

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2018

Martina Leštinská

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vliv grafen oxidu na transkripční
aktivitu aryluhlovodíkového
receptoru (AhR)**

Bakalářská práce

Martina Leštinská

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

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

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Radima Vrzala, Ph.D. za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Martina Leštinská

Souhrn

Aryluhlovodíkový receptor (AhR) je ligand-dependentní transkripční faktor, který se aktivuje pomocí různých syntetických a přírodních látek, jako je například 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Tato bakalářská práce se zaměřila na stanovení cytotoxicity grafen oxidu pomocí metody MTT assay a následně na jeho schopnost aktivovat nebo inhibovat transkripční aktivitu aryluhlovodíkového receptoru pomocí metody Reporter Gene assay. Účinek grafen oxidu byl měřen v pěti různých koncentracích.

Pro testování byla použita stabilně transfekovaná reporterová buněčná linie AZ-AhR, která byla následně ošetřena přídatkem testovaných látek o koncentracích - 0,002; 0,02; 0,2; 2 a 20 $\mu\text{g/ml}$. Po inkubaci buněk s grafen oxidem byla měřena transkripční aktivita. Žádná z vybraných látek AhR neaktivovala, k aktivaci došlo pouze u pozitivní kontroly (TCDD). V antagonistickém módu byla zaznamenána signifikantní koaktivace u dvou nejvyšších koncentracích grafen oxidu. Výsledky naznačují, že grafen oxid ovlivňuje transkripční aktivitu AhR v přítomnosti agonistů AhR (TCDD).

Summary

The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-dependent transcription factor that is activated by different synthetic and natural chemicals such as 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). This thesis is focused on the graphene oxide cytotoxicity using the MTT assay, followed by detection of its ability to activate or inhibit the transcription activity of aryl hydrocarbon receptor using the Reporter Gene assay method. Effect of graphene oxide was measured in five different concentrations.

For testing was used stably transfected reporter cell line AZ-AhR, which was subsequently treated by the addition of the tested compounds with the concentration - 0,002; 0,02; 0,2; 2 a 20 $\mu\text{g/ml}$. After cells incubating with graphene oxide, transcription activity of AhR was measured. None of tested compounds did activate AhR, only the positive control (TCDD) significantly did it. In the antagonist mode, significant co-activation was detected in the two highest concentrations of graphene oxide. The results suggested that graphene oxide affects the transcription activity in the presence of AhR agonists (TCDD).

Poděkování

Velice ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce doc. Ing. Radimu Vrzalovi, Ph.D. za pomoc, rady, věnovaný čas a cenné připomínky. Poděkovat bych chtěla i celému kolektivu Laboratoře molekulární toxikologie a molekulární farmakologie. Také děkuji za finanční podporu projektu IGA PrF-2016-003. V neposlední řadě děkuji rodině a partnerovi za podporu a trpělivost během mého studia.

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Aryluhlovodíkový receptor	10
2.1 Struktura AhR	10
2.2 Metabolismus xenobiotik.....	11
2.3 Aktivace AhR	12
2.4 Ligandy AhR.....	14
3. Grafen oxid	16
3.1 Vlastnosti grafenu	16
3.2 Využití grafenu	17
3.3 Vlastnosti grafen oxidu.....	17
3.4 Použití grafen oxidu.....	19
3.5 Toxicita materiálů na bázi grafenu	20
3.6 Vliv grafenových nanomateriálů na životní prostředí	21
4. Cíl práce	23
5. Materiál a přístroje.....	24
5.1 Biologický materiál.....	24
5.2 Laboratorní pomůcky.....	24
5.3 Chemikálie a použité roztoky	24
5.4 Laboratorní přístroje	25
6. Metodika	26
6.1 Kultivace buněčné linie AZ-AhR	26
6.2 Pasážování buněk.....	26
6.3 Trypan Blue test.....	26
6.4 Počítání buněk a vysetí buněk na 96 jamkovou destičku	27
6.5 Příprava a aplikace roztoků pro MTT assay	27
6.6 MTT assay	28
6.7 Příprava a aplikace roztoků pro Reporter Gene assay	29
6.8 Reporter Gene assay	30
7. Výsledky	31
7.1 Vliv testovaných látek na viabilitu buněčné linie AZ-AhR.....	31

7.2	Vliv testovaných látek na aktivitu AhR.....	33
7.3	Aktivace transkripční aktivity AhR (agonistický mód).....	34
7.4	Inhibice transkripční aktivity AhR (antagonistický mód)	35
8.	Diskuze	36
9.	Závěr	38
10.	Literatura.....	39
11.	Seznam použitých zkratek	42

1. Úvod

V dnešní době stále narůstá zájem o nově syntetizované látky. Mezi tyto látky patří mimo jiné i nanomateriály na bázi grafenu, které se stávají atraktivními pro řadu vědců. Velký zájem vyvolávají pro své jedinečné vlastnosti jako je velký povrch, chemická a mechanická stabilita, vynikající vodivost a dobrá biokompatibilita. Tyto nanomateriály nacházejí své uplatnění v průmyslu, kosmetice a zdravotnictví. Avšak se stále rostoucím používáním grafenových nanomateriálů stoupá i riziko uvolňování těchto látek do životního prostředí. V důsledku toho je proto důležité posoudit, jaký vliv mají tyto látky na životní prostředí a na pochody v těle organismu.

Více se také začíná rozšiřovat používání nanotechnologií v medicíně. Vývoj nových a účinných systémů pro podávání léků je jedním z klíčových problémů, kterým čelí moderní medicína. Nanočástice jsou používány ke snižování toxicity a nežádoucích účinků léků, avšak sami nosiče mohou pro pacienta představovat riziko.

V praktické části bakalářské práce byla zjišťována cytotoxicita grafen oxidu a následně jeho interakce s aryluhlovodíkovým receptorem (AhR). AhR vystupuje jako ligandem aktivovaný transkripční faktor, který hraje důležitou roli v regulaci metabolismu xenobiotik a uplatňuje se v mnoha různých buněčných procesech. Je proto důležité sledovat schopnosti látek tento receptor aktivovat, případně inhibovat.

2. Aryluhlovodíkový receptor

Aryluhlovodíkový receptor (AhR) je cytosolický protein patřící do rodiny jaderných receptorů. AhR je ligandem aktivovaný transkripční faktor patřící do basic helix-loop-helix (bHLH)/PAS (Per-ARNT-Sim) rodiny transkripčních faktorů, které řídí expresi lidského CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1 (Vrzal *et al.*, 2004, Wu, 2013). AhR byl první objevený xenoreceptor. Je také nazýván jako dioxinový receptor, protože je aktivován polyaromatickými uhlovodíky (polycyklickými aromatickými uhlovodíky; PAH) a dioxinovými sloučeninami. Celá řada xenobiotik jsou exogenními ligandy AhR. AhR byl mnoho let považován za orphan (sirotčí) receptor. V posledním desetiletí však byla identifikována řada endogenních ligandů a AhR byl "deorphanizován" (Anzenbacher *et al.*, 2012).

Exprese AhR byla zjištěna v mnoha lidských tkáních. U dospělých lidí AhR mRNA je vysoce exprimována v plicích, slinivce, játrech a srdci, nižší hladiny exprese jsou v mozku a ledvinách (Jiang *et al.*, 2010).

Výzkum ukázal, že AhR hraje významnou roli v mnoha různých buněčných a vývojových procesech. AhR může působit v mnoha typech buněk, zprostředkovávat řadu biologických procesů a ovládat různé funkce, včetně dělení buněk, apoptózy, diferenciaci buněk, vývoje nervového systému a cév, stejně tak dobře cirkadiánní rytmus, metabolismus a stresové reakce na hypoxii (Jiang *et al.*, 2010; Busbee *et al.*, 2013). Kromě toho AhR může hrát roli ve směřování proteinů v proteazomové degradaci tím, že působí jako ligand-dependentní E3 ubiquitin ligaza (Busbee *et al.*, 2013).

2.1 Struktura AhR

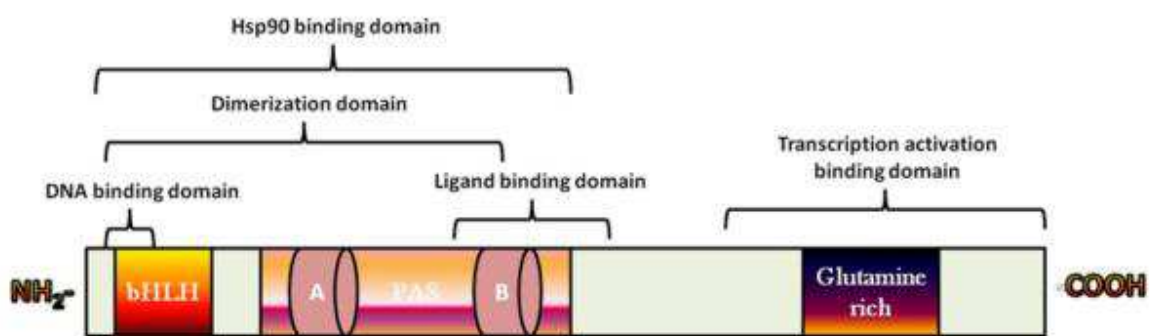
Lidský gen pro AhR se nachází na chromozomu 7. Je zde 12 exonů, které kódují 848 aminokyselin dlouhý protein s teoretickou hmotností 96 147 Da (Vrzal *et al.*, 2004).

Jak již bylo zmíněno, AhR patří do basic helix-loop-helix (bHLH)/PAS rodiny transkripčních faktorů, který jsou přítomny v mnoha tkáních a aktivují genovou expresi ligand-dependentním způsobem (Pandini *et al.*, 2010). Tyto proteiny tvoří velké nadčeledi transkripčních regulátorů, které se uplatňují v kritických vývojových procesech, včetně určení pohlaví a vývoj nervové soustavy a svalů. Členy této nadčeledi bHLH mají dvě vysoce konzervované a funkčně odlišné domény - zásaditou doménu a HLH doménu, které společně tvoří oblast přibližně 60 aminokyselinových zbytků.

Na N-terminálním konci se nachází zásaditá doména, která váže transkripční faktor do DNA na hexanukleotidovou sekvenci, označovanou jako E box. Na C-terminálním konci se nachází HLH doména, která umožňuje interakci s jinými proteinovými podjednotkami za vzniku homo- a hetero- dimerních komplexů (Jones, 2004).

PAS domény, které se nacházejí na C-terminální oblasti bHLH, jsou dlouhé 260-310 aminokyselin a fungují jako dimerizační motivy (obr. 1). Umožňují vazbu s dalšími PAS proteiny, non-PAS proteiny a s malými molekulami jako jsou dioxiny. PAS doména je složena ze dvou opakování přibližně 50 aminokyselinových zbytků (známé jako PAS-A a PAS-B) oddělených asi 150 aminokyselinovými zbytky (Jones, 2004).

AhR i jeho heterodimerní partner aryl uhlovodíkový jaderný translokátor (ARNT) jsou členy této rodiny. V AhR se obě domény používají k heterodimerizaci s ARNT, doména PAS-B slouží také jako doména vázající ligandy (LBD) (Wu, 2013).



Obr. 1: **Struktura AhR** (Převzato od Busbee *et al.*, 2013).

2.2 Metabolismus xenobiotik

Aryl uhlovodíkový receptor spolu s jeho heterodimerním partnerem aryl uhlovodíkovým jaderným translokátorem (ARNT), společně označovanými jako aryl uhlovodíkový receptorový komplex (AhRC), je již dlouho spojován s odezvou organismů na látky znečišťující životní prostředí. Organismy se musí neustále vyrovnávat s potencionálně nebezpečnými látkami antropogenního původu. Xenobiotika, jako jsou pesticidy, rozpouštědla a mnoho dalších průmyslových výrobků, jsou hlavním zdrojem znečištění životního prostředí (Beischlag *et al.*, 2008).

Důležitá role AhR tkví v jeho transkripční kontrole nad několika nejen biotransformačními enzymy (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1). Z tohoto důvodu je AhR

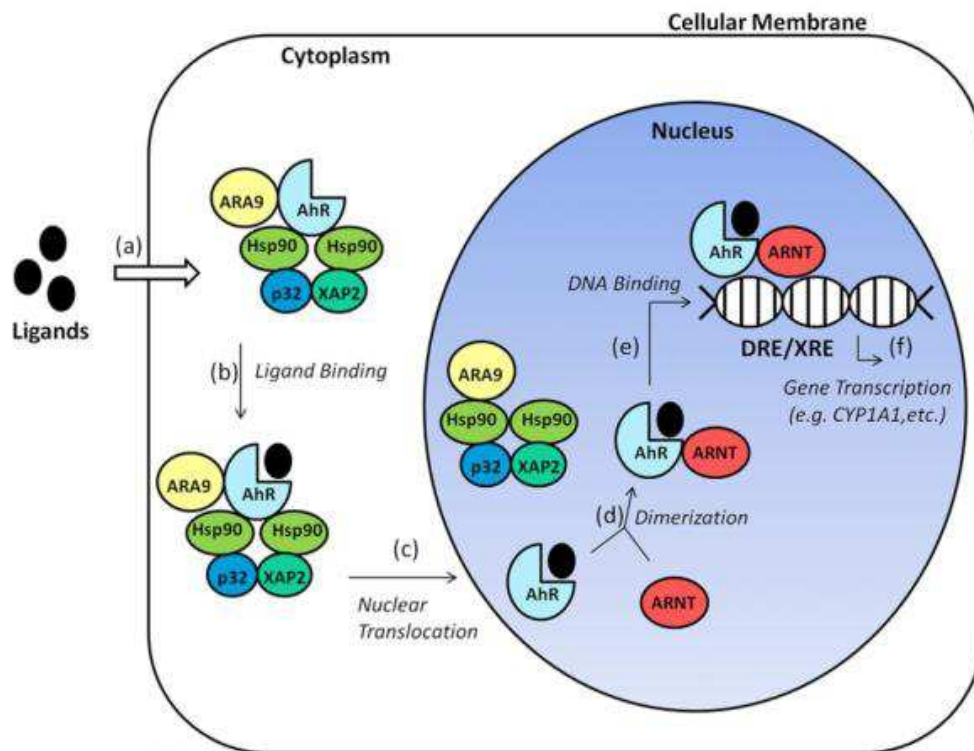
rozhodujícím faktorem v regulaci metabolismu xenobiotik (Vrzal *et al.*, 2004).

Metabolismus xenobiotik se formálně dělí do dvou fází, během kterých dochází ke zvýšení polaritě xenobiotika. Ve fázi I. biotransformace dochází ke zvýšení polaritě třemi strategiemi - vnesení polární skupiny do molekuly, přeměna méně polární skupiny na polárnější skupinu nebo odkrytí polární skupiny chemickou přeměnou molekuly. Uplatňují se zde reakce oxidoredukční a hydrolytické. Nejvýznamnějším enzymovým systémem, který je zodpovědný za fázi I. biotransformace je nadrodina enzymů cytochromu P450 (CYP). Ve fázi II. biotransformace je polarita xenobiotika zvyšována připojením jiné polární molekuly. Někdy se hovoří i o tzv. fázi III. a fázi 0. biotransformace, které zodpovídají za transport xenobiotika do buňky (import, fáze 0.) a metabolitů z buňky (export, fáze III.) (Changjiang *et al.*, 2005, Vrzal *et al.*, 2004).

2.3 Aktivace AhR

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) a příbuzné AhR ligandy (agonisté) difundují vstoupí do buňky (většina z nich je velmi hydrofobních) a váží se s vysokou afinitou k AhR. V klidovém stavu se AhR nachází v cytosolu v multiproteinovém komplexu, který obsahuje dvě molekuly proteinu teplotního šoku Hsp90, XAP2 (aryl hydrocarbon receptor interacting protein), také znám jako AIP1 nebo ARA9 a ko-chaperonový protein p23 (Nguyen *et al.*, 2008). Hsp90 pomáhá zachovat AhR v konformačním stavu, který je schopen vázat ligand a zabránit nevyžádané translokaci AhR do jádra. Fosfoprotein p23 pomáhá při interakci mezi AhR a Hsp90. ARA9 protein se podílí na správném skládání AhR v cytoplasmě (Busbee *et al.*, 2013).

Po vazbě ligandu dojde ke konformační změně AhR a k translokaci proteinového komplexu AhR s navázaným ligandem do jádra. AhR disociuje z komplexu a vytváří heterodimer s jaderným proteinem ARNT. Heterodimerní komplex ligand/AhR/ARNT se naváže na specifické rozpoznávací místo do promotorové oblasti DNA, označované jako dioxin-responsive element (DRE), xenobiotic-responsive element (XRE), nebo Ah-responsive element, což vede k ohýbání DNA, k narušení chromatinu a nukleozomu a celkově ke zvýšení rychlosti transkripce cílového genu (obr. 2). AhR-dependenční genová transkripce je ukončena disociací komplexu ligand/AhR/ARNT z DRE. Jaderný export AhR do cytosolu zprostředkuje jeho N-terminální jaderná exportní sekvence následovaná ubiquitin-proteazomovou degradací (Denison, 2011).



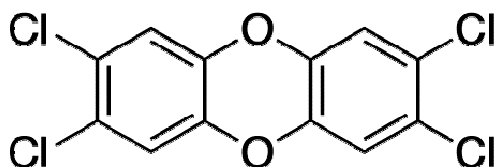
Obr. 2: Schéma aktivace Aryluhlovodíkového receptoru: (a) Ligand prochází plazmatickou membránou do buněčné cytoplazmy. (b) Ligand se váže na cytosolový AhR komplex. (c) Ligand navázaný na AhR komplex je translokován do jádra. (d) Po dimerizaci s ARNT se odloučí chaperonové proteiny. (e) Ligand navázaný na AhR/ARNT komplex se váže na DRE/XRE, což vede k transkripční aktivitě cílových genů. (Převzato od Busbee *et al.*, 2013).

AhR rovněž podléhá negativní zpětné vazbě. Aktivita komplexu AhR/ARNT je tlumena díky zvýšené expresi transkripčního represoru známého jako aryl uhlovodíkový receptorový represor (AhRR). AhRR je bHLH-PAS protein s vysokou sekvenční podobností s AhR. AhRR potlačuje transkripční aktivitu AhR kompeticí o vazbu s ARNT. Tento útlum činnosti AhR pomocí negativní zpětné smyčky a receptorové degradace může sloužit k ochraně organismu před následky transkripční hyperstimulace ze strany silných agonistů (Nguyen *et al.*, 2008).

2.4 Ligandy AhR

V průběhu let bylo objeveno několik AhR ligandů, a to jak přírodních, tak syntetických. Identifikace těchto ligandů poskytla větší znalost o fyziologických funkcích AhR. AhR ligandy se mohou značně lišit ve své chemické struktuře a vazebné afinitě. Ligandy, které mají větší afinitu k receptoru, se často považují za více toxické a mohou se dostat do těla vdechnutím, nebo při přímém kontaktu s kůží. Tyto ligandy, které jsou obvykle součástí látek znečišťujících životní prostředí, zahrnují halogenované aromatické uhlovodíky, mezi které patří polychlorované dibenzo-*p*-dioxiny (PCDD), dibenzofurany (PCDF) a bifenyly, stejně tak jako polycyklické aromatické uhlovodíky jako benzo(a)pyren, anthracen a 3- methylcholanthren (Busbee *et al.*, 2013).

Nejvíce studovaný izomer je 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), běžně označovaný jako dioxin (obr. 3) (Heuvel *et al.*, 1993). TCDD je produkován při výrobě pesticidů a herbicidů jako vedlejší produkt. Je také uvolňován při spalování komunálního odpadu (Tuppurainen *et al.*, 2003). Vystavení TCDD vyvolává řadu toxických účinků, zejména rakovinu a imunosupresi, teratogenezi, imuno-, hepato-, kardio- a dermální toxicity. Vzhledem ke své vysoké vazebné afinitě se stal TCDD prototypem pro studium biologické aktivity AhR (Busbee *et al.*, 2013).



Obr. 3: Vzorec 2,3,7,8 - tetrachlorodibenzo-*p*-dioxinu (TCDD)

Kromě těchto klasických, syntetických AhR ligandů vědci začali objevovat přirozené ligandy. Tyto přírodní sloučeniny se ukázaly jako méně toxické, ale stále schopné vyvolat odpovědi prostřednictvím AhR dráhy. Mezi přírodní ligandy se řadí flavonoidy, stilbeny, karotenoidy a indoly (Busbee *et al.*, 2013).

Mezi endogenní ligandy AhR patří bilirubin, eikosanoidy, deriváty tryptofanu a indolu, biliverdin, indirubin, deriváty kyseliny arachidonové a další. Až do identifikace endogenních ligandů se věřilo, že AhR byl zodpovědný pouze za indukci biotransformačních enzymů jako je CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, glutathion S-transferáza (GSTs), UDP-glukuronosyltransferáza (UGTs) a NADPH reduktáza. Poznání endogenních

ligandů AhR pomohlo k pochopení fyziologických rolí AhR. Nyní je jasné, že AhR hraje důležitou roli v různých endogenních funkcích jako je regulace buněčného cyklu a proliferace, imunitní odpovědi či exprese genů metabolismu lipidů (Anzenbacher *et al.*, 2012).

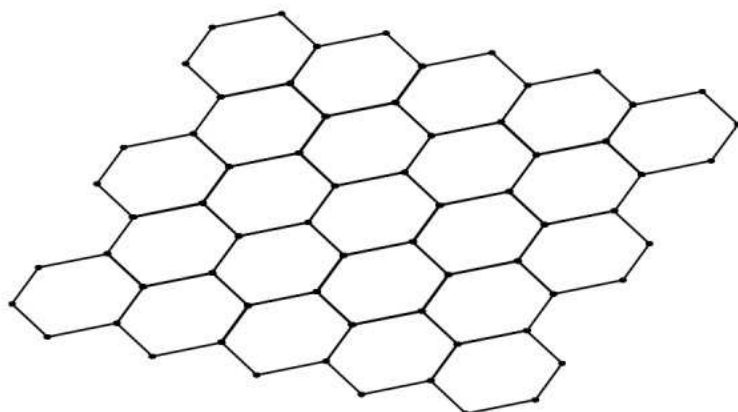
3. Grafen oxid

3.1 Vlastnosti grafenu

Grafen je velmi tenkou formou uhlíku. Jedná se o jednotlivé izolované vrstvy grafitu o tloušťce jednoho atomu. Tento průhledný dvojrozměrný materiál je tvořen sp^2 hybridizovanými uhlíky, které vytváří šestiúhelníky (obr. 4). Grafen poprvé popsali Andre Geim a Konstantin Novoselov, kteří za svůj objev dostali v roce 2010 Nobelovu cenu. Grafen prokázal řadu zajímavých vlastností, proto i na vzdory své krátké historii vyvolal velký zájem. Grafen má dobrou elektrickou vodivost, vysokou pohyblivost elektronů při pokojové teplotě, vynikající mechanické vlastnosti (tuhost, pevnost, pružnost), velkou povrchovou plochu, dobrou tepelnou vodivost, je nepropustný pro plyny a vyznačuje se chemickou inertností. Také má výjimečné optické vlastnosti (propouštění světla, zhášení fluorescence) (Kluková *et al.*, 2013).

Materiály z grafenu mají využití v biomedicíně, žádný jiný materiál nemá srovnatelné vlastnosti. Avšak grafen a jeho deriváty vykazují možnou toxicitu v biologických systémech od prokaryot k eukaryotům v závislosti na aplikované dávce (Gurunathan *et al.*, 2016).

Grafen má dvě aktivní strany, plochy a hrany, které zlepšují přichycení biologických molekul na grafen a jeho přilnavost k buňkám (Jarosz *et al.*, 2015).



Obr. 4: **Struktura 2D grafenu** (Převzato od Jarosz *et al.*, 2015)

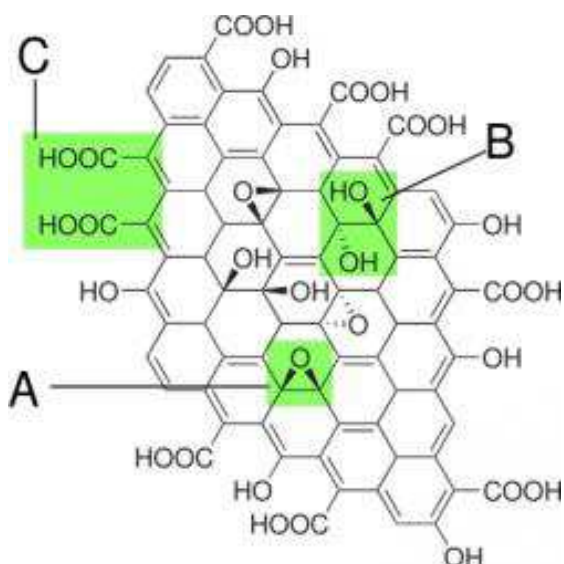
3.2 Využití grafenu

Grafen a nanomateriály na bázi grafenu jsou dnes využívány v mnoha oblastech pro různé účely. Je slibným materiálem pro elektrochemii - nanoelektroniku a energetické technologie (superkondenzátory, baterie, kompoziční materiály, tranzistory, solární články, palivové články). Využívá se také v oblasti senzorů, katalýzy a biomedicíny. Díky svým jedinečným mechanickým vlastnostem jako je vysoká pružnost, flexibilita a adaptabilita pro tkáňové inženýrství, byly grafenové nanomateriály zkoumány v několika biomedicínských odvětvích. Materiály na bázi grafenu jsou slibné v oblasti biosenzorů (optické snímače, fluorescenční zobrazovací sondy a elektrochemické snímače). Kromě toho, grafenové nanomateriály byly použity v pokročilých terapeutických technikách, jako jsou fototermální a fotodynamické terapie (Jarosz *et al.*, 2015).

3.3 Vlastnosti grafen oxidu

Grafen oxid (GO) je jedním z nejdůležitějších chemických derivátů grafenu (Kluková *et al.*, 2013). GO se skládá z jednoatomové vrstvy atomů uhlíku uspořádané do mřížky, která tvarem připomíná včelí plástve a je jedním z nejsilnějších materiálů vůbec (Si-Ying *et al.*, 2015).

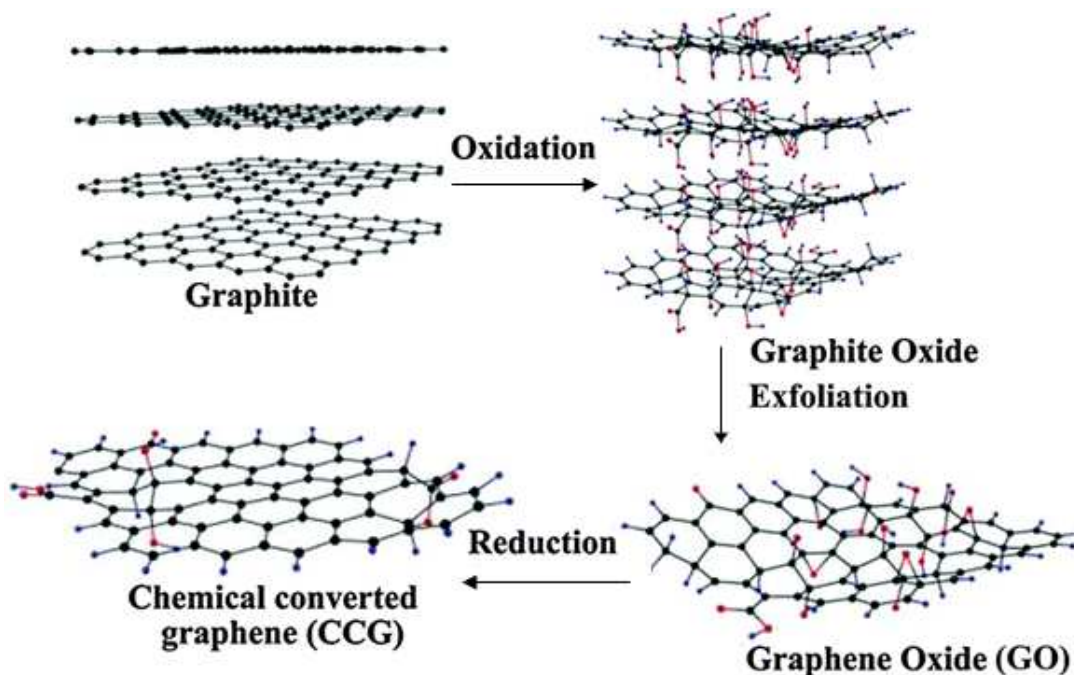
GO je hydrofilní a jeho povrch je snadno modifikován řadou biokompatibilních polymerů jako je chitosan, polyethylenglykol, poly-L-lysin, polyvinylalkohol a další. GO obsahuje velké množství hydrofilních skupin lokalizovaných jak na okrajích vrstvy, tak ve vnitřních rovinách, z tohoto důvodu by malé pláty GO o nízké koncentraci měly být více biokompatibilní. Díky svým vlastnostem našel GO využití v oblasti dávkování léčiv, parazitologie, tkáňového inženýrství, antibakteriálních látek, léčby rakoviny a dalších (Chung, *et al.*, 2013, Si-Ying, *et al.*, 2015)



Obr. 5: **Struktura grafenu oxidu** (A - epoxidová skupina, B - hydroxylová skupina, C - karboxylová skupina)

GO je vysoce oxidovaná forma grafenu vyrobená převážně chemickými metodami, přes energetickou oxidaci grafitu za použití různých oxidačních činidel, nebo známých postupů jako při Hummersově metodě.

Příprava grafenu zahrnuje několik kroků (obr. 6). Prvotní oxidace grafitu probíhá pomocí Hummersovy metody (pomocí oxidačních činidel KMnO_4 a NaNO_3 v koncentrované H_2SO_4) za vzniku grafitového oxidu (Hummers *et al.*, 1958). V porovnání s původním grafitem, grafitový oxid nese hydroxylové a epoxidové skupiny na sp^3 - hybridizovaných uhlících ve vnitřní rovině a karbonylové a karboxylové skupiny na sp^2 - hybridizovaných uhlících nacházejících se na okraji vrstvy (obr. 5). Grafitový oxid je proto velmi hydrofilní a ve vodním roztoku velmi lehce přechází pomocí ultrasonifikace na grafen oxid. GO nese řadu funkčních skupin (Kluková *et al.*, 2013). Reaktivní COOH a OH skupiny v GO usnadňují spojení s různými materiály, jako jsou polymery, biomolekuly, DNA, proteiny, nebo nanočástice Fe_3O_4 , které zlepšují rozpustnost a zabraňují agregaci ve fyziologických pufrch s obsahem soli (Jarosz *et al.*, 2015).



Obr. 6: Schéma přípravy grafenu

3.4 Použití grafen oxidu

Jedinečné vlastnosti grafen oxidu našly využití v biologických a lékařských aplikacích, jako povrchový materiál pro implantáty a také jako stimulátor pro růst a diferenciaci buněk. Velký aromatický povrch GO s množstvím funkčních skupin umožňuje adsorpci molekul s vysokou afinitou a umožňuje vytvářet stabilní komplexy, které dělají GO ideálním nanonosičem pro účinné léky a doručování genů. Různé cílové molekuly, jako je kyselina listová nebo protilátky, mohou být snadno imobilizovány na GO, který následně umožní přesné a účinné dodání molekul do cílových buněk (Jarosz *et al.*, 2015). Předchozí *in vitro* a *in vivo* studie potvrdily, že GO je vysoce účinný v cíleném dodání léčiv proti rakovině (Guo *et al.*, 2014).

Pro použití GO v klinickém prostředí je nezbytné potvrdit jeho toxicitu a biologickou kompatibilitu přes rozsáhlé *in vitro* a *in vivo* studie s použitím speciálních buněčných linií, teoretických a zvířecích modelů (Si-Ying *et al.*, 2015).

3.5 Toxicita materiálů na bázi grafenu

Potenciálně toxické účinky materiálů z grafenu na životní prostředí a lidské zdraví přitahují v poslední době značnou pozornost. Pochopení interakcí grafenu a jeho derivátů s živými systémy a jejich nežádoucích účinků má zásadní význam pro další rozvoj a bezpečné používání nanomateriálů na bázi grafenu (Guo *et al.*, 2014). Cytotoxické studie grafenu zahrnují vliv na životaschopnost a morfologii buněk, integritu membrány, generování ROS, poškození DNA, expresi genu a mechanismus vychytávání. Interakce grafenových nanočástic s buňkami závisí na fyzikálně-chemických a elektrických vlastnostech. Morfologie (velikost, tvar a ostré hrany), povrchový náboj, povrchová funkcionalizace, rozpustnost, skupenství, počet vrstev, čistota a způsob syntézy jsou klíčovými faktory, které ovlivňují mechanismus absorpce (pasivní difúze, endozomální vychytávání) a reakci tkáně na nanomateriály z grafenu (Shen *et al.*, 2012). Kromě toho je toxický účinek grafenu vysoce závislý na podmínkách experimentu, mezi které patří doba působení, dávka, typ buněk a metoda použitá pro stanovení životaschopnosti buněk (Jarosz *et al.*, 2015).

Chemické metody používané při výrobě grafenových nanomateriálů, včetně oxidace nebo redukce grafen oxidu, způsobují vznik toxických látek jako je například hydrazin nebo jeho deriváty, které mají vliv na strukturu grafenu a jeho bezpečnost. Povrchové úpravy grafenových nanomateriálů zlepšují jejich rozpustnost a výrazně snižují toxické interakce s živými systémy (Gurunathan *et al.*, 2016).

GO snadno vstupuje do živé buňky, protože je malé velikosti, má ostré hrany a drsný povrch. Navíc záporně nabitý GO se může snadno hromadit uvnitř buňky. Přítomnost karboxylových, epoxidových a hydroxylových skupin v GO snižuje jeho cytotoxicitu, malá velikost a vysoký obsah kyslíku zlepšuje rozpustnost a vede ke zvýšení biokompatibility. Avšak mechanismus buněčného vychytávání a osud grafenu uvnitř živých buněk není dosud zcela znám (Jarosz *et al.*, 2015).

Fyzikální interakce grafenu s buněčnými membránami jsou jednou z hlavních příčin cytotoxicity. Hydrofobní formy grafenu interagují s lipidy buněčné membrány, zatímco ostatní formy grafenu se mohou vázat na receptory buněk a zasahovat do buněčného metabolismu, inhibovat přívod živin, indukovat napětí nebo způsobit zánik buněk (Jaworski *et al.*, 2013, Jarosz *et al.*, 2015).

Oxidační stres a generování reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) mohou být zahrnuty k toxickým účinkům nanomateriálů na bázi grafenu. Je-li homeostáza v buňce

narušena a enzymy zodpovědné za snížení ROS selžou, u makromolekul jako jsou proteiny, DNA a lipidy může dojít k poškození, které výrazně ovlivní metabolismus buněk a signalizace. Interakce GO s buňkami může vést k nadměrné tvorbě ROS, což je první krok v mechanismu karcinogeneze, stárnutí a mutageneze (Seabra *et al.*, 2014).

S výjimkou poškození plazmatické membrány a indukci oxidačního stresu může grafen způsobit apoptózu nebo nekrózu buněk prostřednictvím přímého vlivu na DNA buněk nebo mitochondriální aktivitu. Grafenové nanočástice mohou vyvolat rozptýlení mitochondriálního membránového potenciálu, který následně zvyšuje tvorbu intracelulárního ROS a případně spouští apoptózu (Gurunathan *et al.*, 2016, Jarosz *et al.*, 2015).

Kromě toho grafen může přímo interagovat s různými geny kódujícími důležité bílkoviny a enzymy. (Jarosz *et al.*, 2015).

3.6 Vliv grafenových nanomateriálů na životní prostředí

Zvyšující se produkce grafenového nano-prachu a komercializace různých produktů obsahujících grafen má za následek uvolnění grafenových nanočástic do životního prostředí. Tedy k uvolnění grafenových nanočástic může dojít během jeho syntézy, stejně tak dobře během různých stádií životního cyklu produktů na bázi grafenu včetně výroby, zpracování, použití a likvidace. Nanočástice grafenových plátů mohou být také uvolněny jako následek záměrného použití technologií na bázi grafenu při čištění odpadních vod nebo při odsolování zařízení (Wang *et al.*, 2012). Současná koncentrace grafenových nanomateriálů v životním prostředí je zanedbatelná a aktuální riziko pro organismy je proto malé (Farre *et al.*, 2009).

Přítomnost polárních skupin na povrchu a/nebo adsorpce rozpuštěných organických látek na jejich povrch může zvýšit jejich rozpustnost a tedy vést k jejich výskytu ve vodním sloupci. Následky to může mít pro vodní organismy, zejména pro ryby, které tomu mohou být vystaveny přes různé cesty včetně požití a dýchání. Například ryby mohou požít uhlíkové nanotrubičky během pití, což vede k jejich ukládání ve střevech. Toto také platí pro grafenové nanomateriály (Lammel *et al.*, 2014).

Nanomateriály mohou interagovat s organickými látkami znečišťujícími životní prostředí a následně je adsorbovat. Různé studie ukázaly, že grafen a grafen oxid mají vynikající kapacitu pro adsorpci organických polutantů jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a polychlorované bifenylly (PCB). Předpokládá se, že grafenové

deriváty mohou působit jako "Trojský kůň" pro hydrofóbní, toxické látky. Usnadňují jejich vstup do buněk a tím zvyšují jejich škodlivé účinky na buněčné úrovni (Lammel *et al.*, 2014).

Cílem studie Lammela *et al.* (2014) bylo zjistit, zda grafenové nanopláty mohou působit jako vektor pro aromatické látky znečišťující životní prostředí. Za tímto účelem byla použita jaterní buněčná linie PLHC-1 z ryby *Poeciliopsis lucida*, která byla vystavena působení grafenových nanoplátů (grafen oxidu (GO) nebo karboxyl grafenu (CXYG)) a AhR agonistovi (β -naftoflavonu (β -NF), benzo(k)fluoranthenu (BkF) nebo 3, 3', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobifenylu (PCB 169)). Výsledky naznačují, že grafenové nanopláty zvyšují účinnou koncentraci agonistů AhR usnadněním jejich pasivní difúze do buněk poškozením plazmatické membrány a/nebo jejich transport přes plazmatickou membránu (Lammel *et al.*, 2014).

4. Cíl práce

Cílem této práce bylo sledovat cytotoxicitu grafen oxidu a následně zjistit jak grafen oxid ovlivňuje transkripční aktivitu aryluhlovodíkového receptoru na buněčné linii AZ-AhR pomocí metody Reporter Gene assay.

5. Materiál a přístroje

5.1 Biologický materiál

Ke stanovení transkripční aktivity AhR byla použita stabilně transfekovaná reporterová buněčná linie AZ-AhR odvozená od lidského hepatocelulárního karcinomu (HepG2). HepG2 buňky byly transfekovány plazmidem nesoucím několik AhR vazebných míst fúzovaných s reportérovým genem pro luciferázu (Novotná *et al.*, 2011).

5.2 Laboratorní pomůcky

- 96 jamková černá destička pro měření luminiscence (NUNC)
- 96 jamkové kultivační destičky (TPP)
- Automatické pipety o rozsahu 0,1-2,5 μ l, 0,5-10 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l (Eppendorf)
- Bürkerova komůrka (Assistent)
- Krycí sklíčka 22x22 mm (Menzel Gläser)
- Kultivační láhve o obsahu 25 cm² a 75 cm² (TPP)
- Mikrozkušavky o objemech 0,5 ml, 1,5 ml a 2 ml (BIOplastics)
- Multikanálové pipety o rozsahu 0,5-10 μ l, 10-100 μ l, 30-300 μ l (Eppendorf)
- Petriho misky (TPP)
- Plastové stojany na zkumavky a mikrozkušavky (TPP)
- Plastové špičky o rozsahu 0,1-10 μ l, 10-200 μ l, 100-1000 μ l (Eppendorf)
- Sterilní sérologické pipety o objemech 2 ml, 5 ml, 10 ml a 25 ml (TPP)
- Zkušavky o objemech 15 ml a 25 ml (TPP)

5.3 Chemikálie a použité roztoky

- 0,25% trypsin (Sigma-Aldrich, T4049)
- 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (LG standarts)
- Antibiotikum Hygromycin B (Sigma-Aldrich, H7772)
- Deionizovaná voda (dH₂O)
- Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, D8418)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma-Aldrich, D6546) s přidanými 5 ml roztoku antibiotika penicilinu (Sigma-Aldrich, P4333),

5 ml L-glutaminu (Sigma-Aldrich, G8540), 50 ml fetálního bovinního séra (Sigma-Aldrich, F6178) a 5 ml neesenciálních aminokyselin (Sigma-Aldrich, G8540)

- Fosfátový pufr (Gibco, 10010031)
- Grafen oxid o velikosti částic 50-200 nm, 200-500 nm a < 500 nm (Bimake, B51211, B51221, B51231)
- Luciferase Assay Substrate (Promega, N1113A)
- Lyzační pufr (Promega, E3971)
- Roztok methylnetrazoliové soli (MTT) (Sigma-Aldrich, M2128)
- Triton X-100 (Serva, 37240)
- Trypanová modř

5.4 Laboratorní přístroje

- Inkubátor Mitre 4000 (Conterm)
- Laminární flowbox Labculture® (ESCO)
- Mikroskop (Novel Optics)
- Mrazák (SANYO ultra low VIP series)
- Spektrofotometr Infinite M200 (Tecan Trading AG)
- Třepačka Mini-Rocker Shaker MR-1 (Biosan)
- Vodní lázeň LCB22D (LabTech)
- Vortex Reax top D-1126 (Heidolph)

6. Metodika

6.1 Kultivace buněčné linie AZ-AhR

Adherentní buněčná linie AZ-AhR byla kultivována v plastové kultivační lahvi s 20 ml média v inkubátoru při 37 °C v atmosféře s 5% obsahem CO₂.

6.2 Pasážování buněk

Kultivační láhev s kulturou AZ-AhR jsem přenesla z inkubátoru do laminárního boxu a za sterilních podmínek odsála staré médium. Kulturu jsem opláchla sterilním roztokem PBS a tento roztok znovu odsála. Na kulturu jsem aplikovala 1 ml roztoku trypsinu, láhev uzavřela a pomocí naklánění láhve jsem rovnoměrně rozprostřela roztok trypsinu po celé kultivační ploše láhve. Láhev jsem vložila na 2 minuty do inkubátoru. Poté jsem láhev vytáhla z inkubátoru a opakovaným nakláněním láhve a poklepáváním jsem rozrušila kontakty mezi buňkami a kultivačním povrchem lahve. Působení trypsinu jsem zastavila přidáním 9 ml média, opakovaným promícháváním suspenze pomocí nasávání do pipety a zpětným vypouštěním jsem rozbila zbytek buněčných vazeb. Obsah láhve jsem přenesla do nové plastové zkumavky. Z dané suspenze jsem odebrala 3 ml a přenesla do kultivační láhve. Přidala jsem 17 ml nového kultivačního média a láhev umístila zpět do inkubátoru. Pasážování jsem opakovala každé tři dny. Jednou týdně jsem do kultivační lahve přidala 80 µl antibiotika Hygromycinu.

6.3 Trypan Blue test

V buněčné suspenzi, která byla získána při pasážování buněk, bylo nutné stanovit koncentraci (počet) buněk. Ke stanovení počtu životaschopných buněk jsem použila Trypanovou modř. Pokud jsou živé buňky vystaveny působení specifického barviva (Trypanová modř), nevpustí barvivo do intracelulárního prostoru, naopak mrtvé nebo poškozené buňky se zbarví. Buněčnou suspenzi smíchanou s roztokem Trypanové modři jsem hodnotila mikroskopicky v tzv. Bürkerově komůrce.

6.4 Počítání buněk a vyšetí buněk na 96 jamkovou destičku

Z plastové zkumavky jsem odebrala 10 μl buněčné suspenze, kterou jsem následně smíchala v mikrozkuhavce s 90 μl roztoku Trypanové modři. Nachystala jsem si Bürkerovu komůrku, kterou jsem přikryla krycím sklíčkem. Připravený roztok jsem přenesla do Bürkerovy komůrky. Provedla jsem počítání buněk pod mikroskopem v 5 náhodně vybraných čtvercových polích v dolní i horní oblasti Bürkerovy komůrky. Vypočítala jsem si průměrný počet buněk ve čtverci a ten jsem následně vynásobila zřed'ovacím faktorem 10^5 . Tím jsem získala množství buněk v 1 ml suspenze. V 96 jamkové destičce jsem vysela 25 000 buněk na jamku v 200 μl média. Kultivační destičku jsem následně umístila do inkubátoru.

6.5 Příprava a aplikace roztoků pro MTT assay

Provedla jsem testování cytotoxicity grafen oxidu. Jako rozpouštědlo jsem použila médium. Po 24 hodinách jsem z 96 jamkové destičky odsála staré médium a nahradila ho novým médiem, do kterého jsem přidala další chemikálie. Množství a složení roztoků viz tab. I. Na 96 jamkovou destičku jsem použila 200 μl média s danou chemikálií na jamku. Aplikace testovaných látek je uvedena na schématu č. 1. 96 jamkovou destičku jsem následně umístila na 24 hodin do inkubátoru.

Tab. I: Příprava roztoků s testovanými látkami pro 96 jamkovou kultivační destičku pro MTT assay

Testovaná látka	Složení roztoku
UT	25 μl H ₂ O + 2475 μl média
GO o koncentraci 0,002 $\mu\text{g/ml}$	9 μl GO o koncentraci 0,2 $\mu\text{g/ml}$ + 891 μl média
GO o koncentraci 0,02 $\mu\text{g/ml}$	9 μl GO o koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$ + 891 μl média
GO o koncentraci 0,2 $\mu\text{g/ml}$	9 μl GO o koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ + 891 μl média
GO o koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$	9 μl GO o koncentraci 200 $\mu\text{g/ml}$ + 891 μl média
GO o koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$	9 μl GO o koncentraci 2000 $\mu\text{g/ml}$ + 891 μl média
Triton	250 μl 2% tritonu + 2250 μl média

Legenda: UT - negativní kontrola, GO - grafen oxid

Schéma 1.: Aplikace testovaných látek na 96 jamkové destičce

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

Legenda: UT - negativní kontrola, GO - grafen oxid

6.6 MTT assay

MTT assay patří mezi základní metody hodnotící cytotoxickou aktivitu chemických látek. Tento test je založen na principu fungování mitochondriální dehydrogenázy v živých buňkách, které redukují MTT a mají tak schopnost přeměnit mírně žlutě zbarvenou tetrazoliovou sůl na sytě fialově zbarvený formazan. Mrtvé buňky tuto schopnost ztrácí. Vyšší intenzita zbarvení tak odpovídá většímu počtu živých buněk.

Po ukončení inkubace buněk s testovanými látkami jsem provedla MTT assay. Obsah kultivační 96 jamkové destičky jsem vyklepla do výlevky a zbytek kapek média osušila buničinou. Pomocí multikanálové pipety jsem napipetovala do každé jamky 100 μ l roztoku MTT, který jsem si připravila smícháním 1 ml zásobního roztoku MTT (3 mg/ml) předeřátého na 37 °C s 9 ml média. Kultivační destičku jsem na 30 minut umístila do inkubátoru. Po ukončení inkubace jsem obsah destičky vylila do výlevky. Fialové krystalky redukováného MTT jsem rozpustila přidáním 50 μ l dimethylsulfoxidu do každé jamky. Takhle připravené vzorky jsem následně měřila na spektrofotometru při vlnové délce 565 nm.

6.7 Příprava a aplikace roztoků pro Reporter Gene assay

Buňky byly stejně jako v předešlém případě první den zpasážovány, spočítány a vysety společně s médiem na 96 jamkovou destičku po 200 μ l o množství 25 000 buněk na jamku. Měření jsem prováděla v agonistickém a v antagonistickém módu. V agonistickém módu bylo možné určit schopnost vybraných látek aktivovat receptor. Díky antagonistickému módu bylo možné měřit schopnost látek ovlivňovat již aktivovaný receptor.

Po 24 hodinách inkubace jsem odsála staré médium a nahradila ho médiem novým, do kterého jsem přidala další chemikálie. Pro agonistický mód jsem použila GO + DMSO a pro antagonistický mód jsem použila GO + TCDD. Na 96 jamkové destičky jsem aplikovala 200 μ l média s danou chemikálií na jamku. Aplikace testovaných látek je uvedena na schématu 2 a 3. Destičky jsem následně umístila na 24 hodin do inkubátoru.

Schéma 2: Aplikace testovaných látek na 96 jamkové destičce - agonistický mód

	GO 50 - 200 nm				GO 200 - 500 nm				GO > 500 nm			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO											
B	0,002 + DMSO				0,002 + DMSO				0,002 + DMSO			
C	0,02 + DMSO				0,02 + DMSO				0,02 + DMSO			
D	0,2 + DMSO				0,2 + DMSO				0,2 + DMSO			
E	2 + DMSO				2 + DMSO				2 + DMSO			
F	20 + DMSO				20 + DMSO				20 + DMSO			
G												
H	TCDD											

Legenda: GO - grafen oxid, DMSO - dimethylsulfoxid, TCDD - 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-*p*-dioxin

Schéma 3: Aplikace testovaných látek na 96 jamkové destičce - antagonistický mód

	GO 50 - 200 nm				GO 200 - 500 nm				GO > 500 nm			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO											
B	0,002 + TCCD				0,002 + TCCD				0,002 + TCCD			
C	0,02 + TCCD				0,02 + TCCD				0,02 + TCCD			
D	0,2 + TCCD				0,2 + TCCD				0,2 + TCCD			
E	2 + TCCD				2 + TCCD				2 + TCCD			
F	20 + TCCD				20 + TCCD				20 + TCCD			
G												
H	TCDD											

Legenda: GO - grafen oxid, TCDD - 2,3,7,8-tetrachlordibenzo- *p*-dioxin

6.8 Reporter Gene assay

Reporter Gene assay se obvykle používá jako nástroj ke studiu genové exprese na transkripční úrovni.

Po ukončení inkubace buněk s testovanými látkami jsem obsah kultivačních 96 jamkových destiček vyklepla do výlevky. Pomocí multikanálové pipety jsem do každé jamky napipetovala 25 μ l lyzačního pufru, který jsem si připravila smícháním 2 ml zásobního roztoku lyzačního pufru s 8 ml vody. Destičky jsem následně umístila na 20 minut do mrazáku. Po 20 minutách jsem destičky vytáhla z mrazáku a nechala je rozmrazit na třepačce. Z každé jamky jsem pomocí multikanálové pipety přepipetovala 3 μ l roztoku na černou 96 jamkovou destičku. Do každé jamky jsem poté přidala 30 μ l substrátu pro luciferázu ohřátého na 37 °C. Takhle připravené vzorky jsem následně měřila na spektrofotometru.

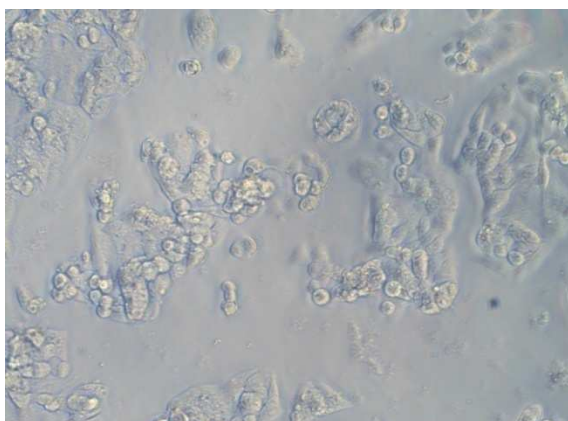
7. Výsledky

7.1 Vliv testovaných látek na viabilitu buněčné linie AZ-AhR

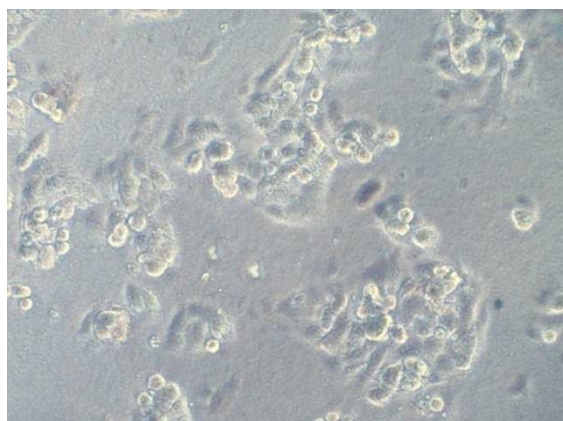
Na buněčné linii AZ-AhR bylo sledováno cytotoxické působení testovaných látek. Buňky byly inkubovány s GO o různých velikostech částic (50-200; 200-500 a > 500 nm) a o koncentraci 0,002; 0,02; 0,2; 2 a 20 $\mu\text{g/ml}$. Jako pozitivní kontrola byl použit 2% Triton X-100. Jako negativní kontrola bylo zvoleno médium s deionizovanou vodou. Viabilita buněčné linie byla určena pomocí MTT assay, hodnoty byly měřeny spektrofotometricky při vlnové délce 565 nm. Experiment byl proveden v pěti nezávislých opakováních.

Na obr. 13 vidíme buněčnou linii s DMSO, který sloužil jako negativní kontrola. Na snímcích (obr. 7, 8, 9, 10, 11, 12) můžeme vidět buněčnou linii po aplikaci GO o koncentracích 2 a 20 $\mu\text{g/ml}$. Zejména u nejvyšší koncentrace (obr. 8, 10, 12) jsou mezi buňkami viditelné částice grafenu, nicméně na morfologii buněk jeho přítomnost neměla vliv.

U buněčné linie AZ-AhR nebyl zaznamenán žádný výrazný pokles viability buněk. Jak můžeme vidět z grafu 1, u většiny hodnot nedošlo k odchýlení od 100 %, žádná z hodnot neklesla pod 80 %. Mírný pokles viability byl zaznamenán u GO (200-500 nm) u koncentrací 0,2 a 2 $\mu\text{g/ml}$, pokles byl však vyhodnocen jako statisticky nevýznamný. Na základě toho zjištění mohou být proto všechny testované koncentrace vybraných látek použity pro další metodu Reporter Gene assay.



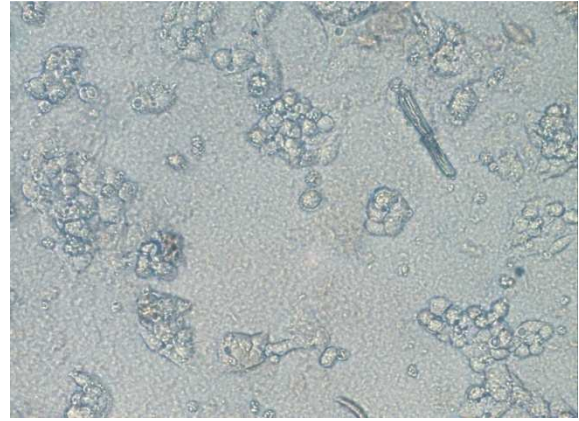
Obr. 7: GO (50 - 200 nm) - 2 $\mu\text{g/ml}$



Obr. 8: GO (50 - 200 nm) - 20 $\mu\text{g/ml}$



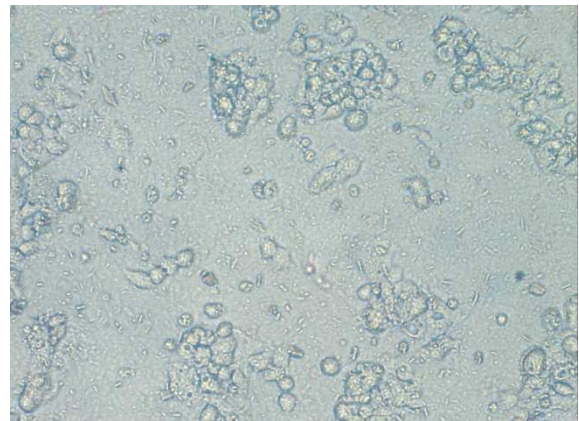
Obr. 9: GO (200 - 500 nm) - 2 µg/ml



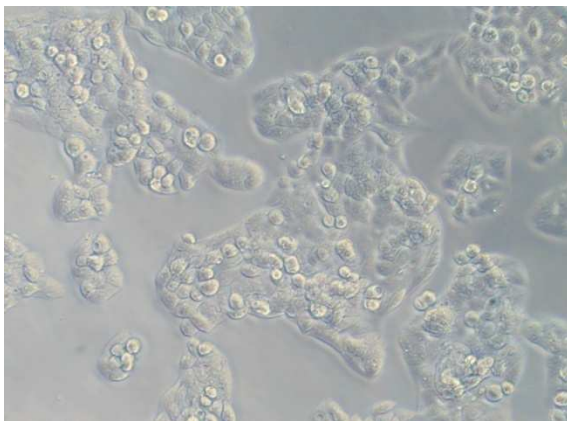
Obr. 10: GO (200 - 500 nm) - 20 µg/ml



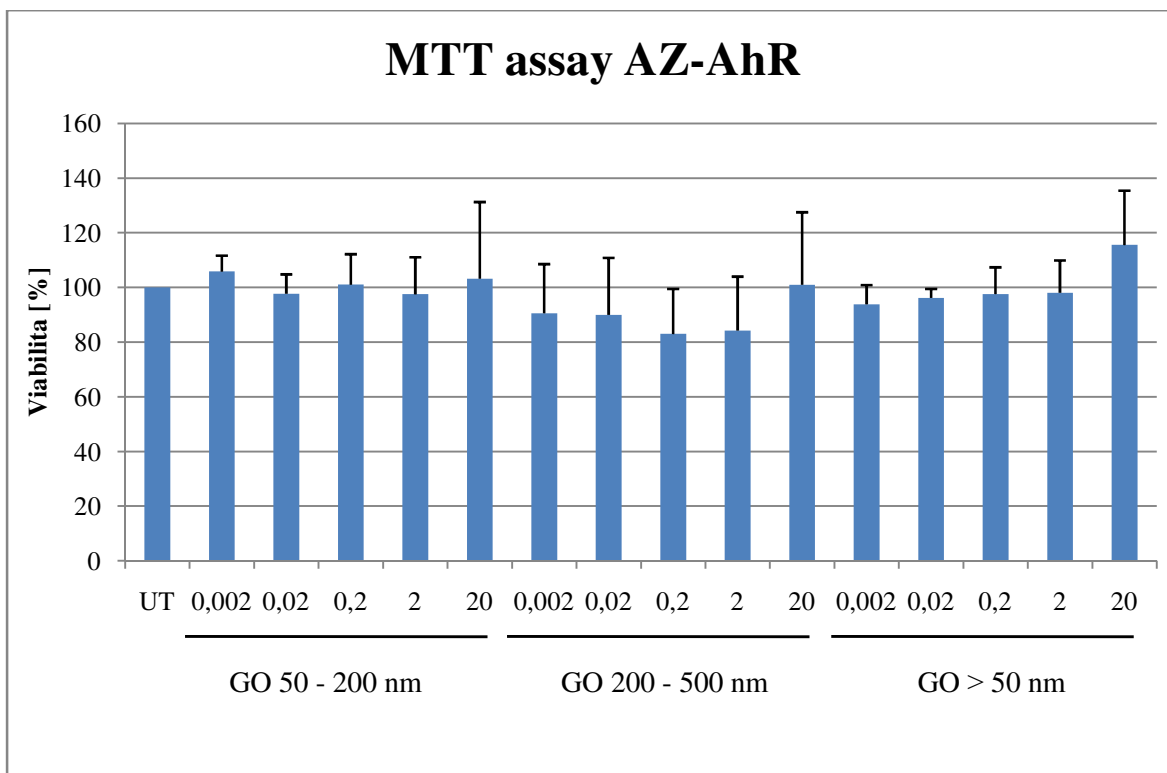
Obr. 11: GO (> 500 nm) - 2 µg/ml



Obr. 12: GO (> 500 nm) - 20 µg/ml



Obr. 13: Negativní kontrola (DMSO)



Graf 1: Viabilita buněk AZ-AhR linie po aplikaci testovaných látek

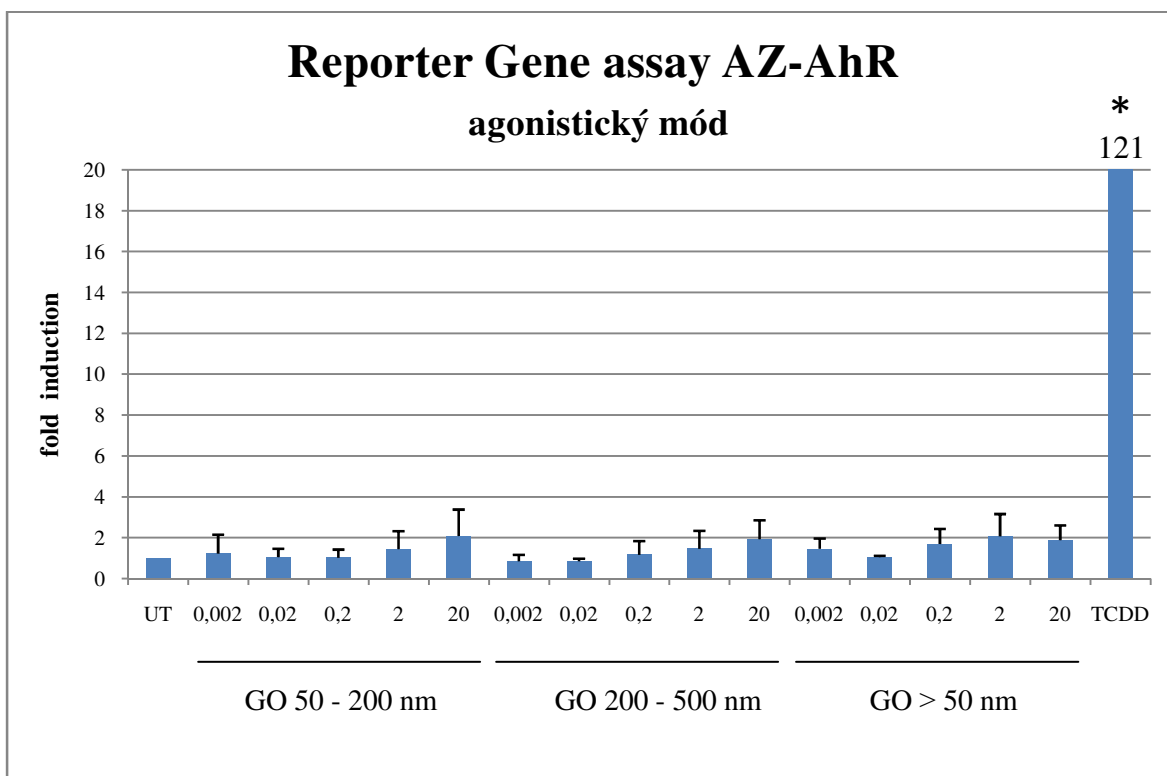
Buněčná linie AZ-AhR byla inkubovaná 24 hodin s vybranými látkami o různých koncentracích - médium + H₂O - negativní kontrola, GO (50-200, 200-500 a > 500 nm) o koncentracích 0,002; 0,02; 0,2; 2 a 20 µg/ml. Úroveň viability je vztažena k negativní kontrole, která představuje 100 %. Výsledky jsou získány z pěti na sobě nezávislých experimentů.

7.2 Vliv testovaných látek na aktivitu AhR

Pomocí metody Reporter Gene assay byla sledována transkripční aktivita AhR. U agonistického módu byla aktivace receptoru vypočítaná jako podíl luciferázové aktivity pro vybrané látky a negativní kontroly. Aktivace receptoru je vyjádřena jako tzv. fold induction. U antagonistického módu byly výsledky vyjádřeny v procentech pozitivní kontroly. Grafy byly vytvořeny zprůměrováním pěti (graf 2) a devíti (graf 3) na sobě nezávislých experimentů.

7.3 Aktivace transkripční aktivity AhR (agonistický mód)

Jako první byla testována schopnost látek aktivovat Ah receptor. Z grafu je patrné, že žádná z uvedených koncentrací signifikantně neaktivuje AhR. Hodnoty luciferázové aktivity testovaných látek se výrazně neliší od negativní kontroly. Jako pozitivní kontrola byl zvolen 2,3,7,8-tetrachlordibenzo- *p*-dioxin (TCDD), který signifikantně zvýšil aktivitu luciferázy a jemuž odpovídala fold induction 121.

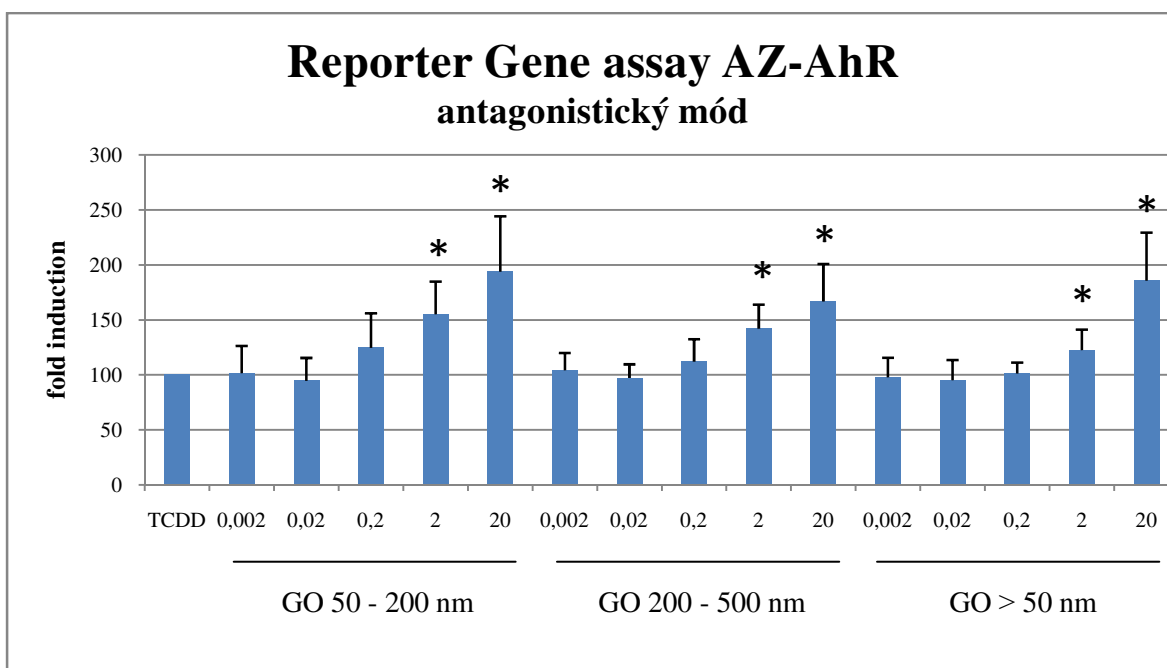


Graf 2: Míra aktivace AhR

Buněčná linie AZ-AhR byla inkubovaná 24 hodin s vybranými látkami o různých koncentracích - DMSO - negativní kontrola, GO (50-200, 200-500 a > 500 nm) o koncentracích 0,002; 0,02; 0,2; 2 a 20 µg/ml, TCDD - pozitivní kontrola. Úroveň transkripční aktivity je vztažena k negativní kontrole, data v grafu jsou vyjádřena jako fold induction. Výsledky jsou získány z pěti na sobě nezávislých experimentů. Hodnoty označené [*] jsou statisticky významně odlišné od hodnoty negativní kontroly (DMSO) (Studentův T-test; $p < 0,05$). 121 - hodnota fold induction pro pozitivní kontrolu.

7.4 Inhibice transkripční aktivity AhR (antagonistický mód)

Jako druhá byla testována schopnost látek ovlivňovat již aktivovaný receptor. V antagonistickém módu vidíme statisticky významný nárůst transkripční aktivity AhR u dvou nejvyšších koncentrací. Procentuálně se jedná o nárůst ve výši 67 % u GO (200-500 nm) o koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$, o 86 % u GO (> 500 nm) o koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ a v případě GO (50-200 nm) o koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ dokonce o 94 %. Hodnoty jsou uváděny jako procenta pozitivní kontroly. Jako pozitivní kontrola byl použit TCDD.



Graf 3 : Míra inhibice AhR

Buněčná linie AZ-AhR byla inkubovaná 24 hodin s vybranými látkami o různých koncentracích - TCDD - pozitivní kontrola, GO (50-200, 200-500 a > 500 nm) o koncentracích 0,002; 0,02; 0,2; 2 a 20 $\mu\text{g/ml}$. Úroveň transkripční aktivity je vztažena k pozitivní kontrole, data v grafu jsou uváděna jako procenta pozitivní kontroly. Výsledky jsou získány z devíti na sobě nezávislých experimentů. Hodnoty označené [*] jsou statisticky významně odlišné od pozitivní kontroly (TCDD) (Studentův T-test; $p < 0,05$).

8. Diskuze

Tato bakalářská práce věnuje značnou pozornost grafen oxidu a tomu jaký má vliv na transkripční aktivitu aryl uhlovodíkového receptoru. AhR zprostředkovává řadu biologických odpovědí na všudypřítomné látky znečišťující životní prostředí a hraje důležitou roli v mnoha fyziologických procesech (Brauze *et al.*, 2017). Je proto důležité sledovat schopnosti látek tento receptor aktivovat, případně inhibovat. Pro testování aryl uhlovodíkové aktivity byly vybrány sloučeniny grafen oxidu o různých koncentracích. Testování probíhalo na buněčné linii AZ-AhR. Také byla stanovena cytotoxicita těchto sloučenin.

Pro stanovení cytotoxicity byly zvolené koncentrace GO následující - 0,002; 0,02; 0,2; 2 a 20 $\mu\text{g/ml}$. Vybrané koncentrace GO nevykazovaly signifikantně významný pokles viability buněčné linie. GO má vysokou afinitu k plazmatické membráně a dokáže způsobit její mechanické poškození již při koncentraci 4 $\mu\text{g/ml}$ (Lammel *et al.*, 2013). Grafen oxidové nanopláty následně proniknou přes membránu do cytosolu, kde se akumulují. Jejich přítomnost je doprovázena zvyšující se úrovní reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), změnami v buněčné ultrastruktuře a změnami metabolické aktivity. Ve velmi nízkých koncentracích nevykazuje GO žádnou toxicitu a může tak představovat atraktivní materiál pro biomedicínské aplikace (Lammel *et al.*, 2013).

Při sledování transkripční aktivity u agonistického módu nedošlo ke zvýšení aktivace Ah receptoru. Statisticky významné zvýšení bylo zaznamenáno pouze u TCDD. Při testování antagonistického módu byly zaznamenány rozmanitější hodnoty. Statisticky významný nárůst byl pozorován o dvou nejvyšších koncentrací GO. U GO (50-200 nm) se jednalo o nárůst dokonce o 94 % oproti TCDD. Podobné výsledky byly zaznamenány i u rybí jaterní buněčné linie PLHC-1 pocházející z živorođenky lesklé (*Poeciliopsis lucida*). Buněčná linie byla vystavena současně působení grafen oxidu a AhR agonisty (β -NF, BkF nebo PCB 169). Při současném působení GO a AhR agonisty byla prokázána vyšší ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) aktivita než u buněk vystavených jenom agonistovi. GO sám EROD aktivitu neindukuje. Hladina EROD aktivity byla vyšší při koncentraci GO 16 $\mu\text{g/ml}$ než při 4 $\mu\text{g/ml}$ u všech agonistů. Buněčná linie PLHC-1 vystavená současně GO a BkF také vykazuje vyšší hladiny exprese mRNA CYP1A než buňky vystaveny BkF samotným. Vliv GO na zesílení exprese CYP1A byl také prokázán na transkripční úrovni. Zvýšení EROD aktivity pozorované v přítomnosti grafenu je spojeno s nárůstem genové exprese CYP1A (Lammel *et al.*, 2014). Výsledky naznačují, že

působení GO nanoplátů může změnit toxikokinetické vlastnosti aromatických polutantů jako jsou PAH a PCB. To vede k podpoření hypotézy, že grafenové nanopláty mohou působit jako tzv. nosiče pro aromatické látky znečišťující životní prostředí (Lammel et al, 2014). Na obou jaterních buněčných liniích (PLHC-1 a AZ-AhR) byly pozorovány podobné výsledky. GO sám transkripční aktivitu Ah receptoru nezvyšuje. Míra aktivace je závislá na koncentraci GO a na přítomnosti agonisty AhR. S rostoucí koncentrací GO se zvyšuje i transkripční aktivita.

Zatím je jen málo známo o přesném mechanismu degradace GO nebo o identitě meziproductů degradace. Nicméně s vzhledem k polyaromatické molekulární struktuře grafenu je možné, že meziproducty vykazují strukturní podobnost s polycyklickými aromatickými uhlovodíky (PAH) a splňují strukturní požadavky vázat se a aktivovat AhR (Lammel *et al.*, 2014). Na základě výsledků můžeme uvažovat o možném účinku GO na polycyklické aromatické uhlovodíky. Je důležité posoudit možné riziko, které může nastat při interakcích nanomateriálů a látek znečišťujících životní prostředí.

9. Závěr

V teoretické části bakalářské práce jsem popsala aryl uhlovodíkový receptor, což je ligandy aktivovaný transkripční faktor. Zaměřila jsem se na jeho strukturu, aktivaci a ligandy. Dále jsem popsala grafen oxid a podrobněji jsem se zmínila o jeho vlastnostech, využití a toxicitě.

V experimentální části jsem sledovala cytotoxicitu grafen oxidu pomocí MTT assay v buněčné linii AZ-AhR, odvozené od lidského hepatocelulárního karcinomu. Transkripční aktivity AhR byla stanovena metodou Reporter Gene assay. V agonistickém módu nevykazovala žádná z látek signifikantní účinky. Pouze TCDD signifikantně zvýšil aktivitu luciferázy. V antagonistickém módu byly zaznamenány statisticky významný nárůst u koncentrací 2 a 20 $\mu\text{g/ml}$ ve srovnání s TCDD samotným.

Cíle práce byly splněny. Byla otestovaná cytotoxicita grafen oxidu i jeho vliv na aktivitu aryluhlovodíkového receptoru. Výsledky ukázaly, že grafen oxid ovlivňuje transkripční aktivitu AhR v přítomnosti jeho agonisty TCDD.

10. Literatura

Anzenbacher, P., Zanger, U. M. (2012): *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*. Wiley-VCH Verlag GmbH. ISBN: 9783527329038

Beischlag, T. V., Morales, J. L., Hollingshead, B. D., Perdew G. H. (2008): The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex and the Control of Gene Expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 18(3): 207–250.

Brauz, D., Zawierucha, P., Kiwerska, K., Bednarek, K., Oleszak, M., Rydzanicz, M., Jarmuz-Szymczak, M. (2017): Induction of expression of aryl hydrocarbon receptor-dependent genes in human HepaRG cell line modified by shRNA and treated with β -naphthoflavone. *Mol Cell Biochem.* 425(1): 59–75.

Busbee, P. B., Rouse, M., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P. S. (2014): Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders. *Nutr Rev.* 71(6): 353–369.

Denison, M. S., Soshilov, A. A., He, G., DeGroot, D. E., Zhao B. (2011): Exactly the Same but Different: Promiscuity and Diversity in the Molecular Mechanisms of Action of the Aryl Hydrocarbon (Dioxin) Receptor. *Toxicol Sci.* 124(1): 1–22.

Farre, M, Gajda-Schranz, K, Kantiani, L, Barcelo, D. (2009). Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393(1):81-95.

Gurunathan, S., Kim, J. (2016): Synthesis, toxicity, biocompatibility, and biomedical applications of graphene and graphene-related materials. *Int J Nanomedicine.* 11: 1927–1945.

Heuvel, J. P. V., Lucier G. (1993): Environmental toxicology of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. *Environ Health Perspect.* 100: 189–200.

Hummers W. S. Jr., Offeman R. E. (1958): Preparation of Graphitic Oxide. *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80 (6), pp 1339–1339

Chung, C., Kim, Y. K., Shin, D., Ryoo, S. R., Hong, B. H., Min, D. H. (2013): Biomedical applications of graphene and graphene oxide. *Acc Chem Res.* 15;46(10):2211-24.

Jarosz, A., Skoda, M., Dudek, I., Szukiewicz, D. (2016): Oxidative Stress and Mitochondrial Activation as the Main Mechanisms Underlying Graphene Toxicity against Human Cancer Cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2016: 5851035.

Jaworski, S., Sawosz, E., Grodzik, M., Winnicka, A., Prasek, M., Wierzbicki, M., Chwalibog, M. (2013): In vitro evaluation of the effects of graphene platelets on glioblastoma multiforme cells. *Int J Nanomedicine.* 8: 413–420.

Jiang, Y., Wang, K., Fang, R., Zheng, J. (2010): Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor in Human Placentas and Fetal Tissues. *J Histochem Cytochem.* 58(8): 679–685.

Jones, S. (2004): An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol.* 5(6): 226.

Kluková, Ľ., Bertók, T., Tkáč, J. (2014): Vlastnosti a elektrochemické využití grafénu. *Chem. Listy* 108, 653–659 (2014)

Lammel, T., Boisseaux, P., Fernández-Cruz, M., L. (2013): Internalization and cytotoxicity of graphene oxide and carboxyl graphene nanoplatelets in the human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2. *Part Fibre Toxicol.* 2013; 10: 27.

Lammel, T., Boisseaux, P., Navas, J. M. (2014): Potentiating effect of graphene nanomaterials on aromatic environmental pollutant-induced cytochrome P450 1A expression in the topminnow fish hepatoma cell line PLHC-1. *Environ Toxicol.* 30(10):1192-204

Nguyen, L. P., Bradfield, CH. A. (2008): The Search for Endogenous Activators of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Chem Res Toxicol.* 21(1): 102–116.

Novotná, A., Pavěk, P., Dvořák, Z. (2011): Novel stably transfected gene reporter human hepatoma cell line for assessment of aryl hydrocarbon receptor transcriptional activity: construction and characterization. *Environ Sci Technol.* 45(23):10133-9

Pandini, A., Denison, M. S., Song, Y., Soshilov, A. A., Bonati, L. (2010): Structural and Functional Characterization of the Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Binding Domain by Homology Modeling and Mutational Analysis. *Biochemistry.* 23; 46(3): 696–708.

Seabra, A. B., Paula, A. J., de Lima, R., Alves, O. L., Durán, N., (2014): Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. *Chem Res Toxicol.* 17;27(2):159-68.

Shen, H., Zhang, L., Liu, M., Zhang, Z. (2012): Biomedical Applications of Graphene. *Theranostics.* 2(3): 283-294.

Tuppurainen, K., Asikainen A., Ruokojärvi P., Ruuskanen, J. (2003): Perspectives on the formation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans during municipal solid waste (MSW) incineration and other combustion processes. *Environ. Sci. Technol.* 36:652–658.

Vrzal, R., Ulrichová, J., Dvořák, Z. (2004): Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions. *Biomed. Papers.* 148(1), 3-10

Wang, EN, Karnik, R. (2012). Water desalination: Graphene cleans up water. *Nature Nanotechnology* 7(9):552-554.

Westwell, A.D. (2014): The therapeutic potential of aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonists in anticancer drug development. *Environ Health Perspect.* 29(5): 479

Wu, D., Potluri, N., Kim, Y., Rastinejad, F. (2013): Structure and Dimerization Properties of the Aryl Hydrocarbon Receptor PAS-A Domain. *Mol Cell Biol.* 33(21): 4346–4356.

Wu, S., An, S. S. A., Hulme J. (2015): Current applications of graphene oxide in nanomedicine. *Int J Nanomedicine.* 10(Spec Iss): 9–24.

Xu, CH., Li, CH. Y. L., Kong, A. N. T. (2004): Induction Of Phase I, II a III Drug Metabolism/Transport by Xenobiotics. *Pharm Res.* Vol 28, No 3, 249-268.

11. Seznam použitých zkratek

AhR	= aryl uhlovodíkový receptor
AhRC	= aryl uhlovodíkový komplex
AHRR	= aryl uhlovodíkový receptorový represor
ARNT	= aryl uhlovodíkový nukleární translokátor
AZ-AhR	= buněčná linie odvozená od hepatocelulárního karcinomu
bHLH	= basic helix-loop-helix
BkF	= benzo(k)fluoranthen
CO ₂	= oxid uhličitý
CYP	= cytochrom P450
dH ₂ O	= deionizovaná voda
DMEM	= Dulbecco's Modified Eafle's Medium
DMSO	= dimethylsulfoxid
DNA	= deoxyribonukleová kyselina
DRE	= dioxinový responzivní element
EROD	= ethoxyresorufin-O-deethylase
GO	= grafen oxid
GST	= glutathion -S- transferáza
HepG2	= buněčná linie odvozená od hepatocelulárního karcinomu
Hsp90	= protein teplotního šoku
LBD	= ligand vázající doména
mRNA	= mediátorová ribonukleová kyselina
MTT	= methyltetrazoliová sůl
NADPH	= nikotinamidadeninukleotidfosfát - redukována forma
p23	= ko-chaperon pro Hsp90
PAH	= polycyklické aromatické uhlovodíky
PAS	= Per-ARNT-Sim doména
PBS	= fosfátový pufr
PCB 169	= 3, 30, 4, 40, 5, 50-hexachlorobifenyl
PCB	= polychlorované bifenyly
PCDD	= polychlorované dibenzo - p - dioxiny
PCDF	= dibenzofurany
PLHC-1	= rybí jaterní linie

ROS	= reaktivní kyslíkové radikály
TCDD	= 2,3,7,8-tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
UGR	= UDP-glukuronosyltransferáza
XAP 2	= aryl hydrocarbon receptor interacting protein
XRE	= xenobiotický responzivní element
β-NF	= β-naftoflavon