC-1, se zabývala působením grafenových nanočástic (GO a CXYG) na aryluhlovodíkový receptor (AhR), který se také řadí mezi ligandem aktivované transkripční faktory, stejně jako VDR. Přítomnost těchto grafenových derivátů vedla ke zvýšení indukce mRNA a CYP1A katalytické aktivity ve srovnání s agonisty samotnými. Zvýšená katalytická aktivita byla zaznamenána při vystavení buněk působení nanočástic GO o koncentracích  $4\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a  $16\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Lammel *et al.*, 2015). Při studiu agonistického působení nanočástic GO na VDR v rámci mé bakalářské práce bylo zjištěno, že určité koncentrace nanočástic GO jsou také schopny tento receptor aktivovat, i když pouze do malé míry. I přes relativně malou schopnost aktivace VDR se však může jednat o důležitou informaci pro další výzkumy. Při sledování antagonistického působení nanočástic GO nebyla prokázána schopnost těchto částic inhibovat aktivovaný VDR v žádném případě použité koncentrace VDR, naopak byla pozorována jeho zvýšená aktivace oproti samotnému kalcitriolu, který byl zvolen jako pozitivní kontrola, jelikož je přirozeným agonistou VDR a tento receptor aktivuje. Výsledky potvrzují, že přítomnost grafenových nanočástic signifikantně zvýšila transkripční aktivitu VDR při středních použitých koncentracích. Metoda, která by mohla doplnit výsledky získané v rámci této práce, je např. PCR, která by umožnila získat bližší informace o expresi genů regulovaných VDR.

Vzhledem k tomu, že grafenové nanomateriály byly objeveny až v roce 2004 a jejich využívání ve spotřebitelských aplikacích je stále poměrně novinkou, nejsou ještě přesně prozkoumány všechny jejich účinky na živé organismy. Získané výsledky proto mohou představovat důležité informace pro další výzkumy. Pro experimenty byla použita VDR-responzivní linie, což je také poměrně nově transfekovaná buněčná linie. Proto neexistuje dosud žádná odborná publikace, která by se věnovala stejnému tématu. Další výzkumy by mohly vést k objasnění účinku grafenových nanočástic na jiné buňky lidského či živočišného organismu. Také VDR-responzivní buněčná linie představuje nový modelový systém, který může být použit v dalších studiích pro objasnění různých metabolických procesů.

## 6 ZÁVĚR

V mé bakalářské práci jsem se věnovala vlivu nanomateriálů, konkrétně částecek grafen oxidu, na transkripční aktivitu receptoru pro vitamín D s použitím VDR-responzivní buněčné linie.

V rámci experimentální části byla zjišťována cytotoxicita grafen oxidu na VDR-responzivní buněčnou linii pomocí metody MTT. Délka trvání jednoho MTT testu činila tři dny a celkem bylo provedeno sedm experimentů, jejichž hodnoty byly statisticky vyhodnoceny. Použity byly různé koncentrace grafen oxidu ( $0,002\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) o různé velikosti částic (50 – 200nm, 200 – 500nm, >500nm). Podle výsledků experimentů žádná použitá koncentrace grafen oxidu signifikantně nesnižuje životnost buněk VDR-responzivní buněčné linie. Z výsledků můžeme usoudit, že grafen oxid nevykazuje žádnou toxicitu vůči použité buněčné linii. Toto tvrzení bylo také potvrzeno mikroskopickým pozorováním, kdy byla sledována morfologie buněk. Z pořízených fotografií je patrné, že žádná z použitých koncentrací neovlivňuje morfologii buněk VDR-responzivní buněčné linie. Následně byla stanovena transkripční aktivita VDR metodou Gene reporter assay, pro kterou bylo možno použít všechny testované koncentrace grafen oxidu.

V případě sledování agonistického působení byly výsledky získány z celkového počtu čtyř nezávislých experimentů, které ukázaly, že pouze určité použité koncentrace GO jsou schopny aktivovat VDR. Výsledky signifikantní aktivace byly zaznamenány v případě použití nanočástic GO o velikosti 50-200nm a koncentracích  $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a  $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , nanočástic o velikosti 200-500nm a koncentraci  $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a nanočástic o velikosti >500nm a koncentracích  $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a  $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

V případě sledování antagonistického působení nanočástic GO na aktivovaný VDR nevykázala žádná z použitých koncentrací schopnost tento receptor inhibovat. Výsledky dokazují schopnost středních použitých koncentrací ( $0,02\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $0,2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a  $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) všech velikostí nanočástic GO (50-200nm, 200-500nm a >500nm) aktivovat VDR o cca 20-30% více vzhledem k pozitivní kontrole, čili syntetickému kalcitriolu. Všechny použité koncentrace vykazovaly synergický efekt. Výsledky dokazují, že nanočástice GO mají vliv na transkripční aktivitu VDR a mají schopnost zvýšit aktivaci tohoto receptoru.

Cíle této bakalářské práce byly splněny. Otestována byla jak cytotoxicita testovaných sloučenin, tak aktivita studovaného receptoru. Výsledky mohou být součástí dalších experimentů týkajících se působení jiných nanočástic na buňky živých organismů.

## 7 LITERATURA

- Aloia J. F., Talwar S. A., Pollack S., Yeh J. (2005): A randomized controlled trial of vitamin D supplementation in African American women. *Archives of Internal Medicine*, **165**, 1618-1623.
- Baron D., Cacho C., Petr J. (2017): Electrokinetic preconcentration of magnetic core – Carboxylic shell nanoparticles by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967317304892>.
- Bartoňková I., Grycová A., Dvořák Z. (2016): Profiling of Vitamin D Metabolic Intermediates toward VDR Using Novel Stable Gene Reporter Cell Lines IZ-VDRE and IZ-CYP24. *Chemical Research in Toxicology*, **29**, 1211-1222.
- Bouillon R., Carmeliet G., Verlinden L., van Etten E., Verstuyf A., Luderer H. F., Lieben L., Mathieu C., Demay M. (2008): Vitamin D and Human Health: Lessons from Vitamin D Receptor Null Mice. *Endocrine Reviews*, **29**, 726-776.
- Brodie B. C. (1859): On the Atomic Weight of Graphite. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, **149**, 249-259.
- Camargo C.A. Jr, Ganmaa D., Frazier A.L., Kirchberg F.F., Stuart J.J., Kleinman K., Sumberzul N., Rich-Edwards J.W. (2012): Randomized trial of vitamin D supplementation and risk of acute respiratory infection in Mongolia. *Pediatrics*, **130**, 561-567.
- Clemens T. L., Henderson S. L., Adams J. S., Holick M. F. (1982): Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D<sub>3</sub>. *The Lancet*, **1**, 74-76.
- Cohen-Tanugi D., Grossman J. C. (2012): Water desalination across Nanoporous graphene. *Nano Letters*, **12**, 3602-3608.
- Cuppari L., Lopez M. G. G., Kamimura M. A. (2011): Vitamin D Biology: From the Discovery to Its Significance in Chronic Kidney Disease. *Journal of Renal Nutrition*, **21**, 113-116.
- Dastyh M., Breinek P. a kolektiv autorů (2015): *Klinická biochemie*. 3. vydání, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika, 253 stran.
- Department of Cell Biology, Baylor College of Medicine Houston, Texas (1978): *Receptors and Hormone Action*. (O'Malley B.W., Birnbaumer L.), ACADEMIC PRESS, INC., New York, U.S.A., 601.
- Di Corato R., Espinosa A., Lartigue L., Tharaud M., Chat S., Pellegrino T., Ménager Ch., Gazeau F., Wilhelm C. (2014): Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs. *Biomaterials*, **35**, 6400-6411.
- Dimiev A. M., Tour J. M. (2014): Mechanism of Graphene Oxide Formation. *ACS Nano*, **8**, 3060-3068.
- Dreyer D. R., Park S., Bielawski Ch. W., Ruoff R. S. (2010): The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society Reviews*, **39**, 228-240.
- Ebihara K., Masuhiro Y., Kitamoto T., Suzawa M., Uematsu Y., Yoshizawa T., Ono T., Harada H., Matsuda K., Hasegawa T., Masushige S., Kato S. (1996): Intron Retention Generates a Novel Isoform of the Murine Vitamin D Receptor That Acts in a Dominant Negative Way on the Vitamin D Signaling Pathway. *Mol Cell Biol*, **16**, 3393-3400.
- Eloranta J.J., Hiller C., Jüttner M., Kullak-Ublick G.A. (2012): The SLC01A2 gene, encoding the human organic anion transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2), is transactivated by the vitamin D receptor (VDR). *Molecular Pharmacology*, **82** 37-46.
- Farré M., Gajda-Schranz K., Kantiani L., Barceló D. (2009): Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **393**, 81-95.
- Frébortová J. (2016): *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. 1. vydání. Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika, 77 stran.
- Freestone I., Meeks N., Sax M., Higgitt C. (2007): The Lycurgus Cup – A Roman nanotechnology. *Gold Bulletin*, **40**, 270-277.
- Geim A. K., Novoselov K. S. (2007): The rise of graphene. *Nature Materials*, **6**, 183-19.
- Germain P., Staels B., Dacquet C., Spedding M., Laudet V. (2006): Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacological Reviews*, **58**, 685-704.

- Gómez-Navarro C., Weitz R. T., Bitter A. M., Scolari M., Mews A., Burghard M., Kern K. (2007): Electronic Transport Properties of Individual Chemically Reduced Graphene Oxide Sheets. *Nano Letters*, **7**, 3499-3503.
- Gottschalk F., Nowack B. (2011): The release of engineered nanomaterials to the environment. *Journal of Environmental Monitoring*, **13**, 1145-1155.
- Handy R. D., Henry T. B., Scown T. M., Johnston B. D., Tyler C. R. (2008): Manufactured nanoparticles: their uptake and effect on fish—a mechanistic analysis. *Ecotoxicology*, **17**, 396-409.
- Haussler M. R., Norman A. W. (1969): Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **62**, 155-162.
- Haussler M. R., Whitfield G. K., Haussler C. A., Hsieh J., Thompson P. D., Selznick S. H., Dominguez C. E., Jurutka P. W. (1998): The Nuclear Vitamin D Receptor: Biological and Molecular Regulatory Properties Revealed. *Journal of bone and mineral research*, **3**, 325-349.
- Havinga E., de Kock R. J., Rappoldt M. P. (1960): The photochemical interconversions of provitamin D, lumisterol, previtamin D and tachysterol. *Tetrahedron*, **11**, 276-284
- Heindel J. J., Newbold R., Schug T. T. (2015): Endocrine disruptors and obesity. *Nature Reviews Endocrinology*, **11**, 653-661.
- Holick M. F. (2007): Vitamin D Deficiency. *The New England Journal of Medicine*. **81**, 266-357.
- Holick M. F., Binkley N. C., Bischoff-Ferrari H. A., Gordon C. M., Hanley D. A., Heaney R. P., Murad M. H., Weaver C. M. (2011): Evaluation, Treatment and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **96**, 1911-1930.
- Hsieh J. C., Jurutka P. W., Galligan M. A., Terpening C. M., Haussler C. A., Samuels D. S., Shimizu Y., Shimizu N., Haussler M. R. (1991): Human vitamin D receptor is selectively phosphorylated by protein kinase C on serine 51, a residue crucial to its trans-activation function. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 9315-9319.
- Hummers W. S., Offeman R. E. (1958): Preparation of Graphitic Oxide. *Journal of the American Chemical Society*, **80**, 1338-1339.
- Inagaki M., Kang F. (2014): Graphene derivatives: graphane, fluorographene, graphene oxide, graphyne and graphdiyne. *Journal of Materials Chemistry A*, **33**, 13193-13206.
- Jain K. K. (2008): *The Handbook of Nanomedicine*. 1st ed., Springer, Berlín, Německo, 404 stran
- Internetový zdroj č. 1: Materiály 21: <http://www.materialy21.cz/vyzkum-a-pouziti-grafenu> (4. 3. 2017).
- Jurutka P. W., Hsieh J. C., MacDonald P. N., Terpening C. M., Haussler C. A., Haussler M. R., Whitfield G. K. (1993): Phosphorylation of serine 208 in the human vitamin D receptor. The predominant amino acid phosphorylated by casein kinase II in vitro and identification as a significant phosphorylation site in intact cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **268**, 6791-6799.
- Kato S. (2000): The Function of Vitamin D Receptor in Vitamin D Action. *The Journal of Biochemistry*. **127**, 717-722.
- Kodíček M., Valentová O., Hynek R. (2015): *Biochemie chemický pohled na biologický svět*. 1st ed., Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, Česká Republika, 416 stran.
- Kogawa M., Findlay D. M., Anderson P. H., Ormsby R., Vincent C., Morris H. A., Atkins G. A. (2010): Osteoclastic Metabolism of 25(OH)-Vitamin D3: A Potential Mechanism for Optimization of Bone Resorption. *Endocrinology*, **151**, 4613-4625.
- Koolman J., Röhm K.H. (2012): *Barevný atlas biochemie*. 1. české vydání, GRADA Publishing a.s., Praha, Česká Republika, 512 stran.
- Kim S., Zhou S., Hu Y., Acik M., Chabal Y. J., Berger C., de Heer W., Bongiorno A., Riedo E. (2012): Room-temperature metastability of multilayer graphene oxide films. *Nature Materials*, **11**, 544-549.

- Kim J. S., Roberts J. M., Bingman W. E., III., Shao L., Wang J., Ittman M. M., Weigel N. L. (2014): The Prostate Cancer TMPRSS<sub>2</sub>: ERG Fusion Synergizes With the Vitamin D Receptor (VDR) to Induce CYP24A1 Expression-Limiting VDR Signaling. *Endocrinology*, **155**, 3262-3273.
- Lammel T., Boisseaux P., Navas J. M. (2014): Potentiating Effect of Graphene Nanomaterials on Aromatic Environmental Pollutant-Induced Cytochrome P450 1A Expression in the Topminnow Fish Hepatoma Cell Line PLHC-1. *Environmental Toxicology*, **30**, 1192-1204
- Lammel T., Navas J. M. (2014): Graphene nanoplatelets spontaneously translocate into the cytosol and physically interact with cellular organelles in the fish cell line PLHC-1. *Aquatic Toxicology*, **150**, 55-65.
- Landau L. D., Lifshitz E. M., Reichl L. E. (1980): *Statistical Physics, Part I*. 3rd edition. Pergamon, Oxford, Velká Británie, 74 stran.
- Laurent S., Saei A. A., Behzadi S., Panahifar A., Mahmoudi M. (2014): Superparamagnetic iron oxide for delivery of therapeutic agents: opportunities and challenges. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **11**, 1449-1470.
- Li A., Cong Q., Xia X., Leong W. F., Veh J., Miao D., Mishina Y., Huijuan L., Li B. (2017): Pharmacologic calcitriol inhibits osteoklast lineage commitment via the BMP-Smad1-IkB-NF-kB pathway. *Journal of Bone and Mineral Research*. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbmr.3146/full?wo1URL=/doi/10.1002/jbmr.3146/full&regionCode=CZ&identityKey=edf7f6d7-aa66-4c3d-86f0-397045a166e0>.
- Li X., Zhang G., Bai X., Sun X., Wang X., Wang E., Dai H. (2008): Highly conducting graphene sheets and Langmuir-Blodgett film. *Nature Nanotechnology*, **3**, 538-542.
- Li H., Song S. I., Song G. Y., Kim I. (2014): Non-Covalently Functionalized Carbon Nanostructures for Synthesizing Carbon-Based Hybrid Nanomaterials. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **14**, 1425-1440.
- Liu X. T., Mu X. Y., Wu X. L., Meng L. X., Guan W. B., Ma Y., Q., Sun H., Wang C. J., Li X., F. (2014): Toxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes, Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide to Zebrafish Embryos. *Biomedical and Environmental Sciences*, **27**, 676-683.
- Masuno H., Ikura T., Morizono D., Orita I., Yamada S., Shimizu M., Ito N. (2013): Crystal structures of complexes of vitamin D receptor ligand-binding domain with lithocholic acid derivatives. *Journal of Lipid Research*, **54**, 2206-2213.
- Moreau A., Maurel P., Vilarem M. J., Pascussi J. M. (2007): Constitutive androstane receptor-vitamin D receptor crosstalk: Consequence on CYP24 gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **360**, 76-82.
- Mkhoyan A. K., Contryman A. W., Silcox J., Stewart D. A., Mattevi C., Miller S., Chhowalla M. (2009): Atomic and Electronic Structure of Graphene Oxide. *Nano Letters*, **9**, 1058-1063.
- Murray, Robert K., et al. (2002): *Harperova biochemie*. Z angl. 23. vyd. přel. Lenka Fialová et. al. 4. vyd. v ČR. Praha: H & H, 872.
- Monostory K., Pascussi J. M. (2008): Regulation of Drug-metabolizing Human Cytochrome P450s. *Analytica Chimica Acta*, **55**, 20-37.
- Nakamura T., Takano T., Fukunaga M., Shiraki M., Matsumoto T. (2013): Eldecalcitol is more effective for the prevention of osteoporotic fractures than alfacalcidol. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, **31**, 417-422.
- Novoselov K. S., Jiang D., Schedin F., Booth T. J., Khotkevich V. V., Morozov S. V., Geim A. K. (2005): Two-dimensional atomic crystals. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, **102**, 10451-10453.
- Ozin G. A., Arsenault A. C. (2005): *Nanochemistry: A chemical approach to nanomaterials*. 2. vydání, RSC Publishing, Cambridge, Velká Británie, 45 stran.
- Park S., Ruoff R. S. (2010): Chemical methods for the production of graphenes. *Nature Nanotechnology*, **4**, 217-224.
- Pawlak A., Strzadala L., Kalas W. (2015): Non-genomic effect of the NR4A1/Nur/TR3/NGFIB orphan nuclear receptor. *Steroids*. **95**, 1-6.
- Pei S., Cheng H. M. (2012): The reduction of graphene oxide. *Carbon*, **50**, 3210-3228.



- Ross C. A., Taylor C. L., Yaktine A. L., Valle H. B. D. (2011): *Dietary reference intakes for calcium and vitamin D*. 3rd edition, National Academies Press, Washington, USA, 1115.
- Santos-Martinez M. J., Rahme K., Corbalan J. J., Faulkner C., Holmes J. D., Tajber L., Medina C., Radomski M. W. (2014): Pegylation increases platelet biokompatibility of gold nanoparticles. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, **10**, 1004-1015.
- Shannon M. A., Bohn P. W., Elimelech M., Georgiadis J. G., Marinas B. J., Mayes A. M. (2008): Science and technology for water purification in the coming decades. *Nature*, **452**, 301-310.
- Shi X., Gong H., Li Y., Wang C., Cheng L., Liu Z. (2013): Graphene-based magnetic plasmonic nanocomposite for dual bioimaging and photothermal therapy. *Biomaterials*, **34**, 4786-4793
- Stankovich S., Dikin D. A., Piner R. D., Kohlhaas K. A., Kleinhammes A., Jia Y., Wu Y., Nguyen S. T., Ruoff R. S. (2007): Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. *Carbon*, **45**, 1558-1565.
- Sun K. L., Cock T.A., Crofts L. A., Eisman J. A., Gardiner E. M. (2001): Novel N-terminal variant of human VDR. *Molecular Endocrinology*. **15**, 1599-1609.
- Šrámek J. (2009): *Nanotechnologie v medicíně*. 1. vydání, Masarykova univerzita v Brně, Lékařská fakulta – Biofyzikální ústav, Brno, Česká republika, 15 stran.
- Taymans S. E., Pack S., Pak E., Orban Z. Barsony J., Zhuang Z. Stratakis C. A. (1999): The human vitamin D receptor gene (VDR) is localized to region 12-cen-q12 by Fluorescent In Situ Hybridization and Radiation Hybrid Mapping: Genetic and Physical VDR Map. *Journal of bone and mineral research*, **7**, 1163-1166.
- Tietze R., Zaloga J., Unterweger H., Lyer S., Friedrich R. J., Janko Ch., Pötter M., Dürr S., Alexiou Ch. (2015): Magnetic Nanoparticle-based Drug Delivery for Cancer Therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **468**, 463-470.
- van Geel M. J., Mul K., Oostveen A. M., van de Kerkhof P. C. M., de Jong E. M. G. J., Seyger M. M. B. (2014): Calcipotriol/betamethasone dipropionate ointment in mild-to-moderate paediatric psoriasis: long-term daily clinical particle data in a prospective cohort. *British Journal of Dermatology*, **171**, 363-369.
- Wallace P. R. (1947): The band theory of graphite. *Physical Review*, **71**, 622-634
- Wang E. N., Karnik R. (2012): Water desalination: Graphene cleans up water. *Nature Nanotechnology*, **7**, 552-554.
- Wang Y., Zhu J., DeLuca H. F. (2012): Where is the vitamin D receptor?. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **523**, 123-133.
- Wang Y., Zhang X., Cheng C., Li Ch. (2014): Mucoadhesive and enzymatic inhibitory nanoparticles for transnasal insulin delivery. *Nanomedicine*, **9**, 451-464.
- Wonbong Ch., Jo-won L. (2011): *Graphene – Synthesis and Applications*. CRC Press, Florida, USA, 394 stran.
- Wei D., Kivioja J. (2013): Graphene for energy solutions and its industrialization. *Nanoscale*, **5**, 10108-10126.
- Wu J., Wei W., Wang L., Su Z., Ma G. (2007): A thermosensitive hydrogel based on quaternized chitosan and poly (ethylene glycol) for nasal drug delivery systém. *Biomaterials*, **28**, 2220-2232.
- Xie X., Hu K., Fang D., Shang L., Tran S. D., Cerruti M. (2015): Graphene and hydroxyapatite self-assemble into homogenous, free standing nanocomposite hydrogels for bone tissue engineering. *Nanoscale*, **17**, <http://pubs.rsc.org/content/articlelanding/2015/nr/c5nr01107h#!divAbstract>.
- Xu J., Wang L., Zhu Y. (2012): Decontamination of bisphenol A from aqueous solution by graphene adsorption. *Langmuir*, **28**, 8418-8425.
- Zhao J., Pei S., Ren W., Gao L., Cheng H. (2010): Efficient Preparation of Large-Area Graphene Oxide Sheets for Transparent Conductive Films. *ACS Nano*, **4**, 5245-5252.
- Zhu J., DeLuca H. F., (2012): Vitamin D-25-hydroxylase – Four decades of searching, are we there yet? *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **523**, 30-36.
- Zhu Y. B., Wang F., Ch., Heng A. W. (2017): Superheating of monolayer ice in graphene nanocapillaries. *The Journal of Chemical Physics*, **146**, <http://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.4979478>.

Ženata O., Vrzal R. (2017): Fine tuning of vitamin D receptor (VDR) activity by transcriptional and post-translational modifications. *Oncotarget*  
<http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%5B0%5D=15697&author-preview=c41>.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

$\alpha$ - $\beta$ -GP	$\alpha$ - $\beta$ -glycerolfosfát
AFM	mikroskopie atomových sil
AhR	aryluhlovodíkový receptor
ATP	adenosintrifosfát
AuNP	nanočástice zlata
BkF	benzo(k)fluoranthén
Ca <sup>2+</sup>	vápenaté ionty
CBP	vápník vazebný protein
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
CK-II	kasein kináza II
CT	kalcitonin
CVD	chemická depozice v plynné fázi
CYP	cytochrom P450
CXYG	grafen karboxyl
DBD	DNA-vazebná doména
dH <sub>2</sub> O	deionizovaná voda
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECAACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EELS	spektroskopie ztrát energie elektronů
FBS	fetální bovinní sérum
FBS-CS	fetální bovinní sérum přečištěné aktivním uhlím

FI	fold induction
FXR	farnesoid X receptor
GO	grafen oxid
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	kyselina sírová
HgB	hygromycin B
HI	kyselina jodovodíková
HNO <sub>3</sub>	kyselina dusičná
HTCC	N-[(2-hydroxy-3-trimethylamonium)propyl]chitosan chlorid
IZ-VDR	VDR responzivní buněčná linie
KClO <sub>3</sub>	chloristan draselný
KMnO <sub>4</sub>	manganistan draselný
LBD	ligand-vazebná doména
MWCNTs	uhlíkové nanotrubičky
MTT	methylnitrotetrazoliová sůl
NaNO <sub>3</sub>	dusičnan sodný
Nluc	NanoLuc, gen pro luciferázu
NP	nanočástice
NR	nukleární receptor
NR1H1	receptor pro vitamín D
O <sub>2</sub>	molekula kyslíku
PBC169	3,3',4,4',5,5'-hexachlorbifenyl
PBS	fosfátový pufr Phosphate-Buffered Saline
PEG	polyethylenglykol
PKC	proteinkináza C

PTH	parathormon
PXR	pregnane X receptor
RANKL	receptor aktivovaný ligandem kappaB
rGO	redukovaný grafen oxid
RXR	receptor kyseliny retinové
S51	serin 51
S208	serin 208
SERM	specifický modulátor estrogenních receptorů
SMRT	umlčení mediátorů pro receptory tyroidních hormonů
SPIONs	superparamagnetické částice oxidu železa
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
UT	negativní kontrola (untreated)
UV	ultrafialové záření
VD3	vitamín D <sub>3</sub>
VDBP	vitamin D binding protein
VDR	receptor pro vitamín D
VDRE	vitamín D responzivní element