

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BOTANIKY

**STUDIUM ENDOKRINNĚ DISRUPČNÍCH
VLASTNOSTNÍ GRAFEN OXIDU SKRZ
TRANSKRIPČNÍ AKTIVITU VYBRANÝCH
JADERNÝCH RECEPTORŮ**

Diplomová práce

Bc. Andrea Francúzová

Biologie N1501, Biologie - Geografie

Prezenční studium

Vedoucí práce: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

Olomouc 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením doc. Ing. Radima Vrzala, Ph.D., za využití pouze citovaných zdrojů.

V Olomouci dne

.....
Bc. Francúzová Andrea

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce doc. Ing. Radimu Vrzalovi, PhD. za jeho vedení, cenné rady i neskutečnou trpělivost. Dále bych ráda poděkovala zaměstnancům KBB Univerzity Palackého za jejich ochotu a pomoc při práci v laboratoři.

Děkujeme za finanční podporu projektu IGA PrF-2016-003.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení: Andrea Francúzová

Název práce: Studium endokrinně disruptivních vlastností grafen oxidu skrz transkripční aktivitu vybraných jaderných receptorů

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

Rok obhajoby: 2017

Abstrakt: Tato práce je zaměřena na monitoring transkripční aktivity vybraných receptorů ovlivněné přítomností GO nanočástic. První část práce se věnuje teoretickému úvodu s charakteristikou testovaných receptorů (glukokortikoidního, androgenního a thyroïdního) a dosud popsányými vlastnostemi GO. V praktické části je pomocí MTT testu hodnocena toxicita GO na sledované buněčné linie, která byla vyhodnocena jako žádná nebo zanedbatelná a pomocí GRA a PCR je sledována transkripční aktivita. V případě AZ-GR a PZ-TR buněčné linie se GO choval jako synergista v součinnosti s agonisty receptorů a s rostoucí koncentrací GO (při všech velikostech) rostla aktivace receptoru, která v obou případech přesáhla i 150 % aktivace samotným agonistou. V agonistickém módu dokázal GO aktivovat pouze TR a při velikosti částic > 500 nm při koncentraci 20 µg/ml dosáhl téměř stejné aktivace jako T3 (pozitivní kontrola). Pouze u linie AIZ-AR se GO choval antagonisticky a jeho antagonistický účinek rostl s rostoucí koncentrací ve všech třech případech velikostí nanočástic. Pokles aktivity byl pro nejvyšší koncentrace až o 40 % oproti negativní kontrole (DHT). Výsledky metody PCR neposkytují dostatečné informace a vyžadují další studie. V agonistickém módu je u TR pozorovatelný trend snižující se exprese s rostoucí koncentrací GO.

Klíčová slova: grafen oxid, jaderné receptory, glukokortikoidní receptor, thyroïdní receptor, androgenní receptor, gene reporter assay, PCR

Počet stran: 78

Počet příloh: 1

Jazyk: Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's name and surname: Andrea Francúzová

Title: The study of graphene oxide endocrine-disrupting properties via transcription activity of selected nuclear receptors

Type of thesis: Master's thesis

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc

Supervisor: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

The presentation year: 2017

Abstract: This work is focused on transcriptional activity of chosen receptors influenced by GO. In the first part of this work, there is a theoretical introduction of the characterization of tested receptors (glucocorticoid, androgen and thyroid receptors) and known characteristics of GO. Second part describes used methods and the results. The MTT test was used for measuring cytotoxic effects of GO on tested cell lines. No effect was observed. GRA and PCR methods were used for testing transcriptional activity. In the case of AZ-GR and PZ-TR cell lines, GO acted like synergist in combination with known agonists. With increasing concentration of GO (for all tested sizes), increased receptors activation was observed, which got higher than 150 % of agonist's activation for both receptors (GR, TR). GO alone activated TR and it almost reached the same value as T3 (positive control) for GO > 500 nm with concentration 20 µg/ml. Antagonistic tendencies were recorded for AIZ-AR cell line only. There was significant decline of inducible luciferase activity with increasing concentrations of GO (for all tested sizes). In case of higher concentration, the inhibition was almost 40 % against negative control (DHT). Results of PCR method are inconclusive and require more studies. In agonistic mode for TR, there is a tendency of decreasing expression with increasing concentration of GO.

Keywords: graphene oxide, nuclear receptors, glucocorticoid receptor, thyroid receptor, androgen receptor, gene reporter assay, PCR

Number of pages: 78

Number of appendices: 1

Language: Czech

OBSAH

ÚVOD	9
1. TEORETICKÁ ČÁST	10
1.1 JADERNÉ RECEPTORY	10
1.1.1 Glukokortikoidní receptor	12
1.1.2 Androgenní receptor	17
1.1.3 Thyroidní receptor	22
1.2 NANOMATERIÁLY	26
1.2.1 Grafen	28
1.2.2 Grafen oxid – charakteristika	28
1.2.3 Grafen oxid – využití v biologických oborech	31
1.2.4 Uhlíkové nanomateriály a životní prostředí	33
2. POUŽITÝ MATERIÁL.....	35
2.1 CHEMIKÁLIE.....	35
2.2 PŘÍSTROJE	36
2.3 BUNĚČNÉ LINIE.....	37
2.3.1 AZ-GR.....	37
2.3.2 AIZ-AR.....	37
2.3.3 PZ-TR	38
3. METODIKA PRÁCE	39
3.1 PRÁCE S BUNĚČNÝMI LINIEMI.....	39
3.1.1 Rozmražení.....	39
3.1.2 Kultivace buněk.....	39
3.1.3 Pasážování	40
3.1.4 Počítání buněk	40
3.2 MTT TEST – TEST VIABILITY.....	41
3.3 GENE REPORTER ASSAY	43
3.3.1 Příprava buněk.....	43
3.3.2 Agonistický mód	43
3.3.3 Antagonistický mód.....	44
3.3.4 Měření aktivity receptorů prostřednictvím luciferázové aktivity	45

3.4	MONITOROVÁNÍ GENOVÉ EXPRESE	46
3.4.1	Ošetření buněčných linií	46
3.4.2	Izolace RNA	47
3.4.3	Přepis RNA na cDNA	48
3.4.4	Real-Time PCR	49
4.	VÝSLEDKY.....	50
4.1	MTT TEST – TEST VIABILITY.....	50
4.1.1	AZ-GR.....	50
4.1.2	PZ-TR.....	51
4.1.3	AIZ-AR.....	52
4.2	SROVNÁNÍ FOTOGRAFIÍ	53
4.3	GENE REPORTER ASSAY	54
4.3.1	Interakce GO s glukokortikoidním receptorem	54
4.3.2	Interakce GO s thyroïdním receptorem	56
4.3.3	Interakce GO s androgenním receptorem.....	58
4.4	PCR	60
4.4.1	HeLa	60
4.4.2	HepG2.....	62
4.4.3	22Rv1	64
5.	DIDAKTICKÝ ASPEKT	66
6.	DISKUSE	72
7.	ZÁVĚR.....	77
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:	79
	SEZNAM ZKRATEK.....	96

ÚVOD

Nanomateriály jsou hojně diskutovaným tématem současné vědy. Posledních pár let je pozornost věnována grafenu oxidu, látce z řady uhlíkových nanomateriálů, která nachází využití v mnoha odvětvích. Ačkoliv doba pokročila a věda včetně medicíny a farmacie taktéž, stále existují nemoci, na které nemá žádné z těchto odvětví řešení. Studie zkoumající grafen oxid a jeho účinky se snaží tuto skutečnost změnit.

Je důležité věnovat, nejen nově objeveným, nanomateriálům pozornost, protože jejich vlastnosti mohou poskytnout nové možnosti a v jedinečných vlastnostech zajištěných právě velikostí těchto materiálů může být skrytý velký potenciál.

Na pochodech lidského těla a na léčbě patologických stavů se podílí transkripční aktivita jaderných receptorů, ať už formou metabolismu xenobiotik či zvýšenou produkcí potřebných hormonů. Na regulaci pochodů v lidském těle, prostřednictvím aktivity jaderných receptorů, se může podílet také grafen oxid, ať už jejich aktivací nebo inhibicí. Otázka jeho působení vyvolává potřebu věnovat čas a úsilí pro objevení správné odpovědi a odhalení jeho funkce a schopností.

Tato práce odhaluje další z mnoha schopností grafenu oxidu a zároveň slouží z didaktického hlediska jako odhalení vědeckého světa studentům středních škol a gymnázií a poskytuje autorovi, jakožto budoucímu pedagogovi, širší rozhled ohledně studia biologických oborů, díky čemuž bude schopen poskytnout svým studentům cenné informace a zkušenosti ohledně jejich pomaturitního studia.

Cílem této práce je určit toxický efekt GO na vybrané jaderné receptory a odhalit jeho případnou schopnost aktivovat či inhibovat tyto receptory s následným určením exprese konkrétních genů.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 JADERNÉ RECEPTORY

Jaderné, nebo též nukleární, receptory (NR) jsou jednou z nejhojnějších tříd transkripčních regulátorů u mnohobuněčných živočichů. V této skupině se nachází 48 druhů receptorů v případě lidského organismu, ačkoliv ne všechny jsou spojeny s ligandy. Tyto regulátory mají na starost různé funkce, jako je homeostáza, reprodukce, vývoj a metabolismus (Overington et al., 2006; Robinson-Rechavi 2003).

Dělení jaderných receptorů může být dvojitě. Buďto je založené na sekvenční homologii nebo DNA-vazebné/dimerické partnerské specifitě (homodimery, heterodimery, monomery) nebo do 3 skupin na steroidní receptory, obligátní heterodimerní partneři retinoidních receptorů (nesteroidní receptory) a sirotčí receptory (Mangelsdorf et al., 1995; Robinson-Rechavi et al., 2003)

Steroidní receptory – Jedná se skupinu receptorů, jejichž ligandem neboli aktivátorem, je steroidní hormon. Pokud není ligand navázán, nachází se tyto receptory v multiproteinovém komplexu chaperonů s heat shock proteiny (Hsp90, Hsp56), které drží receptor v inaktivní konformaci, ale připravený k reakci s ligandem. Do této skupiny náleží receptory například glukokortikoidní, progesteronový, mineralokortikoidní, androgenní atd. (Beato et al., 1995).

Nesteroidní receptory – jsou to receptory, které po navázání příslušného ligandu dimerizují s retinoidním X receptorem (RXR) a vytváří tedy heterodimer, který následně nasedá na příslušnou oblast DNA a spouští transkripci určitého genu. Do této skupiny patří thyroidní receptor, receptor pro vitamín D apod. (Sipes et al., 1997; Mangelsdorf et al., 1995).

Sirotčí receptory – podskupina NR s neidentifikovaným endogenním ligandem. Jedná se o velké množství jaderných receptorů, které byly identifikovány pomocí podobnosti sekvence ke známým receptorům, ale jejich fyziologický ligand nebyl zatím nalezen (Robinson-Rechavi et al., 2003). Příkladem sirotčích receptorů je jaderní receptorový homolog 1 (LRH-1), steroidogenní faktor 1 (SF-1) nebo testikulární receptor 2 (TR2) (Garattini et al., 2016).

Jaderné receptory mohou mít různou velikosti, která se určuje podle počtu aminokyselin. Jejich délka může být od cca 400 aminokyselin po téměř 1000 aminokyselin. Ačkoliv může být délka jaderných receptorů různá, strukturální organizaci mají společnou

(Obr. 1). Jsou kódovány geny, které se obvykle skládají z 8 exonů a mají molekulární strukturu se 4 funkčními doménami, což se odráží v organizaci exonů a intronů v genu.

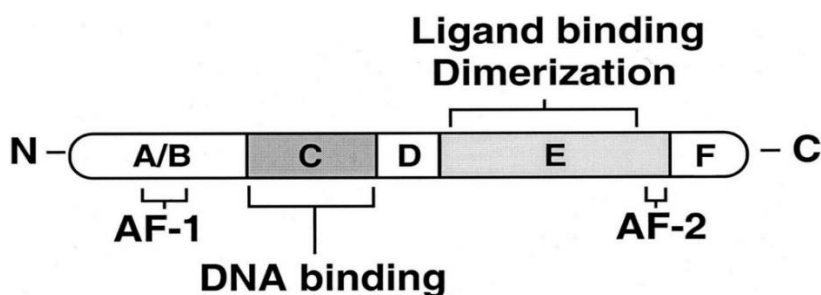
První doménou je N-terminální oblast (A/B doména), která zahrnuje funkci transkripční aktivace a interakce s kofaktory. Obsahuje tedy alespoň jednu přirozeně aktivní transaktivační oblast (AF-1) a několik autonomních transaktivačních domén (AD). Tato doména je kódována pouze jedním exonem, její délka je velice variabilní a doména je málo konzervovaná.

Druhou doménou je nejvíce konzervovaná doména C a to DNA-vazebná doména (DBD), která zejména obsahuje P-box – krátký motiv odpovědný za DNA-vazebnou specifitu na sekvence typicky obsahující AGGTCA motiv, a podílí se na dimerizaci nukleárních receptorů (homodimerizaci i heterodimerizaci). Je kódována 2 exony, z nichž každý kóduje jeden motiv zinkového prstu.

Následující D doména je méně konzervativní, chová se jako pružný pant mezi C a E doménami a obsahuje jaderný lokalizační signál (NLS), který v některých receptorech hraje roli v transkripčním umlčování.

Poslední doména (E doména) je ligand-vazebná doména (LBD), která je největší a je mírně konzervována. Tato doména bývá kódována 5 exony. Kromě toho, že obsahuje místo pro navázání ligandu, podílí se na dimerizaci, regulaci transkripce a interaguje s proteiny teplotního šoku a kofaktory.

Některé nukleární receptory mohou na C-terminálním konci E domény obsahovat také doménu F, jejíž sekvence je extrémně variabilní a její struktura a funkce nejsou známy (Robinson-Rechavi et al., 2003; Mangeldorf et al., 199; Wurtz et al., 1996).



Obr. 1 Struktura jaderného receptoru (Základní 4 domény přítomné v každém receptoru + 5. doména F. První N-terminální oblast A/B doména s transaktivační oblastí AF-1 (na ligandu nezávislá), C doména s DNA vazebným místem (zodpovědná za správné rozeznání příslušné DNA sekvence), D doména spojující domény C a E a E doména s ligand-vazebným místem, kde se nachází transaktivační oblast AF-2, která je na rozdíl od oblasti AF-1 je striktně ligandem aktivovatelná. Na C-terminálním konci doména F, která se vyskytuje jen u některých receptorů a její funkce není známa) (Převzato z: Aranda & Pascual, 2001).

Aktivita jaderných receptorů je klasicky rozdělená do tří kroků – represe, dereprese a transkripční aktivace. Během represe receptor rekrutuje korepresorový komplex s histon deacetylázovou aktivitou (HDAC). Dereprese nastane následujícím navázáním ligandu, který disociuje tento komplex a dochází k navázání prvního koaktivačního komplexu s histon acetyltransferázovou (HAT) aktivitou, což má za následek dekondenzaci chromatinu. V poslední fázi se HAT komplex rozpadá a naváže se druhý koaktivační komplex, který vede k aktivaci transkripce cílového genu. Tento mechanismus není ovšem obecně aplikovatelný, protože některé jaderné receptory mohou působit jako aktivátory bez ligandu a jiné jsou schopny interagovat s cílovým promotorem genu v nepřítomnosti ligandu (Robinson-Rechavi et al., 2003).

Protože NR vážou malé molekuly, které mohou být snadno v lékařském odvětví upravovány do podoby léků a kontrolovat funkce spojené s nemocemi jako je rakovina, osteoporóza či cukrovka, jsou slibným farmakologickým cílem (Gustafsson, 1999; Robinson-Rechavi et al., 2003).

1.1.1 Glukokortikoidní receptor

1.1.1.1 Charakteristika a struktura receptoru

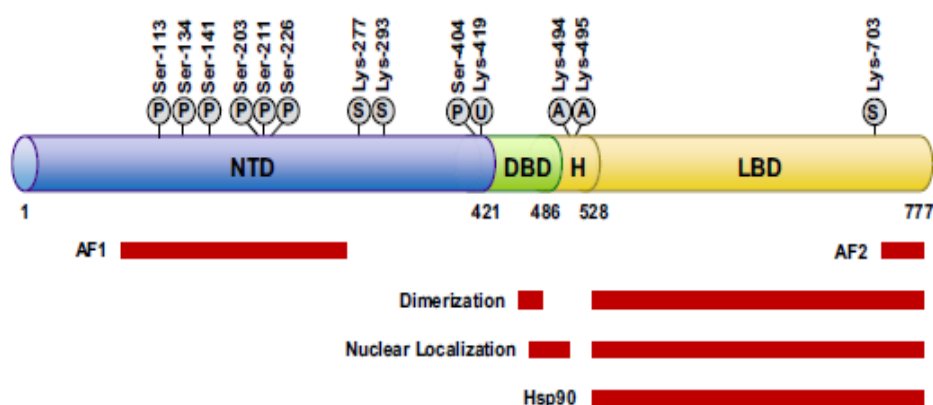
Glukokortikoidní receptor (GR) je členem steroidních jaderných receptorů. Lidský gen pro GR se nachází na chromosomu 5q31-32 a je sestaven z 9 exonů (Nicolaidis et al., 2010). Exon1 nepodléhá jako jediný procesu translace (Cain & Cidlowski, 2015). Podle příslušnosti GR do podrodiny 3 jaderných receptorů, skupiny C jakožto člen 1, bývá tento gen označován zkratkou NR3C1. Jedná se o ligandem aktivovaný transkripční faktor regulující expresi genů řízených glukokortikoidy (Nicolaidis et al., 2010).

Glukokortikoidní receptor je protein skládající se ze 4 různých regionů. Prvním je N-terminální transaktivační doména (NTD), která je kódována exonem 2, za ní je DNA-vazebná doména (DBD) kódována exonem 3 a 4, a pantová oblast a C-terminální ligand-vazebná doména (LBD) jsou kódovány exonem 5 – 9 (Obr. 2) (Nicolaidis et al., 2010; Oakley and Cidlowski, 2013).

První doména představuje aktivační funkční doménu (AF-1), která je na ligandu nezávislá. Tato doména se podílí na interakci GR s molekulami potřebnými pro iniciaci transkripce. Takovými molekulami jsou koaktivátory a bazální transkripční faktory, jako například RNA-polymeráza nebo TATA-vazebný protein (Nicolaidis et al., 2010).

DNA-vazebná doména je nejvíce konzervovanou doménou jaderných receptorů. Základní kostru této domény tvoří dva zinkové prsty, díky kterým GR rozpozná a váže se na specifické sekvence DNA známé jako glukokortikoidní responzivní elementy (GRE) v promotorové oblasti cílového genu (Helsen & Claessens, 2014; Nicolaidis et al., 2010; Oakley & Cidlowski, 2013). Dále jsou zinkové prsty důležité pro receptorovou homodimerizaci a jadernou translokaci GR (McMaster & Ray, 2007).

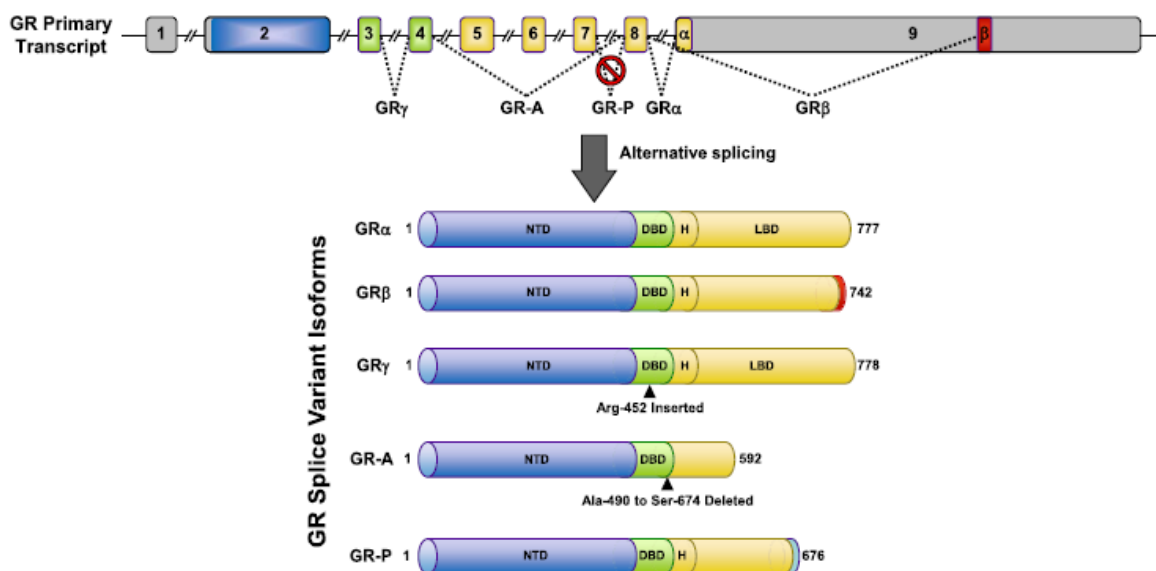
Ligand vazebná doména slouží pro rozeznání a navázání příslušného ligandu, chaperonů a dalších proteinů. Zahrnuje aktivační funkční doménu AF-2, která je na rozdíl od AF-1 závislá na ligandu. Kromě ligandu umožňuje kompletní navázání dalších proteinů jako jsou koaktivátory a korepresory (Kumar & Thompson, 2005).



Obr. 2 Struktura glukokortikoidního receptoru (Receptor je složen z N-terminální domény obsahující na ligandu nezávislou AF1, DNA vazebné domény, pantu a Ligand-vazebné domény obsahující na ligandu závislou AF2) (Převzato z: Oakley & Cidlowski, 2013)

Ačkoliv je GR produktem jednoho genu, má mnoho isoform, které vznikají na základě alternativních sestřihů a alternativních iniciačních míst pro translaci genu (Lu & Cidlowski, 2005). Tyto změny jsou nezbytné, aby se buňky a tkáně mohly přizpůsobit různým koncentracím glukokortikoidů. Alternativní sestřih GR prekurzorové mRNA dává vzniknout 5 podtypům GR proteinů – GR α , GR β , GR γ , GR-A a GR-P (Obr. 3) (Nicolaidis et al., 2010; Zhou & Cidlowski, 2005). Přítomnost 8 alternativních iniciačních míst pro translaci dává kombinační potenciál pro 40 různých isoform GR proteinu (Cain & Cidlowski, 2015). Alternativní sestřih v exonu 9 v blízkosti konce GR primárního transkriptu vede ke vzniku 2 isoform, které jsou nejčastější, a to GR α a GR β (Bamberger et al., 1996; Oakley et al., 1996). GR α je odvozen od konce exonu 8 napojeného

na začátek exonu 9, zatímco GR β pochází od konce exonu 8 napojeného na pozdější část exonu 9 (Obr. 3) (Kino et al., 2009; Lewis-Tuffin & Cidlowski, 2006). Pouze jedna z forem GR váže glukokortikoidy a to GR α . GR β sice interaguje s DNA, ale ne s glukokortikoidy, takže může teoreticky fungovat jako dominantní inhibitor glukokortikoidové aktivity tím, že zabrání navázání GR na DNA (Lewis-Tuffin & Cidlowski, 2006).

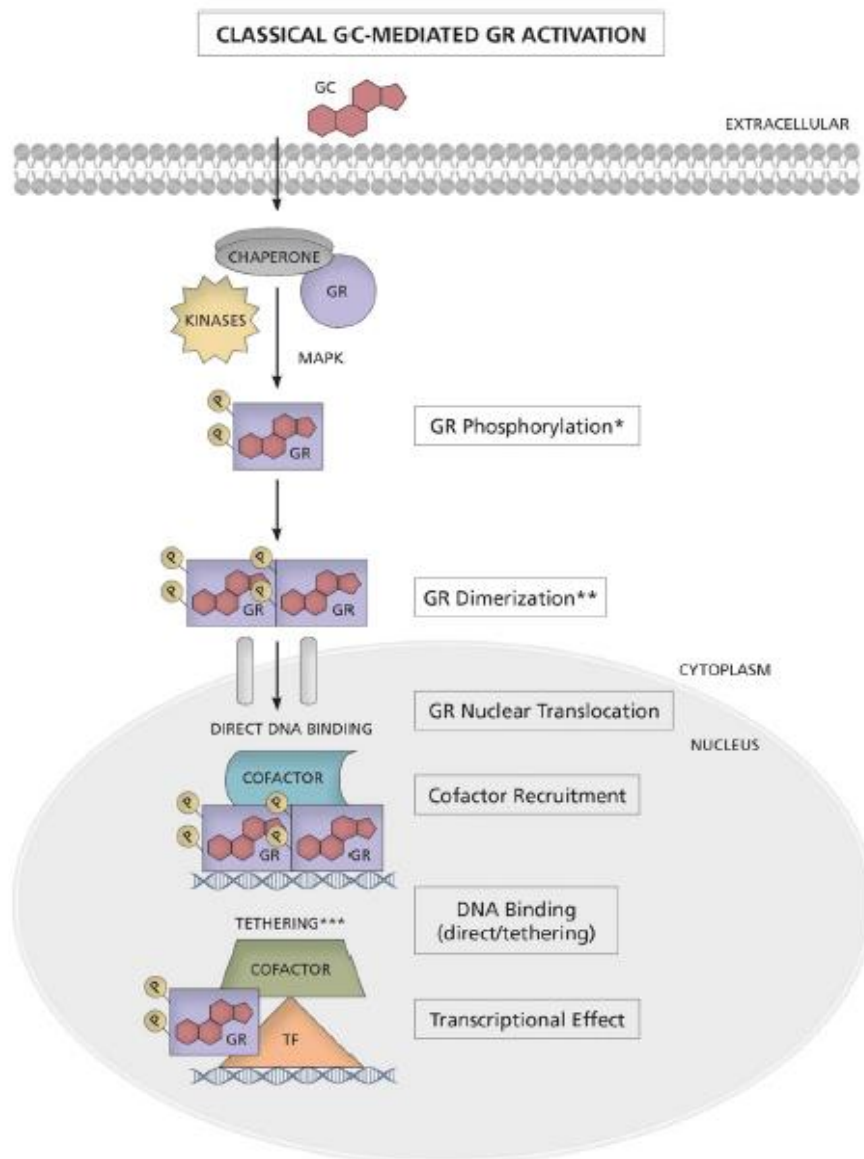


Obr. 3 Struktura lidského genu pro GR a alternativní sestřihy výsledných receptorů. (převzato z: Oakley & Cidlowski, 2013)

1.1.1.2 Aktivace receptoru

V nepřítomnosti ligandu je GR umístěný v cytoplazmě v multiproteinovém komplexu s chaperony (hsp90, hsp70 a p23), členy FK506 rodiny imunofilinů (FKBP51 a FKBP52) a noreceptorovými tyrosin kinázami (Grad & Picard, 2007; Wu et al., 2013). V tomto komplexu je GR neaktivní jakožto transkripční faktor, ale vykazuje vysokou afinitu pro glukokortikoidní ligandy. Následné navázání ligandu na GR způsobí změny konformace, které oddělí receptor od multiproteinového komplexu (Cain & Cidlowski, 2015). Strukturální přeskládání receptoru odhalí 2 jaderné lokalizační signály (NLS), které jsou rozeznány skupinou translokačních proteinů, a GR je okamžitě přenesen do jádra skrze jaderné póry (Oakley & Cidlowski, 2013; Smoak & Cidlowski, 2004). Jakmile se GR dostane do jádra, váže se na glukokortikoidní responsivní element (GREs) a reguluje expresi cílových genů (Beato, 1989; Freedman, 1992). GR se navazuje na DNA v podobě homodimeru tvořeného dvěma glukokortikoidními receptory (Cain & Cidlowski, 2015). Po navázání na GRE následuje asociace s dalšími proteiny jako jsou koaktivátory, což vede

k nárůstu genové transkripce (Hapgood et al., 2016). Sekvence GRE obsahuje dvě místa, z nichž každé slouží pro navázání jednoho receptoru z příslušného homodimeru a tato sekvence se může nacházet v promotoru, intronu nebo exonu cílového genu. Navázáním GR dochází k zapojení chromatin-remodelujících komplexů a koregulatorů, které regulují transkripci pomocí RNA polymerázy II (Jenkins et al., 2001; Rosenfeld & Glass, 2001; Lonard & O'Malley, 2005).



Obr. 4 Aktivace glukokortikoidního receptoru (GR se nachází v cytosolu buňky v multiproteinovém komplexu s chaperonovými proteiny. Po navázání ligandu se GR uvolní, dimerizuje s jiným aktivovaným GR za vzniku homodimeru a po přesunutí do jádra se tento homodimer navazuje na DNA na glukokortikoidní responsivní element a je spuštěna transkripce příslušného genu) (převzato z: Hapgood et al., 2016)

1.1.1.3 Ligand

Přírodním ligandem GR jsou glukokortikoidy (GC). Ty hrají ústřední roli ve většině fyziologických funkcí, včetně homeostázy, zánětů, chování, metabolismu, ukládání tuku a obezity, imunitních funkcí a souvisejících chorob u lidí (Baschant & Tuckermann, 2010; Countinho & Chapman, 2011; Lee et al., 2014). GC regulují všechny aspekty imunitní funkce a zánětu, včetně buněčné proliferace, sekrece cytokininů a chemokininů, cytolytické aktivity, diferenciací, efektorové funkce a produkce protilátek v imunitní buněčné funkci (Padgett & Glaser, 2003).

Glukokortikoidy se řadí do rodiny steroidních hormonů, které jsou si chemicky podobné a jsou generovány z cholesterolu multienzymovým procesem zvaným steroidogeneze (Miller & Auchus, 2011). Protože nejsou steroidy rozpustné ve vodě, jsou transportovány krví k jejich cílové tkáni nejčastěji spojené s proteinem transkortinem. Glukokortikoidy volně projdou skrze buněčnou membránu, kde vytvoří komplex s příslušným receptorem a jsou přesunuty do jádra (Nicolaidis et al., 2010).

GC jsou produkovány v nadledvinkách. Biologicky aktivní glukokortikoid je v případě člověka kortizol. Produkce tohoto hormonu v nadledvinách je regulována hypotalamus-hypofýza-nadledvinkovou (HPA = hypothalamic-pituitary-adrenal) osou. Jako odpověď na neurální, cytokininový či endokrinní signál je produkce kortikotropin-uvolňujícího hormonu (CRH), který stimuluje adrenokortikotropní hormon (ACTH) uvolňovaný z předního laloku (Webster et al., 2002). ACTH v nadledvinkách indukuje syntézu glukokortikoidů a jejich následnou sekreci do krevního oběhu. Celý tento systém funguje na základě zpětné vazby, kdy zvýšení cirkulujících GC vede k redukcí exprese CRH a ACTH. Produkce GC je spojena s denním rytmem. U lidí je nejvyšší koncentrace kortizolu v krvi ráno a postupně během dne klesá. Svého minima dosahuje v noci (Derek & Cidlowski, 2015).

U zdravých jedinců je pouze 5 % cirkulujícího kortizolu biologicky aktivní. 80-90 % je navázáno na kortikosterod-vazebný globulin (CBG) a 5-15 % je navázáno na albumin, který drží kortizol v neaktivní formě. CBG slouží jako nárazník proti kortizolovému napětí a hraje důležitou roli při uvolňování kortizolu do tkáně (Oakly & Cidlowski, 2013). Glukokortikoidová aktivita je regulována na buněčné úrovni enzymy 11b-hydroxidsteroid dehydrogenázové (11b-HSD) rodiny. 11b-HSD1 podporuje přeměnu kortizonu (neaktivní prekurzor kortizolu) v kortizol, čímž zvyšuje lokální glukokortikoidní aktivitu,

kteřá neodpovídá předurčené úrovni cirkulujícího kortizolu. Naproti tomu 11 β -HSD2 katalyzuje kortizol na kortizon, čímž snižuje aktivitu glukokortikoidů v buňkách. (Derek & Cidlowski, 2015; Cooper & Stewart, 2009).

Glukokortikoidy, známé také pod označením glukokortikosteroidy nebo kortikosteroidy, jsou nejučinnější protizánětlivé léky, které jsou k dispozici pro léčbu mnoha chronických zánětlivých a imunitních onemocnění, jako např. astmatu (Barnes, 2008). HPA osa reaguje jako součást stresového systému, ve kterém je spojena detekce fyzického nebo emocionálního stresu s uvolňováním glukokortikoidů. HPA osa je stimulována prozánětlivými cytokiny, včetně IL-1, TNFa, IL-6 a interferony typu I, které jsou zahrnuty v odpovědi na patogeny nebo tkáňové poškození (Derek & Cidlowski, 2015).

Syntetické GC (např. prednisolon, dexamethason) jsou široce užívané pro léčbu zánětlivých a imunitních poruch, včetně revmatoidní artritidy, roztroušené sklerózy, zánětu střev, sarkoidózy a neurotického syndromu (Bal et al, 2017; Rhen & Cidlowski, 2005). Často jsou také předepisovány k zabránění odmítnutí transplantovaného orgánu a k léčbě rakovin lymfoidního systému, jako je leukémie, lymfomy a myelomy (Rhen & Cidlowski, 2005, Miner et al., 2005). Ovšem léčba glukokortikoidy sebou nese také množství nežádoucích účinků včetně hyperglykémie a osteoporózy. Mimo to si pacienti, kteří jsou vystaveni dlouhodobému účinku GC, vypěstují vůči těmto látkám rezistenci. Z tohoto důvodu narůstá snaha navrhnout vhodné ligandy s protizánětlivou účinností konvenčních glukokortikoidů za co nejmenšího rozsahu nežádoucích účinků (Oakly & Cidlowski, 2013; Trebble et al., 2013).

1.1.2 Androgenní receptor

1.1.2.1 Charakteristika a struktura receptoru

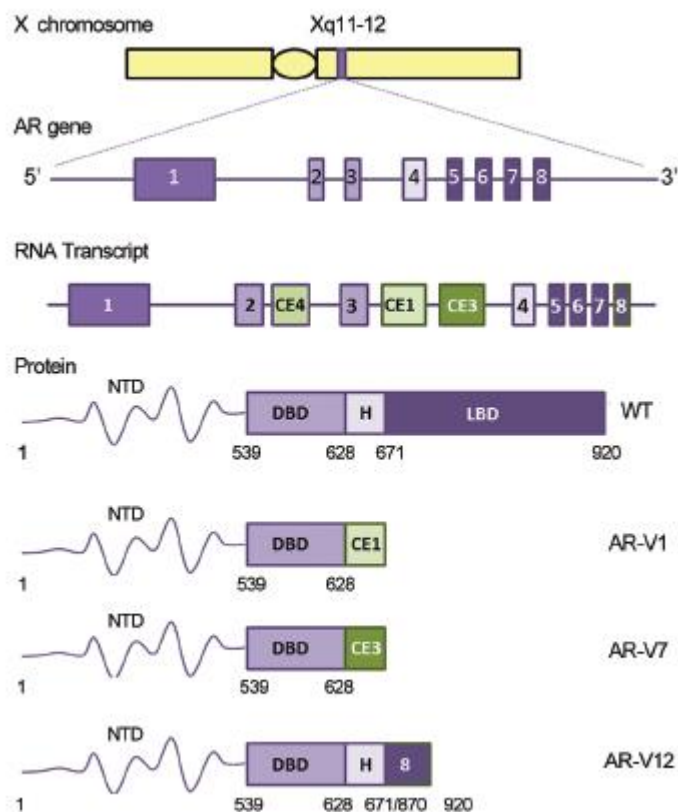
Androgenní receptor (AR) je členem rodiny jaderných receptorů a řadí se mezi steroidní receptory. Lidský gen pro AR se nachází na chromozomu Xq11 a je tvořen 8 exony. Podle příslušnosti genu do podrodiny 3 jaderných receptorů skupiny C, jakožto člen 4, bývá označován NR3C4 (Lu et al., 2006).

Jednotlivé exony v různém početním zastoupení kódují N-terminální doménu (NTD) – exon 1, DNA vazebnou doménu (DBD) – exon 2 a 3, závěsný region – exon 4, a ligand vazebnou doménu (LBD) – exon 5 – 8 (Higa & Fell, 2013). NTD zahrnuje aktivační funkční

doménu (AF-1), která zajišťuje většinu AR aktivity (Jenster et al., 1995). AF-1 je tvořena dvěma jednotkami – na ligandu závislou TAU1 a na ligandu nezávislou TAU5 (Monaghan & McEwan, 2016). Za NTD následuje DBD se dvěma zinkovými prsty, které zodpovídají za dimerizaci, rozeznávají odpovídající androgenní responzivní element (ARE) a upevňují receptor k rozeznáním sekvencím (Verrijdt et al., 2006; Brinkmann et al., 1989). Pro rozpoznání a navázání na ARE slouží P-box, a D-box zprostředkovává dimerizaci receptoru na DNA (Kumar & McEwan, 2012). Závěsný region obsahuje jaderný lokalizační signál tvořený sekvencí RKLKKL, který je cílem pro acetylaci, ubiquitinaci a metylaci. Velice důležitou roli hraje pantová oblasti při translokaci receptoru do jádra a při vazbě DNA (Clinckemalie et al., 2012; Cutress et al., 2008). LBD obsahuje ligand vazebnou kapsu, která je důležitá pro rozpoznání příslušného ligandu. Jedná se o místo pro navázání endogenního androgenu a exogenního antiandrogenu. Kromě toho tato doména obsahuje AF-2 doménu, která je na ligandu závislá a je důležitá pro formování vazebného místa pro koregulátory, stejně tak jako pro zprostředkování interakce mezi N-terminální a ligand vazebnou doménou (N/C interakce) (Matias, 2000; Slagsvold et al., 2000; Wilson, 2011).

Stejně jako GR i AR má více možností vzniku a existuje tedy více jeho podob. Jednotlivé varianty se označují jako AR-Vx a ty mohou vznikat mutacemi nebo alternativními sestřihy (Shweizer & Yu, 2015). Různé varianty vykazují rozdílné interakce s koregulujícími proteiny, transkripčními faktory, DNA a léky využívanými pro léčbu rakoviny prostaty (Dehm et al., 2008; Sun et al., 2010).

AR je ligandem aktivovaný transkripční faktor, který kontroluje expresi specifických genů zatažených do mnoha fyziologických a patologických procesů (Mangelsdorf et al., 1995; Higa & Fell, 2013). Tento receptor se podílí na umožnění mužské sexuální diferenciaci a produkci spermií, mimo to má svou roli v metabolismu, nervovém systému a podněcuje růst lebečních svalů (Davison & Bell, 2006; Sinnesael et al., 2012). Má vliv na pubertální vývoj primárních a sekundárních sexuálních znaků, úroveň mentální energie, libido a sílu svalstva. V dospělosti se podílí na celkovém správném fungování, u mužů ovlivňuje plodnost a je zahrnut do nástupu rakoviny prostaty a prsu (Pietri et al., 2016; Higa & Fell, 2013).

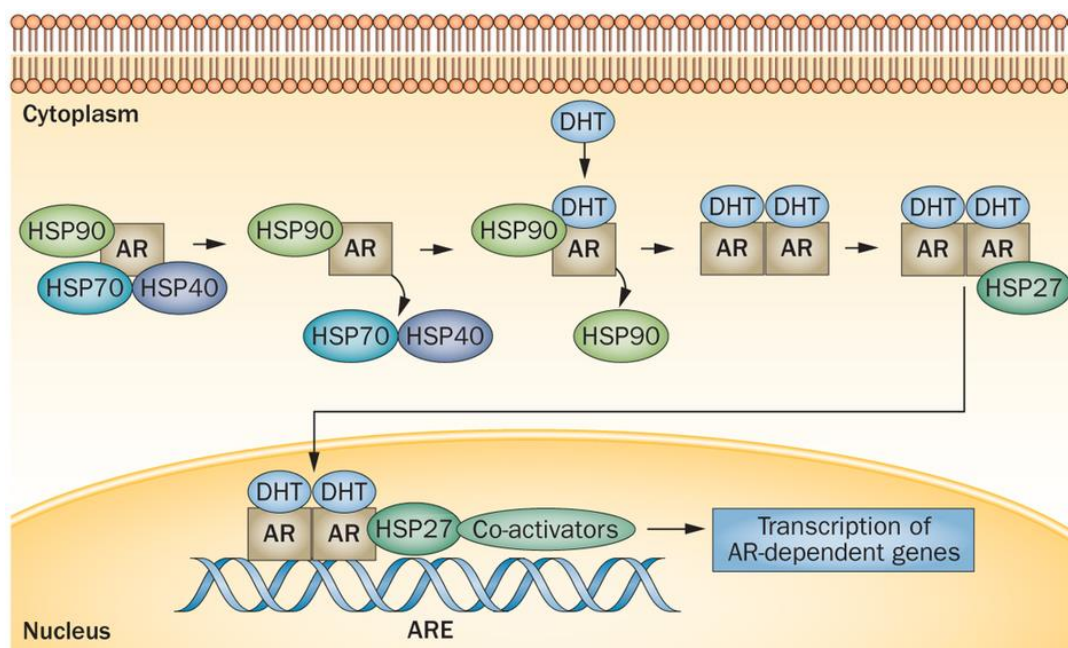


Obr. 5 Umístění a struktura genu pro AR, struktura transkriptu a finálního proteinu (AR se skládá z N domény, DNA-vazebné domény, závěšného regionu a Ligand-vazebné domény. Alternativní sestřihy RNA transkriptu vedou ke vzniku různých variant AR.) (Převzato z: Monaghan & McEwan, 2016)

1.1.2.2 Aktivace receptoru

Neaktivovaný AR se nachází v cytoplazmě v neaktivním komplexu s heat shock proteiny (HSP70 a HSP90) a imunofiliny v tzv. chaperonovém komplexu. Chaperonové proteiny udržují receptor poskládaný v takové konformaci, která usnadňuje navázání specifického hormonu (Kumar & McEwan, 2012; Koryakina et al., 2014). Interakci mezi AR a HS a chaperonovými proteiny zprostředkovává LBD (Heinlein & Chang, 2002). Po navázání ligandu dochází ke změně konformace LBD a receptor je uvolněn z chaperonového komplexu, což mu umožňuje přesunout se do jádra a navázat se na elementy DNA, které jsou umístěny v obou směrech – proximálně i distálně vůči transkripčnímu počátku (Wang et al., 2009). DBD umožňuje rozeznání a navázání na AREs a dimerizaci receptoru na DNA, což vede k vytvoření AR-transkripčního komplexu s transkripční aktivitou skrze interakci NTD-LBD (Kumar & McEwan, 2012; Koryakina et al., 2014). Jakmile se naváže na DNA, AR rekrutuje koaktivátory a generální transkripční faktory k úpravě transkripce a translace cílového genu (Obr. 6). Agonisté

rekrutují koaktivátory aby se rozšířila transkripce a translace cílových genů, proti tomu antagonisté receptoru brání koaktivátorům ve spojování s AR, nebo ponechávají AR v cytoplasmě v inaktivní formě (Narayanan & Dalton, 2016). Po dokončení molekulární aktivity je AR-transkripční komplex okamžitě odloučen a přenesen do cytoplazmy pomocí chaperonů. AR je také předmětem posttranskripčních modifikací jako je fosforylace, ubiquitinace a metylace (Kumar & McEwan, 2012; Koryakina et al., 2014).



Obr. 6 Aktivace androgenního receptoru (Bez ligandu je AR v cytoplasmě v multiproteinovém komplexu, který jej drží v inaktivní formě, ale zajišťuje vysokou afinitu vzhledem k ligandu. Po navázání ligandu dochází k uvolnění z komplexu, dimerizaci s dalším AR a pomocí HSP27 dochází k lokalizaci jádra, v němž dochází k navázání na ARE a spuštění transkripce.) (Převzato z: Azad et al., 2014)

1.1.2.3 Ligand

Tento receptor je aktivován širokou skupinou steroidních hormonů zvanou androgeny (např. testosteron, dihydrotestosteron (DHT)) (Jenster et al., 1995). Všechny přírodní steroidní hormony jsou syntetizovány z cholesterolu v nadledvinkách a/nebo pohlavních žlázách. Jsou hydrofobní povahy, což jim umožňuje snadný průchod skrze buněčnou membránu. Syntetizované steroidní hormony jsou přenášeny krví navázané na proteinový nosič, jako je např. albumin nebo pohlavní hormon vázající globulin (SHBG) (Cooper et al., 2013).

Androgeny jsou mužské pohlavní hormony potřebné pro rozvoj mužského reprodukčního systému a sekundárních pohlavních znaků (Davey & Grossmann, 2016). Testosteron je produkován v největší koncentraci. Jedná se o 19-C steroid s androgenními

a anabolickými účinky v těle. Primárně je produkován pohlavními žlázami – Leydigovými buňkami ve varlatech a v určitém množství i u žen v Theca buňkách vaječníků. Mimo to může ale vznikat v kůře nadledvinek a periferní přeměnou androstendionu (Palacios, 2007). Testosteron může být převeden na biologicky aktivnější formu DHT, který poté zprostředkovává svou akci skrze transkripční aktivitu AR. Afinity AR vůči DHT je 2x vyšší než pro testosteron a rychlost disociace je u DHT 5x nižší než u testosteronu (Grino et al., 1990).

Testosteron má v těle mnoho fyziologických účinků – stimuluje růst svalů a jejich udržení, podporuje vývoj kostí a inhibuje jejich resorpci, zvyšuje množství červených krvinek a hladinu hemoglobinu, zvyšuje libido a erektilní funkce, zlepšuje náladu a kognitivní funkce. Naopak nízká hladina testosteronu nebo deficit androgenů obecně vyvolává slabost, sarkopenii, hypertrofii tukové tkáně a sníženou neurotransmisi (Coope et al., 2013).

Další androgeny jsou slabými ligandy androgenního receptoru. Jedná se o dihydroepiandrosteron (DHEA), androstenediol a androstenedion. Ačkoliv jde o slabé agonisty AR, mohou být přeměněny na testosteron nebo DHT, které se pak na receptor navážou (Chan & Dehm, 2014).

Mimo endogenní steroidní hormony byly identifikovány exogenní zdroje, jako např. luštěniny, sója, batáty a průmyslových chemikálie, které mohou působit jako endokrinní disruptory či jako toxické látky (Sikka & Wang, 2008).

Androgeny mají své využití jako anabolické steroidy. Jsou nejúčinnější formou sportovního dopingu a jsou při testování nejčastějším typem zjištěné látky pro zvýšení výkonu. Svou oblibu si získaly díky schopnosti zvýšit podíl svalové hmoty, snížit tukovou hmotu, zvýšit výkon a udržovat intenzivní tréninkové období (Yesalis, 2000). Nadměrné užívání může ovšem vést k vážným klinickým následkům jako je abnormální jaterní funkce, gynekomastie, těžké psychologické a psychiatrické poruchy, zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění a u žen poruchy menstruace a rozvoj mužských sekundárních pohlavních znaků (Kickman, 2008). Některé androgeny nejsou při klasickém testování na doping zjištěny, a proto testování činnosti AR bylo zvoleno jako alternativní testování pro kontrolu sportovního dopingu (Cooper et al., 2013).

Kromě využití jako dopingu se ovšem androgeny využívají pro klinické účely pro léčbu řady různých lidských onemocnění a stavů, jako je obstrukční plicní nemoc, těžké popáleniny, v souvislosti s úbytkem svalů vlivem HIV, nebo při léčbě stavů vyplývajících

z nedostatku produkce androgenů, jako je konstituční zpomalení růstu a hypogonadismus. Androgenní terapie může být prováděna orálně, intramuskulárním podáním (injekce) či pomocí gelů a krémů (Demling & Orgill, 2000; Cooper et al., 2013).

1.1.3 Thyroidní receptor

1.1.3.1 Charakteristika a struktura receptoru

Thyroidní receptor (TR) náleží stejně jako předchozí receptory do skupiny jaderných receptorů. Jedná se o ligandem aktivovaný transkripční faktor, který váže thyroidní hormon. Na rozdíl od steroidních receptorů, TR reguluje transkripci oběma způsoby – v přítomnosti i v nepřítomnosti ligandu (Yen, 2001; Harvey & Williams, 2002; Zhang & Lazar, 2000; Torchia et al., 1998). Tyto receptory jsou formovány z jednoho jediného peptidu, který je složen ze tří funkčních domén: N-terminální doména (A/B doména), centrální DNA-vazebná doména (DBD) a C-terminální ligand-vazebná doména (LBD) (Ortiga-Carvalho et al., 2014).

V A/B doméně se nachází aktivační region (AF-1) jehož funkce je málo pochopena (Brent, 2012). Stejně jako u ostatních jaderných receptorů i zde DBD obsahuje 2 zinkové prsty. Mezi DBD a LBD se nachází pant obsahující jaderný lokalizační signál. LBD určuje specifitu receptoru pro ligand a moduluje kapacitu pro formování jak homodimerů, tak heterodimerů s ostatními členy superrodiny jaderných receptorů. Obsahuje mnoho kontaktních ploch důležitých pro heterodimerizaci s jeho partnerem – retinoidním X receptorem – stejně tak jako pro protein-protein interakci s korepresory a koaktivátory (Cheng et al., 2010, Figueira et al., 2011; Yen et al., 2006).

Dva TR geny – THRA a THRB – kódují tři proteiny s plnou receptorovou funkcí na genomové úrovni: TR α 1, TR β 1 a TR β 2. Kromě těchto forem existují další zkrácené proteiny postrádající DNA-vazebnou doménu nebo funkční T3-vazebnou doménu (Kalayanaraman et al., 2014). THR α a THR β proteiny jsou si strukturou podobné, ale mají rozdílné a/nebo komplementární fyziologické role, které přesahují do jejich rozdílné distribuce v tkáních (Obr. 7) (Bochukova et al., 2012; Refetoff & Dumitrescu, 2007). Lidský THRA se nachází na chromozomu 17, THRB na chromozomu 3 (Yen, 2001; Harvey & Williams, 2002; Zhang & Lazar, 2000).

Protein	Able to bind T ₃	Able to form dimers	Diagram
THRβ1	Yes	Yes	
THRβ2	Yes	Yes	
THRβ3	Yes	Yes	
THRα1	Yes	Yes	
THRα2	No	Yes	
THRα3	No	Yes	

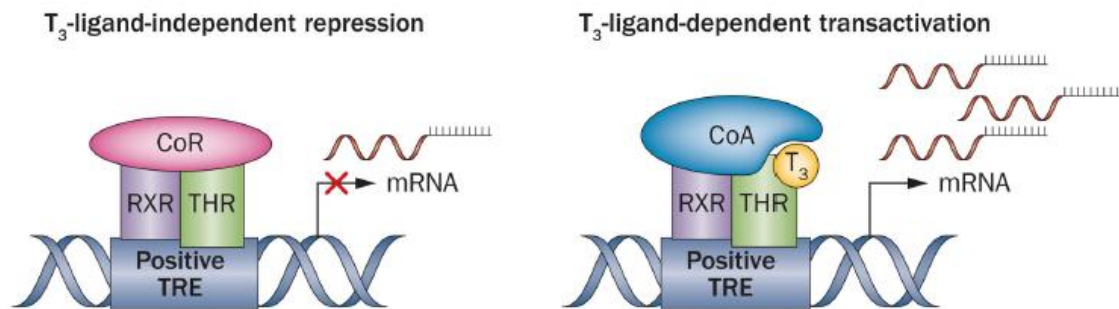
Obr. 7 Struktura jednotlivých forem thyroïdního receptoru (Thyroidní receptor se nachází ve dvou formách – THRα a THRβ, které jsou kódovány dvěma různými geny a nachází se v různých variantách sestřihů.) (Převzato z: Ortiga-Carvalho et al., 2014)

1.1.3.2 Aktivace receptoru

V současnosti je toho o distribuci thyroïdního receptoru v buňce v nepřítomnosti ligandu známo jen málo. Zhruba 90 % běžného TRβ se nachází v jádře v případě absence i přítomnosti T₃ (trijodthyronin) (Baumann et al., 2001).

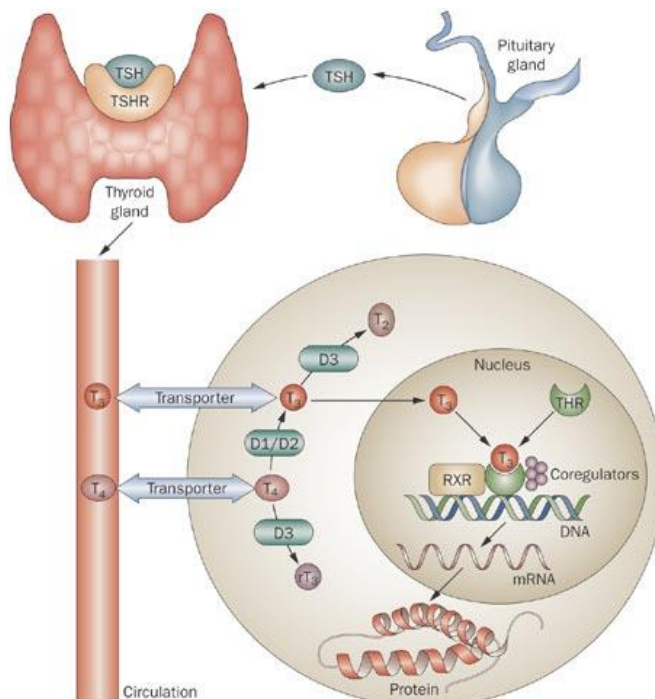
Při absenci ligandu vytváří TR komplex, kdy AF-1 interaguje s kofaktory, jako je jaderný receptorový korepresor 1 (CoR) nebo jaderný receptorový korepresor 2 (CoR2) (Lavery & McEwan, 2005; Cohen et al., 2001). Korepresor vytváří komplex s histon deacetylázou, která modifikuje chromatinovou strukturu s výsledkem poklesu genové transkripce (Astapova et al., 2008). Po navázání T₃ je tento komplex destabilizován a korepresory se uvolňují, což vede k uzavření helix 12. Konformační změny helix 12 v AF-2 doméně vedou k expozici AF-2 a to dovoluje navázání dalších proteinů (kofaktorů), včetně koaktivátorů jako je jaderný receptorový koaktivátor 1 (CoA-1) a korepresory, jako je již zmiňovaný CoR (Obr. 8) (Ortiga-Carvalho et al., 2005; Astapova et al., 2008; Feng, 1998).

Když TR naváže T₃, LBD prodělá dramatickou strukturální změnu, která usnadňuje spojení s koaktivátory (Valadares et al., 2008). Fyziologická významnost a specifická role koaktivátorů a korepresorů, které se vážou na AF-2 aby usnadnily T₃ řízenou inhibici transkripce, nejsou dobře známé, nicméně bylo prokázáno, že tato oblast je rozhodující pro T₃ zprostředkovanou transkripční inhibici (Ortiga-Carvalho et al., 2005).



Obr. 8 Model genové regulace thyroidními hormony (V nepřítomnosti T₃ je korepresor navázán na heterodimer RXR-THR v místě TRE, čímž je aktivně potlačena exprese cílového genu. Ve chvíli, kdy se T₃ naváže na THR dimer, korepresor je uvolněn a ke komplexu je připojen koaktivátor, který umožní aktivaci genové transkripce.) (Převzato z: Ortiga-Carvalho et al., 2014)

Klasická genomická akce receptoru začíná tedy navázáním ligandu na receptor TR α nebo TR β . Receptor rozezná specifický thyroidní responzivní element (TRE) v promotoru T₃ cílového genu a aktivuje nebo potlačí transkripci jakožto odpověď vyvolanou navázaným hormonem (Obr. 9) (Yen, 2001). Receptor se váže na TRE převážně jako heterodimer s retinoidním X receptorem (RXR), ale může se také vázat ve formě homodimeru (Yen et al., 2006).



Obr. 9 Aktivace thyroidního receptoru (činností TSH a TRH (viz kapitola 2.1.3.3 Ligand) jsou ve štítné žláze syntetizovány hormony T₄ a T₃. Po transportu do buňky jsou T₄ pomocí deiodinázových enzymů přeměny na T₃ a T₃ se přesouvá do jádra, kde se naváže na THR, který dimerizuje s RXR a ve formě heterodimeru nasedají tyto receptory na příslušný responzivní element na DNA a spouští transkripci genu vedoucí k syntéze určitého proteinu.) (Převzato z: Ballini, 2012)

1.1.3.3 Ligand

Ligandem TR jsou hormony štítné žlázy (thyroxine (T4) a trijodthyronin (T3)) zahrnující různorodé fyziologické účinky jako je regulace růstu, kontrola rychlosti metabolismu, pozitivní chonotropní a inotropní účinky na srdce a vývoj centrálního nervového systému (CNS). Deficit hormonů štítné žlázy má různé účinky na organismus podle toho, jak je intenzivní a v jakém období vývoje nastal. Specifické načasování nástupu může vést až k nevratnému poškození mozku (Bernal, 2005; Koibuchi & Iwasaki, 2006). Syntéza thyroidních hormonů (TH) je řízena hypothalamickým thyreotropin uvolňujícím hormonem (TRH) a hypofyzárním štítnou žlázu stimulujícím hormonem (TSH) a naopak T4 a T3 regulují TRH a TSH syntézu jako část negativní zpětné vazby. Vstup TH do buněk je řízen membránovými transportéry. Uvnitř buňky zprostředkovávají metabolismus TH deiodinázové enzymy (DIOs) – DIO1 generuje T3 v periferních tkáních, DIO2 zprostředkovává přeměnu T4 na T3 v CNS včetně hypofýzy a hypothalamu a DIO3 zprostředkovává katabolismus TH do formy neaktivních metabolitů (St. Germain et al., 2009).

T3 je přirozeným ligandem TR. T4 může působit skrze TR také, ale afinita receptoru pro T4 je značně nižší než pro T3. Z pohledu genomického konceptu hormonální aktivity je T4 spatřován jako prohormon, který dává pomocí deiodinázové aktivity vzniknout metabolicky aktivnímu T3 (Davis et al., 2006; Wu & Koenig, 2000). Co se týče syntézy hormonu, ve větším množství je produkován T4 a biologicky aktivní T3 je produkován pouze v malém množství. Nicméně právě činností DIOs je T4 na T3 přeměňován (Bianco et al., 2002).

Mimo T3 a T4 existuje velké množství exogenních ligandů zahrnujících přírodní i syntetické látky, léky a environemntální polutanty (např. PCB, dioxiny), které mohou narušovat akci thyroidních hormonů a tím ovlivňovat normální funkci endokrinního systému (Zoeller, 2005; Boas, 2006). V současnosti je snaha syntetizovat thyromimetické léky, kde se očekává, že dokáží poskytnout prospěšné účinky T3 (zejména snížení hladiny cholesterolu), ale zároveň nebudou mít toxický vliv na srdce (Figueira et al., 2011).

1.2 NANOMATERIÁLY

Nanomateriály jsou v současnosti velice častým a oblíbeným tématem nejen na vědeckém poli. Evropská komise stanovuje nanomateriál jako přirozeně, náhodně nebo uměle získaný materiál, který obsahuje v nevázaném stavu nebo jako agregát či aglomerát minimálně 50 % částic, které mají nejméně v jednom rozměru velikost v rozpětí 1 – 100 nm (Evropská komise, 2012). Jednou z významných charakteristik nanomateriálů je nárůst poměru plochy povrchu k objemu částic. Dochází ke vzrůstajícímu podílu povrchových atomů se zmenšením rozměrů objektů. Povrchové atomy tak mají nižší počet sousedů, než atomy v objemu materiálu a vytvářejí tím pádem menší počet vazeb, což ovlivňuje jejich vazebné energie a jejich prostorové uspořádání (Mayoral et al., 2010). Tato skutečnost má silný vliv na chemické a fyzikální vazby na hranicích zrn v materiálu (Anonym¹, 2009). Tato práce věnuje pozornost grafen oxidu, který se řadí mezi uhlíkové nanomateriály a jeho charakteristiky dané jeho uspořádáním jsou uvedeny níže. Kromě uhlíkových nanomateriálů se samozřejmě můžeme setkat s mnohými dalšími, jako například s nanomateriály zlata, železa, křemíku atp. Teoreticky mohou být vytvořeny z jakékoliv látky a v současnosti máme k dispozici cca 44 prvků periodické tabulky a jejich sloučenin, které se vyskytují v nanoformě (Kahru et al., 2008).

Nanomateriály nejsou výsledkem čistě umělé výroby a vznikají i bez lidského přičinění po celou dobu existence Země. Mezi způsoby vzniku nanomateriálů řadíme lesní požáry, vulkanickou aktivitu a eroze, ale také například mikrobiologickou aktivitu. Co se lidské činnosti týče, podílí se na existenci nanomateriálů cíleně jejich syntézou, i neúmyslně, například spalovacími procesy (doprava, průmysl, energetika) (Bhat & Tripathi, 2011; Handy et al., 2008a; Klaine et al., 2008).

Světový trh s nanomateriály roste velice rychle a odhaduje se, že ročně je produkováno 11 milion tun nanomateriálů v hodnotě 20 bilionů euro (Evropská komise, 2012). Celosvětový trh s grafenem je pak odhadován, že vzroste na 675 milionů amerických dolarů do roku 2020 (McWilliams, 2011). Evropská unie identifikuje nanotechnologie jako klíčovou technologii pro EU, jakožto jednu z hlavních technologických sil inovace (Savolainen et al., 2013). Potenciál nanomateriálů je spatřován zejména ve vědě a medicíně, mimo to také v potravinářství, elektronice, strojírenství, stavebnictví či kosmickém průmyslu (Anonym¹, 2009).

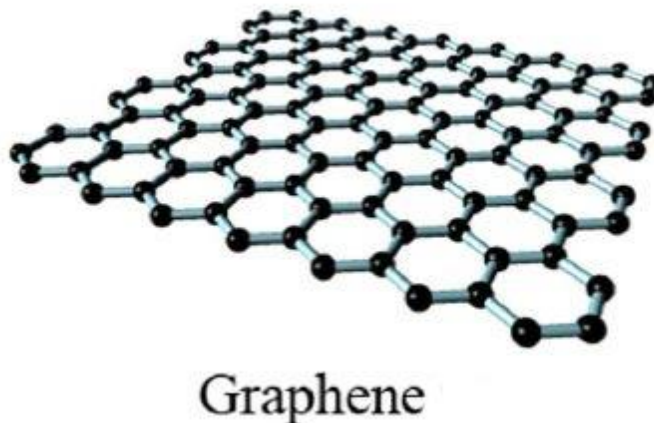
Ve zdravotnictví nachází nanočástice své uplatnění a potenciál díky širokému spektru unikátních fyzikálně-chemických a biologických vlastností, zahrnujících velký poměr povrch/objem, specifické strukturální vlastnosti, schopnost navázání specifické agens na svém povrchu, schopnost projít buněčnou nebo tkáňovou bariérou a dlouhou dobu cirkulace v krevním systému v porovnání s jinými látkami (Pitkel et al, 2016).

Na druhou stranu je ale třeba věnovat pozornost rizikům a bezpečnosti při užívání nanoléciv a celkovém využívání nanomateriálů a jejich vlivu na životní prostředí. Nejen vliv na člověka, ale vliv i na nejmenší části ekosystému by mohl mít nečekané důsledky větších rozměrů. Zejména je třeba věnovat pozornost uměle sestrojeným nanomateriálům. Předpokládá se, že organické bio-degradovatelné nanočástice budou menším problémem, protože budou rozloženy metabolickými drahami (Cockburn et al., 2012). Naproti tomu anorganické biologicky nerozložitelné nanočástice mohou přetrvávat po značnou dobu, a jejich vlivu budou lidé, zvířata i životní prostředí vystaveny dlouhodobě a následky tohoto dlouhodobého vlivu nám zatím nejsou známy (Hall, 2001; Radomska et al., 2016). Mimo to už teď víme, že se některé nanočástice dokážou v určitých případech chovat toxicky (Anonym¹, 2009).

Problémem navíc může být tendence agregace. Očekává se, že ve většině případů budou nanomateriály po vstupu do reálného prostředí agregovat, takže pouze část z nich si zachová nanoformu. Bude docházet ke shlukování a sedimentaci a ve vodním prostředí tím mohou být ohroženy bentické organismy. Stejně tak může docházet k usazování látek v tělech organismů a jejich kumulaci (Franklin et al., 2007; Baun et al., 2008; Handy et al., 2008c). Mnoho nanomateriálů se navíc díky svému specifickému povrchu může v reálném prostředí vázat na další látky, čímž mohou být ovlivněny vlastnosti těchto materiálů, včetně toxicity, či mohou pomoci v transportu a distribuci vázaných kontaminantů (Navarro et al., 2008; Baun et al., 2008; Handy et al., 2008a; Christian et al., 2008). Je proto nutné důkladně zvážit všechna možná rizika.

1.2.1 Grafen

Grafen je dvourozměrný uhlíkový nanomateriál tvořený jednou vrstvou atomů. Je to jeden z nejsilnějších kdy testovaných materiálů s pevností v tahu vyšší než 100 GPa a pružností v tahu 1 TPa (Novoselov et al., 2015). Tloušťka grafenového listu činí 0,35 – 1,6 nm. Tento materiál má triagonálně spojené atomy uhlíku vazbou sp^2 , které jsou pevně uspořádány do hexagonální krystalové mřížky ve tvaru včelí plástve (obr. 10) (Kuila et al, 2012). Díky této hybridizační vazbě sp^2 je grafen dobrým elektrickým vodičem (La Fuente, 2009). Jedná se o hydrofóbní látku, která je špatně dispergovatelná ve vodě (Farré et al., 2009).



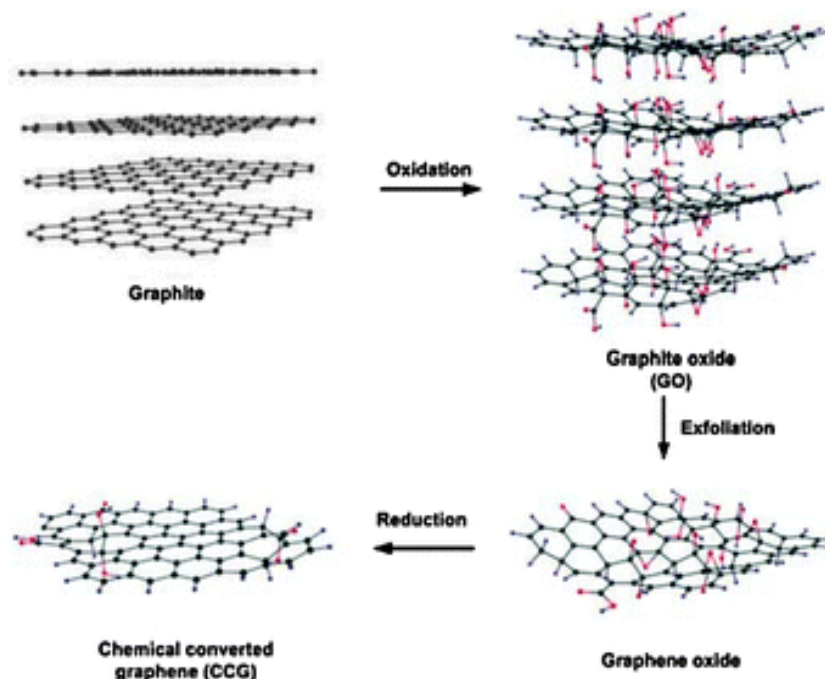
Obr. 10 Struktura Grafenu (Jednovrstevný nanomateriál ve tvaru hexagonální krystalové mřížky s triagonálně pospojovanými atomy uhlíku) (převzato z: Kiew et al., 2016).

1.2.2 Grafen oxid – charakteristika

Grafen oxid (GO) se získává oxidací grafítu, jež se vyskytuje hojně a levně. Nejpopulárnější metodou jeho syntézy je tzv. Hummersova metoda (obr. 11), což je jedna z 4 základních metod získávání GO (Anonym², 2017).

Jedná se o oxidovanou formu grafenu, protkanou skupinami obsahujícími kyslík. Tato řada reaktivních skupin usnadňuje aplikaci GO listů v bioinženýrství (Sabourin et al., 2009). Přítomnost kyslíkových skupin ve struktuře GO narušuje sp^2 síť, které grafenu zajišťují výbornou vodivost a na základě nasycení GO kyslíkem může být jeho vodivost snížena, nebo se GO stává, v případě plného nasycení, elektrickým izolátorem (La Fuente, 2009). Tvoří jej tedy hydrofobní domény složené z sp^2 -hybridizovaných grafenových

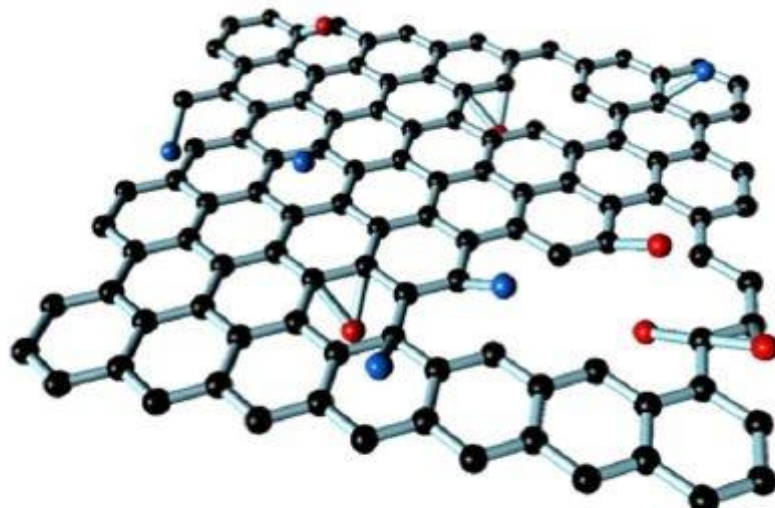
mřížek, ale také hydrofilní domény, kde je grafenová mřížka substituována kyslíkovými funkčními skupinami. Díky přítomnosti hydrofilních skupin by listy malé velikosti a o nízké koncentraci měly být více biokompatibilní, čímž se stávají atraktivní pro vědu (Wu et al., 2015). GO obsahuje velké množství reaktivních kyslíkových funkčních skupin, zahrnujících epoxidové, karboxylové a hydroxylové skupiny. Tyto skupiny se nacházejí na bazální rovině a rozích GO a umožňují mu interagovat s proteiny skrze kovalentní, elektrostatické a vodíkové vazby (Lerf et al., 1998; Shih et al., 2012; Gu et al., 2014).



Obr. 11 Hummersova metoda (Z 3D grafítu je oxidací získán 3D grafít oxide, z něhož je exfoliací odloučena vrstva 2D grafen oxidu. Následnou redukcí GO může být získán čistý grafen) (Převzato z: Xiang et al., 2012).

Na rozdíl od grafenu, který je hydrofobní, se GO rozpouští ve vodě, díky přítomnosti polárních povrchových skupin a adsorpci rozpuštěné organické hmoty na jejich povrchu, což zvyšuje jeho dispergovatelnost (Handy et al., 2008a; MacCormack et al., 2014). Přítomnost kyslíku mu zajišťuje dobrou dispergovatelnost nejen ve vodě, ale i v dalších organických rozpouštědlech či jiných matrix (La Fuente, 2009). Celková rozpustnost závisí jak na polaritě rozpouštědla, tak na rozsahu povrchové funkcionalizace udělované při oxidaci. Dobrá rozpustnost GO je důležitá zejména pro aplikaci v biotechnologiích (Hummers et al., 1958).

GO má vysokou povrchovou plochu, díky čemuž může být využit jako materiál elektrod pro baterie, kondenzátory či solární články. GO je považován za snadno zpracovatelný a jeho výroba je levnější a jednodušší, než v případě grafenu (Anonym², 2017).



Graphene oxide (GO)

Obr. 12 **Struktura Grafen Oxidu** (Oxidovaná forma grafenu, protkaná kyslíkovými skupinami, které narušují pravidelnost struktury pozorované u čistého grafenu) (převzato z: Kiew et al., 2016).

Vzhledem k zájmu medicíny o aplikaci GO či jiných uhlíkových nanomateriálu je na místě věnovat pozornosti možné cytotoxicitě zkoumaného materiálu. I přes velký zájem o uhlíkové nanomateriály existuje zatím pouze málo studií zkoumajících *in vitro* cytotoxicitu GO na bakteriálních nebo savčích buňkách (Sun et al., 2008). Navíc záleží, a to nejen u cytotoxicity, na typu materiálu, a ne pouze na prvku, ze kterého je tvořen. Fullereny, které jsou stejně jako GO z uhlíku, mají jiné toxické vlastnosti než ultrajemné grafitové částice (Handy et al., 2008a; Handy et al., 2008b). Ukázalo se, že způsob syntézy daného nanomateriálu může ovlivnit jeho fyzikální vlastnosti jako je rozpustnost, povrchová funkčnost a toxicita (Pumera, 2011). Toxicita může vykazovat různých hodnot při odlišných velikostech částic GO nebo při různém nasycení kyslíkem (Liao et al., 2011).

Hu a spol. zjistili, že GO inhibuje bakteriální růst, ale vykazoval minimální toxicitu na lidských buňkách alveolárního epitelu (Hu et al., 2010). Akhaven a spol. objevili, že GO způsobuje škody na membránách bakterií *Escherichia* a *Staphylococcus* (Geim & Novoselov, 2007; Hernandez et al., 2008). Jeden z výzkumů demonstroval toxicitu GO na lidských fibroblastech závislou na dávce, kdy po překročení hraniční dávky 50 $\mu\text{g/ml}$ je toxicita zřetelná, proti tomu ale další dva výzkumy ukazují vysokou biokompatibilitu GO nanočástic, kdy Chang et al. neodhalili žádnou zřetelnou toxicitu GO nanočástic (testováno

na buněčné linii A549 – adenokarcinom lidských alveolárních buněk) (Wang et al., 2008; Ryoo et al., 2010; Chang et al., 2011).

Ve výsledku všechny studie demonstrují vysokou bakteriální toxicitu, ale nejsou jednotné v interpretaci ohledně toxicity mnohobuněčných organismů (Liao et al., 2011). Jako vysvětlení se nabízí fakt, že fyzikálně chemické charakteristiky GO, jako je velikost, povrchový náboj, částicový stav, povrchové funkční skupiny a zbytkové prekurzory nejsou vždy dobře ovladatelné, ačkoliv zrovna ony mohou mít signifikantní vliv na biologickou/toxikologickou aktivitu (Gil et al., 2010).

Dalším problémem tohoto tématu je zjišťování cytotoxicity pomocí MTT testu, který je v případě určování viability/toxicity nejběžněji využívaným testem. Byla testována reakce GO s MTT bez přítomnosti buněčné linie a díky tomu byla dokázána nedůvěryhodnost tohoto testu, který může vykazovat falešně vyšší viabilitu, než ve skutečnosti je. Tento test není vhodný pro práci s uhlíkovými nanomateriály, protože jejich vlivem může docházet ke spontánní redukci MTT, což následně vede k falešně pozitivnímu signálu. V praxi to znamená, že falešný signál může zamaskovat skutečnou toxicitu nanomateriálu. Látka vypadá na oko netoxická díky spontánní redukci MTT na formazan, který za normálních okolností vzniká pouze v živých buňkách. V tomto případě ovšem může vznikat i pokud buňky budou usmrceny (Liao et al., 2011; Monteiro-Riviere et al., 2006; Worle-Knirsch et al., 2006).

1.2.3 Grafen oxid – využití v biologických oborech

Grafen oxid se v poslední době stává oblíbenou a velice zkoumanou látkou v mnoha biologických odvětvích. V současnosti je velká pozornost věnována GO jakožto nosiči léků pro léčbu rakoviny. Mnoho protinádorových látek je totiž toxických nejen pro rakovinové buňky, ale také pro buňky zdravé, a je proto třeba hledat nové možnosti. Grafen oxid kombinuje několik dobrých vlastností.

Funkcionalizovaný GO díky své velké ploše ($2\ 600\ \text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) může přepravit velké množství léčiva naráz, které se na jeho povrch snadno naváže (Yang et al., 2010). Na rozdíl od jiných nanomateriálů na bázi uhlíku, dvojrozměrný GO, má plochu i hranu dostupnou pro biomolekulární interakci, což mu propůjčuje vysokou nosnost léčiv (Kiew et al., 2016; Hu H. et al., 2012; Zhang et al., 2010). Rakovinové buňky jsou kyselejší než buňky zdravé, a proto tým vědců vyvinul systém, díky kterému se protilátky, navázané na GO, uvolňují jen v případě poklesu pH, což umožní zvýšit dávku, protože zacíleny budou pouze buňky

nemocné. Zeta potenciály GO suspenzí jsou totiž citlivé na pH. GO listy mohou vytvořit stabilní suspenzi při hodnotě pH 3 – 12, s tím, že nejvyšší stability dosahují při pH 7 nebo 8 (Chen et al., 2013). Právě tato skutečnost umožnila formulaci GO do inteligentního systému, který má kontrolovanou uvolňovací schopnost v různých specifických mikroprostředích (např. při slabé kyselosti) (Yang et al., 2008). Tímto se zabývala například studie Yanga a kol., Depana a kol a Mendese a kol., kteří přišli s faktem, že protirakovinná molekula doxorubicin (DOX) tvoří silné pouto s GO povrchem, a uvolňování DOX je rozsáhlejší v kyselém prostředí nebo nádorovém prostředí než v normální tkáni. Nosič nesoucí DOX ho uvolní 6x více při pH 5 než při pH 7 (Yang et al., 2008; Depand et al., 2011). Kromě intracelulárních změn v pH, koncentraci iontů a teploty, existují i vnější metody jako je ultrazvuk, magnetická a elektrická pole, která mohou být využity pro uvolnění léčiv z nosiče (Wu et al., 2015). Výzkum se nyní zabývá tím, zda GO, po splnění své funkce a doručení léku do cílové buňky, dokáže opustit tělo bez vedlejších nežádoucích účinků na pacienta (Kiew et al., 2016).

GO může narážet v tomto případě ovšem i na další omezení, ať už kvůli agregaci v PBS či na proteiny bohatém médiu, nebo nejednotné velikosti. Průnik do buňky mu zhoršuje jeho nedostatečná tuhost. Dalším problémem je fakt, že zatím byl GO zkoumán pouze *in vitro* a nejsou známy jeho dopady na živý organismus (Kiew et al., 2016; Sun et al., 2008).

Vyjma doručování léků se uvažuje o GO jako o přenašeči genů, což by umožnilo léčbu různých onemocnění způsobených genetickými poruchami. Využití syntetických látek se uvažuje kvůli nepředvídatelnosti virových vektorů, jakožto přenašečů genů (Wu et al., 2015).

Své využití může GO také najít ve tkáňovém inženýrství. Studie kupříkladu dokázaly schopnost GO podporovat diferenciaci kmenových buněk v osteogenních, kardiogenních, neurálních a adipogenních liniích (Ryu et al., 2012; Kim et al., 2015; Bressan et al., 2014). Na mnoho dalších studií zabývajících se využitím GO v oblasti tkáňového inženýrství odkazuje review Wu a spol. z roku 2015. *In vitro* experimenty ukázaly, že GO vykazuje slibné charakteristiky pro regeneraci kostní tkáně, obzvláště díky hydrofilnímu povrchu, který může podporovat buněčnou adhezi, buněčnou proliferaci a diferenciaci indukovaných pluripotentních kmenových buněk (Chen et al., 2012; Zhang et al., 2012).

V posledních letech je mnoho úsilí vkládáno do využívání grafenových derivátů jako kontrastních činidel pro intracelulární zobrazování *in vitro* a *in vivo*. V jedné ze studií byl

syntetizován hybridní materiál, který se skládal z organických barviv, mezoporézních nanočástic oxidu křemičitého (MSNPs) a GO. Barviva byla vložena do MSNPs a MSNPs plochy byly potom zabaleny do ultratenkých GO listů. Takto vytvořený hybrid byl biokompatibilní, netoxický a vykazoval signifikantní potenciál pro *in vitro* fluorescenční zobrazování při měření v HeLa buněčné linii (Sreejith et al., 2012).

V rámci magnetické rezonance jsou nejvíce využívána kontrastní činidla z gadolinia Gd^{3+} , manganu Mn^{2+} nebo železa Fe^{2+} . Gd^{3+} , které v těchto činidlech dominuje, začíná být omezováno při léčbě pacientů postižených selháním ledvin a nahrazuje jej Mn^{2+} . Bylo ovšem objeveno, že komplex $GO/Mn^{2+}/Dextran$ (GNP-Dex) pracuje stejně dobře, je termálně stabilní a vyvolává pouze zanedbatelnou alergickou reakci a signál tohoto komplexu je 20-30 x vyšší než u kontrastních činidel založených pouze na Gd^{3+} a Mn^{2+} (Sitharaman et al., 2013).

1.2.4 Uhlíkové nanomateriály a životní prostředí

V současnosti stále není dořešená otázka vlivu nanomateriálů, a tedy ani GO na životní prostředí. K uvolňování grafenových nanomateriálů může docházet v průběhu jejich syntézy, stejně tak jako v různých stádiích životního cyklu produktů založených na grafenu nebo grafen obsahující, včetně výroby, zpracování, použití a likvidace těchto produktů. Nanografenové listy navíc mohou být uvolňovány do prostředí následkem jejich cíleného využití pomocí na grafenu založených technologií pro čištění odpadních vod nebo odsolovacích zařízeních (Wang & Karnik, 2012; Xu et al., 2012).

Ačkoliv je v současnosti koncentrace grafenových nanomateriálů v životním prostředí zanedbatelná, očekává se, že vlivem nárůstu jejich výroby dojde k vytvoření jistých „hot spots“ (oblastí zvýšeného výskytu), a to zejména v blízkosti čistíren odpadních vod a místech produkce nebo zneškodňování. Grafen jakožto hydrofobní materiál se bude usazovat na povrchu těl organismů, na dnech, anebo, jako sediment na rozhraní vodní hladiny. GO naopak díky přítomnosti polárních skupin zvýší svou disperzibilitu, a to může vést k jeho přítomnosti ve vodním prostředí. Odtud jsou mu vystaveny vodní organismy, do nichž se může dostávat požitím či dýcháním (Farre et al., 2009; Handy et al., 2008c; MackCormack et al., 2013).

GO byl ve spojitosti se životním prostředím zkoumán jako problém založený na principu trojského koně přenášejícího látky prostředí znečišťující. GO má vynikající kapacitu pro adsorpci organických polutantů, jako jsou PAHs (polycyklické aromatické

uhlovodíky) a PCBs (polychlorované bifenyly) (Karamani et al., 2013). Pokud se na něj tyto látky navážou, dokáže je GO dostat skrze plasmatickou membránu do cytosolu buněk. Tento jev byl zkoumán na jaterní buněčné linii PLHC-1 ryby z čeledi *Fundulidae*, a to skrze transkripční aktivitu aryluhlovodíkového receptoru (AhR). Studie dokázala, že GO společně s vybranými agonisty příslušného receptoru, zvýšil aktivitu receptoru více než samotný agonista, kterými byly β -naftoflavon (β -NF), benzo(k)fluoranten (BkF) a 3,3',4,4',5,5'-hexachlorobyphenyl (PCB169). Receptor vystavený samotnému GO nevykazoval žádnou aktivitu v porovnání s negativní kontrolou. Stejných výsledků dosáhl také karboxyl grafen (CXYG), který taktéž náleží mezi grafenové nanomateriály. Ty tedy mohou působit jako nosiče pro aromatické látky znečišťující ovzduší (Lammel et al., 2015).

Ačkoliv tedy samotné nanomateriály nemusí pro životní prostředí představovat žádné nebezpečí vlastní toxicitou, neznáme zatím jejich vliv ve spojení s jinými kontaminanty. Specifické vlastnosti těchto nanomateriálů, které je vedou do popředí zájmů vědců, mohou být také vlastnosti, které mohou způsobovat různé nežádoucí účinky.

2. POUŽITÝ MATERIÁL

2.1 CHEMIKÁLIE

Chemikálie	Výrobce/Dodavatel
2-Propanol	Sigma-Aldrich, I9516 – 500 mL (Lot: #BCBQ9033V)
ATP	Sigma-Aldrich (Cas N.: 34369-07-8)
Buněčné linie	Public Health England
Caston Essay – Real Time Ready – IL6	Roche, Assay ID: 144013 (Lot: 0000036388)
Caston Essay – Real Time Ready – PCK1	Roche, Assay ID: 113980 (Lot: 0000026748)
Caston Essay – Real Time Ready – TSC22D3	Roche, Assay ID: 101316 (Lot: 0000036390)
CoA	Sigma-Aldrich(CasN: 85-61-0)
dATP 100mM	TaKaRa (Code: 4026; Lot: B1053A)
dCTP 100mM	TakaRa (Code: 4028; Lot: B1050A)
DEX	Sigma-Aldrich (Cas N.: 50-02-2)
dGTP 100mM	TaKaRa (Code: 4027; Lot: B1058A)
DHT	Sigma-Aldrich (Cas N.: 521-18-6)
D-Luciferin	Sigma-Aldrich (L9504; Cas N.: 2591-17-5)
DMEM	Sigma-Aldrich, 500 mL, D6546 (Lot: RNBF 6342)
DMSO	Lach-Ner, s. r. o. (Cat: 200Z2 – CTO; CAS: 67-68-5)
DTT	Sigma-Aldrich (Cas N.: 3483-12-3)
dTTP 100mM	TaKaRa (Code: 4029; Lot: B1048A)
EDTA	Sigma-Aldrich (Cat N.: 60-00-4)
Ethanol	Penta (Index č.: 603-002-00-5; Kat: 71250-11000)
FBS	Sigma Aldrich, F6178
Grafen Oxid > 500 [µg/ml]	Bimake (Cat: B51231, Lot: 710005)
Grafen Oxid 200 - 500 [µg/ml]	Bimake (Cat: B51221, Lot: 710005)
Grafen Oxid 50 – 200 [µg/ml]	Bimake (Cat: B51211, Lot: 710005)
HygB	Sigma-Aldrich (Cas N.: 31282-04-9)
Chloroform	Sigma-Aldrich, 432 – 25 mL (Lot: #SHBD99; PCode: 101441076)
L-Glutamine	Sigma-Aldrich, G8540 – 1000 G (Lot: #091M0023V; PCode: 101150216)
Lyzační pufr	Promega (Lot: 0000123655; Ref: E397A)
MEEM NEAA	100 mL, M7145, Lot: RNBF 3037
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sigma-Aldrich (CasN: 10034-99-8)
M-MuLV Buffer 10x cont.	BioLabs, #B0253S (Lot: 0101504)
M-MuLV Reverse Transcriptase	BioLabs, #M0253L (Lot: 0281603)
MTT	Sigma-Aldrich (Cas N.: 57360-69-7)
PBS	Biosera (Cat: LM-S2041/500; Lot: O15BS118)
Primer GAPDH-For-UPL	Generi Biotech (Lot: 1082G0)
Primer GAPDH-Rev-UPL	Generi Biotech (Lot: 1082G1)
Probes Master na LightCycler 480 II	Roche

Tris-acetátový pufr: Tris Base (kys. octovou upraveno na pH 7,8, konc. 1M)	Sigma-Aldrich, (Cas N.: 77-86-1)
RNase Inhibitor, Human Placenta	BioLabs, #M0307L (Lot: 0321511)
RPMI-1640	Sigma-Aldrich, 500 mL, R0883 (Lot: RNBF 6095)
RU486	Sigma-Aldrich (Cas N.: 84371-65-3)
T3	Sigma-Aldrich (Cas N.: 1217676-14-6)
TRI Reagent	Sigma-Aldrich, T9424 – 100 mL (Lot: #MKCB2851V; PCode: 1002355581)
Triton X-100	Serva (37240)
Trypanová modř	Sigma-Aldrich, T6145-25 G, 23796 BJ
Trypsin	Sigma-Aldrich (Cas N.: 9002-07-7)
UPL Sonda #60	Roche (04 668 589 001; 152514)
Voda	Sigma-Aldrich, W4502 (Lot: RNBF0860)
Charcoal stripped FBS	Sigma Aldrich (F6765)

Tab. 1 Seznam použitých chemikálií a jejich dodavatelé.

2.2 PŘÍSTROJE

Pro uskutečnění výzkumu bylo zapotřebí několik málo přístrojů. Pro kultivaci a uchovávání buněčných linií byl využíván inkubátor Mitre 4000 (CONTHERM). Sterilní prostředí pro práci s buněčnými liniemi zajišťoval Flow-box ESCO Class II Type A2. Pro urychlení rozmrazování při pokojové teplotě byl používán Shaker-Rocker MR12 od firmy BIOSAN. K mražení buněk na -80°C byl využit hlubokomrazicí skříňkový box SANYO MDF-U53V. K homogenizaci roztoků dopomohl vortex značky Heidolph. Pro měření absorbance a luciferázové aktivity byl použit spektrofotometr Infinite M200 od firmy Tecan Trading AG. Koncentraci RNA v roztoku a její čistotu měřil spektrofotometr NanoDrop Lite od THERMO Scientific. Pro oddělení RNA od zbytku buněčných struktur byla použita centrifuga 5451R od firmy EPPENDORF. Pro zahřívání mikrozkušavek sloužily termobloky LabNet nebo MajorScience. K měření genové exprese byl použit LightCycler 480II od firmy Roche.

Z laboratorního vybavení byly používány jednoduché i multikanálové pipety a špičky o třech různých objemech, jednoduché nebo s filtrem, od značky eppendorf. Kultivační láhve velikostí 25 cm^2 , 75 cm^2 a 150 cm^2 byly od firmy TPP. Pro experimenty byly využívány 96 jamkové a 6 jamkové destičky taktéž od firmy TPP.

2.3 BUNĚČNÉ LINIE

2.3.1 AZ-GR

AZ-GR je buněčná linie odvozená od HeLa buněčné linie (buňky lidské rakoviny děložního čípku). Buňky HeLa buněčné linie byly transfektovány reportérovým plazmidem pGL-4.27-GRE, který zahrnuje 3 kopie GRE, který byl vložen proti směru luciferázového reportérového genu. Takto byla vytvořena lidská buněčná linie s reportérovým genem umožňujícím detekci ligandů GR prostřednictvím luciferázové aktivity – AZ-GR. Ze 17 klonů byly vybrány dva, které nejlépe reagovaly na ošetření dexamethasonem příslušnou luciferázovou aktivitou. Byla prováděna analýza reakce buněčné linie na ošetření 22 různými přírodními a syntetickými steroidy se závislostí na dávce. AZ-GR projevila vysokou specifitu a citlivost na glukokortikoidy, velice nízkou odpověď na mineralokortikoidy a na estrogény, gestageny nebo androgeny nevykazovala žádnou odpověď.

Buňky byly na dva týdny zmrazeny a uchovány v tekutém dusíku a po rozmrazení byla měřena jejich schopnost detekce aktivity GR prostřednictvím luciferázové aktivity. Reakce buněk po kryokonzervaci na ošetření glukokortikoidy byla stejná jako před zmražením. Kryokonzervace tedy nemá signifikantní vliv na buněčnou linii.

Takto vytvořená buněčná linie plně reaguje na glukokortikoidy po 32 dní a přes 16 pasáží bez znatelných změn. AZ-GR buňky umožňují detekci GR aktivátorů po 14 hodinách kultivace od ošetření.

Byla vytvořena stabilní linie umožňující rychlou, citlivou a selektivní detekci GR aktivátorů s možným užitím pro preklinický výzkum a environmentální aplikace.

Při porovnání buněk HeLa buněčné linie a linie AZ-GR byly pozorovány drobné morfologické rozdíly (Novotná et al., 2012).

2.3.2 AIZ-AR

AIZ-AR je buněčná linie odvozená od buněčné linie lidského prostatického karcinomu 22Rv1. Tato buněčná linie byla tranfektovaná reportérovým plazmidem p3ARR/ARE-luc2P/minP/hygro, který obsahuje 3 kopie androgenního responzivního regionu (ARRs), za nímiž následuje jediná kopie androgenního responzivního elementu (AREs) z promotorové oblasti lidského genu pro prostatický specifický antigen (PSA).

Takto zkonstruovaná lidská reportérová buněčná linie AIZ-AR slouží pro testování transkripční aktivity lidského androgenního receptoru.

Z 23 původních testovaných klonů byly dále vybrány a charakterizovány klony 8 a 14, které vykazovaly největší signál při měření luciferázové aktivity. Bylo prokázáno, že AIZ-AR buňky zajišťují plnou funkčnost po více než 60 dní a přes 25 dní v pasáži. Výzkum také ukázal, že čerstvé buňky a buňky které prošly zmražením na -80°C nevykazují rozdílné výsledky, kryokonzervace tedy neovlivňuje funkčnost této buněčné linie.

Kromě androgenů mají na transkripční aktivitu AIZ-AR buněk vliv glukokortikoidy a progesteron, které ale mají 2-3x slabší signál v porovnání s androgeny. Estrogeny a mineralokortikoidy nevykazovaly žádnou aktivaci.

Byla sestrojena rychle, citlivě a selektivně odpovídající, reprodukovatelná buněčná linie pro detekci lidských AR ligandů s potenciálem pro využití ve farmakologii a environmentálních aplikacích (Bartonkova et al., 2015).

2.3.3 PZ-TR

PZ-TR je buněčná linie odvozená od HepG2 buněčné linie (buňky lidského hepatocelulárního karcinomu). Tato buněčná linie byla sestrojena pro měření transkripční aktivity thyroideálního receptoru prostřednictvím luciferázové aktivity a jedná se tedy o reportérovou buněčnou linii. Linie byla transfektována reportérovým plazmidem pGL4.14-TRE. Po transfekci HepG2 buněk reportérovým plazmidem a kultivaci pod selekčním tlakem hygromycinu B bylo získáno 21 Hygromycin B rezistentních, stabilně transfektovaných klonů. Z nich byl vybrán jediný klon s nejvýznamnějšími reakčními výsledky na ošetření T3 a ten byl dále charakterizován.

Buňky byly po dobu jednoho týdne uchovávány zmražené v tekutém dusíku. Po rozmražení byla naměřena stejná luciferázová aktivity jako před zmražením.

Buněčná linie byla testována na vliv dalších látek. Nebyla pozorována žádná luciferázová aktivita po ošetření dalšími steroidními hormony či VDR ligandy, s výjimkou částečné aktivace kyselinou retinovou, která je přirozeným ligandem PXR, se kterým TR při aktivaci heterodimerizuje.

Luciferázová aktivita vykazovala stejných hodnot po dobu 54 dní a 12 pasáží. Mezi linií HepG2 a PZ-TR nebyly pozorovány žádné morfologické změny (Illés et al., 2015).

3. METODIKA PRÁCE

3.1 PRÁCE S BUNĚČNÝMI LINIEMI

3.1.1 Rozmražení

Buňky jsou uchovávány v tekutém dusíku rozalíkvtované v množství 2-4 miliony na 1 ml roztoku složeného z FBS a DMSO v poměru 90:10. Pro rozmražení je zkumavka přenesena do sterilního flow-boxu, kde je nachystána malá kultivační láhev o ploše 25 cm² s 10 ml kultivačního média, které je předehřáté na teplotu 37°C. Po rozmražení buněčné suspenze v mikrozkuhavce je okamžitě přenesena část média do zkumavky, kde se promíchá s buňkami a celý obsah zkumavky je pomocí pipety přenesen do kultivační láhve. Pro větší úspěšnost získání přenesení většiny buněk je proces s vyplachováním pomocí média případně zopakován, aby se vymyly zbylé buňky ze zkumavky, a dostaly se do kultivační láhve. Vše probíhá za sterilních podmínek. Po přenesení buněk do kultivační láhve jsou uzavřeny v inkubátoru a kultivovány při teplotě 37°C do druhého dne, kdy je jim vyměněno médium. Poté jsou kultivovány klasickým způsobem.

3.1.2 Kultivace buněk

Buňky jsou podle potřeby kultivovány ve středních (75 cm²) nebo velkých (150 cm²) kultivačních lahvích v inkubátoru při teplotě 37°C a obsahu CO₂ 5 %. Živiny pro svůj růst získávají z kultivačního média, které je specifické pro jednotlivé buněčné linie.

Buněčné linie AZ-GR a PZ-TR byly kultivovány v DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), zatímco linie AIZ-AR byla kultivována v RPMI-1640.

Příprava kultivačního média:

DMEM/RPMI 1640	500 ml
Glutamin	5 ml
FBS	50 ml
MEM NEAA	5 ml

3.1.3 Pasážování

Pro svůj růst potřebují buňky dostatek místa i živin. Abychom zabránili jejich přemnožení v láhvi a nedostatku živin, jsou buňky v pravidelných intervalech pasážovány. Celý proces probíhá za sterilních podmínek ve flow-boxu.

Z kultivačních lahví o ploše 75 cm² je odsáto staré médium a láhev je omyta 6 ml PBS. Poté je do kultivační láhve přidán 1 ml 0,25% trypsinu, díky kterému dochází k uvolnění buněk ode dna kultivační láhve. Láhve s trypsinem jsou vloženy na dobu 3 minut do inkubátoru při teplotě 37°C. Po uplynutí doby je láhev opět přenesena do flow-boxu, buňky jsou lehce sklepnuty ze dna kultivační láhve, a je do ní přidáno 9 ml kultivačního média příslušného dané buněčné linii. Za pomoci serologické pipety jsou shluky buněk rozbity, aby se co nejlépe oddělily a vznikla nám homogenní suspenze. Tato suspenze je přenesena bokem do zkumavky. Ze suspenze je odebráno 10 µl pro spočítání koncentrace buněk. Podle potřebného množství buněk je poté vrácena část suspenze do kultivační láhve a je doplněna novým médiem do objemu 15-25 ml (podle počtu dní do dalšího pasážování či množství buněk). Po přidání média je kultivační láhev opět vrácena do inkubátoru. Na víkend je do kultivačních lahví s upravenými buněčnými liniemi (AZ-GR, AIZ-AR, PZ-TR) přidáno antibiotikum HygromycinB o finální koncentraci 50 mg.l⁻¹. Pasážování bylo prováděno podle potřeby po 2-3 dnech. Pro kultivační láhev o ploše 150 cm² je množství přidávaných látek dvojnásobné.

3.1.4 Počítání buněk

Pro pasážování i pro další práci s buňkami bylo třeba znát jejich množství v suspenzi. Vždy při pasážování bylo odebráno 10 µl suspenze (která byla řádně zhomogenizována, aby množství buněk bylo rovnoměrně rozmístěno v celém objemu), ke kterému bylo přidáno 90 µl trypanové modři, která obarví pouze mrtvé buňky, zatímco živé buňky v roztoku zůstávají světlé. Směs je pomocí pipety zhomogenizována a na podložní sklíčko s Burkerovou komůrkou je přidáno 10 µl suspenze z obou stran pod krycí sklíčko. Pod mikroskopem je pozorovatelný mřížovaný čtverec, který je rozdělen do 9 velkých polí (ohrazeny třemi čarami) a každé z nich je rozděleno do 16 malých polí (ohrazeny jednou čarou). V každém velkém poli jsou spočítány buňky a je zaznamenán jejich počet. Na jednom sklíčku se celkem vyskytují dva čtverce, tedy 18 velkých polí. Po zaznamenání počtu buněk v 10 polích je vypočítán jejich aritmetický průměr, který je vynásobený 10⁵ a stanovuje počet buněk na 1 ml.

3.2 MTT TEST – TEST VIABILITY

V první řadě, před samotným testováním účinků grafen oxidu bylo třeba zjistit, jestli nemá vliv na životnost buněk. K tomuto účelu byl využit MTT test, jehož princip spočívá v porovnání množství buněk v neošetřeném vzorku, kde je očekávána 100% životnost a 0% úmrtnost. K tomuto vzorku jsou potom vztahovány hodnoty vzorků ošetřených.

Příprava vzorků probíhala za sterilních podmínek ve flow-boxu. Pro každou buněčnou linii byly spočítány buňky a určena jejich koncentrace. Z tohoto číselného údaje poté bylo dopočítáno množství suspenze, které bylo smícháno s čistým médiem. Médium bylo rozdílné pro jednotlivé buněčné linie. Pro linii AZ-GR bylo použito DMEM, pro PZ-TR bylo použito DMEM, při jehož přípravě nebylo využito fetální bovinní sérum pro jeho vliv na receptory, které nebyly odstraněny ani přidáním „charcoaled stripped“ FBS a pro linii AIZ-AR médium RPMI1640 s „charcoal stripped“ FBS (odstraněny hormony, které by mohly zkreslit aktivitu receptoru).

Testování probíhalo v 96 jamkových destičkách. Buněčná suspenze byla připravena tak, aby ve finále připadalo na každou jamku 25 000 buněk pro AZ-GR a 50 000 buněk pro PZ-TR a AIZ-AR. Do každé jamky bylo za pomoci multikanálové pipety nanášeno 200 µl buněčné suspenze a destičky byly kultivovány v inkubátoru po dobu 24 h při teplotě 37 °C.

Po 24 hodinách byly buněčné linie, opět ve flow-boxu, za sterilních podmínek, ošetřeny grafen oxidem (GO) o třech různých velikostech částic a 5 různých koncentracích pro každou velikost (Tab. 2). Na každý vzorek připadaly 4 jamky a tedy 4 výsledné hodnoty. Ošetření probíhalo tak, že z každé jamky bylo pomocí odsávačky odstraněno staré kultivační médium a přidáno 200 µl nového média obohaceného o požadovanou koncentraci GO příslušné velikosti částic. Jako negativní kontrola bylo využito čisté médium a jako pozitivní kontrola triton o finální koncentraci 2 %, který buňky usmrtil. Takto připravená destička byla opět vložena do inkubátoru, kde byla inkubována při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		UT							X			
B	GO 50 – 200 nm	0,002 µg/ml			GO 200 – 500 nm	0,002 µg/ml			GO > 50 nm	0,002 µg/ml		
C		0,02 µg/ml				0,02 µg/ml				0,02 µg/ml		
D		0,2 µg/ml				0,2 µg/ml				0,2 µg/ml		
E		2 µg/ml				2 µg/ml				2 µg/ml		
F		20 µg/ml				20 µg/ml				20 µg/ml		
G		Triton 2%							X			
H							X					

Tab. 2 Rozložení látek pro ošetření buněk v 96 jamkové destičce.

Poslední den bylo již s buňkami pracováno mimo flow-box. Destičky byly vytaženy z inkubátoru a médium bylo vyklepnuto do výlevky. Zbytky média, které ulpěly na okrajích jamek, byly vysušeny do buničiny. Do každé jamky bylo pomocí multikanálové pipety přidáno 100 µl MTT (methylnetrazoliová sůl) o finální koncentraci 0,3 mg.l⁻¹. Poté byly destičky uzavřeny a vloženy na 30 minut do 37 °C, do inkubátoru. Po uplynutí 30 minut byly destičky opět vytaženy z inkubátoru. Již v této fázi bylo možné pozorovat viabilitu buněk. Princip testu spočívá v tom, že v živých buňkách fungují mitochondriální dehydrogenázy, které MTT redukuje na formazan a ten mění barvu z původní žluté na fialovou. Mrtvé buňky tohoto schopny nejsou. Protože čím větší podíl modré/fialové barvy vzorek obsahuje, tím větší je viabilita buněk.

Obsah destiček byl vyklepnut do výlevky a okraje byly osušeny buničinou. Do každé jamky bylo napipetováno 50 µl neředěného dimethylsulfoxidu (DMSO), který slouží k rozpuštění fialových krystalků redukováného MTT.

V poslední fázi byla pomocí programu Tecan I-Control (Infinite 200) měřena absorbance světla redukovanými krystaly MTT při vlnové délce 570 nm. V negativní kontrole byl vzorek celý modrofialový a propouštěl velmi malé množství světla, naopak měl tedy vysokou absorbanci. Proti tomu v pozitivní kontrole došlo k usmrcení všech buněk

a propustnost světla byla maximální, absorbance tedy nulová. K těmto dvěma hodnotám byly vztahovány jednotlivé hodnoty pro vzorky ošetřené GO a byla určována jejich viabilita. Čím vyšší byla absorbance, tím vyšší byla také viabilita. Výsledky byly dále statisticky a graficky zpracovány.

3.3 GENE REPORTER ASSAY

Pro pozorování vlivu GO na aktivitu receptorů byly využity plasmidem upravené buněčné linie. Princip celé metody spočívá v nepřímém měření činnosti receptorů prostřednictvím měření luciferázové aktivity. Místa pro vazbu receptorů jsou totiž v buňce umístěny před genem pro luciferázovou aktivitu. Pokud byl tedy ligandem aktivován receptor a nasedl na DNA, spustil současně transkripci luciferázového genu, čímž docházelo k produkci luciferázy, která následně reagovala se substrátem. Reakcí luciferázy s luciferinem, který se nachází právě v substrátu, došlo k produkci světla, které bylo následně měřeno a zaznamenáváno pro jednotlivé vzorky.

Testována byla jak aktivace receptorů, tak i inhibice receptorů již aktivovaných. Každá linie proto byla testována souběžně ve dvou provedeních a to v tzv. agonistickém (aktivace) a antagonistickém (inhibice) módu.

Měření probíhalo ve třech dnech – první den byly buňky vysety do destiček, druhý den ošetřeny podle toho, zda se jednalo o agonistický nebo antagonistický mód a poslední den byla změřena luciferázová aktivita.

3.3.1 Příprava buněk

První den probíhala příprava stejně jako v případě MTT testu. Buňky byly spočítány, byla stanovena jejich koncentrace a v množství 25 000 buněk na jamku v případě AZ-GR a 50 000 buněk na jamku v případě PZ-TR a AIZ-AR byly buňky vysety do 96 jamkových destiček a inkubovány při teplotě 37°C do druhého dne. Práce probíhala sterilně ve flow-boxu.

3.3.2 Agonistický mód

V tomto případě byla testována schopnost GO v různých velikostech a koncentracích aktivovat jednotlivé receptory podle příslušných buněčných linií. Výsledky se vztahovaly k pozitivní a negativní kontrole.

Látky byly po 24 hodinové inkubaci při 37°C ošetřeny stejným způsobem jako v předchozím měření (viz Tab. 1) – z jamek tedy bylo odsáto staré kultivační médium a přidáno nové médium obohacené o testované látky a to v množství 200 µl na jamku. Jako negativní kontrola (nedochází k aktivaci receptoru) byl ve všech třech případech využit dimethylsulfoxid (DMSO) a to z toho důvodu, že látky využity pro pozitivní kontrolu (dochází k aktivaci receptoru) byly právě v DMSO rozpouštěny. DMSO byl přidán jako 1/1000 objemu média také do ostatních jamek, kde byl přidáván GO. Tím došlo k zabránění možnosti rozdílnosti výsledků vlivem DMSO přítomného v pozitivní kontrole. Látky pro pozitivní kontrolu jsou uvedeny v tabulce 3.

Buněčná linie	Pozitivní kontrola
AZ-GR	Dexamethason (DEX) (100 nM)
PT-TR	Trijodthyronin (T3) (20 nM)
AIZ-AR	Dihydrotestosteron (DHT) (100 nM)

Tab. 3 Pozitivní kontrola pro jednotlivé buněčné linie v agonistickém módu.

Práce probíhala ve sterilních podmínkách ve flow-boxu. Po ošetření buněk příslušnými koncentracemi GO a látek pro kontrolu byly destičky vloženy na 24 hodin do inkubátoru s teplotou 37°C.

3.3.3 Antagonistický mód

V případě antagonistického módu byla naproti agonistickému módu měřena schopnost GO inhibovat aktivitu již aktivovaného receptoru. Zde byly výsledky vztahovány k modelovému ligandu (agonistovi) (Tab. 3), který maximálně aktivoval daný receptor.

U AZ-GR linie byl jako u jediné použit antagonist, látka RU486 o finální koncentraci 5µM, který právě snižoval míru aktivizace glukokortikoidního receptoru v přítomnosti ligandu dexamethasonu.

Z destiček bylo opět odsáto staré kultivační médium a do každé jamky bylo přidáno 200 µl nového média obohaceného o testované látky a daný modelový ligand (agonista). Tímto způsobem bylo monitorováno, zda přítomnost GO aktivaci modelovým ligandem jakýmkoliv způsobem ovlivňuje.

Práce probíhala ve sterilních podmínkách ve flow-boxu. Po ošetření buněk příslušnými koncentracemi GO a látek pro kontrolu byly destičky vloženy na 24 hodin do inkubátoru s teplotou 37°C.

3.3.4 Měření aktivity receptorů prostřednictvím luciferázové aktivity

Poslední den byly destičky vytaženy z inkubátoru a zbytek experimentu probíhal již mimo sterilní prostředí. Médium bylo z jamek vyklepnuto do výlevky a destičky byly osušeny do buničiny. Zbytky média byly z jamek omyty chlazeným PBS. Do prázdných jamek byl za pomoci multikanálové pipety nanesen lyzační pufr (viz Tab. 3) a destičky byly vloženy na minimálně 20 minut do -80°C .

Buněčná linie	Množství lyzačního pufru na jamku
AZ-GR	22 μl
PZ-TR	25 μl
AIZ-AR	25 μl

Tab. 4 Množství lyzačního pufru na jamku pro jednotlivé buněčné linie

Po uplynutí doby byly destičky s lyzačním puffrem rozmrazeny při pokojové teplotě. Do černé destičky bylo napipetováno dané množství pufru s buňkami (Tab. 4), které byly za pomoci špiček pro jistotu seškrabány ode dna jamek. Do každé jamky pak bylo přidáno potřebné množství substrátu (Tab.4; složení viz níže) a destičky byly měřeny pomocí aplikace I-Control. Zaznamenané hodnoty byly vztahovány ke kontrolám a následně zpracovány v grafické podobě.

Buněčná linie	Množství suspenze na jamku černé destičky	Množství substrátu na jamku
AZ-GR	20 μl	100 μl
PZ-TR	20 μl	50 μl
AIZ-AR	20 μl	100 μl

Tab. 5 Množství buněčné suspenze na jamku černé destičky a následné množství přidávaného substrátu.

Příprava substrátu pro měření luciferázy:

D-Luciferin	5 mg
ATP	9,6 mg
CoA	6,83 mg
DTT	168 mg
Tris-acetátový pufr 1M (pH 7,8)	1,32 ml
EDTA	1,23 mg (v 6,6 ml 0,5M EDTA)
MgSO ₄ .7H ₂ O	30,3 mg

Vše doplnit do 30 ml destilované vody.

3.4 MONITOROVÁNÍ GENOVÉ EXPRESE

Dále byla sledována exprese vybraných genů, které jsou pod vlivem právě sledovaných receptorů. Pro každou buněčnou linii byly vybrány konkrétní geny a sledována jejich exprese a její změny vlivem přidaného GO.

3.4.1 Ošetření buněčných linií

V první fázi bylo potřeba buňky ošetřit GO. Proces probíhal prakticky stejně jako v případě MTT testu a Gene Reporter Assay, s tím rozdílem, že byly využívány 6 jamkové destičky. Na každý experiment jedné buněčné linie byly potřeba 2 destičky. Testovány byly pouze 3 nejvyšší koncentrace GO. Bylo tedy potřeba 9 jamek pro buňky ošetřené GO a 2 jamky pro pozitivní a negativní kontrolu.

První den byly buňky klasickým způsobem spočítány a v množství 1 milion na jamku vysety do 6 jamkové destičky. Objem buněčné suspenze na jamku činil 1,5 až 2 ml. Práce probíhala za sterilních podmínek ve flow-boxu. Buňky nanoseny do destiček byly inkubovány do druhého dne při teplotě 37°C.

Druhý den, opět za sterilních podmínek, bylo ve flow-boxu odsáto staré kultivační médium a přidáno nové médium obsahující GO a kontrolní látky (Tab. 6). Testovány byly všechny tři velikosti GO částic, ale pouze 3 nejvyšší koncentrace. Ošetřené buňky byly inkubovány při teplotě 37°C na 24 hodin.

Buněčná linie/Mód	Médium	Pozitivní kontrola	Negativní kontrola
AZ-GR (Antagon)	DMEM	DMSO	DEX
PZ-TR (Agon)	DMEM bez séra	T3	DMSO
PZ-TR (Antagon)	DMEM bez séra	DMSO	T3
AIZ-AR (Antagon)	RPMI 1640 (CS FBS)	DMSO	DHT

Tab. 6 Použité médium a pozitivní a negativní kontrola pro jednotlivé buněčné linie.

Třetí den probíhala práce již mimo sterilní prostředí. Médium bylo vyklepnuto z destiček, jamky byly omyty vychlazeným PBS a osušeny do buničiny. Na každou jamku byl přidán 1 ml trizolu, který rozpustil jednotlivé buněčné komponenty, ale integrita RNA byla zachována. Za pomoci škrabky jsou buňky seškrabány ze dna jamek a napipetovány do 2ml mikrozskumavek. Pro tendenci trizolu vylézat v pipetě nad objem byly využity špičky s filtrem. Po této fázi bylo s buňkami buďto dále pracováno, nebo byly uchovány v -80°C.

3.4.2 Izolace RNA

Buňky v trizolu byly rozpuštěny při pokojové teplotě a za pomoci pipety zhomogenizovány. Do každého vzorku bylo přidáno 200 μ l chloroformu, pro oddělení RNA od ostatních komponent. Mikrozkušavky byly protřepávány po dobu 60 sekund. Poté se nechaly ustát při pokojové teplotě na 5 minut.

Po uplynutí doby byly mikrozkušavky vyskládány do centrifugy vychlazené na 4°C a centrifugovány 15 minut při 13 200 rpm. Po 15 minutách byly vytaženy z centrifugy, jejíž činností byl roztok rozdělen na spodní organickou fázi, ve které se nacházely jednotlivé rozložené buněčné komponenty, na hranici s druhou fází se vyskytovala DNA a proteiny a nahoře se nacházela vodná část, jež obsahovala RNA.

Za pomoci žlutých špiček byla tato vodná část oddělena a v množství 600 μ l přenesena do 1,5ml mikrozkušavek. Při pipetování byl kladen velký důraz na oddělení pouze vodné části a zamezení kontaminace organickou částí suspenze. Mikrozkušavky s organickou částí byly vyhozeny a pracovalo se dále pouze s vodnou částí obsahující RNA.

Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 500 μ l isopropanolu, pro vysrážení RNA, a zkušavky byly zvortexovány pro maximální promíchání. Po přidání isopropanolu byly ponechány při pokojové teplotě na dobu 5 – 10 minut a následně vloženy do centrifugy na 13 minut, při 13 200 rpm.

Centrifugací byl oddělen pellet od supernatantu. Po vytažení zkušavek z centrifugy byl supernatant vylit, okraje mikrozkušavek osušeny a do každé byl přidán 1 ml na -20°C vychlazeného 75% etanolu. Následně byly vloženy do centrifugy na 5 minut při RPM 1320. Po pěti minutách byl etanol vylit a pellet byl omyt podruhé stejným postupem – přidán 1 ml etanolu, centrifugace na 5 minut. Po druhém omytí byl etanol vylit a otevřené zkušavky byly na 1,5 minuty vloženy do termobloku vyhřátého na teplotu 65°C, aby byly řádně vysušeny.

Po uplynutí doby byly zkušavky přeskládány do ledu a do každé bylo přidáno 40-50 μ l vody zbavené RNáz a DNáz. Uzavřené mikrozkušavky byly opět vloženy do termobloku vyhřátého na 65°C a to na dobu 5 minut. Po pěti minutách byly jednotlivé vzorky pipetou co nejlépe zhomogenizovány.

Po izolaci byla měřena koncentrace RNA v jednotlivých vzorcích pomocí spektrofotometru. Výsledná koncentrace RNA v každém ze vzorků byla klíčová k přepočtům pro prepis na cDNA

3.4.3 Přepis RNA na cDNA

Přepisem RNA byla získána komplementární DNA (complementary DNA = cDNA), která právě díky přepisu z RNA obsahuje pouze exony. cDNA byla nutná pro samotné měření míry exprese jednotlivých genů.

Podle změřené koncentrace RNA bylo přepočítáno množství RNA přidávané do vody do finální koncentrace $200 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a vše bylo pipetováno do 1,5ml mikrozkušavek. Do každé pak byl přidán 1 μl náhodných primerů (random primers) o koncentraci $100 \text{ pmol} / \mu\text{l}$ a všechny mikrozkušavky byly vloženy na 5 minut do termobloku vyhřátého na 65°C .

Vzorky byly po pěti minutách krátce zchlazeny na ledu a vloženy do centrifugy na krátké stočení po dobu 10 vteřin. Poté bylo do každé mikrozkušavky přidáno 6 μl mixu (Tab. 7) a zkumavky byly opět krátce stočeny v centrifuze.

Množství pro jeden vzorek [μl]	Látka
0,6	M-MuLV (reverzní transkriptáza)
0,3	RNAse inhibitor
0,6	dNTP (10mM stock)
1,2	10x reakční pufr
3,3	voda

Tab. 7 Složení mixu pro přepis RNA na cDNA

Z centrifugy byly jednotlivé mikrozkušavky přeskládány do termobloku vyhřátého na 42°C , kde setrvaly po dobu 60 minut. Po uplynutí doby byly přeneseny na 10 minut do 65°C a následně chlazeny 2 minuty na ledu.

Na závěr bylo do každé mikrozkušavky přidáno 108 μl vody a všechny vzorky byly zvortexovány. Dále mohla být cDNA využita pro měření PCR nebo uchovávána v -20°C .

3.4.4 Real-Time PCR

Samotné měření míry exprese vybraných genů probíhalo metodou real-time PCR, která je založena na klasické polymerázové řetězové reakci, ale v každém cyklu je zaznamenáváno množství amplifikované DNA a to pomocí fluorescenčních sond. Ty se naváží na příslušný úsek DNA a ve chvíli, kdy jsou odbourány DNA polymerázou při probíhající replikaci daného úseku DNA, dochází k jejich oddělení od zřáseče, čímž jsou sondy aktivovány a fluoreskují.

Podle příslušného genu byl namíchán mix (viz Tab. 8 a 9) a ten byl rozpipetován po 8 μ l do bílé 96 jamkové destičky. V triplikátech byly přidávány 2 μ l cDNA jednotlivých vzorků na jamku. Celý proces pipetování probíhal na ledu.

Množství látky [μ l]	Látka
5	Probes Master 2x
0,2	UPL Sondy (60)
0,8	Forward and Reverse primers (viz 2.1 Chemikálie)
2	voda

Tab. 8 Mix pro měření exprese GAPDH genu.

Množství látky [μ l]	Látka
5	Probes Master 2x
0,5	Custom Assay (podle příslušného genu (viz 2.1 Chemikálie))
2,5	voda

Tab. 9 Mix pro měření genů GILZ, IL6 a PCK1.

Po napipetování všech vzorků byla destička přelepena fólií a vložena do centrifugy na 3 minuty při 1 500 rpm. Poté byla vložena do LightCycleru 480 II a byla spuštěna samotná PCR, která probíhala v 37 cyklech pro geny GAPDH a GILZ a 45 cyklech pro geny IL6 a PCK1. Měření probíhalo ve třech fázích. V první fázi preinkubace při teplotě 95°C dochází k odbourání modifikace polymerázy. Následuje amplifikace, kdy vždy v 10 vteřinách dojde k rozpojení řetězců při teplotě 95°C a v následních 30 vteřinách při 60°C k syntéze nového vlákna. Reakce je na závěr ukončena zchlazením na 40°C.

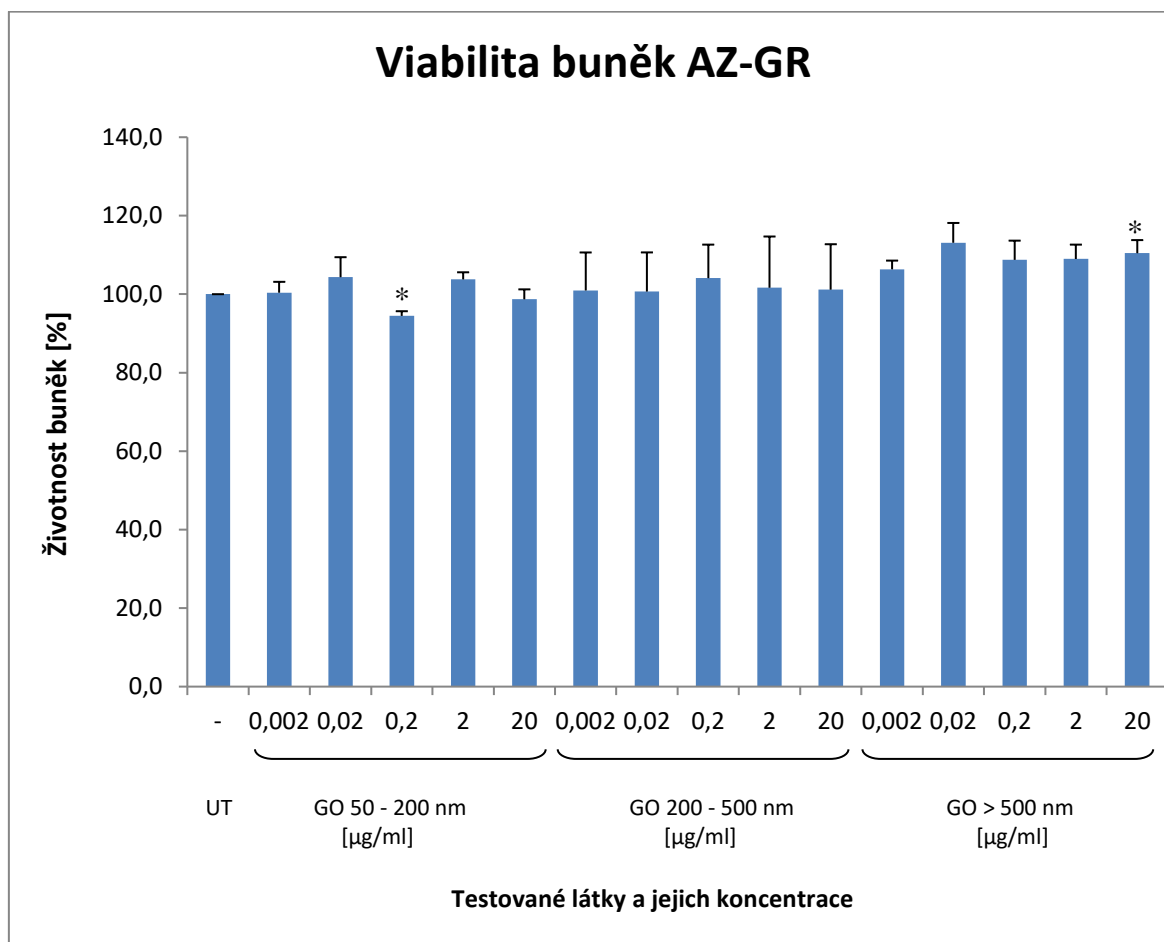
Výsledky byly dále statisticky a graficky zpracovány.

4. VÝSLEDKY

4.1 MTT TEST – TEST VIABILITY

Pomocí MTT testu byla zjišťována viabilita buněk a její změny vlivem grafen oxidu. Z výsledků byla určena předpokládaná toxicita GO na testovaných buněčných liniích. Výsledné hodnoty jsou vztaženy k neošetřenému vzorku (UT), který je stanoven jako 100 %.

4.1.1 AZ-GR

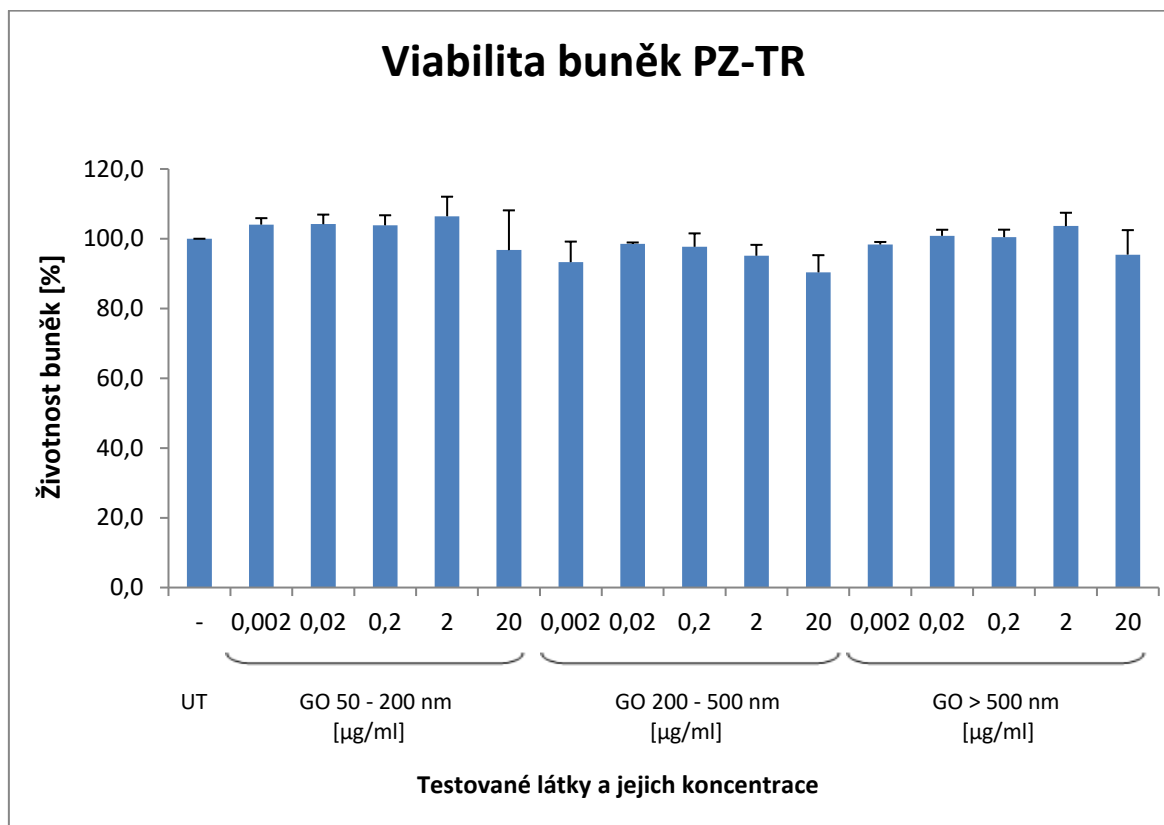


Obr. 13 Viabilita buněk AZ-GR buněčné linie při působení vybraných koncentrací různých velikostí GO částic. (GO částice byly ve třech velikostech a 5 různých koncentracích vysety do 96 jamkové destičky k buněčné linii AZ-GR a po 24 hodinách inkubace byla měřena jejich viabilita prostřednictvím měření světelné absorbance. Procenta viability jsou vztažena k negativní kontrole – UT. * označuje signifikantní výsledky ($p < 0,05$). Hodnoty jsou průměrem minimálně 3 měření.)

U AZ-GR buněčné linie nebyl pozorovaný výrazný pokles životnosti buněk. Dle grafu zdánlivě stoupá viabilita buněk, zejména při použití největších testovaných částic GO, což může být způsobeno shlukováním grafen oxidu, jak je pozorovatelné na fotkách, viz obr. X. Shluky grafen oxidu vytvářejí tmavé skvrny, které tvoří bariéru pro průchod

světla při měření absorbance, životnost tedy ve skutečnost může být i částečně snížena. Nepředpokládá se však, vzhledem k ostatním výsledkům, že by se jednalo o významné snížení. Žádná z hodnot neklesla pod 90 % oproti UT.

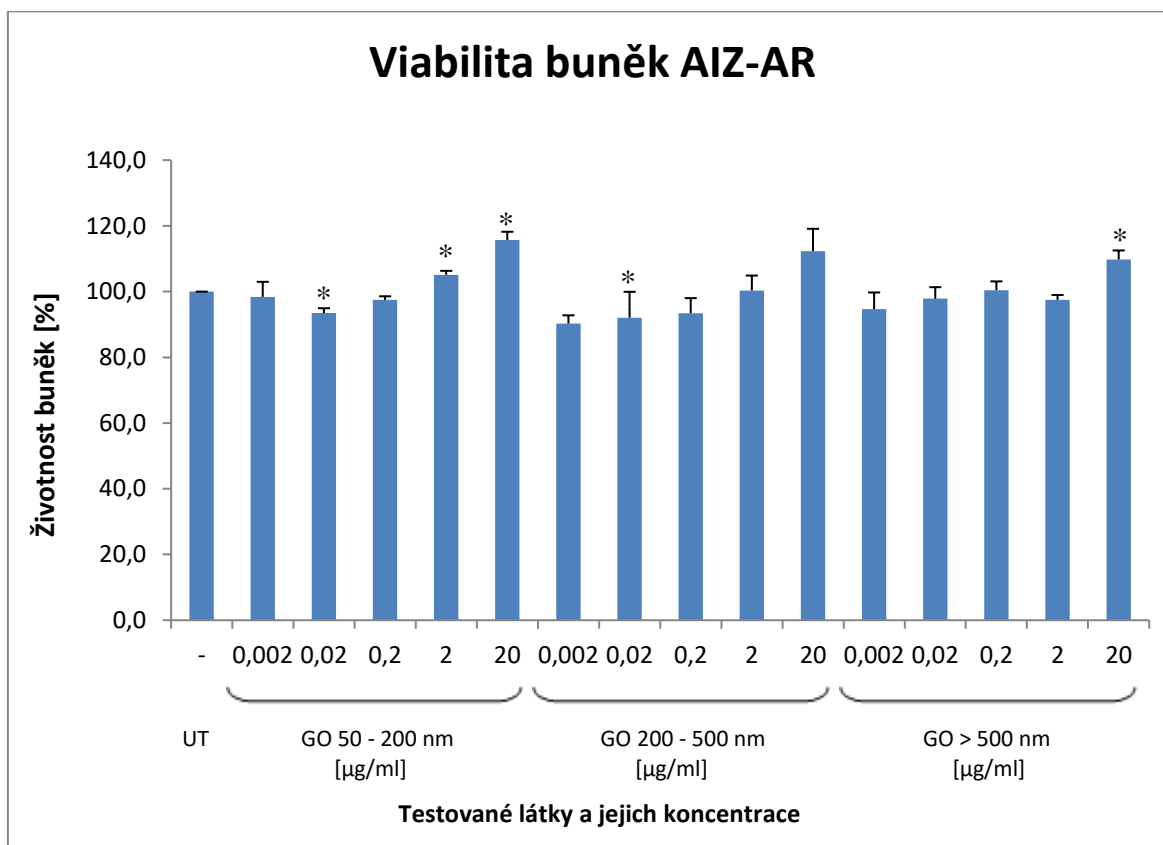
4.1.2 PZ-TR



Obr. 14 Viabilita buněk PZ-TR buněčné linie při působení vybraných koncentrací různých velikostí GO částic. (GO částice byly ve třech velikostech a 5 různých koncentracích vysety do 96 jamkové destičky k buněčné linii PZ-TR a po 24 hodinách inkubace byla měřena jejich viabilita prostřednictvím měření světelné absorbance. Procenta viability jsou vztažena k negativní kontrole – UT. Hodnoty jsou průměrem minimálně 3 měření.)

U buněčné linie PZ-TR nebyl pozorovaný významný pokles životnosti. Nejnižší naměřená hodnota byla pro GO o velikosti částic 200 – 500 nm o koncentraci 20 µg/ml, kde hodnota klesla na 90,38 % oproti UT. Vzhledem k tomu, že nižší hodnota nebyla naměřena, předpokládá se, že GO nepůsobí toxicky ani na tuto buněčnou linii. I zde je možné sledovat v některých případech mírný zdánlivý nárůst viability buněk, což může být opět dáno tendencí GO se ve větším množství shlukovat, stejně jako odchylkami při pipetování. Směrodatné odchylky ukazují na vesměs konstantní výsledky napříč experimenty.

4.1.3 AIZ-AR

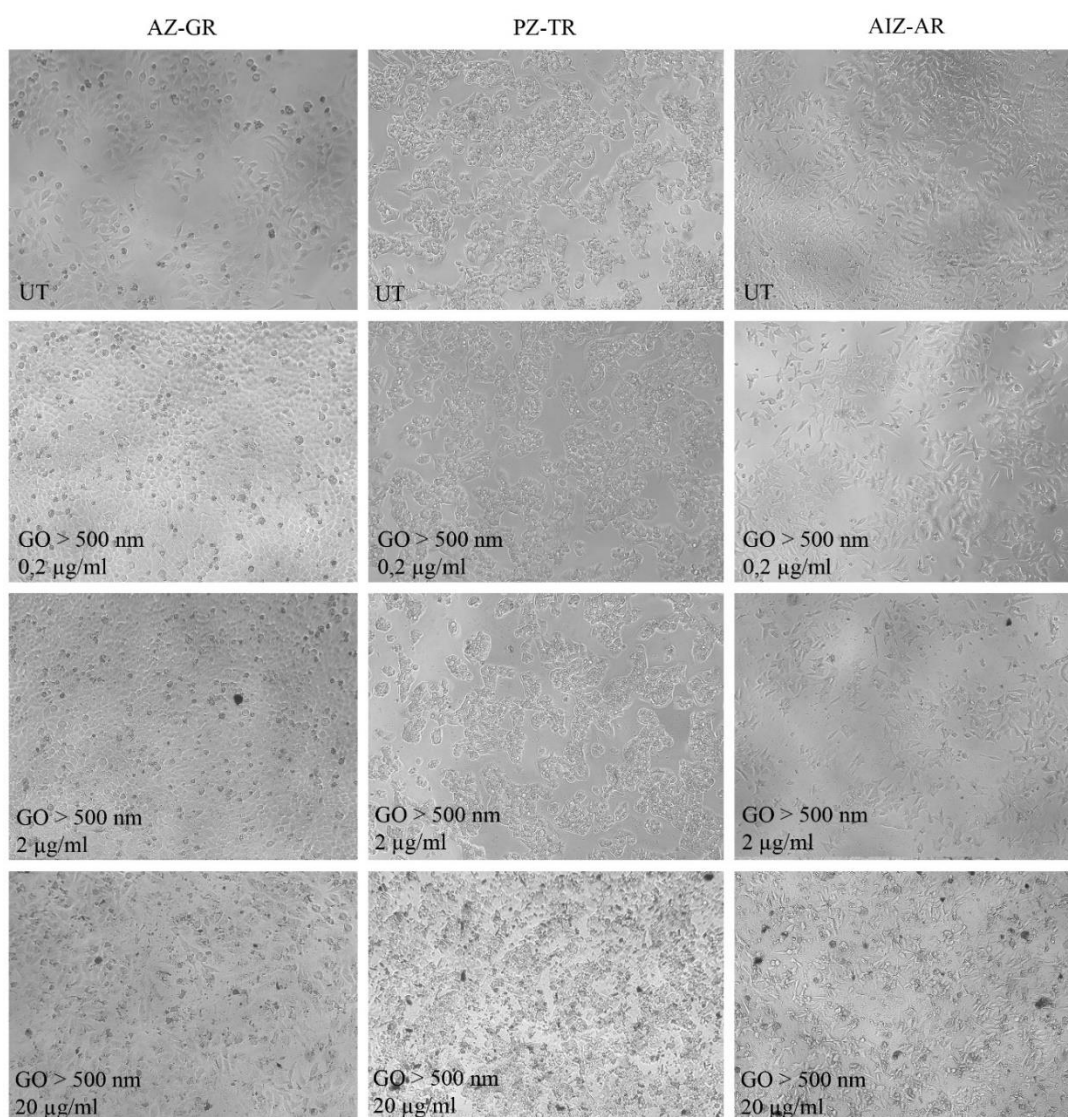


Obr. 15 Viabilita buněk AIZ-AR buněčné linie při působení vybraných koncentrací různých velikostí GO částic. (GO částice byly ve třech velikostech a 5 různých koncentracích vysety do 96 jamkové destičky k buněčné linii AIZ-AR a po 24 hodinách inkubace byla měřena jejich viabilita prostřednictvím měření světelné absorbance. Procenta viability jsou vztažena k negativní kontrole – UT. * označuje signifikantní výsledky ($p < 0,05$). Hodnoty jsou průměrem minimálně 3 měření.)

Ani v případě buněčné linie AIZ-AR nedošlo k poklesu viability buněk a tedy bylo v dalších měřeních pokračováno se všemi vybranými koncentracemi všech velikostí GO. Nejnižší viabilita byla naměřena pro GO o velikosti částí 200 – 500 nm při koncentraci 0,0002 $\mu\text{g/ml}$, ovšem ani tato hodnota neklesla pod 90 % oproti UT. V nejvyšších koncentracích je pozorován nárůst viability v porovnání s neošetřeným vzorkem, což opět může být dáno tendencí GO shlukovat se ve větších koncentracích, čímž brání průchodu světla při měření absorbance.

4.2 SROVNÁNÍ FOTOGRAFIÍ

Vzhledem k tomu, že bylo zjištěno, že MTT test může v přítomnosti GO vykazovat falešný signál a není tedy pro měření toxicity nejvhodnější (Liao et al., 2011), byly jednotlivé buněčné linie, 24 hodin po ošetření GO, pozorovány pod mikroskopem pro ověření, zda přítomnost GO ovlivňuje viditelně morfologii buněk. Tři nejvyšší koncentrace pro každou velikost částic, byly vyfotografovány. V práci jsou uvedené tři nejvyšší koncentrace pro GO částice o velikosti > 500 nm, protože jsou na nich nejzřetelnější shluky GO částic. Na fotografiích je jasně pozorovatelný nárůst shluků s rostoucí koncentrací. Ani nejvyšší koncentrace neměly viditelný vliv na morfologii buněk (obr. 16).

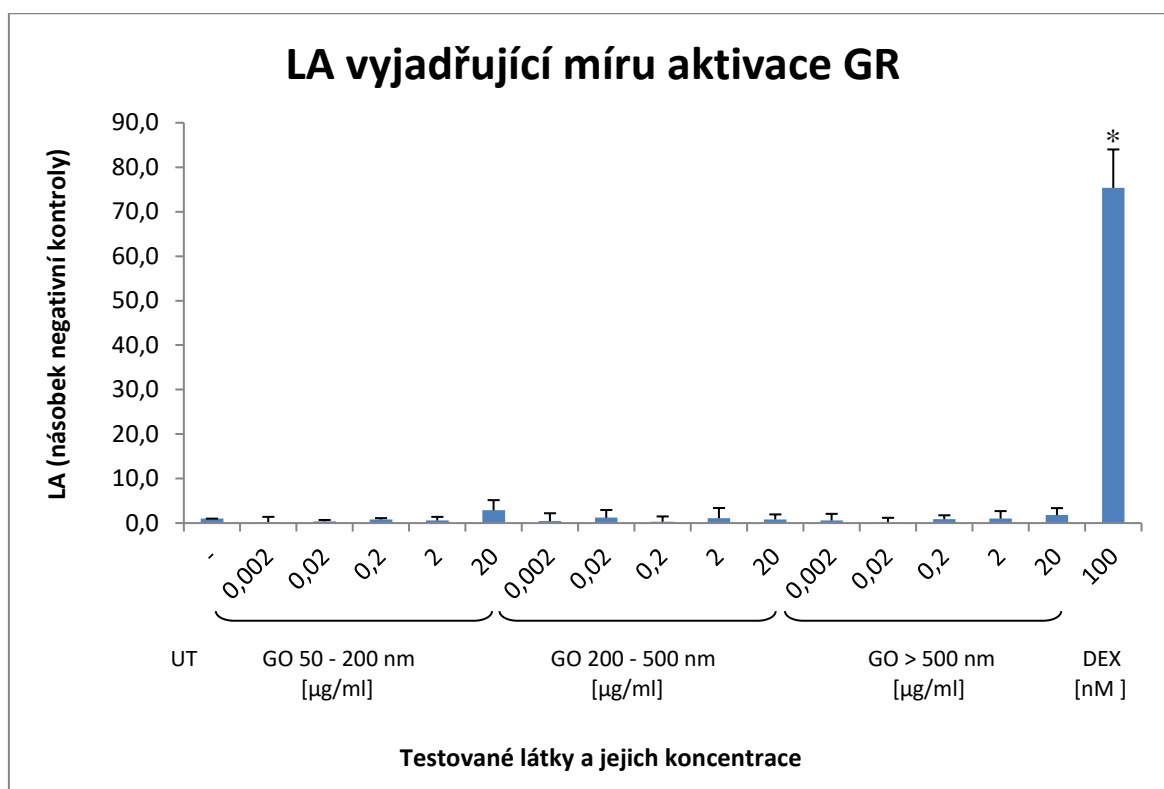


Obr. 16 Srovnání mikroskopických snímků buněčných linií ošetřených třemi nejvyššími koncentracemi nejvyšší velikostí GO částic (První sloupec – buněčná linie AZ-GR, Druhý sloupec – PZ-TR, Třetí sloupec – AIZ-AR. S narůstající koncentrací GO je pozorovatelné shlukování GO částic do tmavých skvrn; Zvětšení: 100x).

4.3 GENE REPORTER ASSAY

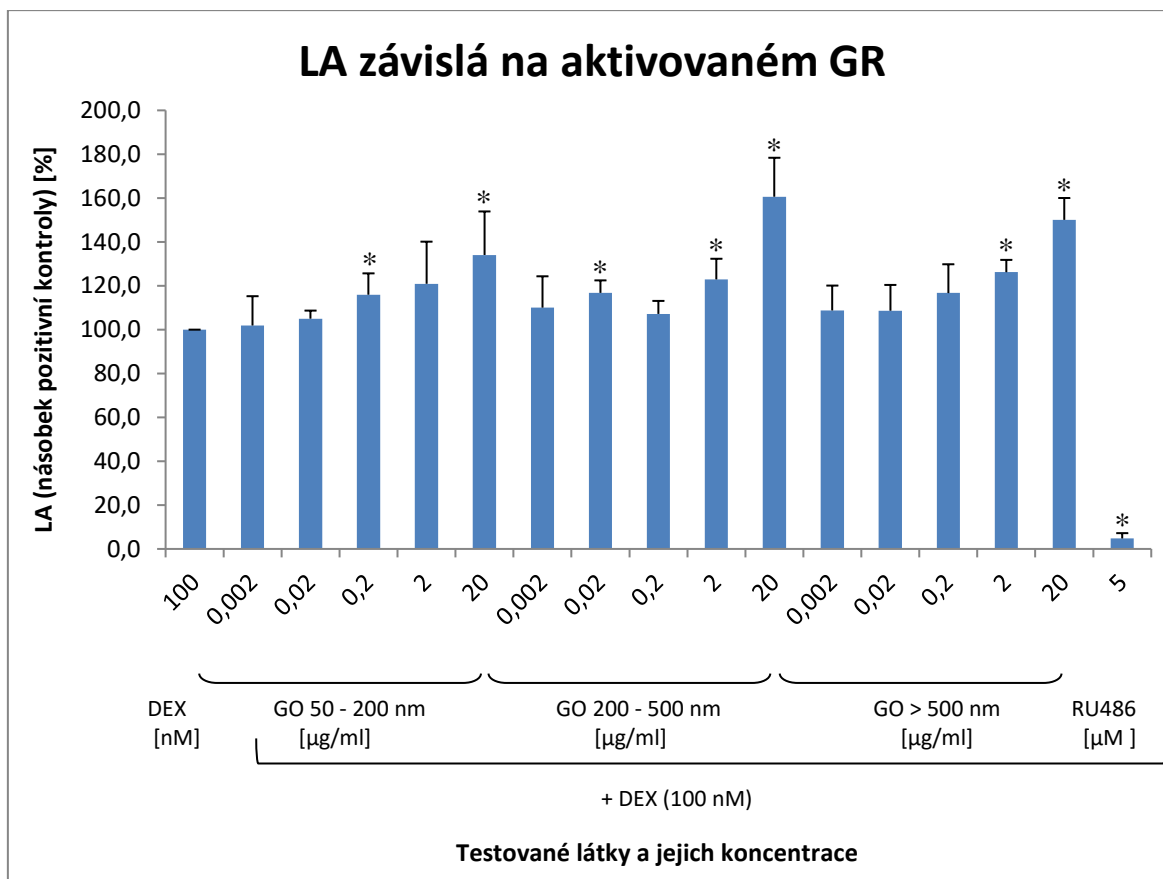
Pomocí metody Gene Reporter Assay (GRA) byla měřena schopnost GO aktivovat či inhibovat vybrané receptory. Každá buněčná linie byla měřena v agonistickém (bez ligandu) a antagonistickém módu (s ligandem) a výstupem je tedy 6 grafů se statisticky zpracovanými daty. Aktivace receptorů byla nepřímo měřena měřením luciferázové aktivity (LA). Míru úrovně aktivace určoval poměr luciferázové aktivity v daném vzorku vzhledem k negativní kontrole.

4.3.1 Interakce GO s glukokortikoidním receptorem



Obr. 17 Míra aktivace GR vlivem GO v závislosti na míře luciferázové aktivity. (GO částice byly ve třech velikostech a 5 různých koncentracích vysety do 96 jamkové destičky k buněčné linii AZ-GR a po 24 hodinách inkubace byla měřena luciferázová aktivita určující míru aktivace GR vlivem GO. Hodnoty jsou násobky negativní kontroly (UT). * označuje signifikantní výsledky ($p < 0,05$). Hodnoty jsou průměrem minimálně 3 měření.)

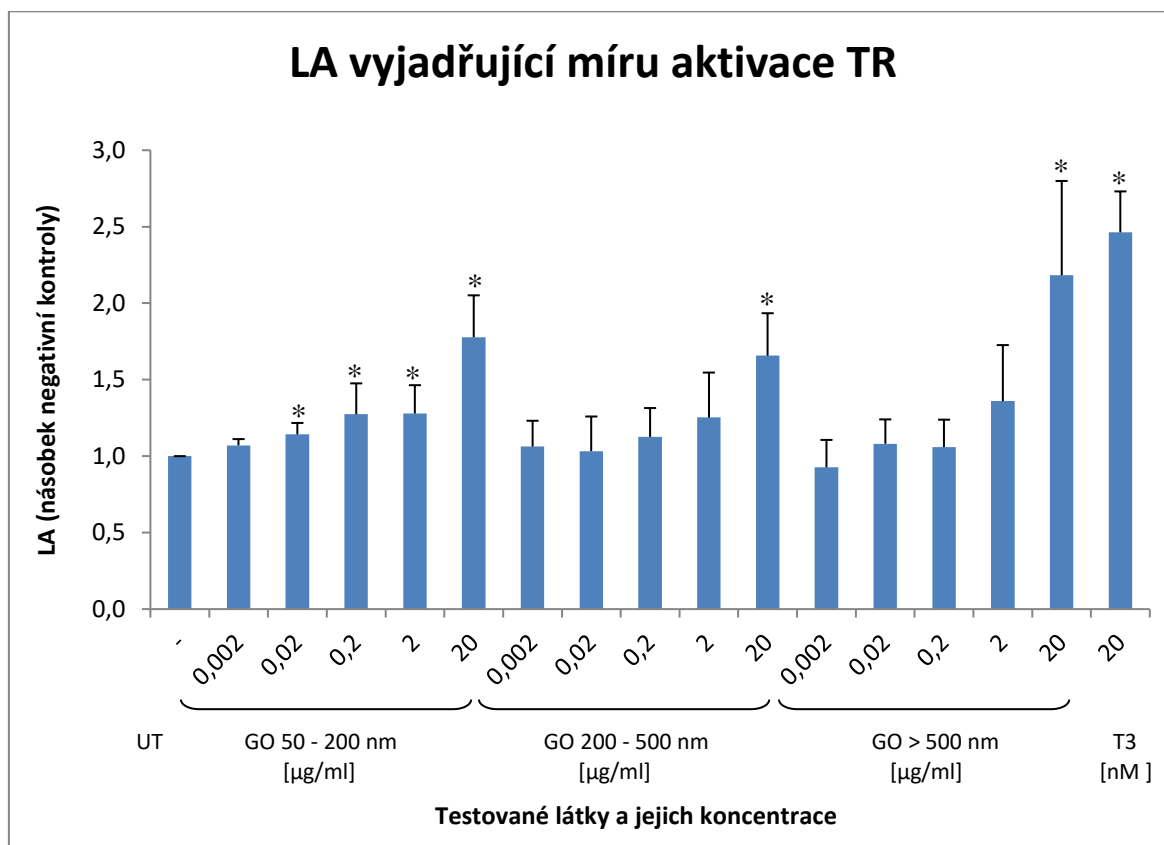
V agonistickém módu nebyl zaznamenán žádný významný nárůst aktivity glukokortikoidního receptoru. Nejvyšší luciferázová aktivita byla naměřena pro GO o velikosti částic 50 - 200 nm o koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ a to ve výši 2,87 násobku negativní kontroly. Tento výsledek je nesignifikantní a v porovnání s hodnotou pozitivní kontroly dexamethasonu (DEX) - 75,37 násobek negativní kontroly (UT), je tento číselný údaj naprosto zanedbatelný.



Obr. 18 Míra inhibice GR vlivem GO v závislosti na míře luciferázové aktivity. (GO částice byly ve třech velikostech a 5 různých koncentracích vysety do 96 jamkové destičky k buněčné linii AZ-GR a po 24 hodinách inkubace byla měřena luciferázová aktivita určující míru inhibice GR vlivem GO. Hodnoty jsou uváděny jako procenta negativní kontroly (DEX). * označuje signifikantní výsledky ($p < 0,05$). Hodnoty jsou průměrem minimálně 3 měření.)

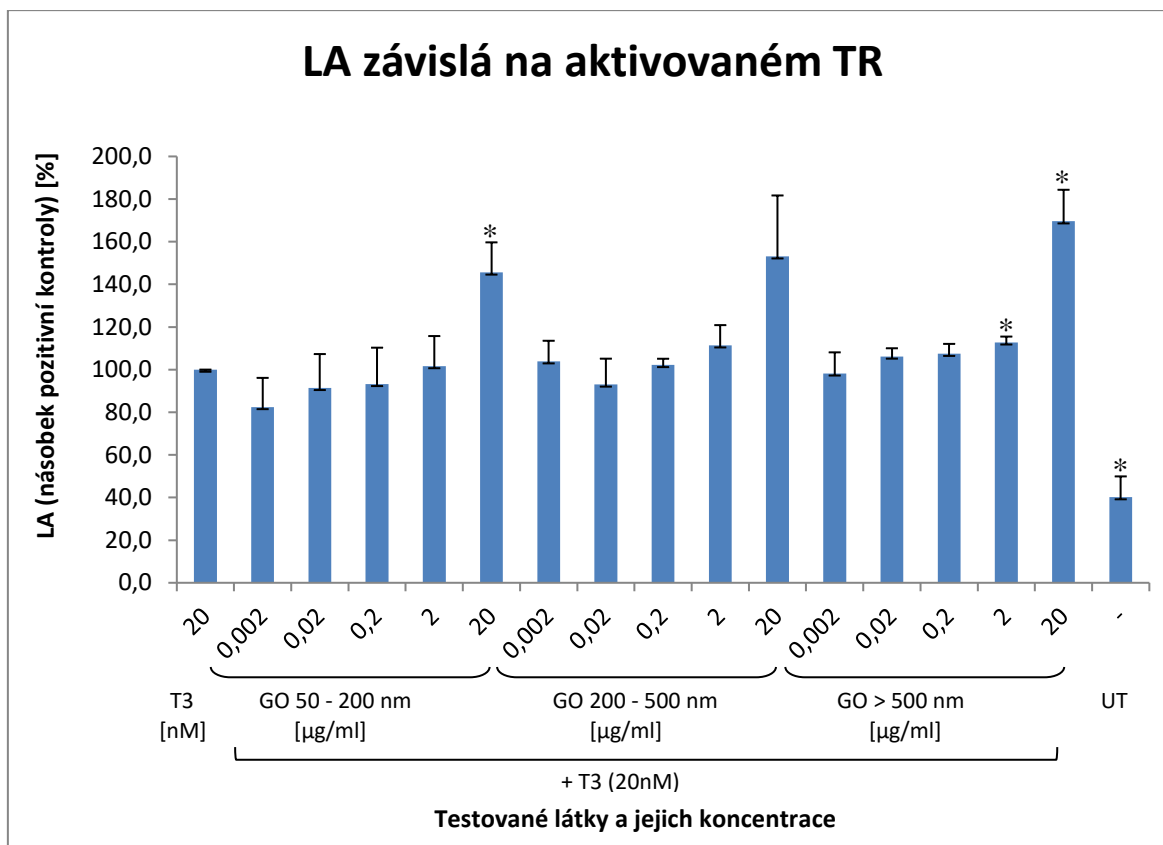
Pro antagonistický mód vycházejí výsledky poměrně zajímavěji. Byla sledována schopnost GO snížit aktivitu již aktivovaných receptorů. Z měření vyplynulo, že GO v kombinaci s DEX působí jako synergista, tedy nejen že nedochází ke snížení aktivace receptoru, ale dochází naopak k jeho zvýšení v porovnání s působením čistě samotného DEX. Vesměs je pozorovatelný nárůst indukce s narůstající koncentrací. Nejvyšších hodnot tedy vždy dosahuje nejvyšší koncentrace dané velikosti pozorovaných částic. Hodnoty jsou procentuálně vztaženy k indukci buněk ošetřených čistým DEX, jejichž indukce je vyjádřena jako 100 %. Pro GO o velikosti částic 50 – 200 nm je pro koncentraci 20 µg/ml indukce v hodnotě 134 %, pro GO o velikosti částic 200 – 500 nm je pro koncentraci 20 µg/ml indukce zvýšena na 160,3 %, což je nejvyšší z naměřených hodnot a pro GO o velikosti částic > 500 nm pro koncentraci 20 µg/ml je tato hodnota rovna 150 %. Ve všech třech případech byly výsledky vyhodnoceny T-testem jako signifikantní. V žádné z pozorovaných velikostí ani koncentrací nedochází k poklesu luciferázové aktivity, tedy s největší pravděpodobností ani ke snížení aktivace receptoru.

4.3.2 Interakce GO s thyroideálním receptorem



Obrázek 19 Míra aktivace TR vlivem GO v závislosti na míře luciferázové aktivity. (GO částice byly ve třech velikostech a 5 různých koncentracích vysety do 96 jamkové destičky k buněčné linii PZ-TR a po 24 hodinách inkubace byla měřena luciferázová aktivita určující míru aktivace TR vlivem GO. Hodnoty jsou násobky negativní kontroly (UT). * označuje signifikantní výsledky ($p < 0,05$). Hodnoty jsou průměrem minimálně 3 měření.)

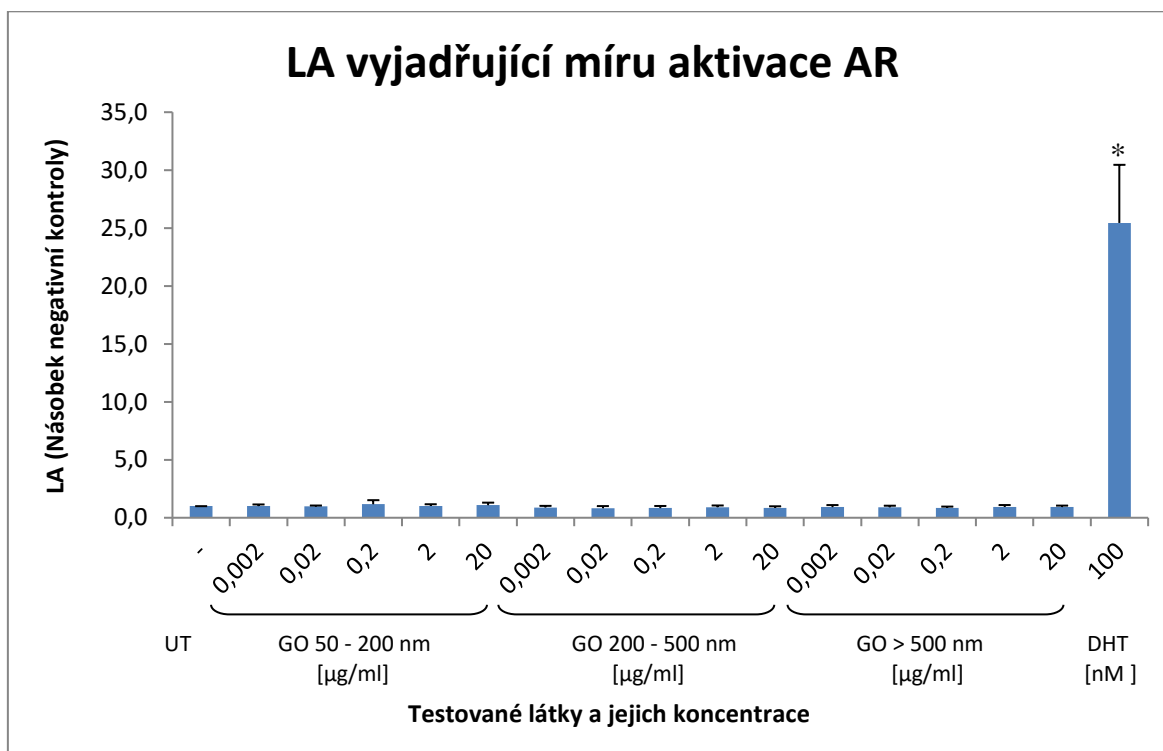
Měření schopnosti GO zvyšovat aktivitu thyroideálního receptoru (TR) poskytlo vcelku zajímavé výsledky. Z grafu je jednoznačně viditelný trend narůstající aktivity s narůstající koncentrací GO u všech tří velikostí částic nanomateriálu. Indukce nejvyšších koncentrací je ve všech třech případech signifikantní. U GO o velikosti částic 50 – 200 nm byla pro koncentraci 20 µg/ml 1,78 násobek negativní kontroly, nepatrně nižší indukci s hodnotou 1,66 násobku negativní kontroly vykazuje GO o velikosti částic 200 – 500 nm o koncentraci 20 µg/ml a nejzajímavější hodnotu má GO o velikosti částic > 500 nm o koncentraci 20 µg/ml, kdy indukce činí 2,18 násobku negativní kontroly, což se již, jak je z grafu viditelné, blíží hodnotě pozitivní kontroly – T3, která zvýšila indukci na 2,46 násobku oproti negativní kontrole. I přes vyšší směrodatné odchylky byly ve všech experimentech pozorovány stejné trendy nárůstu indukce s nárůstem koncentrace. Pro zajímavost výsledků byla linie PZ-TR testována metodou PCR nejen v antagonistickém módu, jako zbývající linie, ale jako jediná také v módu agonistickém.



Obrázek 20 Míra inhibice TR vlivem GO v závislosti na míře luciferázové aktivity. (GO částice byly ve třech velikostech a 5 různých koncentracích vysety do 96 jamkové destičky k buněčné linii PZ-TR a po 24 hodinách inkubace byla měřena luciferázová aktivita určující míru inhibice TR vlivem GO. Hodnoty jsou uváděny jako procenta negativní kontroly (T3). * označuje signifikantní výsledky ($p < 0,05$). Hodnoty jsou průměrem minimálně 3 měření.)

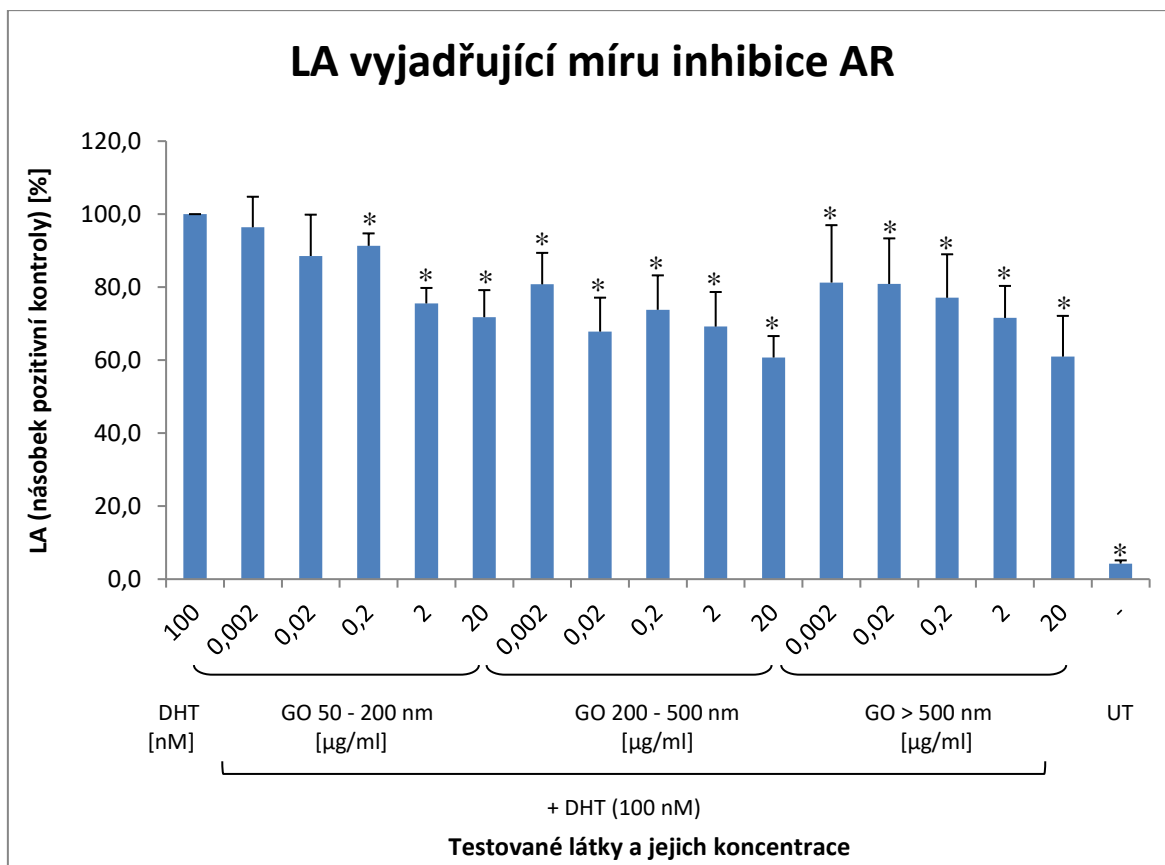
Zajímavé výsledky poskytuje i graf s hodnotami antagonistického módu. I zde nejvyšší koncentrace všech tří velikostí GO částic vykazuje zajímavý výsledek. Stejně jako v případě AZ-GR i zde působí GO v kombinaci s aktivátorem receptoru, konkrétně T3, synergisticky a společně zvyšují luciferázovou aktivitu oproti samotné T3. Ačkoliv dochází i ke snížení aktivity v nižších koncentracích, tak nejnižší hodnoty dosahuje GO o velikosti částic 50 – 200 nm o koncentraci 0,002 µg/ml, kdy aktivita klesá pouze na 82 % indukce vyvolané dodáním T3, nejedná se o významný pokles. Indukce GO o velikosti částic 50 – 200 nm o koncentraci 20 µg/ml dosáhla 146 % proti samotné T3 – výsledek je signifikantní. Nesignifikantní, nicméně významnou indukci vykazaly buňky ošetřené GO o velikosti částic 200 – 500 nm o koncentraci 20 µg/ml a to v hodnotě 154 % oproti samotné T3. A nejvýznamnější a zároveň signifikantní nárůst indukce byl pozorován u GO o velikosti částic > 500 nm při koncentraci 20 µg/ml, který dosáhl hodnoty téměř 170 % oproti negativní kontrole.

4.3.3 Interakce GO s androgenním receptorem



Obr. 21 Míra aktivace AR vlivem GO v závislosti na míře luciferázové aktivity. (GO částice byly ve třech velikostech a 5 různých koncentracích vysety do 96 jamkové destičky k buněčné linii AIZ-AR a po 24 hodinách inkubace byla měřena luciferázová aktivita určující míru aktivace AR vlivem GO. Hodnoty jsou násobky negativní kontroly (UT). * označuje signifikantní výsledky ($p < 0,05$). Hodnoty jsou průměrem minimálně 3 měření.)

V agonistickém módu nevykazuje buněčná linie AIZ-AR žádnou aktivitu. Ve všech případech nevyvolalo ošetření GO žádnou indukci luciferázové aktivity, tedy nedošlo k aktivaci androgenního receptoru. Není pozorovatelný ani nepatrný nárůst u nejvyšších koncentrací a nejvyšší hodnoty dosahují buňky ošetřené GO o velikosti částic 50 – 200 nm při koncentraci 20 µg/ml s hodnotou 1,09 násobek negativní kontroly, což je nepatrně vyšší než ostatní hodnoty a v porovnání s DHT, které bylo využito jako aktivátor receptoru a dosáhlo indukce 25,44 x vyšší než negativní kontrola, je tento výsledek naprosto zanedbatelný.



Obr. 22 Míra inhibice AR vlivem GO v závislosti na míře luciferázové aktivity. (GO částice byly ve třech velikostech a 5 různých koncentracích vysety do 96 jamkové destičky k buněčné linii AIZ-AR a po 24 hodinách inkubace byla měřena luciferázová aktivita určující míru inhibice AR vlivem GO. Hodnoty jsou uváděny jako procenta negativní kontroly (DHT). * označuje signifikantní výsledky ($p < 0,05$). Hodnoty jsou průměrem minimálně 3 měření.)

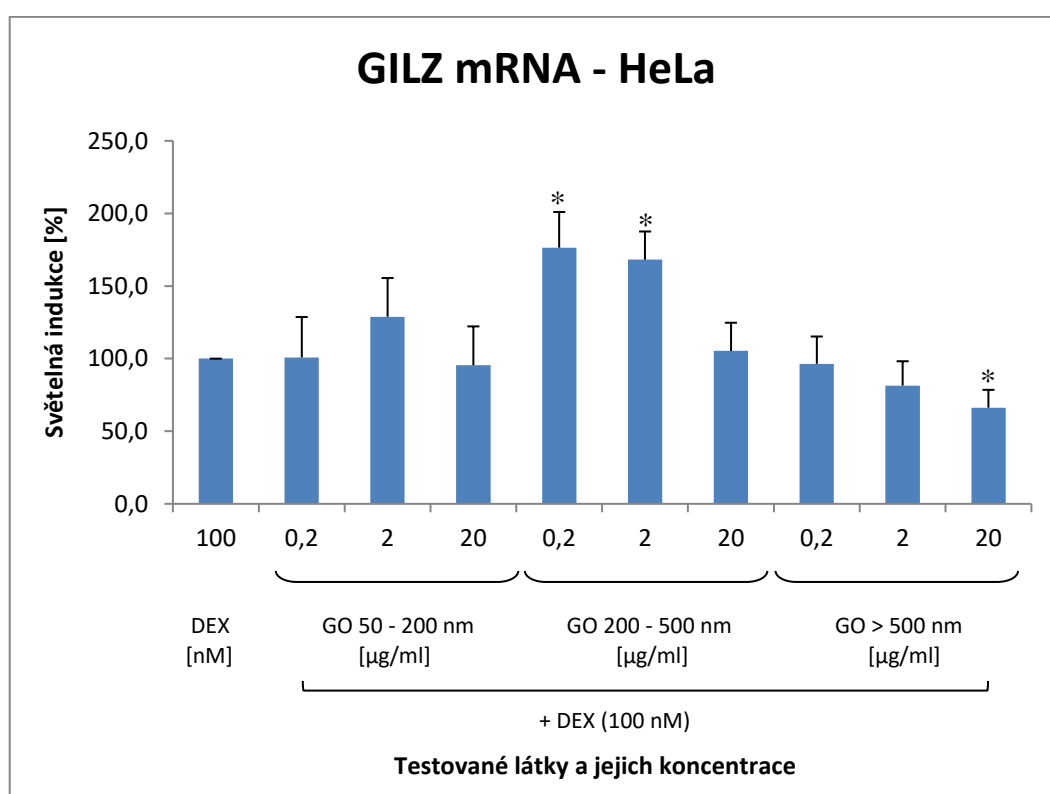
Antagonistický mód v případě buněčné linie AIZ-AR vykazuje přesně opačné trendy než v předchozích dvou případech linií AZ-GR, PZ-TR. Nejvyšší koncentrace dosahují nejnižších hodnot indukce luciferázy a s narůstající koncentrací je vesměs pozorována klesající aktivita. Všechny výsledky jsou dle T-testu signifikantní. Buňky ošetřené GO o velikosti částic 50 – 200 nm při koncentraci 20 µg/ml vykazují luciferázovou aktivitu sniženou proti DHT na 72 %. V případě GO o velikosti částic 200 – 500 nm při koncentraci 20 µg/ml dochází k nejnižší indukci a to o hodnotě 60,72 % indukce DHT, což je hodnota jen nepatrně nižší než GO o velikosti částic > 500 nm, kde při koncentraci 20 µg/ml dosahuje aktivita luciferázy pouhých 60,97 %.

4.4 PCR

U všech třech buněčných linií byla následně sledována změna exprese cílových genů regulovaných danými receptory. Linie byly testovány v antagonistickém módu, pouze HepG2, z níž je odvozena linie PZ-TR, byla testována pro zajímavost výsledků v módu agonistickém i antagonistickém. Indukce pro konkrétní geny byla srovnávána s house keeping) genem GAPDH a následné výsledky v grafu jsou prezentovány podle charakteru dat buď jako násobky indukce UT nebo jako procentuální vyjádření indukce vůči pozitivní kontrole, která je převedena na hodnotu 100 %. Testovány byly pouze 3 nejvyšší koncentrace všech velikostí GO částic.

4.4.1 HeLa

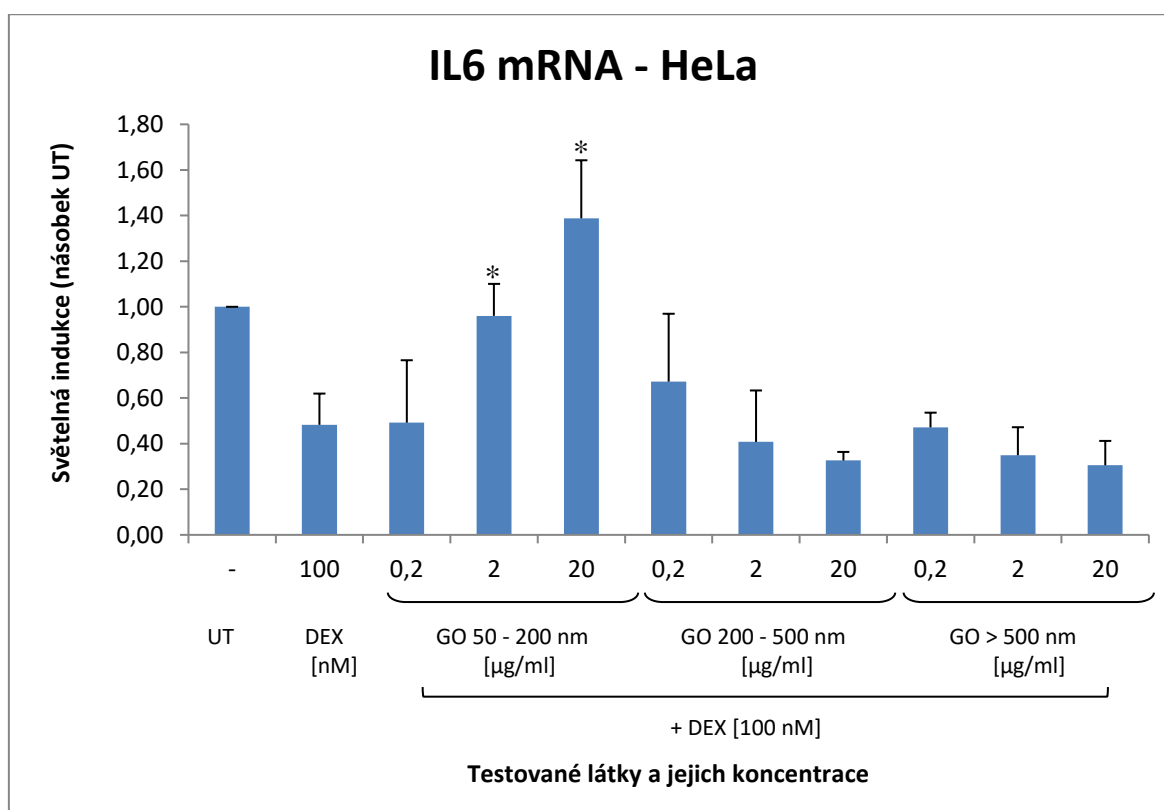
Buněčná linie HeLa byla testovaná pro dva geny. Prvním z testovaných genů je gen GILZ (glukokortikoidem indukovaný leucinový zip - Glucocorticoid-induced leucine zipper).



Obr. 23 Míra exprese genu GILZ v buněčné linii HeLa vlivem GO. (Z GO ošetřených vzorků buněčné linie HeLa byla vyizolována RNA a přepsána na cDNA. Z té byla pomocí metody PCR měřena exprese genu GILZ. Výsledné hodnoty jsou vyjádřeny jako procenta negativní kontroly (DEX). * označuje signifikantní výsledky ($p < 0,05$). Hodnoty jsou průměrem minimálně 3 měření.)

Výsledná indukce jednotlivých vzorků je vztažena k indukci DEX, který zde hraje úlohu pozitivní kontroly a je roven 100 %. Významný a signifikantní výsledek vykazují vzorky ošetřené grafen oxidem o velikosti částic 200 – 500 nm při koncentraci 0,2 µg/ml s hodnotou 176 % indukce DEX a 2 µg/ml s hodnotou 168 % indukce DEX. Naopak významný a signifikantní pokles se projevuje u vzorku ošetřného GO s velikostí částic > 500nm s koncentrací 20 µg/ml, kde indukce činí pouhých 66 % indukce vyvolané DEX.

Druhým sledovaným genem byl gen IL6 (Interleukin6).



Obr. 24 Míra exprese genu IL6 v buněčné linii HeLa vlivem GO. (Z GO ošetřených vzorků buněčné linie HeLa byla vyizolována RNA a přepsána na cDNA. Z té byla pomocí metody PCR měřena exprese genu IL6. Výsledné hodnoty jsou vyjádřeny jako násobky UT). * označuje signifikantní výsledky vůči DEX ($p < 0,05$). Hodnoty jsou průměrem minimálně 3 měření.)

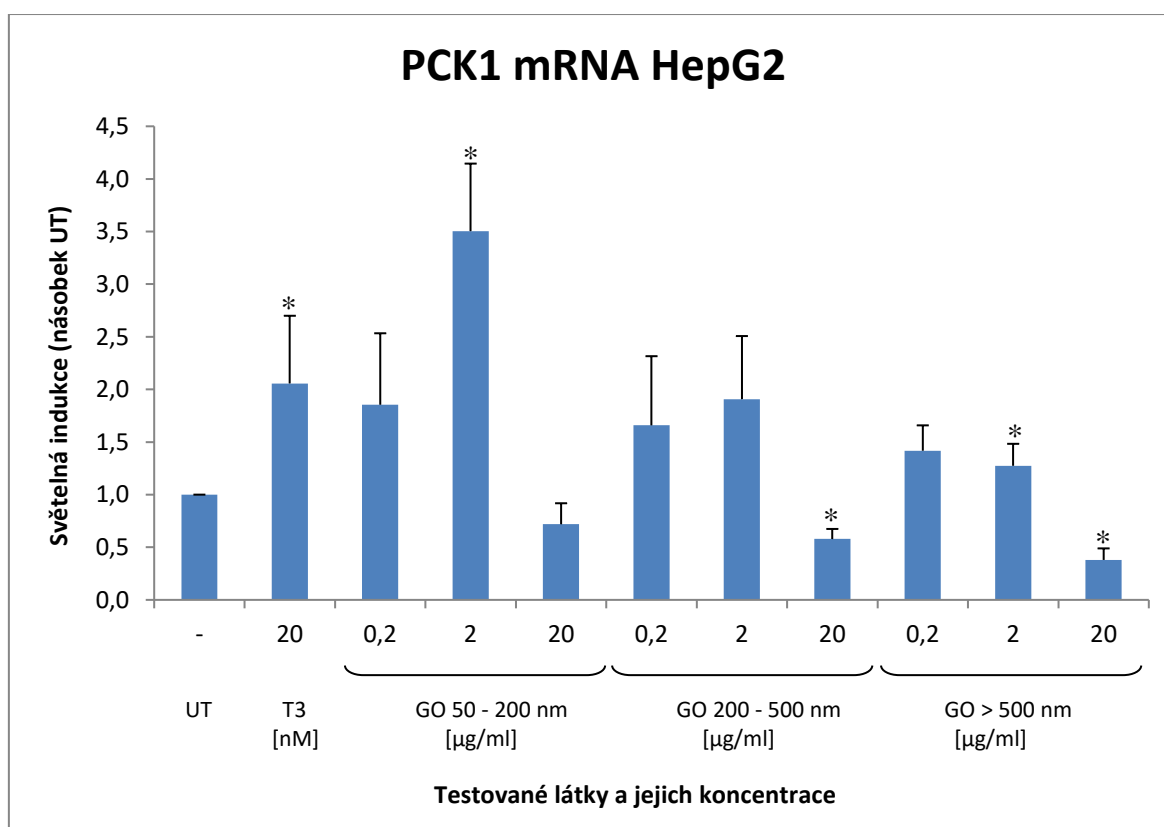
Vzhledem k tomu, že IL6 je gen s prozánětlivými účinky, tak je aktivací GR jeho exprese snižována. Z toho důvodu byla data prezentována jako násobky indukce UT. Nejmenší velikost částic jako jediná vykazuje nárůst exprese s rostoucí koncentrací GO. Nejnižší koncentrace zůstává stejná jako při použití samotného DEX (negativní kontrola), ale při koncentraci 0,2 µg/ml dosahuje exprese stejné hodnoty jako UT a při koncentraci

20 µg/ml je hodnota exprese rovna 1,4 násobku UT, což je zhruba 3x vyšší hodnota, než pro vzorek ošetřený samotným DEX. Obě hodnoty jsou signifikantní.

Střední a největší velikost GO částic vyvolává expresi, která se s rostoucí koncentrací GO snižuje, ale hodnoty jsou stále blízké hodnotě exprese vyvolané samotným DEX. GO o velikosti částic 200 – 500 nm při koncentraci 20 µg/ml vyvolává expresi o hodnotě 0,33 násobku UT. GO o velikosti částic > 500 nm při koncentraci 20 µg/ml vyvolal expresi o hodnotě 0,35 násobku UT. Dexametason samotný, který slouží jako negativní kontrola, vyvolává indukci v hodnotě 0,48 násobku UT.

4.4.2 HepG2

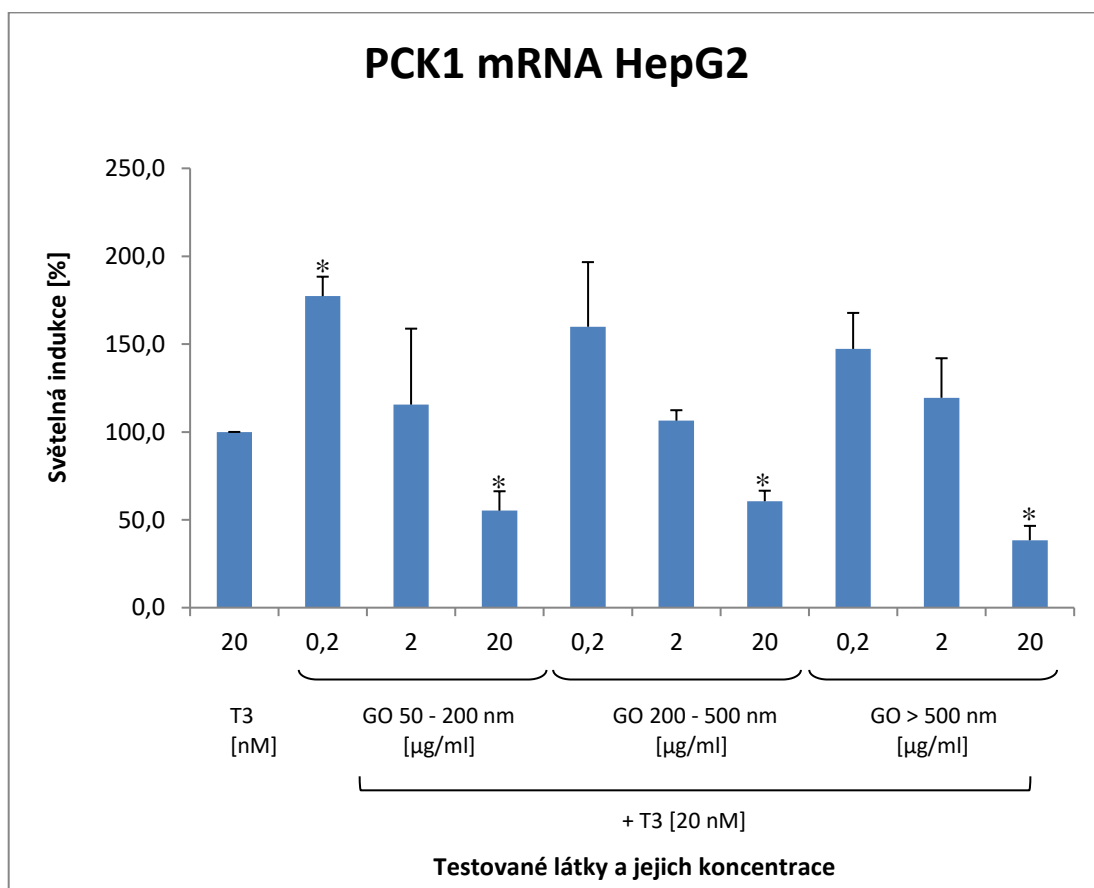
Buněčná linie HepG2 byla testována pouze pro jeden gen, ale pro zajímavé výsledky GRA byla testována pro oba módy – agonistický i antagonistický. Měřena byla exprese genu PCK1 (fosfoenolpyruvát karboxykináza - Phosphoenolpyruvate carboxykinase).



Obr. 25 Míra exprese genu PCK1 v buněčné linii HepG2 vlivem GO. (Z GO ošetřených vzorků buněčné linie HepG2 byla vyizolována RNA a přepsána na cDNA. Z té byla pomocí metody PCR měřena exprese genu PCK1. Výsledné hodnoty jsou vyjádřeny jako násobky UT). * označuje signifikantní výsledky vůči UT ($p < 0,05$). Hodnoty jsou průměrem minimálně 3 měření.)

Výsledná data jsou vyjadřována jako násobek indukce UT. Z grafu je zřejmé, že v nejvyšší koncentraci v případě všech tří velikostí GO částic dochází ke snížení exprese genu a toto snížení je s rostoucí velikostí částic výraznější. Pro vzorek ošetřený GO o velikosti částic 50 – 200 nanometrů je pro koncentraci 20 µg/ml indukce 0,72 násobkem indukce UT (nesignifikantní), pro GO o velikosti částic 200 – 500 nm o koncentraci 20 µg/ml klesá na 0,58 násobku indukce UT (signifikantní) a pro GO o velikosti částic > 500 je pro nejvyšší koncentraci hodnota pouhých 0,38 násobku indukce (signifikantní).

Opačný trend je pozorovatelný pro nižší koncentrace všech pozorovaných částic, které ve všech případech vykazují vyšší expresi genu než UT a v případě GO o velikosti částic 50 – 200 nanometrů při koncentraci 2 µg/ml byla naměřena signifikantní hodnota 3,5 násobku indukce UT, což je o polovinu vyšší indukce, než byla naměřena pro T3 (2,06 násobku indukce UT), který byl využit jako pozitivní kontrola.



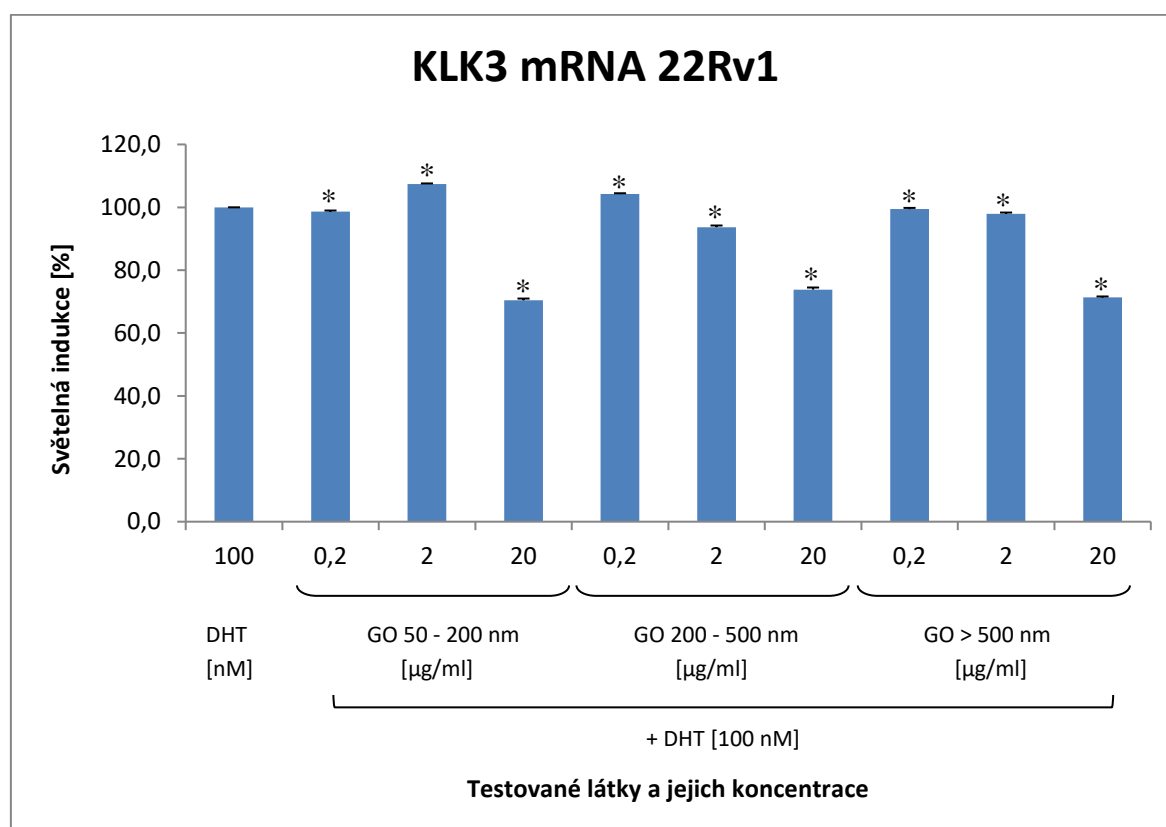
Obr. 26 Míra exprese genu PCK1 v buněčné linii HepG2 vlivem GO. (Z GO ošetřených vzorků buněčné linie HepG2 byla vyizolována RNA a přepsána na cDNA. Z té byla pomocí metody PCR měřena exprese genu PCK1. Výsledné hodnoty jsou vyjádřeny jako procenta negativní kontroly (T3). * označuje signifikantní výsledky vůči T3 ($p < 0,05$). Hodnoty jsou průměrem minimálně 3 měření.)

Pro antagonistický mód byly výsledky vyjádřeny procenty, kdy negativní kontrola T3, kterou byly všechny vzorky ošetřeny a receptory aktivovány, byla rovna 100 %. Z grafu je viditelná jasná sestupná tendence exprese s rostoucí koncentrací, a to pro všechny tři velikosti částic GO.

Při nejnižších koncentracích je exprese genu vyšší než při ošetření T3. Nejvýraznější vzestup je pozorovatelný pro GO o velikosti částic 50 – 200 nm při koncentraci 0,2 µg/ml, kdy je naměřená indukce 1,7x vyšší než v případě T3. Tento výsledek byl T-testem vyhodnocen jako signifikantní.

Střední koncentrace (2 µg/ml) se ve všech třech případech pohybuje kolem stejné indukce jako T3 a v nejvyšších koncentracích dochází k výraznému poklesu, který je ve všech případech signifikantní. Nejvýznamnější pokles nastává u GO o velikosti částic > 500 nm při koncentraci 20 µg/ml, kde indukce dosahuje pouze 38 % z indukce naměřené pro T3.

4.4.3 22Rv1



Obr. 27 Míra exprese genu KLK3 v buněčné linii 22Rv1 vlivem GO. (Z GO ošetřených vzorků buněčné linie 22Rv1 byla vyizolována RNA a přepsána na cDNA. Z té byla pomocí metody PCR měřena exprese genu KLK3. Výsledné hodnoty jsou vyjádřeny jako procenta negativní kontroly (DHT). * označuje signifikantní výsledky vůči DHT ($p < 0,05$). Hodnoty jsou průměrem minimálně 3 měření.)

Pro buněčnou linii 22Rv1 byla měřena exprese genu KLK3 (kallikren související peptidázy 3 - kallikrein related peptidase 3). Měřena byla exprese pro antagonistický mód, a proto byly výsledné hodnoty vztahovány k pozitivní kontrole, kterou bylo DHT, a to bylo stanoveno jako 100 %. Významnější výsledky byly naměřeny pouze pro nejvyšší koncentrace všech tří velikostí GO částic, jejichž výsledky jsou srovnatelné. Pro GO o velikosti částic 50 – 200 nm byla pro koncentraci 20 µg/ml naměřena indukce na 70,4 % proti samotnému DHT, pro GO o velikosti částic 200 – 500 nm pro koncentraci 20 µg/ml byla tato hodnota 73,8 % indukce DHT a pro nejvyšší velikost částic, tedy GO > 500 nm pro koncentraci 20 µg/ml byla hodnota indukce 71,3 %. Všechny výsledné hodnoty byly T-testem vyhodnoceny jako signifikantní.

5. DIDAKTICKÝ ASPEKT

Vzhledem k tomu, že jsem studentkou oboru biologie a geografie se zaměřením na vzdělávání, je na místě uvést didaktický aspekt, případně didaktické využití této práce.

V rámci této kapitoly byla pro studenty vyššího gymnázia připravena 45 minutová přednáška, která byla rozdělena na dvě hlavní části. V první polovině byl probírán význam mezipředmětových vztahů, který byl demonstrován na příkladu grafen oxidu a důležitost znalosti jazyka mateřského i cizího. Ve druhé polovině byli studenti seznámeni s vědeckou prací a prací v laboratoři a bylo jim nastíněno, jakým způsobem jsou data zpracovávána a co vědecký výzkum obnáší. Prezentace je přiložena jako příloha. K přednášce získali studenti dokument o možnostech vysokoškolského studia biologie, který byl tvořen názory a postřehy současných studentů různých biologických oborů, aby přednáška měla význam pro všechny zájemce o biologii, nejen pro ty zaujaté ve vědě.

Jedním z hodně diskutovaných témat na poli učitelství jsou mezipředmětové vztahy. Těmto vztahům mnohdy nebývá přikládána dostatečná významnost a jsou, zejména z řad studentů, často podceňovány. Tato práce, s grafen oxidem jakožto hlavním představitelem, má význam těchto vztahů jistým způsobem demonstrovat. Student si má uvědomit, že předměty tak, jak jsou známy ze školních lavic, v reálném světě neexistují izolovaně, a že jedno bez druhého nefunguje.

Tato diplomová práce je představena jako biologická, podíváme-li se ovšem například na charakteristiku grafen oxidu, zjistíme, že získáváme poznatky také z fyziky a především chemie. Chemie všeobecně doprovází biologickou vědeckou práci od začátku do konce. Nejen psaní rešerše, kde se s informacemi chemického rázu neustále setkáváme, ale samotná práce v laboratoři s nespočtelným množstvím chemikálií a chemickými reakcemi jakožto principem mnohých výzkumných metod.

Význam mezipředmětových vztahů je studentům vysvětlován také proto, aby si uvědomili, že se širším rozhledem, za hranicemi svého preferovaného předmětu/oboru, nebude jejich vzdělávání omezeno pouze na prázdné a neefektivní memorování, ale bude pro ně snadnější vytvořit si v hlavě logické mosty a pochopit jednotlivé souvislosti, čímž dokáží lépe využít nabyté informace a snáze takto své získané vědomosti udržet v paměti. To, co student pochopí, to ve své paměti udržet mnohem lépe.

V rámci mezipředmětových vztahů byly vyzdvíženy také jazyky, zejména tedy jazyk český a anglický. Český jazyk byl zmiňován z všeobecného hlediska a v rámci práce spíše

stylistická úprava textu. Anglickému jazyku byla věnována velká pozornost zejména v souvislosti se studiem na vysoké škole a prací ve vědecké sféře. Je důležité, aby znalost anglického jazyka nebyla studenty podceňována, neboť se jedná o světový jazyk a pokud chtějí pracovat s nejnovějšími poznatky vědeckých výzkumů, bez angličtiny se neobejdou. Studenti byli díky této práci seznámeni s podobou odborných článků a bylo jim ukázáno, v jakém rozsahu jsou články pro psaní nezbytné.

Další význam této práce pro studenty středních škol je v přiblížení vysokoškolského studia a objasnění vědecké práce, protože studenti často ve skutečnosti netuší, co za tím stojí. Jakožto budoucí pedagog věřím tomu, že širší rozhled a praktická znalost konkrétního biologického oboru a jeho studia je pro studenty vítaným benefitem učitele. Učitel tak může studentům přiblížit nejen, o čem je samotné studium na vysoké škole z hlediska fungování školy, ale také konkrétní možnost studia. Proto si myslím, že výběr odborného tématu pro závěrečnou práci je vysokoškolskému studentovi učitelství vždy k dobru.

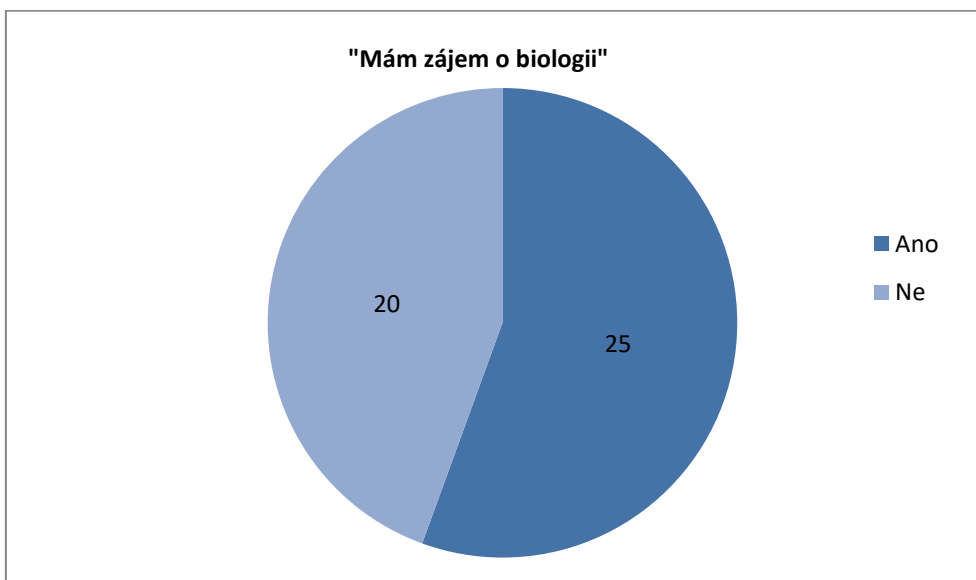
Oblast vědecké práce a toxikologie mi přijde přínosná pro více oborů a zabírá široké spektrum studijních možností. Studentům na této práci byla představena vědecká činnost. Byli seznámeni s laboratorní prací, sběrem dat, jejich vyhodnocováním a psaním samotné rešerše a výzkumné práce.

Cílem bylo ukázat, že vědecká práce není pouhé sezení za mikroskopem, ale statistické zpracovávání dat, vytyčování hypotéz a jejich verifikace či vyvrácení. Pro zajímavost a ukázkou statistického zpracování byli studenti seznámeni s některými výsledky této práce, kde jim také bylo vysvětleno, že, nejen ve vědě, nelze jevy charakterizovat pouze jedním číslem a že výsledky nemají 100% spolehlivost, nýbrž mají jistý stupeň volnosti, tak jako vše ostatní v přírodě.

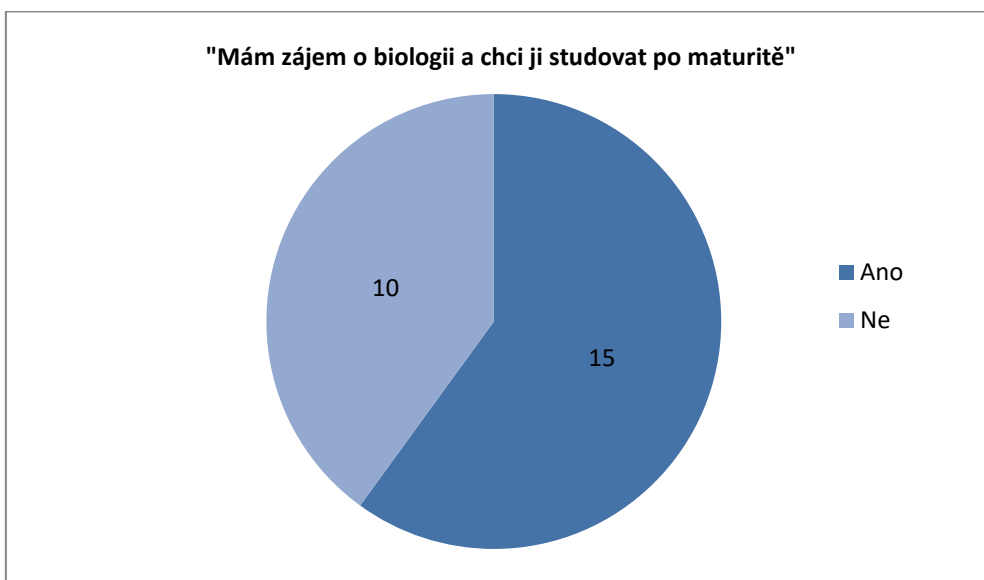
Na závěr přednášky vyplnili studenti krátký dotazník na přednášená témata. Výsledky jsou zpracovány níže.

Protože přednáška byla připravena pro hodinu biologie ve třídě 2.A a VI. a pro biologický seminář pro třídu 3.A a VII., jsou některé výsledky zpracovány zvlášť.

Ze 45 studentů 2. ročníku vyššího gymnázia označilo 25, že má zájem o biologii. Z těchto 25 studentů 15 označilo, že má v plánu biologii studovat dále.



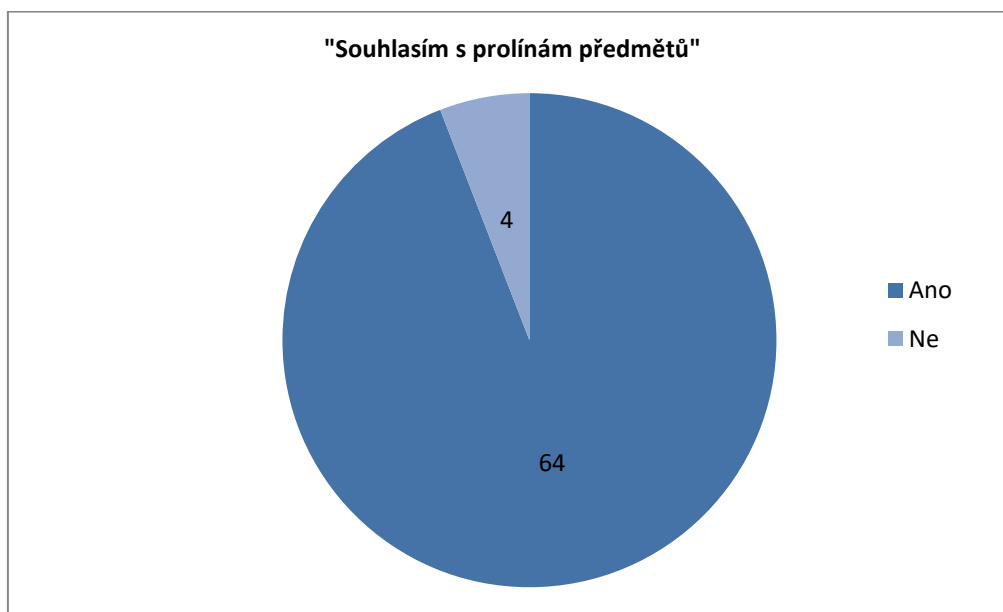
Obr. 28 Zájem studentů o obor biologie. (Množství studentů druhého ročníku vyššího gymnázia, kteří mají a nemají zájem o biologii jako vědu.)



Obr. 29 Zájem studentů o pomaturitní studium biologie. (Množství studentů druhého ročníku vyššího gymnázia, kteří mají zájem o biologické obory a chtějí v jejím studiu po složení maturitní zkoušky pokračovat v rámci vysokoškolského studia.)

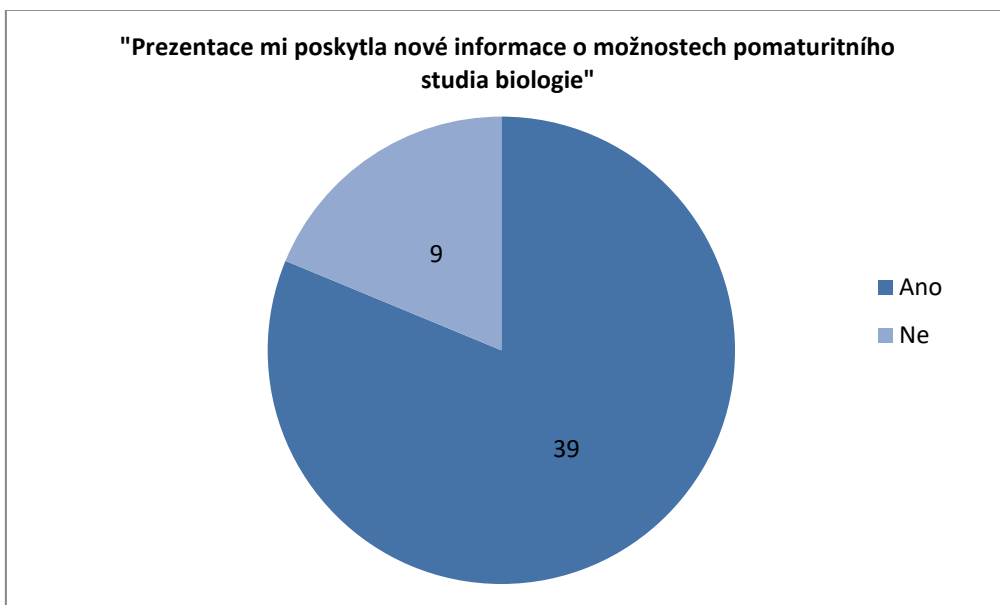
Dále je pracováno s daty, ve kterých vztah k biologii nehraje roli, nebo pouze s dotazníky, ve kterých studenti zodpověděli, že mají zájem o biologii, tudíž není rozlišováno mezi 2. a 3. ročníkem vyššího gymnázia a výsledky jsou zpracovány společně.

Mým hlavním cílem bylo zjistit, zda je prezentace pro studenty něčím přínosná. V případě mezipředmětových vztahů nebylo o čem diskutovat a studenti označili v téměř 100 %, že jsou si vědomi významu mezipředmětových vztahů, důležitosti jazyka jak mateřského, tak cizího a většina souhlasila s prolínáním předmětů a propojováním informací.

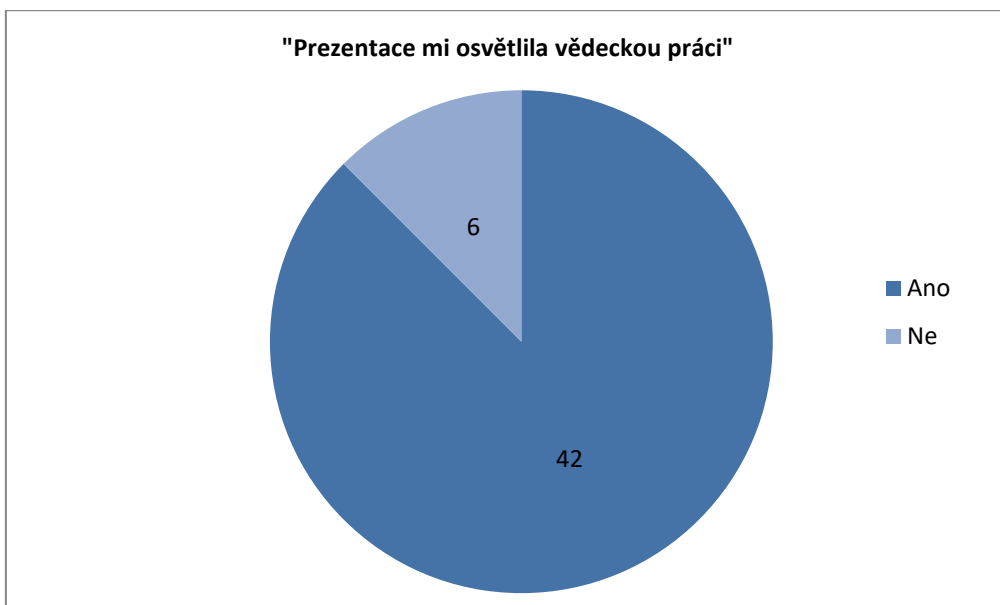


Obr. 30 Názor studentů na prolínání předmětů v rámci mezipředmětových vztahů. (Názor studentů druhého a třetího ročníku vyššího gymnázia na prolínání předmětů v rámci mezipředmětových vztahů.)

Vzhledem k charakteru druhé části prezentace pro mě bylo důležité zjistit, zda studenti považovali tuto přednášku za přínosnou. Tato zpětná vazba byla získávána otázkami ohledně nabytí nových informací o pomaturitním studiu a osvětlení vědecké práce. Tyto výsledky jsou vztaženy pouze ke studentům se zájmem o biologii. Celkový počet respondentů je 48 studentů čtyř tříd vyššího gymnázia.



Obr. 31 Přínos prezentace pro studenty z hlediska nových informací o možnostech pomaturitního studia biologie (Názor studentů druhého a třetího ročníku vyššího gymnázia na přínos prezentace a zpracovaných materiálů z hlediska poskytnutí nových informací o možnostech pomaturitního studia biologie.)



Obr. 32 Přínos prezentace pro studenty z hlediska osvětlení vědecké práce (Názor studentů druhého a třetího ročníku vyššího gymnázia na přínos prezentace a zpracovaných materiálů z hlediska osvětlení vědecké práce a problémy, které se okolo vědecké práce nacházejí.)

Při pohledu do grafů je zřejmé, že prezentace byla studenty hodnocena jako přínosná. 81,25 % studentů uvedlo, že jim přednáška a k ní zpracované materiály poskytly nové informace ohledně pomaturitního studia biologie. 87,5 % studentů uvedlo, že jim prezentace osvětlila vědeckou práci. Pokud bychom vzali v potaz všechny dotazované studenty, tedy i ty, kteří zájem o studium biologických oborů neprojeví, i pak by se prezentace jevila jako přínosná, protože 83,8 % studentů ze všech dotazovaných uvedlo, že jim prezentace poskytla nové informace a 88,2 % v dotazníku sdělilo, že jim tato přednáška osvětlila vědeckou práci.

6. DISKUSE

Tato práce se věnuje vlivu uhlíkových nanomateriálů, konkrétně grafen oxidu, na transkripční aktivitu 3 jaderných receptorů – glukokortikoidního, androgenního a thyroïdního. Testována je jak schopnost aktivovat, tak schopnost inhibovat činnost těchto receptorů. Všechny tři receptory mají svou nezastupitelnou roli při fungování lidského těla a mohou být klíčovým prvkem pro léčbu různých nemocí, ať už jejich zvýšenou aktivitou, nebo naopak umlčením.

Pro testování toxických účinků GO na vybrané receptory byl využit MTT test. Tento test byl využit pro jeho dostupnost a rychlé výsledky, ačkoliv není pro testování GO úplně vhodný. GO reaguje s MTT solí za spontánní redukce na formazan a může tak tedy vytvářet falešný signál, který není ovlivněn skutečnou viabilitou buněk (Liao et al., 2011). Druhé možné zkreslení mohlo být způsobeno zablokováním průchodu světelného signálu shluky grafen oxidových destiček, které bylo pozorovatelné u nejvyšších koncentrací, zejména pro velikost částic > 500 nm (obr. 16, str. 53). Z těchto dvou důvodů proto pravděpodobně v některých případech nejen, že životnost neklesla, ale zdánlivě stoupla i přesto, že ve skutečnosti mohlo k jistému snížení viability buněk dojít. I přes nevhodnost MTT testu byla ovšem možná toxicita GO vyhodnocena jako zanedbatelná, protože při pozorování buněk pod mikroskopem (obr. 16, str. 53), nebyl pozorován znatelný úbytek buněk ani žádné morfologické změny. V případě AIZ-AR buněčné linie je pozorovatelné snížení viability, které je nejzřetelnější při nejnižších koncentracích. S rostoucí koncentrací zdánlivá viabilita roste. Falešným signálem a zastíněním jamek shluky destiček by mohla být zastřena částečně toxicita GO. Ani v tomto případě se ovšem nejedná o výrazné hodnoty, které by měly omezovat rozpětí koncentrací pro další výzkum. Signál MTT testu neklesl nikdy pod 90 % proti UT, proto byly dále testovány všechny koncentrace i velikosti pro všechny vybrané receptory. Další práce s tímto nanomateriálem by ovšem vyžadovala věrohodnější testování, před jeho konkrétní aplikací.

Glukokortikoidní receptor se podílí na protizánětlivých reakcích organismu a jeho ligandy – glukokortikoidy – jsou proto častým léčivem. Vyjma protizánětlivých účinků ovšem mnoho z nich způsobuje také řadu účinků nežádoucích, a to zejména ve vyšších dávkách. Cílem moderního výzkumu je proto najít nové exogenní ligandy tohoto receptoru s nejnižším množstvím vedlejších účinků. Stejný případ platí i pro další testované receptory. Ačkoliv samotný GO nedokázal aktivovat GR, v kombinaci s DEX působí jako synergista

a jejich kombinací bylo dosaženo až 1,6x většího signálu, než samotným dexamethasonem. Dexamethason je hojně využívaný lék využívaný pro léčbu alergií, kožních poruch, lupusu či dýchacích obtíží. Ovšem, jako mnohé další léky, i DEX může způsobovat vedlejší účinky, kdy se často jedná o změnu glukózové tolerance, zvýšenou chuť k jídlu a přibírání, změny chování a nálad a další (Anonym³, 2017). Tyto vedlejší účinky souvisí mimo jiné s dávkováním léku. Ačkoliv samotný GO neaktivuje GR, v kombinaci DEX aktivuje receptor silněji než samotný DEX a tím může být teoreticky dávka DEX snížena, čímž se sníží i jeho vedlejší účinky a léčebný efekt zůstane zachován.

Buněčná linie PZ-TR byla GO aktivována v agonistickém i antagonistickém módu. GO o velikosti částic > 500 nm o koncentraci 20 µg/ml dosáhl 2,18 násobku UT, což je velice blízká hodnota té hodnotě, která byla vyvolána užitím T3 – 2,5 násobku UT. Vzhledem k tomu, že T3 je přirozený endogenní ligand thyroideálního receptoru s nezastupitelnou rolí v organismu, ale má ve vyšších dávkách své nežádoucí účinky, je na místě odhalit látku s podobnými vlastnostmi, která ovšem tyto toxické účinky nezahrnuje (viz kapitola 1.1.3.3 str. 27). GO by se s takovou hodnotou mohl touto hledanou látkou stát, pokud u něj nebudou žádné toxické ani vedlejší účinky prokázány. Navíc, stejně jako v případě AZ-GR, i zde se dokázal GO chovat jako synergista a ve spojení s T3 dosáhla síla signálu 170 % oproti samotnému užití T3. V takovéto kombinaci by mohly být nežádoucí účinky T3 eliminovány snížením jeho dávky, ale účinku by bylo dosaženo díky synergistickému účinku s GO.

Vysvětlením synergistického účinku v obou dvou případech by mohla být schopnost GO umožnit agonistům receptoru snáze vstoupit do buňky rozrušením plazmatické membrány nebo pasivní difúzí na principu Trojského koně (Lammel et al., 2015). To by znamenalo, že GO nemá ve skutečnosti vliv na receptor jako takový, ale pouze pomáhá transportu konkrétního agonisty. Tento případ je předpokládán pro GR. U linie PZ-TR se choval GO i jako agonista, nelze tedy říci, jestli nárůst aktivace v součinnosti s T3 způsobila schopnost GO aktivovat receptor, nebo usnadnění transportu T3 do buňky.

Mimo to je možno setkat se s případy, kdy je třeba transkripční aktivitu utlumit (např. nadbytek androgenů vede k nadměrné funkci jater, gynekomastii, psychologickým poruchám, vývoji sekundárních mužských pohlavních znaků u žen atp. (Kickman, 2008)). Pro androgenní receptor byl skutečně odhalen antagonistický účinek GO, kdy s jeho narůstající koncentrací klesala naměřená luciferázová aktivita. Nejnižší hodnota byla naměřena pro GO o velikosti částic 200 – 500 nm a > 500 nm pro koncentraci 20 µg/ml,

kde hodnota klesla téměř o 40 % oproti vzorku ošetřenému DHT. Nedávná studie z roku 2017 se zabývá otázkou role AR při gliomu. Skutečnost je taková, že muži trpí na výskyt tohoto typu nádoru 1,5-2x více než ženy a proto se nabízí otázka vlivu pohlavních hormonů. Výzkum dospěl k závěru, že AR skutečně nese zodpovědnost a jeho zvýšená aktivace vede k rozvoji nádoru a snižuje se exprese genu SVIP, který inhibuje buněčnou proliferaci. V této situaci se nabízí samozřejmě utlumení činnosti AR pomocí antiandrogenů (Bao et al., 2017). K těmto účelům by mohl být antagonistický účinek GO využit. Otázkou zůstává, zda je jeho antagonistický účinek dostačující a jaké chování by vykazoval v rámci celého organismu, kde se spouští větší kaskáda dějů.

V případě určitých léků je nutno mít jistotu, že jejich aplikací neaktivujeme nebo neutlumíme jiné receptory a dráhy než ty cílové. Tímto bývá zamezováno nežádoucím účinkům. Proto data o nezměněné aktivitě jsou pro výzkum taktéž významná. V tomto případě je glukokortikoidní i androgenní receptor bez rizika aktivace.

GO byl testován pro schopnost aktivace AhR a expresi cyp1A mRNA. Lammel et al. ve své studii zjistili, že GO sám o sobě expresi neindukuje. V kombinaci s agonisty příslušného receptoru ji ovšem zvyšuje vcelku výrazně. Neplatí to však pro všechny testované agonisty. Ukázalo se, že závisí na charakteru látky, se kterou je GO spojen (Lammel et al., 2015). Podle chemických vlastností různých chemických látek může být dosaženo různých výsledků, které mezi sebou nemusí vykazovat žádnou paralelu v rámci GO při testování stejného receptoru, pokud využijeme různé látky jakožto agonisty receptorů. Ačkoliv ve zmíněné studii (Lammel et al., 2015) narůstala exprese společně s narůstající koncentrací GO, u linií testovaných v mé práci se toto pravidlo prokázat nedá. V případě HeLa buněčné linie (GR) bylo nejvyšších hodnot u genu GILZ dosaženo při GO o velikosti částic 200 – 500 nm při koncentraci 0,2 $\mu\text{g/ml}$ a 2 $\mu\text{g/ml}$. Ostatní hodnoty se víceméně blížily hodnotě exprese vyvolané přidáním DEX. Tento gen se podílí na zánětlivých reakcích organismu a nachází se v různých typech buněk (Ronchetti et al., 2015).

Gen IL-6 naopak působí zánětlivě a aktivace GR by měla vést k jeho snížené expresi. Výsledky měření jdou ovšem částečně proti výsledkům GRA. Pro nejmenší velikost částic je při GRA pozorovatelná narůstající aktivita s rostoucí koncentrací GO částic, stejně jako v případě dalších velikostí. Při měření exprese ovšem s narůstající koncentrací částic také narůstá naměřená indukce, což naopak značí nižší aktivaci receptoru. Nejvyšší naměřená indukce byla pro koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$, která dosahovala až trojnásobné hodnoty ošetření

samotným DEX. To by ale značilo, že aktivita receptoru byla značně snížena. Tomu ovšem již neodpovídají hodnoty z GRA. Střední a největší velikost částic ovšem naopak jdou ve stejném trendu jako výsledky GRA – s narůstající koncentrací GO stoupá aktivace GR a tím stoupá exprese pozorovaného genu. Ovšem, ačkoliv je tendence znatelná, pořád jsou hodnoty vcelku blízké hodnotě exprese při ošetření buněk samotným DEX. Důvod, proč pouze nejnižší velikost částic jde proti výsledkům přechozího měření není známý, nicméně unikátní vlastnosti nanomateriálů jsou zajištěné právě jejich velikostí. I tato skutečnost může skrývat odpověď na tuto otázku. Bližší informace by vyžadovaly další měření.

Pro linii HepG2 byl sledován gen PCK1 a to v módu agonistickém i antagonistickém. Ačkoliv výsledky agonistického módu nevykazují stejnou tendenci jako při GRA, dochází jednoznačně k utišení exprese genu při nejvyšších koncentracích. Naopak při ošetření GO o velikosti částic 50-200 nm při koncentraci 2 μ g/ml dochází k vysoké expresi genu, která je 1,5x vyšší než pro vzorek ošetřený T3. Ačkoliv zde není vidět tendence změny exprese v závislosti na koncentraci, nelze si nevšimnout, že je zde sestupná tendence exprese s rostoucí velikostí nanočástic, při porovnání stejných koncentrací. Jak bylo řečeno dříve, může se jednat o odlišné vlastnosti GO způsobené rozdílnou velikostí částic. V případě antagonistického módu jsou jednoznačně viditelné tendence snižující se exprese s narůstající koncentrací, a to ve všech třech velikostech. Trend je přesně opačný proti výsledkům GRA. Nejnižší i nejvyšší koncentrace každé testované velikosti vykazuje významný rozdíl proti kontrole.

Gen PCK1 je přirozeně stimulován velkým množstvím hormonů, včetně glukagonu, glukokortikoidů a thyroidního hormonu, a naopak jeho inhibici zajišťuje inzulin. V nedávné studii, z roku 2013, bylo zjištěno, že i androgeny negativně regulují expresi tohoto genu. Tato studie byla ovšem prováděna na samečcích kuřat (Duan et al., 2013). Tento gen hraje důležitou roli v mnoha fyziologických procesech u savců a podílí se na obezitě a rezistenci na inzulin. Bližší zkoumání exprese tohoto genu by mohlo pomoci boji s obezitou a svou pozornost si zaslouží díky participaci na cukrovce II. typu.

Gen KLK3, sledovaný pro androgenní receptor sleduje svou expresí tendence naměřené aktivity receptoru dle GRA. Pouze v nejvyšších koncentracích se jedná o významný pokles exprese pozorovaného genu.

Problémem testování na buněčných liniích je skutečnost, že procesy v nich probíhající fungují izolovaně od ostatních procesů, které by za normálních podmínek probíhaly v rámci celého organismu, a tím je omezen vliv pochodů, který by se reálně

uplatňoval. Ztrácí se tím komplexnost reálného organismu a nelze počítat s tím, že aplikace na živý organismus by poskytla stejné výsledky jako testy na samotných buňkách. Navíc se nejedná o přirozeně se vyskytující buňky, ale pro možnost měření aktivace receptorů pomocí luciferázové aktivity, musely být buněčné linie upraveny zásahem z vnějšku. Dále je při vyhodnocování výsledků a vytváření hypotéz na základě srovnání s jinými studii třeba uvažovat, na jakém organismu byly látky testovány. Je nutno brát v potaz absolutní a relativní hodnotu naměřených výsledků. Různé chování nanomateriálu lze očekávat u různě velkých organismů, proto je ohledně uhlíkových nanomateriálů problém vyvozovat nějaké závěry, protože velká spousta nasbíraných dat je testovaná na menších organismech nebo izolovaně. Mimo to bylo při testování zamezeno všem vnějším vlivům, které jsou pro nás nadále nepředvídatelné.

Vzhledem k tomu, že problematika, která je předmětem této práce, není dosud pořádně prozkoumána a uhlíkové nanočástice, GO obzvláště, jsou na vědeckém poli stále novinkou, není moc studií, ze kterých je možno při hodnocení výsledků vycházet. Vyvozování konkrétních závěrů vyžaduje další zkoumání a může být předmětem další studie.

7. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se věnuje vlivu GO částic na transkripční aktivitu jaderných receptorů – GR, TR a AR. Pro testování byly využity tři buněčné linie, které byly pro metodu GRA upraveny vnesením reportérového plazmidu. Měření pro GR bylo uskutečňováno na linii HeLa a upravené linii AZ-GR, pro TR na HepG2 a upravené linii PZ-TR a pro AR na buněčné linii 22Rv1 a upravené linii AIZ-AR.

Pro testování cytotoxických účinků GO na vybrané linie byl využit MTT, ačkoliv teoretická rešerše odhalila, že se nejedná o nejvhodnější metodu měření viability v přítomnosti uhlíkových nanomateriálů. I přes tuto skutečnost byl test vyhodnocen a přijat jako platný, protože kromě naměřené viability ani mikroskopické pozorování neprokázalo pozorovatelnou, a tedy významnou toxicitu. U žádné z buněčných linií neklesla viabilita pod 90 % proti UT.

Metoda gene reporter assay byla zvolena pro určení schopnosti GO aktivovat nebo inhibovat transkripční aktivitu vybraných receptorů. V případě buněčné linie AZ-GR nedokázal GO receptory aktivovat ani částečně, ale v kombinaci s DEX se choval jako synergista a signifikantní signál naměřený pro GO 200 – 500 nm při koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ dosáhl 160 % hodnoty, které dosáhl vzorek ošetřený samotným DEX. U linie PZ-TR docházela k nárůstu signálu při měření agonistického i antagonistického módu a hodnoty signálu stoupaly vždy společně s koncentrací testovaného GO. Pro agonistický mód dosáhl nejvyššího signálu vzorek ošetřený GO > 500 nm o koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$, který byl téměř srovnatelný se signálem vyvolaným samotným T3. V antagonistickém módu dosáhl GO > 500 nm o koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ v kombinaci s T3 signálu o hodnotě 170 % samotného T3. Oba případy byly signifikantní. Měření probíhající na linii AIZ-AR v případě agonistického módu neposkytla žádné změny signálu proti UT, ale pouze u této linie byl prokázán antagonistický efekt GO, který narůstal s narůstající koncentrací GO. Nejnižších hodnot dosáhly vzorky ošetřené GO o střední (200 – 500 nm) a největší (> 500 nm) velikosti částic o koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$, které dokázaly snížit aktivitu receptoru až o 40 % v porovnání se vzorkem ošetřeným samotným DHT.

Pomocí metody RT-PCR byla měřena exprese vybraných genů, které jsou pod vlivem testovaných receptorů. Výsledky této metody poskytly různorodá data. Buněčná linie HeLa byla testována na expresi dvou genů. Protizánětlivý gen GILZ ve většině případů nevykázal žádné výrazné změny exprese vůči kontrole vyjma výrazného nárůstu exprese

pro vzorky ošetřené GO o velikosti 200 – 500 nm při koncentraci 0,2 µg/ml (176 % indukce DEX) a 2 µg/ml (168 % indukce DEX). V případě monitorování prozánětlivého genu IL-6 byly také naměřeny pouze 2 výrazné změny exprese, a to pro GO 50 – 200 nm při koncentraci 2 µg/ml (2x indukce DEX) a 20 µg/ml (3x indukce DEX). Ostatní naměřené hodnoty, ačkoliv vykazovaly jasný trend v závislosti na koncentraci, nebyly od negativní kontroly příliš odlišné.

Na buněčné linii HepG2 byl testován pouze 1 gen, ale v agonistickém i antagonistickém módu. Ačkoliv gen PCK1 v agonistickém módu nevykazuje závislost na koncentraci, je pozorovatelná závislost na velikosti částic v rámci jedné koncentrace. S rostoucí velikostí částic naměřená exprese klesá.

Expresce genu PCK1 (linie HepG2) v antagonistickém módu a genu KLK3 (linie 22Rv1) v antagonistickém módu vykazují stejné tendence, a to pokles exprese s nárůstem koncentrace pro všechny tři velikosti GO částic. Expresce PCK1 ovšem pro nejnižší koncentrace GO výrazně narůstá proti negativní kontrole. Nejvýraznější nárůst exprese je zaznamenán pro nejmenší velikosti GO částic při koncentraci 0,2 µg/ml (170 % indukce T3) a nejnižší pro největší velikost GO částic při koncentraci 20 µg/ml (38 % indukce T3). Pro gen KLK3 jsou nejvýznamnější poklesy exprese pro nejvyšší koncentrace, kdy nejnižší exprese byla naměřena pro nejmenší velikosti GO částic při koncentraci 20 µg/ml a to 70 % indukce DHT.

Výsledky prezentované v této práci jsou vždy průměrem minimálně 3-5 pozorování, dle charakteru naměřených dat. Cíle práce byly splněny – byl určen toxický účinek GO na vybrané buněčné linie a jeho vliv na aktivitu vybraných receptorů. Výsledky, uvedené v této práci, mohou být podmětem dalšího výzkumu, ohledně genové exprese a proteosyntézy.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:

PUBLIKACE:

ARANDA, Ana a Angel PASCUAL. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *The American Physiological Society* [online]. 2001, 81(3), 1269-1304 [cit. 2017-03-19]. ISSN 1522-1210.

ASTAPOVA, I., L. J. LEE, C. MORALES, S. TAUBER, M. BILBAN a A. N. HOLLENBERG. The nuclear corepressor, NCoR, regulates thyroid hormone action in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2008, 105(49), 19544-19549 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1073/pnas.0804604105. ISSN 0027-8424.

AZAD, Arun A., Amina ZOUBEIDI, Martin E. GLEAVE a Kim N. CHI. Targeting heat shock proteins in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Nature Reviews Urology* [online]. 2014, 12(1), 26-36 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1038/nrurol.2014.320. ISSN 1759-4812.

BAL, Navdeep, Anupama KUMAR, Jun DU a Dayanthi NUGEGODA. Multigenerational effects of two glucocorticoids (prednisolone and dexamethasone) on life-history parameters of crustacean *Ceriodaphnia dubia* (Cladocera). *Environmental Pollution* [online]. 2017, [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.03.024. ISSN 02697491.

BAMBERGER, C M, A M BAMBERGER, M DE CASTRO a G P CHROUSOS. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 1995-6-1, 95(6), 2435-2441 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1172/JCI117943. ISSN 0021-9738.

BAO, Dejun, Chuandong CHENG, Xiaoqiang LAN, et al. Regulation of p53^{wt} glioma Cell proliferation by androgen receptor-mediated inhibition of small VCP/p97-interacting protein expression. *Oncotarget* [online]. 2017, 8(14), 23142-23154 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.18632/oncotarget.15509. ISSN 1949-2553.

BARNES, Peter J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2008-11-3, 118(11), 3546-3556 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1172/JCI36130. ISSN 0021-9738.

BARTONKOVA, Iveta, Aneta NOVOTNA, Zdenek DVORAK a Natasha KYPRIANOU. Novel Stably Transfected Human Reporter Cell Line AIZ-AR as a Tool for an Assessment of Human Androgen Receptor Transcriptional Activity. *PLOS ONE* [online]. 2015-3-26, 10(3), e0121316- [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1371/journal.pone.0121316. ISSN 1932-6203.

BASCHANT, Ulrike a Jan TUCKERMANN. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2010, 120(2-3), 69-75 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2010.03.058. ISSN 09600760.

- BAUMANN, C. T. Nuclear Cytoplasmic Shuttling by Thyroid Hormone Receptors. MULTIPLE PROTEIN INTERACTIONS ARE REQUIRED FOR NUCLEAR RETENTION. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2001, 276(14), 11237-11245 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1074/jbc.M011112200. ISSN 00219258.
- BAUN, A., N. B. HARTMANN, K. GRIEGER a K. O. KUSK. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicology* [online]. 2008, 17(5), 387-395 [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.1007/s10646-008-0208-y. ISSN 0963-9292.
- BEATO, Miguel, Peter HERRLICH a Günther SCHÜTZ. Steroid hormone receptors: Many Actors in search of a plot. *Cell* [online]. 1995, 83(6), 851-857 [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90201-5. ISSN 00928674.
- BEATO, Miguel. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* [online]. 1989, 56(3), 335-344 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1016/0092-8674(89)90237-7. ISSN 00928674.
- BERNAL, Juan. *Thyroid Hormones and Brain Development* [online]. 2005, s. 95 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1016/S0083-6729(05)71004-9.
- BHATT, Indu a Bhumi Nath TRIPATHI. Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. *Chemosphere* [online]. 2011, 82(3), 308-317 [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.10.011. ISSN 00456535.
- BIANCO, Antonio C., Domenico SALVATORE, Balázs GEREBEN, Marla J. BERRY a P. Reed LARSEN. Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, and Physiological Roles of the Iodothyronine Selenodeiodinases. *Endocrine Reviews* [online]. 2002, 23(1), 38-89 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1210/edrv.23.1.0455. ISSN 0163-769x.
- BOAS, M. Environmental chemicals and thyroid function. *European Journal of Endocrinology* [online]. 2006, 154(5), 599-611 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1530/eje.1.02128. ISSN 0804-4643.
- BOCHUKOVA, Elena, Nadia SCHOENMAKERS, Maura AGOSTINI, et al. A Mutation in the Thyroid Hormone Receptor Alpha Gene. *New England Journal of Medicine* [online]. 2012, 366(3), 243-249 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1056/NEJMoa1110296. ISSN 0028-4793.
- BRENT, Gregory A. Mechanisms of thyroid hormone action. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2012-9-4, 122(9), 3035-3043 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1172/JCI60047. ISSN 0021-9738.
- BRESSAN, Eriberto, Letizia FERRONI, Chiara GARDIN, et al. Graphene based scaffolds effects on stem cells commitment. *Journal of Translational Medicine* [online]. 2014, 12(1), - [cit. 2017-03-19]. DOI: 10.1186/s12967-014-0296-9. ISSN 1479-5876.
- BRINKMANN, A.O., P.W. FABER, H.C.J. VAN ROOIJ, et al. The human androgen receptor: Domain structure, genomic organization and regulation of expression. *Journal of Steroid Biochemistry* [online]. 1989, 34(1-6), 307-310 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1016/0022-4731(89)90098-8. ISSN 00224731.

- CAIN, Derek W. a John A. CIDLOWSKI. Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2015, 29(4), 545-556 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1016/j.beem.2015.04.007. ISSN 1521690x.
- CLINCKEMALIE, Liesbeth, Dirk VANDERSCHUEREN, Steven BOONEN a Frank CLAESSENS. The hinge region in androgen receptor control. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. 2012, 358(1), 1-8 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1016/j.mce.2012.02.019. ISSN 03037207.
- COCKBURN, Andrew, Roberta BRADFORD, Neil BUCK, et al. Approaches to the safety assessment of engineered nanomaterials (ENM) in food. *Food and Chemical Toxicology*. 2012, 50(6), 2224-2242. DOI: 10.1016/j.fct.2011.12.029. ISSN 02786915.
- COHEN, Ronald N., Sabrina BRZOSTEK, Brian KIM, Michael CHOREV, Fredric E. WONDISFORD a Anthony N. HOLLENBERG. The Specificity of Interactions between Nuclear Hormone Receptors and Corepressors Is Mediated by Distinct Amino Acid Sequences within the Interacting Domains. *Molecular Endocrinology* [online]. 2001, 15(7), 1049-1061 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1210/mend.15.7.0669. ISSN 0888-8809.
- COOPER, Elliot, Kristine MCGRATH a Alison HEATHER. In Vitro Androgen Bioassays as a Detection Method for Designer Androgens. *Sensors* [online]. 2013, 13(2), 2148-2163 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.3390/s130202148. ISSN 1424-8220.
- COOPER, Mark S. a Paul M. STEWART. 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 and Its Role in the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis, Metabolic Syndrome, and Inflammation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2009, 94(12), 4645-4654 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1210/jc.2009-1412. ISSN 0021-972x.
- COUTINHO, Agnes E. a Karen E. CHAPMAN. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. 2011, 335(1), 2-13 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1016/j.mce.2010.04.005. ISSN 03037207.
- CUTRESS, M. L., H. C. WHITAKER, I. G. MILLS, M. STEWART a D. E. NEAL. Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. *Journal of Cell Science* [online]. 2008, 121(7), 957-968 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1242/jcs.022103. ISSN 0021-9533.
- DAVEY, Rachel A., Mathis GROSSMANN. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *The Clinical Biochemist – Reviews* [online]. 2016, 37(1), 3 - 15 [cit. 2017-04-01]. ISSN 0159 – 8090.
- DAVIS, P. J., F. B. Davis, H. Y. Lin. L-thyroxine acts as a hormone as well as a prohormone at the cell membrane. Immunology, Endocrine and Metabolic Agents. *Medicinal Chemistry* [online]. 2006, 6(3), 235 - 240 [cit. 2017-04-02]. ISSN 235-240.
- DAVISON, Sonia a Robin BELL. Androgen Physiology. *Seminars in Reproductive Medicine* [online]. 2006, 24(2), 071-077 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1055/s-2006-939565. ISSN 1526-8004.

DEHM, S. M., L. J. SCHMIDT, H. V. HEEMERS, R. L. VESSELLA a D. J. TINDALL. Splicing of a Novel Androgen Receptor Exon Generates a Constitutively Active Androgen Receptor that Mediates Prostate Cancer Therapy Resistance. *Cancer Research* [online]. 2008, 68(13), 5469-5477 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0594. ISSN 0008-5472.

DEMLING, Robert H. a Dennis P. ORGILL. The anticatabolic and wound healing effects of the testosterone analog oxandrolone after severe burn injury. *Journal of Critical Care* [online]. 2000, 15(1), 12-17 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1053/jcrc.2000.0150012. ISSN 08839441.

DEPAN, D., J. SHAH, R.D.K. MISRA, et al. Controlled release of drug from folate-decorated and graphene mediated drug delivery system: Synthesis, loading efficiency, and drug release response. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2011, 31(7), 1305-1312 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1016/j.msec.2011.04.010. ISSN 09284931.

DUAN, Jinlin, Fan SHAO, Yonggang SHAO, et al. Androgen Inhibits Abdominal Fat Accumulation and Negatively Regulates the PCK1 Gene in Male Chickens. *PLoS ONE* [online]. 2013-3-27, 8(3), e59636- [cit. 2017-04-28]. DOI: 10.1371/journal.pone.0059636. ISSN 1932-6203.

Evropská komise. *Sdělení komise evropského parlamentu, radě a evropskému hospodářskému a sociálnímu výboru: Druhý regulační přezkum týkající se nanomateriálů*. 2. Brusel, 2012.

FARRÉ, Marinella, Krisztina GAJDA-SCHRANTZ, Lina KANTIANI a Damià BARCELÓ. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2009, 393(1), 81-95 [cit. 2017-03-15]. DOI: 10.1007/s00216-008-2458-1. ISSN 1618-2642.

FENG, W. Hormone-Dependent Coactivator Binding to a Hydrophobic Cleft on Nuclear Receptors. *Science* [online]. 1998, 280(5370), 1747-1749 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1126/science.280.5370.1747. ISSN 00368075.

FIGUEIRA, A. C. M., D. M. SAIDEMBERG, P. C. T. SOUZA, et al. Analysis of Agonist and Antagonist Effects on Thyroid Hormone Receptor Conformation by Hydrogen/Deuterium Exchange. *Molecular Endocrinology* [online]. 2011, 25(1), 15-31 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1210/me.2010-0202. ISSN 0888-8809.

FRANKLIN, Natasha M., Nicola J. ROGERS, Simon C. APTE, Graeme E. BATLEY, Gerald E. GADD a Philip S. CASEY. Comparative Toxicity of Nanoparticulate ZnO, Bulk ZnO, and ZnCl₂ to a Freshwater Microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The Importance of Particle Solubility. *Environmental Science & Technology* [online]. 2007, 41(24), 8484-8490 [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.1021/es071445r. ISSN 0013-936x.

FREEDMAN, LEONARD P. Anatomy of the Steroid Receptor Zinc Finger Region. *Endocrine Reviews* [online]. 1992, 13(2), 129-145 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1210/edrv-13-2-129. ISSN 0163-769x.

- GARATTINI, Enrico, Marco BOLIS, Maurizio GIANNI', Gabriela PARONI, Maddalena FRATELLI a Mineko TERA0. Lipid-sensors, enigmatic-orphan and orphan nuclear receptors as therapeutic targets in breast-cancer. *Oncotarget* [online]. 2016, 27(7), 42661-42682 [cit. 2017-04-15]. DOI: 10.18632/oncotarget.7410. ISSN 1949-2553.
- GEIM, A. K. a K. S. NOVOSELOV. The rise of graphene. *Nature Materials* [online]. 2007, 6(3), 183-191 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1038/nmat1849. ISSN 1476-1122.
- GRAD, Iwona a Didier PICARD. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. 2007, 275(1-2), 2-12 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1016/j.mce.2007.05.018. ISSN 03037207.
- GRINO, PLACIDO B., JAMES E. GRIFFIN a JEAN D. WILSON. Testosterone at High Concentrations Interacts with the Human Androgen Receptor Similarly to Dihydrotestosterone*. *Endocrinology* [online]. 1990, 126(2), 1165-1172 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1210/endo-126-2-1165. ISSN 0013-7227.
- GU, Ming, Yunsong LIU, Tong CHEN, Feng DU, Xianghui ZHAO, Chunyang XIONG a Yongsheng ZHOU. Is Graphene a Promising Nano-Material for Promoting Surface Modification of Implants or Scaffold Materials in Bone Tissue Engineering? *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. 2014, 20(5), 477-491 [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.1089/ten.teb.2013.0638. ISSN 1937-3368.
- GUSTAFSSON, J. BIOCHEMISTRY: Seeking Ligands for Lonely Orphan Receptors. *Science* [online]. 284(5418), 1285-1286 [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.1126/science.284.5418.1285. ISSN 00368075.
- HALL, Georgina W. Kasabach-merritt syndrome: pathogenesis and management. *British Journal of Haematology*. 2001, 112(4), 851-862. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2001.02453.x. ISSN 0007-1048.
- HANDY, Richard D., Frank VON DER KAMMER, Jamie R. LEAD, et al. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles: The Present and the Future. *Ecotoxicology* [online]. 2008b, 17(4), 287-314 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1007/s10646-008-0199-8. ISSN 0963-9292.
- HANDY, Richard D., Richard OWEN a Eugenia VALSAMI-JONES. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology* [online]. 2008, 17(5), 315-325 [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.1007/s10646-008-0206-0. ISSN 0963-9292.
- HANDY, Richard D., Theodore B. HENRY, Tessa M. SCOWN, Blair D. JOHNSTON a Charles R. TYLER. Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish--a mechanistic analysis.: their uptake and effects on fish—a mechanistic analysis. *Ecotoxicology*. 2008, 17(5). DOI: 10.1007/s10646-008-0205-1. ISSN 0963-9292.
- HAPGOOD, Janet P., Chanel AVENANT a Johnson M. MOLIKI. Glucocorticoid-independent modulation of GR activity: Implications for immunotherapy. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2016, 165, 93-113 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.06.002. ISSN 01637258.

HARVEY, Clare B. a Graham R. WILLIAMS. Mechanism of Thyroid Hormone Action. *Thyroid* [online]. 2002, 12(6), 441-446 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1089/105072502760143791. ISSN 1050-7256.

HEINLEIN, Cynthia A. a Chawnshang CHANG. Androgen Receptor (AR) Coregulators: An Overview. *Endocrine Reviews* [online]. 2002, 23(2), 175-200 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1210/edrv.23.2.0460. ISSN 0163-769x.

HELSEN, Christine a Frank CLAESSENS. Looking at nuclear receptors from a new angle. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. 2014, 382(1), 97-106 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1016/j.mce.2013.09.009. ISSN 03037207.

HERNANDEZ, Yenny, Valeria NICOLOSI, Mustafa LOTYA, et al. High-yield production of graphene by liquid-phase exfoliation of graphite. *Nature Nanotechnology* [online]. 2008-8-10, 3(9), 563-568 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1038/nnano.2008.215. ISSN 1748-3387.

HIGA, Gerald M. a Ryan G. FELL. Sex Hormone Receptor Repertoire in Breast Cancer. *International Journal of Breast Cancer* [online]. 2013, 2013, 1-14 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1155/2013/284036. ISSN 2090-3170.

HU, Haiqing, Jinhai YU, Yongyong LI, et al. Engineering of a novel pluronic F127/graphene nanohybrid for pH responsive drug delivery: A review. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2012, 100A(1), 141-148 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1002/jbm.a.33252. ISSN 15493296.

HU, Wenbing, Cheng PENG, Weijie LUO, Min LV, Xiaoming LI, Di LI, Qing HUANG a Chunhai FAN. Graphene-Based Antibacterial Paper. *ACS Nano* [online]. 2010, 4(7), 4317-4323 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1021/nn101097v. ISSN 1936-0851.

HUMMERS, William S. a Richard E. OFFEMAN. Preparation of Graphitic Oxide. *Journal of the American Chemical Society*. 1958, 80(6), 1339-1339. DOI: 10.1021/ja01539a017. ISSN 0002-7863.

CHAN, Siu Chiu a Scott M. DEHM. *Constitutive Activity of the Androgen Receptor* [online]. s. 327 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1016/B978-0-12-417197-8.00011-0.

CHANG, Yanli, Sheng-Tao YANG, Jia-Hui LIU, et al. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells: Proliferation, Focal Adhesion, and Gene Transfection Studies. *Toxicology Letters* [online]. 2011, 200(3), 201-210 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1016/j.toxlet.2010.11.016. ISSN 03784274.

CHEN, G.-Y., D.W.-P. PANG, S.-M. HWANG, H.-Y. TUAN a Y.-C. HU. A graphene-based platform for induced pluripotent stem cells culture and differentiation. *Biomaterials* [online]. 2012, 33(2), 418-427 [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.071. ISSN 01429612.

CHEN, Jung-Tsai, Ywu-Jang FU, Quan-Fu AN, et al. Tuning nanostructure of graphene oxide/polyelectrolyte LbL assemblies by controlling pH of GO suspension to fabricate transparent and super gas barrier films: A review. *Nanoscale* [online]. 2013, 5(19), 9081- [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1039/c3nr02845c. ISSN 2040-3364.

CHENG, Sheue-Yann, Jack L. LEONARD a Paul J. DAVIS. Molecular Aspects of Thyroid Hormone Actions. *Endocrine Reviews* [online]. 2010, 31(2), 139-170 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1210/er.2009-0007. ISSN 0163-769x.

CHRISTIAN, P., F. VON DER KAMMER, M. BAALOUSHA a Th. HOFMANN. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology* [online]. 2008, 17(5), 326-343 [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.1007/s10646-008-0213-1. ISSN 0963-9292.

ILLÉS, Peter, Július BRTKO a Zdeněk DVOŘÁK. Development and Characterization of a Human Reporter Cell Line for the Assessment of Thyroid Receptor Transcriptional Activity: A Case of Organotin Endocrine Disruptors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2015, 63(31), 7074-7083 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b01519. ISSN 0021-8561.

JENKINS, Bethany D, Christian B PULLEN a Beatrice D DARIMONT. Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms. *Trends in Endocrinology & Metabolism* [online]. 2001, 12(3), 122-126 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1016/S1043-2760(00)00357-X. ISSN 10432760.

JENSTER, G., H. A. G. M. Van Der KORPUT, J. TRAPMAN . Identification of Two Transcription Activation Units in the N-terminal Domain of the Human Androgen Receptor. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 270(13), 7341-7346 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1074/jbc.270.13.7341. ISSN 00219258.

KAHRU, A., H.-C. DUBOURGUIER, I. BLINOVA, A. IVASK a K. KASEMETS. Biotests and Biosensors for Ecotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles: A Minireview. *Sensors* [online]. 2008, 8(8) [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.3390/s8085153.

KALYANARAMAN, H., R. SCHWAPPACHER, J. JOSHUA, et al. Nongenomic Thyroid Hormone Signaling Occurs Through a Plasma Membrane-Localized Receptor. *Science Signaling* [online]. 2014, 7(326), ra48-ra48 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1126/scisignal.2004911. ISSN 1945-0877.

KARAMANI, Anna A., Alexios P. DOUVALIS a Constantine D. STALIKAS. Zero-valent iron/iron oxide-oxyhydroxide/graphene as a magnetic sorbent for the enrichment of polychlorinated biphenyls, polyaromatic hydrocarbons and phthalates prior to gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2013, 1271(1), 1-9 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.11.018. ISSN 00219673.

KICMAN, A T. Pharmacology of anabolic steroids. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2008, 154(3), 502-521 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1038/bjp.2008.165. ISSN 00071188.

KIEW, Siaw Fui, Lik Voon KIEW, Hong Boon LEE, Toyoko IMAE a Lip Yong CHUNG. Assessing biocompatibility of graphene oxide-based nanocarriers: A review. *Journal of Controlled Release* [online]. 2016, 226, 217-228 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.02.015. ISSN 01683659.

KIM, Tae-Hyung, Shreyas SHAH, Letao YANG, Perry T. YIN, Md. Khaled HOSSAIN, Brian CONLEY, Jeong-Woo CHOI a Ki-Bum LEE. Controlling Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells Using Combinatorial Graphene Hybrid-Pattern Arrays. *ACS Nano* [online]. 2015, 9(4), 3780-3790 [cit. 2017-03-19]. DOI: 10.1021/nm5066028. ISSN 1936-0851.

KINO, Tomoshige, Yan A. SU a George P. CHROUSOS. Human glucocorticoid receptor isoform β : recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2009, 66(21), 3435-3448 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1007/s00018-009-0098-z. ISSN 1420-682x.

KLAINÉ, Stephen J., Pedro J.J. ALVAREZ, Graeme E. BATLEY, et al. NANOMATERIALS IN THE ENVIRONMENT: BEHAVIOR, FATE, BIOAVAILABILITY, AND EFFECTS. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 2008, 27(9), 1825- [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.1897/08-090.1. ISSN 0730-7268.

KOIBUCHI, Noriyuki a Toshiharu IWASAKI. Regulation of Brain Development by Thyroid Hormone and its Modulation by Environmental Chemicals. *Endocrine Journal* [online]. 2006, 53(3), 295-303 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1507/endocrj.KR-69. ISSN 0918-8959.

KORYAKINA, Y., H. Q. TA a D. GIOELI. Androgen receptor phosphorylation: biological context and functional consequences. *Endocrine Related Cancer* [online]. 2014, 21(4), T131-T145 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1530/ERC-13-0472. ISSN 1351-0088.

KUMAR, Raj a E. Brad THOMPSON. Gene regulation by the glucocorticoid receptor: Structure. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2005, 94(5), 383-394 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2004.12.046. ISSN 09600760.

KUMAR, Raj a Iain J. MCEWAN. Allosteric Modulators of Steroid Hormone Receptors: Structural Dynamics and Gene Regulation. *Endocrine Reviews* [online]. 2012, 33(2), 271-299 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1210/er.2011-1033. ISSN 0163-769x.

LAMMEL, Tobias, Paul BOISSEAUX a José M. NAVAS. 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* [online]. 2015, 30(10), 1192-1204 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1002/tox.21991. ISSN 15204081.

LAVERY, Derek N. a Iain J. MCEWAN. Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochemical Journal* [online]. 2005, 391(3), 449-464 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1042/BJ20050872. ISSN 0264-6021.

LEE, Mi-Jeong, Pornpoj PRAMYOTHIN, Kalypso KARASTERGIOU a Susan K. FRIED. Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. 2014, 1842(3), 473-481 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.05.029. ISSN 09254439.

LERF, Anton, Heyong HE, Michael FORSTER a Jacek KLINOWSKI. Structure of Graphite Oxide Revisited. *The Journal of Physical Chemistry B*. 1998, 102(23). DOI: 10.1021/jp9731821. ISSN 1520-6106.

LEWIS-TUFFIN, L. J. a John A. Cidlowski. The Physiology of Human Glucocorticoid Receptor beta (hGRbeta) and Glucocorticoid Resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2006, 1069(1), 1-9 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1196/annals.1351.001. ISSN 0077-8923.

LIAO, Ken-Hsuan, Yu-Shen LIN, Christopher W. MACOSKO a Christy L. HAYNES. Cytotoxicity of Graphene Oxide and Graphene in Human Erythrocytes and Skin Fibroblasts. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2011, 3(7), 2607-2615 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1021/am200428v. ISSN 1944-8244.

LONARD, David M. a Bert W. O'MALLEY. Expanding functional diversity of the coactivators. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2005, 30(3), 126-132 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1016/j.tibs.2005.01.001. ISSN 09680004.

LU, N. Z., S. E. WARDELL, K. L. BURNSTEIN, et al. International Union of Pharmacology. LXV. The Pharmacology and Classification of the Nuclear Receptor Superfamily: Glucocorticoid, Mineralocorticoid, Progesterone, and Androgen Receptors. *Pharmacological Reviews* [online]. 2006, 58(4), 782-797 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1124/pr.58.4.9. ISSN 0031-6997.

LU, Nick Z. a John A. CIDLOWSKI. Translational Regulatory Mechanisms Generate N-Terminal Glucocorticoid Receptor Isoforms with Unique Transcriptional Target Genes. *Molecular Cell* [online]. 2005, 18(3), 331-342 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1016/j.molcel.2005.03.025. ISSN 10972765.

MACCORMACK, Tyson J., Greg G. GOSS a Richard D. HANDY. Emerging Threats to Fishes: Engineered Organic Nanomaterials. TIERNEY, Keith B., Anthony P. FARRELL a Colin J. BRAUNER. *Organic chemical toxicology of fishes*. United States of America: 4 Elsevier, 2014, 439 - 469. Fish physiology, v. 33. ISBN 978-0-12-398254-4.

MANGELSDORF, David J., Carl THUMMEL, Miguel BEATO, et al. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* [online]. 1995, 83(6), 835-839 [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90199-X. ISSN 00928674.

MATIAS, P. M. Structural Evidence for Ligand Specificity in the Binding Domain of the Human Androgen Receptor. IMPLICATIONS FOR PATHOGENIC GENE MUTATIONS. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2000, 275(34), 26164-26171 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1074/jbc.M004571200. ISSN 00219258.

MAYORAL, Alvaro, Hector BARRON, Ruben ESTRADA-SALAS, Alma VAZQUEZ-DURAN a Miguel JOSÉ-YACAMÁN. Nanoparticle stability from the nano to the meso interval. *Nanoscale* [online]. 2010, 2(3), 335-342 [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.1039/B9NR00287A. ISSN 2040-3364.

- MCMMASTER, Andrew a David William RAY. Modelling the glucocorticoid receptor and producing therapeutic agents with anti-inflammatory effects but reduced side-effects. *Experimental Physiology* [online]. 2007, 92(2), 299-309 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1113/expphysiol.2006.036194.
- MCWILLIAMS, Andrew, 2011. Graphene: Technologies, Applications and Markets. Wellesley, MA: BBC Research. AVM075A.
- MILLER, Walter L. a Richard J. AUCHUS. The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocrine Reviews* [online]. 2011, 32(1), 81-151 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1210/er.2010-0013. ISSN 0163-769x.
- MINER, Jeffrey N, Mei Hua HONG a Andrés NEGRO-VILAR. New and improved glucocorticoid receptor ligands. *Expert Opinion on Investigational Drugs* [online]. 2005, 14(12), 1527-1545 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1517/13543784.14.12.1527. ISSN 1354-3784.
- MONAGHAN, AmyE a IainJ MCEWAN. A sting in the tail: the N-terminal domain of the androgen receptor as a drug target. *Asian Journal of Andrology* [online]. 2016, 18(5), 687- [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.4103/1008-682X.181081. ISSN 1008-682x.
- MONTEIRO-RIVIERE, Nancy A., Alfred O. INMAN, Alison ELDER, et al. Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin: The Present and the Future. *Carbon* [online]. 2006, 44(6), 1070-1078 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1016/j.carbon.2005.11.004. ISSN 00086223.
- NARAYANAN, Ramesh a James DALTON. Androgen Receptor: A Complex Therapeutic Target for Breast Cancer. *Cancers* [online]. 2016, 8(12), 108- [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.3390/cancers8120108. ISSN 2072-6694.
- NAVARRO, Enrique, Anders BAUN, Renata BEHRA, et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* [online]. 2008, 17(5), 372-386 [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.1007/s10646-008-0214-0. ISSN 0963-9292.
- NICOLAIDES, Nicolas C., Zoi GALATA, Tomoshige KINO, George P. CHROUSOS a Evangelia CHARMANDARI. The human glucocorticoid receptor: Molecular basis of biologic function. *Steroids* [online]. 2010, 75(1), 1-12 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1016/j.steroids.2009.09.002. ISSN 0039128x
- NOVOSELOV, K. S., A. K. GEIM, S. V. MOROZOV, D. JIANG, M. I. KATSNELSON, I. V. GRIGORIEVA, S. V. DUBONOS a A. A. FIRSOV. Two-dimensional gas of massless Dirac fermions in graphene. *Nature* [online]. 2005, 438(7065), 197-200 [cit. 2017-03-19]. DOI: 10.1038/nature04233. ISSN 0028-0836.
- NOVOTNA, Aneta, Petr PAVEK a Zdenek DVORAK. Construction and characterization of a reporter gene cell line for assessment of human glucocorticoid receptor activation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2012, 47(5), 842-847 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1016/j.ejps.2012.10.003. ISSN 09280987.

OAKLEY, R. H., Sar Madhabananda a J. A. Cidlowski. The Human Glucocorticoid Receptor beta Isoform: EXPRESSION, BIOCHEMICAL PROPERTIES, AND PUTATIVE FUNCTION. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1996, 271(16), 9550-9559 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1074/jbc.271.16.9550. ISSN 00219258.

OAKLEY, Robert H. a John A. CIDLOWSKI. The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2013, 132(5), 1033-1044 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.09.007. ISSN 00916749.

ORTIGA-CARVALHO, Tânia M., Aniket R. SIDHAYE a Fredric E. WONDISFORD. Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. *Nature Reviews Endocrinology* [online]. 2014-8-19, 10(10), 582-591 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1038/nrendo.2014.143. ISSN 1759-5029.

ORTIGA-CARVALHO, Tania M., Nobuyuki SHIBUSAWA, Amisra NIKRODHANOND, et al. Negative regulation by thyroid hormone receptor requires an intact coactivator-binding surface. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2005-9-1, 115(9), 2517-2523 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1172/JCI24109. ISSN 0021-9738.

OVERINGTON, John P., Bissan AL-LAZIKANI a Andrew L. HOPKINS. How many drug targets are there? *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. 2006, 5(12), 993-996 [cit. 2017-03-19]. DOI: 10.1038/nrd2199. ISSN 1474-1776.

PADGETT, David A. a Ronald GLASER. How stress influences the immune response. *Trends in Immunology* [online]. 2003, 24(8), 444-448 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1016/S1471-4906(03)00173-X. ISSN 14714906.

PALACIOS, Santiago. Androgens and female sexual function. *Maturitas* [online]. 2007, 57(1), 61-65 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1016/j.maturitas.2007.02.014. ISSN 03785122.

PIETRI, Elisabetta, Vincenza CONTEDEUCA, Daniele ANDREIS, et al. Androgen receptor signaling pathways as a target for breast cancer treatment. *Endocrine-Related Cancer* [online]. 2016, 23(10), R485-R498 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1530/ERC-16-0190. ISSN 1351-0088.

PIKTEL, Ewelina, Katarzyna NIEMIROWICZ, Marzena WĄTEK, Tomasz WOLLNY, Piotr DEPTUŁA a Robert BUCKI. Recent insights in nanotechnology-based drugs and formulations designed for effective anti-cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*. 2016, 14(1), -. DOI: 10.1186/s12951-016-0193-x. ISSN 1477-3155.

PUMERA, Martin. Nanotoxicology: The Molecular Science Point of View. *Chemistry - An Asian Journal* [online]. 2011, 6(2), 340-348 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1002/asia.201000398. ISSN 18614728.

RADOMSKA, Anna, Jaroslaw LESZCZYSZYN a Marek RADOMSKI. The Nanopharmacology and Nanotoxicology of Nanomaterials: New Opportunities and Challenges. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2016, 25(1), 151-162. DOI: 10.17219/acem/60879. ISSN 1899-5276.

REFETTOFF, Samuel a Alexandra M. DUMITRESCU. Syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone: genetic defects in hormone receptors, cell transporters and deiodination. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2007, 21(2), 277-305 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1016/j.beem.2007.03.005. ISSN 1521690x.

RHEN, Turk a John A. CIDLOWSKI. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. *New England Journal of Medicine* [online]. 2005, 353(16), 1711-1723 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1056/NEJMra050541. ISSN 0028-4793.

RIVERA GIL, Pilar, Günter OBERDÖRSTER, Alison ELDER, et al. Correlating Physico-Chemical with Toxicological Properties of Nanoparticles: The Present and the Future. *ACS Nano* [online]. 2010, 4(10), 5527-5531 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1021/nn1025687. ISSN 1936-0851.

ROBINSON-RECHAVI, M. The nuclear receptor superfamily. *Journal of Cell Science* [online]. 116(4), 585-586 [cit. 2017-03-19]. DOI: 10.1242/jcs.00247. ISSN 00219533.

RONCHETTI, Simona, Graziella MIGLIORATI a Carlo RICCARDI. *GILZ as a Mediator of the Anti-Inflammatory Effects of Glucocorticoids* [online]. 2015, 170(6) [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.3389/fendo.2015.00170. ROSENFELD, M. G. a C. K. GLASS. Coregulator Codes of Transcriptional Regulation by Nuclear Receptors. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2001, 276(40), 36865-36868 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1074/jbc.R100041200. ISSN 0021-9258.

RYOO, Soo-Ryoon, Young-Kwan KIM, Mi-Hee KIM, et al. Behaviors of NIH-3T3 Fibroblasts on Graphene/Carbon Nanotubes: Proliferation, Focal Adhesion, and Gene Transfection Studies. *ACS Nano* [online]. 2010, 4(11), 6587-6598 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1021/nn1018279. ISSN 1936-0851.

RYU, Seungmi a Byung-Soo KIM. Culture of neural cells and stem cells on graphene. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* [online]. 2013, 10(2), 39-46 [cit. 2017-03-19]. DOI: 10.1007/s13770-013-0384-6. ISSN 1738-2696.

SABOURIN, Justin L., Daniel M. DABBS, Richard A. YETTER, Frederick L. DRYER a Ilhan A. AKSAY. Functionalized Graphene Sheet Colloids for Enhanced Fuel/Propellant Combustion. *ACS Nano*. 2009, 3(12), 3945-3954. DOI: 10.1021/nn901006w. ISSN 1936-0851.

SAVOLAINEN, Kai, Ulrika BACKMAN, Derk BROUWER, et al. FINNISH INSTITUTE OF OCCUPATIONAL HEALTH. *Nanosafety in Europe 2015-2025: Towards Safe and Sustainable Nanomaterials and Nanotechnology Innovations*. Helsinki: EDITA, 2013. ISBN 978-952-261-311-0.

SHIH, Chih-Jen, Shangchao LIN, Richa SHARMA, Michael S. STRANO a Daniel BLANKSCHTEIN. Understanding the pH-Dependent Behavior of Graphene Oxide Aqueous Solutions: A Comparative Experimental and Molecular Dynamics Simulation Study. *Langmuir* [online]. 2012, 28(1), 235-241 [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.1021/la203607w. ISSN 0743-7463.

SCHWEIZER, Michael T. a Evan Y. YU. Persistent androgen receptor addiction in castration-resistant prostate cancer. *Journal of Hematology & Oncology* [online]. 2015, 8(1), - [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1186/s13045-015-0225-2. ISSN 1756-8722.

SIKKA, Suresh C. a Run WANG. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. *Asian Journal of Andrology* [online]. 2008, 10(1), 134-145 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1111/j.1745-7262.2008.00370.x. ISSN 1008-682x.

SINNESAEEL, Mieke, Frank CLAESSENS, Michaël LAURENT, Vanessa DUBOIS, Steven BOONEN, Ludo DEBOEL a Dirk VANDERSCHUEREN. Androgen receptor (AR) in osteocytes is important for the maintenance of male skeletal integrity: Evidence from targeted AR disruption in mouse osteocytes. *Journal of Bone and Mineral Research* [online]. 2012, 27(12), 2535-2543 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1002/jbmr.1713. ISSN 08840431.

SITHARAMAN, Balaji, Shruti KANAKIA, Jimmy TOUSSAINT, et al. Physicochemical characterization of a novel graphene-based magnetic resonance imaging contrast agent. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2013, 2821- [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.2147/IJN.S47062. ISSN 1178-2013.

SLAGSVOLD, Thomas, Irene KRAUS, Trine BENTZEN, Jorma PALVIMO a Fahri SAATCIOGLU. Mutational Analysis of the Androgen Receptor AF-2 (Activation Function 2) Core Domain Reveals Functional and Mechanistic Differences of Conserved Residues Compared with Other Nuclear Receptors. *Molecular Endocrinology* [online]. 2000, 14(10), 1603-1617 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1210/mend.14.10.0544. ISSN 0888-8809.

SMOAK, Kathleen A. a John A. CIDLOWSKI. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mechanisms of Ageing and Development* [online]. 2004, 125(10-11), 697-706 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1016/j.mad.2004.06.010. ISSN 00476374.

SREEJITH, Sivaramapanicker, Xing MA a Yanli ZHAO. Graphene Oxide Wrapping on Squaraine-Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles for Bioimaging. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2012, 134(42), 17346-17349 [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.1021/ja305352d. ISSN 0002-7863.

ST. GERMAIN, Donald L., Valerie Anne GALTON a Arturo HERNANDEZ. Defining the Roles of the Iodothyronine Deiodinases: Current Concepts and Challenges. *Endocrinology* [online]. 2009, 150(3), 1097-1107 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1210/en.2008-1588. ISSN 0013-7227.

SUN, Shihua, Cynthia C.T. SPRENGER, Robert L. VESSELLA, et al. Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2010-8-2, 120(8), 2715-2730 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1172/JCI41824. ISSN 0021-9738.

SUN, Xiaoming, Zhuang LIU, Kevin WELSHER, Joshua Tucker ROBINSON, Andrew GOODWIN, Sasa ZARIC a Hongjie DAI. Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. *Nano Research* [online]. 2008, 1(3), 203-212 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1007/s12274-008-8021-8. ISSN 1998-0124.

KUILA, T., S. Bose, A.K.Mishra, P. Khanra, N.H. Kim, J.H. Lee, *Chemical functionalization of graphene and its applications*, Prog. Mater. Sci. 57 (2012) 1061–1105.

TORCHIA, Joseph, Christopher GLASS a Michael G ROSENFELD. Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 1998, 10(3), 373-383 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1016/S0955-0674(98)80014-8. ISSN 09550674.

TREBBLE, P. J., J. M. WOOLVEN, K. A. SAUNDERS, K. D. SIMPSON, S. N. FARROW, L. C. MATTHEWS a D. W. RAY. A ligand-specific kinetic switch regulates glucocorticoid receptor trafficking and function. *Journal of Cell Science* [online]. 2013, 126(14), 3159-3169 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1242/jcs.124784. ISSN 0021-9533.

VALADARES, Napoleão F., Igor POLIKARPOV a Richard C. GARRATT. Ligand induced interaction of thyroid hormone receptor beta with its coregulators. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2008, 112(4-5), 205-212 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2008.10.006. ISSN 09600760.

VERRIJDT, G., T. TANNER, U. MOEHREN, L. CALLEWAERT, A. HAELENS a F. CLAESSENS. The androgen receptor DNA-binding domain determines androgen selectivity of transcriptional response. *Biochemical Society Transactions* [online]. 2006, 34(6), 1089-1094 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1042/BST0341089. ISSN 0300-5127.

WANG, EN a R. KARNIK. Water desalination: Graphene cleans up water. *Nature Nanotechnology* [online]. 2012, 7(9), 552-554 [cit. 2017-03-15]. DOI: 10.1038/nnano.2012.153.

WANG, Kan, Jing RUAN, Hua SONG, et al. Biocompatibility of Graphene Oxide. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2008-8-10, 3(9), - [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1007/s11671-010-9751-6. ISSN 1931-7573.

WANG, Qianben, Wei LI, Yong ZHANG, et al. Androgen Receptor Regulates a Distinct Transcription Program in Androgen-Independent Prostate Cancer. *Cell* [online]. 2009, 138(2), 245-256 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1016/j.cell.2009.04.056. ISSN 00928674.

WEBSTER, Jeanette I., Leonardo TONELLI a Esther M. STERNBERG. N EUROENDOCRINE R EGULATION OF I MMUNITY. *Annual Review of Immunology* [online]. 2002, 20(1), 125-163 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.082401.104914. ISSN 0732-0582.

WILSON, Elizabeth M. *Analysis of Interdomain Interactions of the Androgen Receptor* [online]. 2011, s. 113 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1007/978-1-61779-243-4_8.

- WÖRLE-KNIRSCH, J. M., K. PULSKAMP, H. F. KRUG, et al. Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays: The Present and the Future. *Nano Letters* [online]. 2006, 6(6), 1261-1268 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1021/nl060177c. ISSN 1530-6984.
- WU, I., S. C. SHIN, Y. CAO, et al. Selective glucocorticoid receptor translational isoforms reveal glucocorticoid-induced apoptotic transcriptomes. *Cell Death and Disease* [online]. 2013, 4(1), e453- [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1038/cddis.2012.193. ISSN 2041-4889.
- WU, Si-Ying, Seong Soo AN John HULME, et al. Current applications of graphene oxide in nanomedicine: Synthesis, loading efficiency, and drug release response. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2015, 31(7), 9- [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.2147/IJN.S88285. ISSN 1178-2013.
- WU, Yifei a Ronald J KOENIG. Gene Regulation by Thyroid Hormone. *Trends in Endocrinology & Metabolism* [online]. 2000, 11(6), 207-211 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1016/S1043-2760(00)00263-0. ISSN 10432760.
- WURTZ, Jean-Marie, William BOURGUET, Jean-Paul RENAUD, Valérie VIVAT, Pierre CHAMBON, Dino MORAS a Hinrich GRONEMEYER. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature Structural Biology* [online]. 1996, 3(1), 87-94 [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.1038/nsb0196-87. ISSN 1072-8368.
- XIANG, Quanjun, Jiaguo YU a Mietek JARONIEC. Graphene-based semiconductor photocatalysts. *Chem. Soc. Rev* [online]. 2012, 41(2), 782-796 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1039/C1CS15172J. ISSN 0306-0012.
- XU, Jing, Li WANG a Yongfa ZHU. Decontamination of Bisphenol A from Aqueous Solution by Graphene Adsorption. *Langmuir* [online]. 2012, 28(22), 8418-8425 [cit. 2017-03-15]. DOI: 10.1021/la301476p. ISSN 0743-7463.
- YANG, Kai, Shuai ZHANG, Guoxin ZHANG, et al. Graphene in Mice: Ultrahigh In Vivo Tumor Uptake and Efficient Photothermal Therapy. *Nano Letters* [online]. 2010, 10(9), 3318-3323 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1021/nl100996u. ISSN 1530-6984.
- YANG, Xiaoying, Xiaoyan ZHANG, Zunfeng LIU, et al. High-Efficiency Loading and Controlled Release of Doxorubicin Hydrochloride on Graphene Oxide: A review. *The Journal of Physical Chemistry C* [online]. 2008, 112(45), 17554-17558 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1021/jp806751k. ISSN 1932-7447.
- YEN, Paul M. Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. *American Physiological Society* [online]. 2001, 81(3), 1097-1142 [cit. 2017-04-02]. ISSN 1522-1210.
- YEN, Paul M., Shinichiro ANDO, Xu FENG, Ying LIU, Padma MARUVADA a Xianmin XIA. Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. 2006, 246(1-2), 121-127 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1016/j.mce.2005.11.030. ISSN 03037207.

ZHANG, Jinsong a Mitchell A. LAZAR. The Mechanism of Action of Thyroid Hormones. *Annual Review of Physiology* [online]. 2000, 62(1), 439-466 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1146/annurev.physiol.62.1.439. ISSN 0066-4278.

ZHANG, Mo, Linling BAI, Weihu SHANG, et al. Facile synthesis of water-soluble, highly fluorescent graphene quantum dots as a robust biological label for stem cells. *Journal of Materials Chemistry* [online]. 2012, 22(15), 7461- [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.1039/c2jm16835a. ISSN 0959-9428.

ZHANG, Renyun, Magnus HUMMELGÅRD, Gang LV, et al. Real time monitoring of the drug release of rhodamine B on graphene oxide: A review. *Carbon* [online]. 2011, 49(4), 1126-1132 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1016/j.carbon.2010.11.026. ISSN 00086223.

ZHOU, J a J CIDLOWSKI. The human glucocorticoid receptor: One gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* [online]. 2005, 70(5-7), 407-417 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1016/j.steroids.2005.02.006. ISSN 0039128x.

ZOELLER, R. Thomas. Environmental chemicals as thyroid hormone analogues: New studies indicate that thyroid hormone receptors are targets of industrial chemicals? *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. 2005, 242(1-2), 10-15 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1016/j.mce.2005.07.006. ISSN 03037207.

KNIŽNÍ ZDROJE:

SIPES, I. Glenn, Charlene A. MCQUEEN a A. Jay GANDOLFI. *Comprehensive toxicology*. 1st ed. New York: Pergamon, 1997-2002, 14 v. ISBN 044450868614.

YESALIS, Charles. *Anabolic steroids in sport and exercise*. 2nd ed. Champaign, IL: Human Kinetics, 2000. ISBN 9780880117869.

INTERNETOVÉ ZDROJE:

Anonym¹. Nanotechnologie a nanomateriály. In: *Krajská hygienická stanice Moravskoslezského kraje* [online]. Ostrava, 2009 [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: http://www.khsova.cz/01_aktuality/nanotechnologie.php?datum=2009-03-18

Anonym². Graphene Oxide: Introduction and Market News. In: *Graphene-info* [online]. Israel: Metalgrass software, 2017 [cit. 2017-03-12]. Dostupné z: <http://www.graphene-info.com/graphene-oxide>

Anonym³. Dexamethasone. In: *Drugs.com* [online]. c2000-2017 [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/dexamethasone.html>

BALLINI, Chiara. Deiodinase: Thyroid Hormones. In: *Flipper* [online]. 2012 [cit. 2017-04-02]. Dostupné z: <http://flipper.diff.org/app/pathways/Deiodinase>

LA FUENTE, Jesus de. Graphene Oxide - What Is It? In: *Graphenea* [online]. Spain: Graphenea S.A., 2009 [cit. 2017-03-12]. Dostupné z: <https://www.graphenea.com/pages/graphene-oxide#.WMVEgjvhDIV>

SEZNAM ZKRATEK

Zkratka	Význam
11b-HSD	11b-hydroxysteroid dehydrogenáza
ACTH	Adrenokortikotropní hormon
AD	Aktivní transkripční doména
AF-1, AF-2	Aktivní funkční oblast
AIZ-AR	Buněčná linie odvozená od lidského prostatického karcinomu
AR	Androgenní receptor
ARE	Androgenní responzivní element
AZ-GR	Buněčná linie odvozená od lidského karcinomu děložního čípku
BkF	Benzo(k)fluoranten
CBG	Kortikosteroid vazebný globulin
cDNA	Komplementární DNA (complementary DNA)
CoA1	Jaderný receptorový koaktivátor
CoR	Jaderný receptorový korepresor
CRH	Kortikotropin uvolňující hormon (corticotropin releasing hormon)
CS FBS	Charcoal stripped fetal bovine serum
CXYG	Karboxyl grafen
DBD	DNA vazebná doména (DNA binding domain)
DEX	Dexamethason
DHEA	Dihydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DIOs	Deiodinázové enzymy
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (kultivační médium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FBS	Fetal bovine serum
GAPDH	Glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza
GC	Glukokortikoidy (glucocorticoids)
GILZ	Glukokortikoidem indukovaný leucinový zip (Glucocorticoid-induced leucine zipper)
GO	Grafen Oxid

GR	Glukokortikoidní receptor
GRA	Gene reporter assay
GRE	Glukokortikoidní responzivní element
HAT	Histon acetyltransferáza
HDAC	Histon deacetyláza
HgB	Hygromycin B
HPA	Hypothalamus-hypofýza-nadledvinková osa (hypothalamic-pituitary-adrenal)
HSP	Heat shock protein (Protein teplotního šoku)
IL6	Interleukin 6
KLK3	Kallikren související peptidázy 3 (Kallikrein related peptidase 3)
LBD	Ligand vazebná doména (Ligand binding domain)
LRH-1	Jaterní receptorový homolog 1
MEM NEAA	MEM neesenciální aminokyseliny
mRNA	Messenger RNA
MSNPs	Mezoporézní nanočástice oxidu křemičitého
MTT	Methyltetrazoliová sůl
NLS	Jaderný lokalizační signál (nuclear localisation signal)
NR	Nukleární receptory
NR3C1	Gen pro GR (podrodina č. 3 NR, skupina C, člen 1)
NR3C4	Gen pro AR (podrodina č. 3 NR, skupina C, člen 4)
NTD	N-terminální doména
PACs	Polyaromatické uhlovodíky
PBS	Fosfátový pufr (Phosphate buffered saline)
PCB169	3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl
PCBs	Polycyklické bifenyly
PCK1	Fosfoenolpyruvát karboxykináza (Phosphoenolpyruvate carboxykinase)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
PSA	Prostatický specifický antigen
PZ-TR	Buněčná linie odvozená od lidského hepatocelulárního karcinomu
RNA	Ribonukleová kyselina
RU486	Mifepriston

RXR	Retinoidní X erceptor
SF-1	Steroidogenní faktor 1
SHBG	Pohlavní hormon vázající globulin (sex hormone-binding globulin)
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
THRA, THRB	Geny kódující thyroïdní receptor
TR	Thyroidní receptor
TR2	Testikulární receptor 2
TRE	Thyroidní responzivní element
TRH	Thyreotropin uvolňující hormon
TSH	Štítnou žlázu stimulující hormon
β -NF	β -naftoflavon