

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

## **Vliv subchronické inhalace nanočástic PbO na cílové orgány**

*The effect of subchronic inhalation  
of lead oxid nanoparticles on target organs*

**Tereza Smutná**

Jihomoravský kraj

Brno 2018

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

# **Vliv subchronické inhalace nanočástic PbO na cílové orgány**

*The effect of subchronic inhalation  
of lead oxid nanoparticles on target organs*

**Autor:** Tereza Smutná  
**Škola:** Gymnázium Brno-Řečkovice, p. o.  
Terezy Novákové 2  
621 00 Brno  
Jihomoravský kraj  
**Konzultanti:** doc. RNDr. Marcela Buchtová, Ph.D.  
RNDr. Kateřina Cibulková  
**Obor:** 04 Biologie

**Brno 2018**

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem práci s názvem „Vliv subchronické inhalace nanočástic PbO na cílové orgány“ vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Marcely Buchtové, Ph.D. a použila jsem pouze podklady (literaturu a další informační zdroje) uvedené v seznamu.

Dále prohlašuji, že tištěná i elektronická verze práce jsou shodné a nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Brně dne 9. 2. 2018

Podpis:.....



**ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ FYZIOLOGIE A GENETIKY**

AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY

Laboratoř molekulární morfogeneze

## **Poděkování:**

Mé velké poděkování patří paní doc. RNDr. Marcele Buchtové, Ph.D. za vedení mojí práce, odbornou pomoc, vstřícný přístup, nekonečnou trpělivost a možnost vypracovat práci na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky.

Ráda bych také poděkovala Ing. Lucii Vrlíkové za neocenitelnou pomoc v laboratoři při histologickém zpracování materiálu, osobní přístup a množství času, které mi věnovala. Dále děkuji panu Bc. Michaelovi Killingerovi za cenné poznatky a pomoc při analýze genové exprese. V neposlední řadě děkuji celému kolektivu pracovníků ÚŽFG AV ČR za vytvoření příjemných pracovních podmínek.

Děkuji také paní MUDr. Janě Dumkové za pomoc při analýze patologických změn, cenné rady ohledně histologie a korekturu práce.

Mé poděkování pak patří také paní RNDr. Kateřině Cibulkové za pomoc při sestavování formální stránky práce, věcné připomínky a především za podporu při zpracování SOČ.

Tato práce byla vypracována za finanční podpory Grantové agentury České republiky (GAČR P503/11/2315).



## Abstrakt

Nanočástice (NPs) mají velký potenciál využití v mnoha odvětvích lidské činnosti, nicméně nově publikované studie varují před jejich možným toxickým vlivem na živé organismy. I přes tato varování ale koncentrace nanočástic v životním prostředí neustále roste. Kromě nanočástic, které jsou syntetizovány za účelem různých aplikací, jsou do životního prostředí ve vysokých koncentracích emitovány nanočástice vznikající jako nežádoucí produkty četných průmyslových procesů. Tyto nanočástice se významně podílejí na znečištění ovzduší a představují tak potenciální riziko pro živé organismy. Tato práce se zabývá vlivem inhalace nanočástic PbO, které jsou do prostředí emitovány při vysokoteplotních průmyslových procesech, na primární a sekundární cílové orgány laboratorní myši.

Myši samice umístěné do celotělových inhalačních klecí byly vystaveny nanočásticím PbO o přibližné koncentraci  $10^6$  částic/cm<sup>3</sup> po dobu 6 nebo 11 týdnů (24 hodin denně, 7 dní v týdnu). Na konci inhalačních experimentů byly cílové orgány (plíce, játra, ledviny, mozek a slezina) zváženy a odebrány pro histopatologické, histochemické, imunohistochemické, imunofluorescenční analýzy a pro studium genové exprese.

Histopatologická analýza plic exponovaných jedinců prokázala chronický zánět plicní tkáně. V játrech způsobila inhalace nanočástic PbO steatohepatitidu a remodelaci jaterního parenchymu. Šestitýdenní inhalace NPs PbO překvapivě nezpůsobila žádné signifikantní mikroskopické defekty v ledvinách. Patologické změny v tkáni ledvin jsme prokázali až po jedenáctitýdenní expozici nanočásticím PbO. V mozku byly signifikantní mikroskopické defekty lokalizovány pouze v hippokampální oblasti. Po inhalaci nanočástic PbO byly pozorovány nekrotické neurony v pyramidové vrstvě Ammonova rohu a spongiformní změny bílé hmoty v okolí hippokampu. Ve slezině nebyly zaznamenány žádné signifikantní mikroskopické defekty, byl pouze pozorován vyšší počet megakaryocytů a megakaryoblastů.

Naše studie prokázala, že inhalované nanočástice PbO přestupují přes plicní bariéru a krví jsou distribuovány do dalších tkání a orgánů, kde způsobují četné patologické změny. Dlouhodobá expozice těmto částicím tedy může vést k vážným zdravotním potížím. V dnešní době stále se zvyšujícího množství nanočástic olova v životním prostředí bude tak nezbytné se zaměřit na snížení produkovaných průmyslových emisí.

**Klíčová slova:** nanočástice, PbO, inhalace, plíce, játra, ledviny, mozek, slezina

## Abstract

Nanoparticles (NPs) have an enormous potential of use in various fields; however, recently published studies warn against their possible toxic effect on living organisms. Despite this warnings, the concentration of nanoparticles is constantly increasing in the environment. In addition to nanoparticles synthesized for industrial applications, nanoparticles are emitted in high concentrations to the environment as an unwanted results of numerous processes associated with engineering. These nanoparticles significantly contribute to air pollution and represent a potential risk to living organisms. Our study is focused on the effect of inhalation of lead oxide nanoparticles, which are emitted to the environment by high temperature technological processes, on primary and secondary target organs in laboratory mice.

Female mice were placed into whole body inhalation chambers and continuously exposed to lead oxide nanoparticles with an average concentration  $10^6$  particles/cm<sup>3</sup> for 6 or 11 weeks (24 hours/day, 7 days/week). At the end of the exposure periods, target organs (lung, liver, kidney, brain and spleen) were weighted and collected for histopathological, histochemical, immunohistochemical, immunofluorescent analysis and for the study of gene expression.

The histopathological analysis of PbO-exposed lung revealed a chronic inflammation of lung tissues. In liver, the inhalation of PbO nanoparticles caused steatohepatitis and the remodeling of liver parenchyma. There were surprisingly not observed any significant microscopic defects in kidney after 6<sup>th</sup> week inhalation of PbO NPs. We demonstrated pathological changes only after 11<sup>th</sup> week exposure to PbO nanoparticles. In brain, significant microscopic defects were located just in the hippocampal areas. We observed the presence of necrotic neurons in the pyramidal layer of Ammon's horn and spongiform changes in white matter surrounding the hippocampus after exposure to PbO NPs. There were not observed any significant changes in spleen, only the amount of megakaryocytes was slightly increased.

Our study determined the passage of lead oxide nanoparticles through lung barrier and their distribution via blood into the secondary target organs where they caused numerous pathological changes. Therefore, the long-term expositions to these nanoparticles can initiate serious health problems. Because of increasing amount of the nanoparticles in the environment, it will be necessary to regulate the production of industrial emissions in future.

**Key words:** nanoparticles, lead oxide, inhalation, lung, liver, kidney, brain, spleen

## Seznam používaných zkratek

Ab	protilátka ( <i>Antibody</i> )
ABC	avidin-biotinový komplex ( <i>Avidin-Biotin Complex</i> )
Ag	antigen ( <i>antigen</i> )
APAAP	alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza ( <i>Alkaline Phosphatase-Anti-Alkaline Phosphatase</i> )
ATPáza	adenosin trifosfatáza ( <i>Adenosine Triphosphatase</i> )
BrdU	bromodeoxyuridin ( <i>Bromodeoxyuridine</i> )
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina ( <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> )
CT	Cycle Treshold
DAB	diaminobenzen ( <i>Diaminobenzene</i> )
DNA	deoxyribonukleová kyselina ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
HE	hematoxylin-eosin ( <i>haematoxilin-eosin</i> )
IF	imunofluorescence ( <i>immunofluorescence</i> )
Ig	imunoglobulin ( <i>immunoglobulin</i> )
IHC	imunohistochemie ( <i>immunohistochemistry</i> )
LFB	barvení luxolovou modří ( <i>Luxol Fast Blue</i> )
mRNA	mediátorová RNA ( <i>messenger RNA</i> )
NF	neurofilamenta ( <i>neurofilaments</i> )
NF-M	střední podjednotka neurofilament ( <i>neurofilaments-medium</i> )
NFκB	nukleární faktor kappa B ( <i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-enhancer of activated B cells</i> ) nebo také <i>Nuclear Factor Kappa B</i> )
NFκB1	nukleární faktor kappa B 1 ( <i>Nuclear Factor Kappa B Subunit 1</i> )
NFκB2	nukleární faktor kappa B 2 ( <i>Nuclear Factor Kappa B Subunit 2</i> )
NPs	nanočástice ( <i>nanoparticles</i> )
PAP	peroxidáza-anti-peroxidáza ( <i>Peroxidase-Anti-Peroxidase</i> )
PAS	PAS reakce ( <i>Periodic Acid Schiff</i> )
PbO	oxid olovnatý ( <i>lead oxide</i> )
PBS	fosfátový pufr ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCNA	jaderný antigen proliferujících buněk ( <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i> )
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PFA	paraformaldehyd ( <i>Paraformaldehyde</i> )
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce ( <i>quantitative polymerase chain reaction</i> )
rpm	počet otáček za minutu ( <i>rounds per minute</i> )
SOX	SRY – (Sex determinant region Y)-boxes
SOX2	SRY – (Sex determinant region Y)-BOX 2
SOX9	SRY – (Sex determinant region Y)-BOX 9
TdT	terminální deoxynukleotidyl transferáza ( <i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase</i> )
TUNEL	<u>T</u> erminal <u>D</u> eoxynucleotidyl <u>T</u> ransferase <u>d</u> UTP <u>N</u> ick <u>E</u> nd <u>L</u> abeling

## OBSAH:

1	ÚVOD .....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	10
2.1	Nanočástice .....	10
2.2	Olovo .....	10
2.3	Nanočástice olova .....	12
2.4	Histologická stavba orgánů .....	12
2.4.1	Plíce .....	12
2.4.2	Játra .....	15
2.4.3	Ledviny .....	16
2.4.4	Mozek .....	18
2.4.5	Slezina .....	21
3	CÍLE PRÁCE .....	23
4	MATERIÁL A METODY .....	24
4.1	Probandi .....	24
4.2	Experimentální design .....	24
4.3	Odběr vzorků .....	25
4.4	Histologické zpracování .....	25
4.5	Přehledné metody histologického barvení .....	26
4.5.1	Barvení hematoxylinem-eosinem .....	26
4.6	Speciální metody histologického barvení .....	27
4.6.1	Barvení zeleným trichromem .....	27
4.6.2	Barvení luxolovou modří .....	27
4.6.3	PAS reakce .....	28
4.7	Imunohistochemické metody .....	28
4.7.1	PCNA .....	30
4.7.2	Rodina SOX genů .....	30
4.7.2.1	SOX2 .....	31
4.7.3	Neurofilamenta .....	31
4.7.4	Detekce vybraných markerů .....	31
4.8	Imunofluorescenční metody .....	32
4.8.1	SOX9 .....	33
4.8.2	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPáza .....	34
4.8.3	Detekce vybraných markerů .....	34
4.9	Metoda TUNEL .....	35
4.9.1	Detekce TUNEL-pozitivních buněk .....	36
4.10	Analýza genové exprese .....	37
4.10.1	NFκB rodina a protein NFκB1 .....	37
4.10.2	Izolace mRNA .....	37
4.10.3	Reverzní transkripce .....	38
4.10.4	qPCR .....	39
5	VÝSLEDKY .....	41

5.1	Analýzy váhy orgánů na konci inhalačních experimentů.....	41
5.1.1	Plíce.....	41
5.1.2	Játra.....	42
5.1.3	Ledviny.....	43
5.1.4	Mozek.....	43
5.1.5	Slezina.....	44
5.2	Plíce – brána pro nanočástice.....	45
5.2.1	Šestitýdenní inhalace nanočástic PbO.....	45
5.2.2	Jedenáctitýdenní inhalace nanočástic PbO.....	48
5.3	Játra – sídlo detoxikačních a metabolických funkcí.....	51
5.3.1	Šestitýdenní inhalace nanočástic PbO.....	51
5.3.2	Jedenáctitýdenní inhalace nanočástic PbO.....	53
5.4	Ledviny – orgán filtrace krve.....	56
5.4.1	Šestitýdenní inhalace nanočástic PbO.....	56
5.4.2	Jedenáctitýdenní inhalace nanočástic PbO.....	59
5.5	Mozek – řídicí centrum nervové soustavy.....	62
5.5.1	Šestitýdenní inhalace nanočástic PbO.....	62
5.5.2	Jedenáctitýdenní inhalace nanočástic PbO.....	65
5.6	Slezina – místo zániku erytrocytů.....	67
5.6.1	Šestitýdenní inhalace nanočástic PbO.....	67
5.6.2	Jedenáctitýdenní inhalace nanočástic PbO.....	68
6	DISKUZE.....	70
7	ZÁVĚR.....	79
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	80
9	SEZNAM POUŽITÝCH INTERNETOVÝCH ZDROJŮ.....	90

# 1 ÚVOD

Nanotechnologie je vědní oblast, která se zabývá praktickým využitím takových materiálů, jejichž struktura je tvořena částicemi velikosti v řádu nanometrů (Buzea et al., 2007). Využití nanomateriálů je v dnešní době rozsáhlé, své uplatnění nacházejí v elektronice, medicíně, kosmetice, farmaceutické výrobě, potravinářství, stavebnictví, strojírenství, textilním průmyslu a mnoha dalších odvětvích (Nowack et al., 2007; Skřehot and Rupová, 2011).

Jelikož zájem o nanotechnologie celosvětově stále více roste, přirozeně dochází k nárůstu nanočástic v životním prostředí a zvyšuje se tak pravděpodobnost jejich vlivu na živé organismy. Ruku v ruce se syntézou stále nových nanostruktur se postupně začaly objevovat první toxikologické studie poukazující na negativní vliv nanočástic na lidské zdraví (Buzea et al., 2007; Maynard et al., 2006; Net et al., 2006). Předpokládá se, že jsou to právě významně odlišné a specifické vlastnosti nanomateriálů, které spolu s jejich chemickým složením zodpovídají za odlišný toxický účinek a toxikokinetiku (absorpce, distribuce nebo eliminace v organismu) ve srovnání s většími ekvivalenty (Nel et al., 2006).

Jako reakce na prvotní studie o toxicitě nanočástic začal v posledních několika desetiletích stoupat rovněž počet odborných pracovišť, která se zabývají negativním vlivem nanočástic na živé organismy (Maynard et al., 2006). K této skutečnosti přispěly zejména nové poznatky o množství generovaných nanočástic v důsledku průmyslové činnosti, zhoršující se zdravotní stav obyvatel znečištěných oblastí a také snaha o komplexní výzkum v poli nanotechnologií (Danihelka, 2010).

Ani česká vědecká obec nezůstává v tomto pozadu. Již několik let jsou pořádány vědecké konference jako je Nano či NANOCON, a vznikají nová specializovaná centra pro výzkum nanomateriálů, např. v Praze, Brně, Olomouci či Ostravě (Skřehot and Rupová, 2011).

Tato práce je součástí brněnského projektu s názvem „Centrum toxických studií nanočástic“, na kterém spolupracuje Ústav živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky, v.v.i., Ústav analytické chemie Akademie věd České republiky, v.v.i. a také Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Projekt se zabývá toxickým vlivem inhalovaných aerosolů obsahujících nanočástice oxidů kovů (jako je PbO, CdO, ZnO či MnO) na živé organismy.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Nanočástice

Již od počátku evoluce byly všechny živé organismy vystavovány vlivu nanočástic, které vznikaly při řadě spalovacích procesů, jako jsou lesní požáry či sopečná činnost. Ovšem začátkem průmyslové revoluce se počet nanočástic unikajících do ovzduší dramaticky zvýšil a poté dále rapidně vzrostl s objevem nanotechnologie (Maynard et al., 2006).

Jako nanočástice (NPs) označujeme takové objekty, u nichž se alespoň jeden rozměr pohybuje v rozmezí od 1 nm do 100 nm (Borm et al., 2006). Toxicita různých nanočástic není stejná, závisí na mnoha faktorech, mezi které například patří jejich velikost, tvar či povrchové vlastnosti (Skřehot and Rupová, 2011). Četné studie prokazují, že menší částice představují pro organismus daleko vyšší riziko, než jejich větší ekvivalenty (Li et al., 2003; Oberdorster, 2001).

Kromě vlastních parametrů NPs hraje roli při míře jejich toxicity i způsob, jakým nanočástice do organismu vniknou. Mezi hlavní cesty vstupu nanočástic do organismu patří inhalace, ingesce a dermální vstup. Z expozičních cest je nejpravděpodobnější a v současnosti nejstudovanější inhalační vniknutí NPs, neboť problém znečištěného ovzduší je celosvětový a plíce také představují nejefektivnější primární bránu pro jejich vstup (Casals et al., 2008). Z plic se nanočástice přes krevní oběh rychle dostávají do celého těla a způsobují tak poškození mnohých dalších orgánů (Dumková et al., 2016; Hoet et al., 2004; Oberdorster, 2001).

Nanočástice můžeme obecně dělit na ty, které vznikají jako nežádoucí produkty průmyslových procesů (jako jsou např. spalovací procesy), a na nanočástice uměle připravené pro určité aplikace. Právě nanočástice vzniklé jako nežádoucí produkty se významně podílejí na znečištění životního prostředí (Maynard et al., 2006). V tomto projektu jsme se zaměřili na vliv inhalace nanočástic, které jsou do prostředí emitovány především jako vedlejší produkty průmyslové výroby.

### 2.2 Olovo

Olovo (Pb) je pevný chemický prvek IV. A skupiny s atomovým číslem 82, který řadíme mezi těžké kovy. V přírodě se ve sloučeninách vyskytuje s mocenstvím  $Pb^{2+}$  a  $Pb^{4+}$  (Greenwood and Earnshaw, 1993). Olovo jako těžký kov, který nemá zjevnou biologickou funkci, patří mezi celosvětově přítomné polutanty s největší toxikologickou databází. K jeho uvolňování dochází jak přírodní cestou, například z různých minerálů, tak převážně v důsledku lidské činnosti (Grandjean, 2010; Papanikolaou et al., 2005).

Toxicita olova je známa již řadu let, ale přesto je i v dnešní době stále hojně využíváno například při výrobě akumulátorů, různých slitin nebo střeliva. Olovo se dále používá jako konstrukční materiál v chemickém průmyslu či jako součást ochranných obleků proti RTG záření (Greenwood and Earnshaw, 1993). Hlavním zdrojem olova ve vzduchu jsou spalovací procesy, doprava nebo spalování fosilních paliv a odpadů. Olovo je také nedílnou součástí cigaretového kouře. V pracovním prostředí se lidé do kontaktu s olovem nejvíce dostanou při jeho tavení nebo při recyklaci baterií. V některých lokalitách jsou zdrojem znečištění životního prostředí tímto kovem olovené hutě a doly (Papanikolaou et al., 2005).

Olovo vniká do organismu inhalací malých částic, přes kůži či prostřednictvím trávicího traktu požitím kontaminované potravy nebo vody (Casals et al., 2008). Po vstupu do organismu jedince zůstává kov v krvi navázaný na červené krvinky nebo je distribuován do měkkých tkání a kostí, kde se ukládá (Qu et al., 2002; Toscano and Guilarte, 2005).

Toxicita olova je již řadu let podrobně studována a řadíme jej mezi nejznámější toxikanty pocházející z pracovního prostředí. Četné studie demonstrují vliv olova na funkci ledvin či na nervový a reprodukční systém (Papanikolaou et al., 2005; Ware, 1993). Bylo dokázáno, že akutní expozice olovem může vést k dysfunkci proximálních tubulů v ledvině a chronické vystavení olovu může mít za následek četné intersticiální fibrózy či způsobovat nevratné nefropatie (Loghman-Adham, 1998). Další epidemiologické studie prokazují spojitost mezi otravou olovem a zvýšeným množstvím potratů u žen. Expozice tímto těžkým kovem může také ovlivnit intrauterinní vývoj plodu, jelikož olovo může přecházet z krevního řečiště matky přes placentu (Emory et al., 1999; Silbergeld, 1991; Al-Saleh et al., 2011). Nervový systém je jedním z hlavních cílů pro četné cizorodé látky z životního prostředí, mezi které řadíme i olovo. Nejohroženější skupinou při otravě olovem jsou v tomto případě děti, neboť jejich vyvíjející se nervová soustava patří mezi nejcitlivější. Studie prokazují spojitost otravy olovem se snížením inteligence, nárůstem poruch chování a pozornosti, zhoršením školního prospěchu a častěji diagnostikovanými poruchami motoriky a koordinace (Grandjean, 2010; Toscano and Guilarte, 2005; Ware, 1993). U pracovníků, kteří byly vystaveni vlivu olova, byla navíc pozorována změna rychlosti vedení nervového vzruchu a ovlivnění sensorického vnímání (Oszlanczi et al., 2010). Olovo také může nahrazovat vápník v kostech, ve kterých nakonec dochází k jeho kumulaci (Grandjean, 2010; Hu, 1998). Otrava tímto kovem může být dále jedním z možných faktorů ovlivňujících vznik karcinomu plic a ledvin (Grandjean, 2010; Churg and Wiggs, 1984; Yacobi et al., 2001).



## 2.3 Nanočástice olova

Nanočástice olova se vyskytují v různých sloučeninách. Kromě nanočástic, které obsahují čisté Pb, se můžeme setkat například s nanočásticemi PbO či PbS (Bai et al., 2008).

NPs Pb se využívají zejména v elektrochemickém průmyslu například jako polovodiče v LED diodách, infračervené detektory, aditiva do mazacích olejů aj. Je zřejmé, že nanočástice olova již nyní nacházejí mnohá uplatnění a je tedy velice pravděpodobné, že se s nimi v okolním prostředí budeme setkávat stále častěji. Jejich rostoucí produkce tedy může znamenat vyšší možnost vystavení se těmto nanočásticím. Riziko hrozí zejména pak u zaměstnanců, kteří se na výrobě předmětů obsahujících NPs budou podílet. Nanočástice olova se dále mohou do prostředí dostávat při spalovacích procesech v motorových vozidlech, při spalování odpadů nebo z olověných hutí a dolů (Li et al., 2003; Zhao et al., 2004).

Zatímco negativní účinky olova jsou již řadu let známy, vliv nanočástic olova není dodnes dobře objasněn. Nezpochybnitelné je, že mohou představovat vážné ohrožení pro lidské zdraví právě díky své velikosti a specifickým vlastnostem, které jim umožňují snadný přestup přes buněčné membrány (Dumková et al., 2016; Hoet et al., 2004; Li et al., 2003).

V naší studii jsme se zaměřili na vliv inhalace nanočástic PbO, které jsou do prostředí emitovány během vysokoteplotních procesů v průmyslové výrobě. Experimentální design studie byl navržen tak, aby podmínky co nejpřesněji odpovídaly reálné situaci při expozici nanočásticím. Pokusní jedinci byly umístěni do celotělových inhalačních komor, kde se koncentrace NPs ve vzduchu pohybovala v rozmezí přibližně 120-190  $\mu\text{g PbO}/\text{m}^3$ .

Koncentrace nanočástic v inhalovaném vzduchu byla v našem experimentu srovnatelná s množstvím, se kterým se často setkávají pracovníci v oblastech zpracovávajících olověné produkty (URL 1), obyvatelé průmyslových oblastí nebo lidé žijící v megaměstech, zejména v Číně a Indii (Gurjar et al., 2016; Huang et al., 2013).

## 2.4 Histologická stavba orgánů

### 2.4.1 Plíce

Plíce (*pulmo*, *pulmones*) jsou párové orgány jehlanovitého tvaru, v nichž probíhá výměna plynů mezi okolním vzduchem a krví. Pravá lidská plíce se skládá ze tří laloků na rozdíl od levé, která má pouze laloky dva, což souvisí s topografií srdce (Horký and Čech, 2014). Myši plíce mají celkově také pět plicních laloků, přičemž pravá plíce se skládá ze čtyř, oproti

levé, která je jednolaločná. Mikroskopická stavba myších plic je velice podobná lidským plicím, patrně jsou jen drobné rozdíly, které jsou zmíněné dále v textu (Nejedlý, 1965).

Plicní laloky se dělí na plicní segmenty, které mají svoji vlastní ventilaci a krvení (Dylevský, 2007). Pro myši plíce je typická přítomnost kardiomyocytů ve stěnách plicních cév (Mueller-Hoecker et al., 2008). Plíce jsou tvořeny dvěma hlavními oddíly. První z nich je tvořen intrapulmonálním větvením dýchacích cest (*arbor bronchialis*), druhý oddíl obsahuje vlastní část sloužící k respiraci (*arbor alveolaris*). Větvení bronchů až po terminální bronchioly náleží k prvnímu oddílu, k *arbor alveolaris* patří úseky obsahující alveoly (Grim et al., 2005).

Dvě hlavní průdušky (*bronchi principales*) vznikají bifurkací průdušnice (*trachea*), a dále se v plicích mnohonásobně dělí do takzvaného bronchiálního stromu. Bronchiální strom se skládá z lobárních bronchů (*bronchi lobares*) ústících do jednotlivých plicních laloků, a segmentových bronchů (*bronchi segmentales*), jež vstupují do jednotlivých anatomicky určených složek laloků zvaných plicní segmenty. Segmentové bronchy se v plicích dále mnohonásobně dělí a nakonec jsou zakončeny průdušinkami (Dylevský, 2007).

Stěny hlavních průdušek jsou tvořeny podkovovitými chrupavkami, které zajišťují stálý tvar a zachování volného průsvitu bronchů i při dýchacích pohybech. Zadní (u zvířat horní) část podkovovitých chrupavek je tvořena vazivem, které taktéž navzájem spojuje jednotlivé chrupavky. U lalokových a menších bronchů je stěna tvořena nepravidelně rozmístěnými podkovitými chrupavkami, které jsou proměnlivě umístěny okolo stěny. Chrupavčitá složka stěny se postupně s dalším bronchiálním větvením ztenčuje až je nakonec plně redukována (Dylevský, 2007). U myši jsou podkovovité chrupavky obsažené pouze ve stěně extrapulmonálních bronchů, stěny intrapulmonálních bronchů již chrupavky zcela postrádají (Scudamore, 2014). Ve stěně průdušek se spolu s vazivem nachází množství hladké svaloviny, která u bronchů s menším průsvitem slouží zejména jako náhrada chrupavčité výztuhy (Dylevský, 2007). Vnitřní stěny bronchů jsou vystlány sliznicí krytou cylindrickým řasinkovým epitelem, který obsahuje pohárkové buňky<sup>1</sup>. Ve slizničním vazivu bronchů se taktéž nachází četné smíšené seromucinózní žlázy ústící krátkými vývody na povrch sliznice, a lymfatické uzlíky (Junqueira and Carneiro, 2005). Sekret pohárkových buněk, žlázek a pohyb řasinek dohromady představují jeden z nejdůležitějších ochranných mechanismů, který slouží k odstraňování vdechnutých nečistot (Kopecký et al., 2010).

---

<sup>1</sup> Epitelové žlázové cylindrické buňky, jejichž funkcí je produkce mucinu (Junqueira and Carneiro, 2005).

Průdušinky (*bronchioli*) jsou malé průdušky, které vznikly opakovaným větvením nejmenších segmentových bronchů. Posledním úsekem bronchiálního stromu jsou terminální průdušinky (*bronchioli terminales*). Bronchioly již nemají stěny tvořené chrupavčitou výztuhou, ale obsahují zesílenou vrstvu síťovitě uspořádané hladké svaloviny a hojná elastická vlákna. Jsou vystlány dvouřadým a v dalších úsecích jednořadým kubickým řasinkovým epitelem. V epitelu bronchiolů se vyskytují četné tzv. Clarovy buňky<sup>2</sup> (Grim et al., 2005).

Terminální bronchioly se dále dělí na respirační průdušinky (*bronchioli respiratorii*), na které navazují alveolární chodbičky zakončené předsíní (atrium). Stěna respiračních bronchiolů je tvořena vrstvou kolagenního vaziva s elastickými vlákny a snopečky buněk hladké svaloviny. Stěny jsou uvnitř vystlány nízkým jednovrstevným kubickým až dlaždicovým epitelem s řasinkami. Na respirační bronchioly ojedinele mohou u člověka navazovat rovnou plicní sklípky (Horký and Čech, 2014). Běžně však z atria vystupují plicní váčky (*saculli alveolares*), z jejichž stěn se pak vyklenují plicní sklípky (*alveoli pulmonis*) (Čihák et al., 2013). Myš na rozdíl od člověka respirační průdušinky nemá. Na terminální průdušinky tedy už navazují alveolární chodbičky (Scudamore, 2014).

Plicní sklípky jsou tenkostěnné váčky, které na sebe navzájem těsně naléhají. Stěny sousedních alveolů splývají v tenké přepážky, což vytváří dojem síťového vzhledu plic. Alveoly jsou na své vnitřní straně vystlány respiračním epitelem, který je tvořen dvěma typy pneumocytů – membranózními pneumocyty (pneumocyty I. typu) a sekrečními pneumocyty (pneumocyty II. typu) (Čihák et al., 2013).

Membranózní pneumocyty jsou velmi tenké buňky plicní tkáně, které od jádra vybíhají v extrémně plochou periferní část, a tvoří vnitřní výstelku alveolů. Pneumocyty I. typu se diferencují z pneumocytů II. typu, které tak představují pro membranózní pneumocyty progenitorové buňky (Čihák et al., 2013).

Sekreční pneumocyty (či také granulární pneumocyty nebo septální buňky) jsou buňky oválného nebo kubického tvaru, které jsou nepravidelně roztroušeny mezi membranózními pneumocyty. Nejčastěji se nachází na okraji septa dvou sklípků. Sekreční pneumocyty obsahují ve své cytoplasmě četná lamelózní tělíska s přítomností mukopolysacharidů, fosfolipidů a bílkovin. Obsah těchto tělísek je vylučován na povrch pneumocytů a tvoří základ pro materiál, který pokrývá vnitřní povrch plicních sklípků. Tento dvouvrstevný ultratenký film, označovaný jako surfaktant<sup>3</sup> nebo také jako výstelkový komplex, snižuje povrchové napětí na plochých

---

<sup>2</sup> Buňky bez řasinek, jejichž funkcí je zejména vylučování glykosaminoglykanů (Grim et al., 2005).

<sup>3</sup> Z anglického „surface-active agent“ (Čihák et al., 2013).

membranózních pneumocytech a zabraňuje tak kolapsu alveolů, ke kterému by došlo díky tendenci plochých buněk se smrštit a tím zmenšit svůj povrch (Čihák et al., 2013).

Jednotlivé plicní sklípky jsou od sebe odděleny septy, která jsou tvořena pneumocyty a sítí kolagenních vláken. Obsahují také četné kapiláry, které zajišťují výměnu plynů mezi alveoly a krví. Mezi jednotlivými septy se vyskytují drobné alveolární póry, které propojují jednotlivé sklípky a slouží k vyrovnávání tlaku mezi sousedícími alveoly (Grim et al., 2005).

## 2.4.2 Játra

Játra (*hepar*) jsou největší žlázou v těle člověka i laboratorní myši. Myší játra jsou velice podobné mikroskopické stavby jako játra lidská (Čihák et al., 2013; Nejedlý, 1965).

Játra jsou pokryta tenkým vazivovým obalem tvořeným kolagenními vlákny, který se nazývá Glissonovo pouzdro. Kolagenní vazivo se zhušťuje v oblasti jaterní branky. Ta slouží k průchodu útvarů, které vstupují a vystupují z jater. Jedná se především o vrátnicovou žílu, jaterní tepnu a žlučovody. Tento orgán je tvořen specifickou žlázovou tkání, která se označuje jako jaterní parenchym. Parenchym je tvořený převážně hepatocyty (Horký and Čech, 2014).

Jednotlivé jaterní laloky se skládají z lalůček, které mají tvar nepravidelného mnohostěnu. Lalůčky tvoří základní morfologické jednotky žlázového parenchymu a jsou tvořeny trámci jaterních buněk, které jsou paprscitě uspořádané okolo centrální žíly. Lalůčky jsou od sebe nezřetelně ohraničeny, pouze v místě, kde se stýká lalůček více, vzniká malý prostor (portobiliární prostor) vyplněný řídkým vazivem, ve kterém probíhá interlobulární tepna, žíla i žlučovod<sup>4</sup>. V ose každého lalůčku probíhá centrální vena, která sbírá krev z jaterních sinusoid. Jednotlivé trámce se skládají ze dvou řad těsně k sobě přiložených jaterních buněk. Mezi trámci probíhají jaterní sinusoidy (Horký and Čech, 2014).

Hepatocyty jsou buňky polygonálního tvaru. Mají kulovité jádro, často bývají dvoujaderné. Jaterní buňky se vyznačují vysokou metabolickou aktivitou, s čímž souvisí velké množství organel i jejich velikost. Typická je také přítomnost četných inkluzí v cytoplasmě, která souvisí s metabolickou funkcí hepatocytů. Kontaktní plochy mezi jednotlivými hepatocyty jsou převážně hladké, pouze v místě odstupu žlučových kapilár a na straně přivrácené k sinusoidám jsou vytvořeny mikrokly. Každý hepatocyt má díky svému řazení v trámcích dva póly. Pól přivrácený k sinusoidě tvoří krevní pól buňky. V oblasti mezi buňkami pak začínají intrahepatické žlučové cesty. Hepatocyty vylučují žluč do žlučových kapilár, které

---

<sup>4</sup> Označováno jako Glissonova triáda (*trias hepatis*) (Horký and Čech, 2014).

probíhají mezi jednotlivými buňkami trámce. Kapiláry se dále spojují ve vývody o stále větším průměru, až nakonec splynou v pravý a levý žlučovod (Horký and Čech, 2014).

Jaterní sinusoidy jsou vlasečnice, které vytvářejí v lalůčcích hustou kapilární síť. Mezi trámcem v lalůčcích probíhají radiálně ke středu, kde ústí do centrální vény. Mezi trámcem a stěnou sinusoidy je vytvořen úzký perisinusoidální prostor (Disseho prostor), do kterého jaterní buňky vysílají své mikroklky. Stěna sinusoid je tvořena endotelovými buňkami nepravidelného tvaru, mezi kterými se vyskytují Kupfferovy buňky. Kupfferovy buňky jsou makrofágy hvězdicovitého tvaru s bohatě členěným povrchem, které jsou roztroušené mezi endotelovými buňkami sinusoid (Horký and Čech, 2014).

Endotelové buňky obsahují na svém vnitřním i do perisinusoidálního prostoru obráceném povrchu četné mikroklky, které slouží k transportu látek z krve do hepatocytů a naopak (Horký and Čech, 2014). Vedle jaterních buněk jsou na okraji trámců uloženy méně četné Itovy buňky, které slouží k ukládání lipidů a vitamínu A (Čihák et al., 2013).

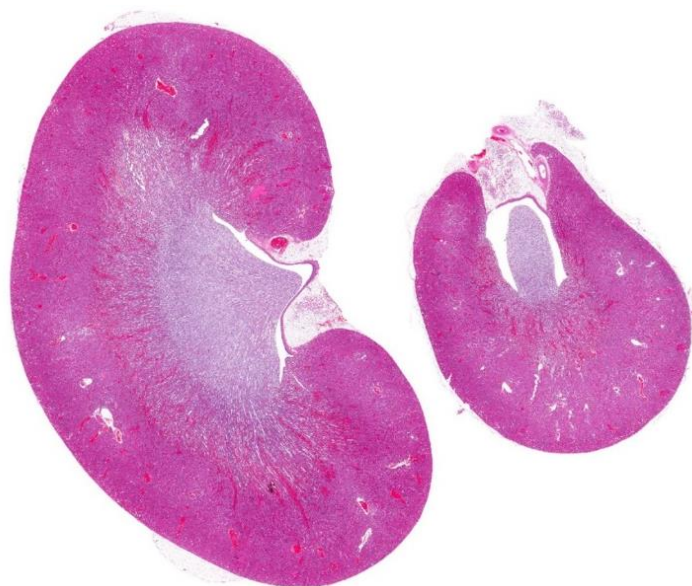
### 2.4.3 Ledviny

Ledvina (*ren, renis*) je párovým orgánem červenohnědé barvy a fazolovitého tvaru. Povrch ledviny kryje tenké vazivové pouzdro, které ojediněle obsahuje buňky hladké svaloviny. Ledvinový parenchym je tvořen dvěma hlavními složkami – kůrou a dřemí. Mikroskopická stavba myší ledviny je velice podobná stavbě ledviny lidské. Případné rozdíly jsou zdůrazněny dále v textu (Grim et al., 2005; Nejedlý, 1965).

Kůra ledviny (*cortex renalis*) je uložena těsně pod vazivovým pouzdem. Dřemí ledviny (*medulla renalis*) člověka je tvořena z ledvinových pyramid, jejichž hroty (papily) vyčnívají do kalichů ledvinové pánvičky, a báze jsou obráceny směrem k povrchu (Lüllmann-Rauch, 2012). U myši pak tvoří dřemí souvislou vrstvu vyčníhající pouze v jedinou dřemňovou papilu (Obr. č. 1; strana 17), která ústí do ledvinové pánvičky (Scudamore, 2014).

Renální tepny se po vstupu do ledviny mnohonásobně dělí na stále drobnější větve, které vstupují do kůry. V ledvinové kůře z tepen odstupují aferentní arterioly, které přivádějí krev do renálních tělísek. Krev z tělísek odvádí eferentní arterioly (Konrádová et al., 2005).

Základní mikroskopickou stavební a funkční jednotkou ledviny je nefron. Každý nefron je tvořen odvodnou a přivodnou cévou, ledvinovým tělískem (Malpighiho tělísko) a ledvinovými kanálky (Konrádová et al., 2005).



*Obr. č. 1: Longitudinální (vlevo) a příčný (vpravo) řez myší ledvinou (barevno HE)*

Malpighiho tělíska jsou vždy uložena v kůře. Skládají se z klubička kapilár (glomerulus), které je obklopeno dvouvrstevným Bowmanovým pouzdrém. Zevní (parietální) list pouzdra je tvořen jednovrstevným dlaždicovým epitelem a vnitřní (viscerální) list, který obklopuje kapiláry, se skládá z podocytů. Mezi oběma listy se nachází Bowmanův prostor, kam je filtrována primární moč (Lüllmann-Rauch, 2012). Pro myši je charakteristický pohlavní dimorfismus ve stavbě parietálního listu. Zatímco u samic je epitel typicky jednovrstevný dlaždicový, u samců může být jednovrstevný dlaždicový i kubický (Scudamore, 2014).

Na Bowmanovo pouzdro navazuje systém ledvinových kanálků, který zahrnuje proximální, intermediární (Henleova klička) a distální tubuly napojující se na sběrné kanálky (Lüllmann-Rauch, 2012).

Proximální tubulus v kůře navazuje na močový pól Bowmanova pouzdra. Je tvořen jednovrstevným kubickým epitelem s výrazným kartáčovým lemem na povrchu buněk. Tento tubulus se skládá ze stočeného úseku nacházejícího se v kůře v blízkosti Bowmanova pouzdra, a přímé části, která se nachází výhradně ve dřeni (Horký and Čech, 2014).

Na proximální tubulus navazuje tubulus intermediální, jinak také nazývaný jako Henleova klička. Tubulus má tvar písmene U a skládá se ze sestupného a vzestupného raménka. Henleova klička sestupuje různě hluboko do dřene, kde se otáčí a vrací se do kůry, kde v blízkosti příslušného Malpighiho tělíska navazuje na distální tubulus (Lüllmann-Rauch, 2012). Podle výšky epitelu a průměru kanálků rozdělujeme části Henleovy kličky na úzký

a široký segment. Úzký segment intermediálního tubulu je tvořen plochým jednovrstevným epitelem. Široký segment tvoří jednovrstevný kubický epitel (Konrádová et al., 2005).

Na vzestupné raménko Henleovy kličky navazuje v kůře distální tubulus, který se opět skládá z přímé a stočené části, a nachází se výhradně v kůře. Zevní průměr distálního tubulu je menší než u proximálního tubulu, ale vnitřní lumen je naopak větší. Stěny distálního tubulu jsou tvořeny malými buňkami jednovrstevného kubického epitelu, které na svém povrchu mají pouze ojedinelé mikrokly, kartáčový lem chybí (je dobře zřetelné lumen). Na přímém průřezu distálním kanálkem tedy nacházíme ohraničené lumen, které také ve srovnání s proximálním tubulem obsahuje více jader, což souvisí s menší velikostí buněk (Konrádová et al., 2005).

Z distálních tubulů ústí moč do sběracích kanálků. Výška epitelu a průměr kanálků se sestupem směrem k ledvinové pánvičce zvyšuje. Lumen je ostře ohraničeno stejně jako u distálních tubulů. Sběrací kanálky jsou nejprve tvořeny jednovrstevným kubickým epitelem, který postupně přechází v epitel cylindrický. Sběrací kanálky ústí do ledvinových kalichů přecházejících do ledvinové pánvičky (Horký and Čech, 2014).

#### 2.4.4 Mozek

Mozek<sup>5</sup> (*cerebrum, encephalon*) je orgán sloužící jako řídicí a organizační centrum nervové soustavy. Společně s míchou (*medulla spinalis*) řadíme mozek k centrální nervové soustavě (CNS). Obecná mikroskopická stavba mozku člověka a myši je podobná, případné odlišnosti jsou uvedeny dále v textu (Butler and Hodos, 2005; Čihák et al., 2016).

Nervová tkáň je tvořena dvěma typy buněk – neurony a gliovými buňkami. Převažujícím elementem v CNS jsou gliové buňky (neuroglie), které zabezpečují především stabilitu vnitřního prostředí a výživu neuronů (Lüllmann-Rauch, 2012).

Neurony (neurocyty) jsou základní stavební a funkční jednotkou nervové tkáně. Tyto nervové buňky se skládají z buněčného těla (soma, perikaryon) a dvou typů funkčně diferenciovaných výběžků – dendritů a axonů (neuritů). Perikaryon zahrnuje tělo s jádrem. Z buněčného těla pak vystupuje zpravidla několik dendritů a jeden axon (Čihák et al., 2016).

Dendrity jsou krátké výběžky, které vedou informace do buňky. Jejich povrch není kryt myelinovou pochvou. Axon je dlouhý výběžek specializovaný pro přenos nervových vzruchů. Místo výstupu axonu z perikarya se nazývá axonový hrbol. U myelinizovaných neuronů

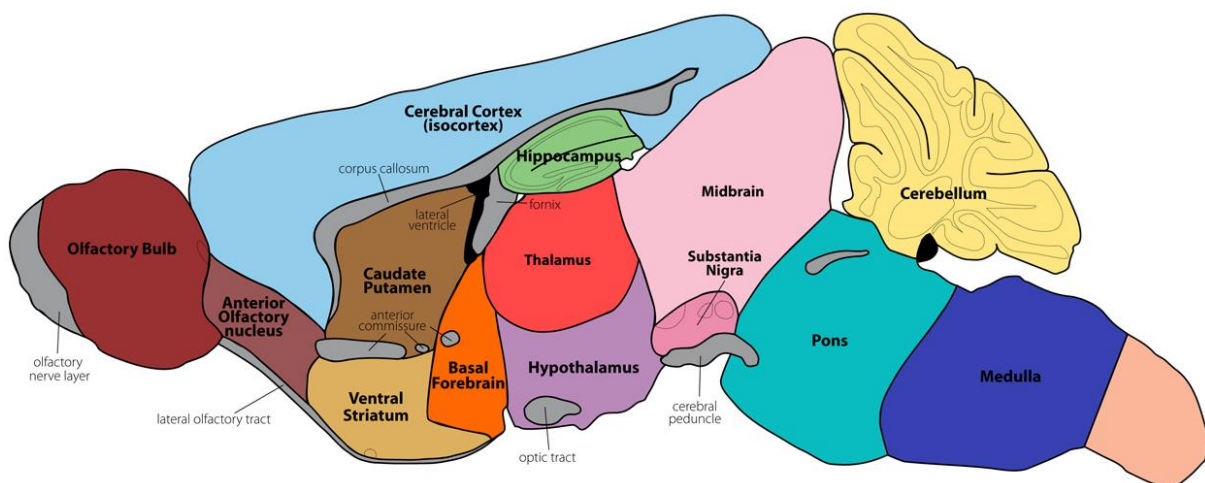
---

<sup>5</sup> V experimentu jsme se rozhodli zjistit vliv nanočástic PbO na mozek, ale vzhledem k jeho složitosti bude v kapitole popsána jen struktura hippokampu, neboť toxický efekt jsme pozorovali zejména v této části mozku. Ostatní části mozku zde z tohoto důvodu budou zmíněny jen okrajově.

přechází hrbol ještě v krátký iniciální segment, za kterým teprve myelinová pochva začíná obklopotvat axon. V CNS vzniká myelin činností oligodendrocytů (typ gliových buněk). Myelinová pochva je po celé délce rozdělena na segmenty, které jsou v pravidelných intervalech odděleny tzv. Ranvierovými zářezy (Lüllmann-Rauch, 2012).

V mozku a míše rozlišujeme makroskopicky dva typy tkáně – bílou a šedou hmotu. Bílá hmota se skládá především z myelinizovaných axonů. Šedá hmota je bohatá zejména na perikarya neuronů. Prostor mezi neurony vyplňuje tzv. neuropil, který tvoří nejobjemnější část šedé hmoty. Neuropil obsahuje zejména dendrity, nemyelizované části axonů, gliové buňky s jejich výběžky a bohatou síť krevních kapilár (Druga et al., 2011).

V plně diferencovaném mozku rozlišujeme 5 základních částí – koncový mozek (*telencephalon*), mezimozek (*diencephalon*), střední mozek (*mesencephalon*), zadní mozek (*metencephalon*) a prodlouženou míchu (*myelencephalon*; *medulla oblongata*) (Druga et al., 2011). Toto uspořádání je typické pro všechny savce (Butler and Hodos, 2005), včetně myši (viz Obr. č. 2 nebo Obr. č. 3; strana 20).

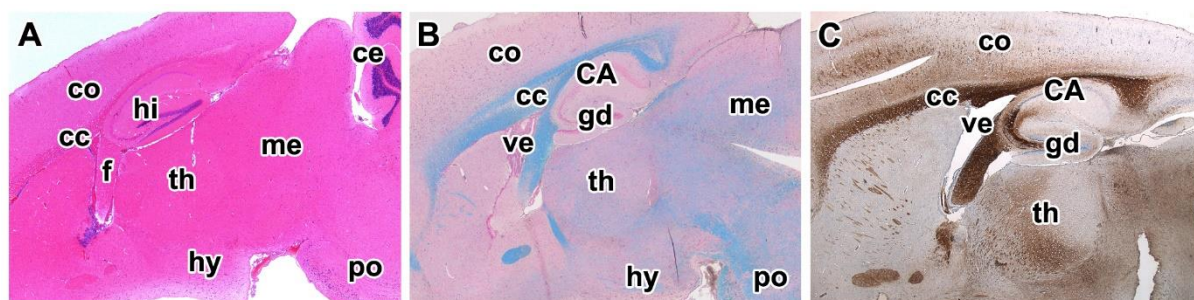


Obr. č. 2: Schéma znázorňující jednotlivé oblasti myšního mozku (longitudinální řez)

Koncový mozek je složen ze dvou hemisfér, které jsou propojeny prostřednictvím kalózního tělesa (*corpus callosum*). Na porchu hemisfér je šedá mozková kůra (plášť), která je zbrázděna množstvím rýh (*sulci*) oddělujících jednotlivé mozkové závitky (*gyri*), čímž u člověka dochází ke gyrifikaci mozku (Druga et al., 2011). U myši ke gyrifikaci nedochází a mozek se označuje jako lissencephalický (hladký) (Butler and Hodos, 2005). Uvnitř hemisfér se nachází bílá hmota, ve které jsou uloženy okrsky šedé hmoty – bazální ganglia (Druga et al., 2011).



Některé části koncového mozku jsou součástí tzv. limbického systému. V případě limbického systému se nejedná o samostatný systém, ale o vzájemně propojené oblasti šedé hmoty, které jsou součástí mezimozku, středního mozku a koncového mozku. Limbický systém je spjat s emočními reakcemi, sociálním chováním, sexuálními projevy či péčí o potomstvo. Rovněž se výrazně podílí na procesech krátkodobé a dlouhodobé paměti (Čihák et al., 2016).

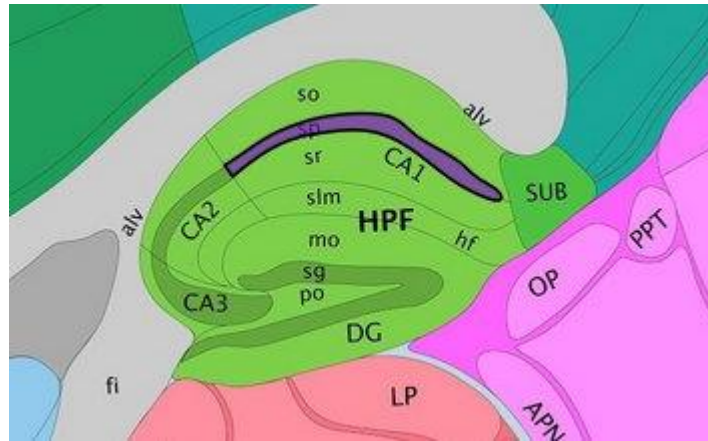


Obr. č. 3: Mikroskopická struktura myšího mozku (longitudinální řez)

Stavba myšího mozku na longitudinálních řezech po barvení hematoxylinem-eosinem (A), luxolovou modří (B) a po imunohistochemické detekci neurofilament (C).

CA – cornu Ammonis, cc – corpus callosum, ce – mozeček, co – mozková kůra, f – fornix, gd – gyrus dentatus, hi – hippokampus, hy – hypothalamus, me – střední mozek, po – Varolův most, th – thalamus, ve – postranní mozková komora.

Hippokampus (viz Obr. č. 4; strana 21) je důležitou oblastí koncového mozku, kterou řadíme i mezi části limbického systému. U myši k hippokampální formaci řadíme Ammonův roh (CA; cornu Ammonis), gyrus dentatus a subiculum (Martin, 2003). Ammonův roh tvoří postupně *stratum oriens*, *stratum pyramidale* a *stratum radiatum*. Ve *stratum pyramidale* jsou lokalizovaná perikarya neuronů. Cornu Ammonis dále členíme do několika polí, která jsou označována jako CA1, CA2 a CA3. Gyrus dentatus je stejně jako Ammonův roh trojvrstevný. Rozlišujeme u něj polyformní vrstvu, *stratum granulosum* s jádry neuronů a *stratum moleculare*. Hranici mezi těmito dvěma strukturami tvoří tzv. *stratum lacunosum-moleculare*. Tato vrstva je někdy považována za čtvrtou vrstvu Ammonova rohu (Andersen et al., 2003).



Obr. č. 4: Schéma znázorňující oblasti myšního hippocampu (longitudinální řez)

**HPF – hippocampální formace:** CA1 – cornu Ammonis 1, CA2 – cornu Ammonis 2, CA3 – cornu Ammonis 3, dg – gyrus dentatus, fi – fornix, mo – stratum moleculare, po – polyformní vrstva, sg – stratum granulosum, slm – stratum lacunosum-moleculare, so – stratum oriens, sp – stratum pyramidale, sr – stratum radiatum, sub – subiculum.

Hippokampus hraje důležitou roli při ukládání informací z krátkodobé do dlouhodobé paměti, při prostorové orientaci a je také asociován s emočními projevy. Při narušení jeho funkce dochází k vážným poruchám paměti. Hippokampus je jedna z prvních struktur v mozku lidí, která je poškozena při Alzheimerově chorobě (Hampel et al., 2008), při nedostatku kyslíku (Liu et al., 2004) nebo při zánětech mozkových blan (Hofer et al., 2011).

#### 2.4.5 Slezina

Slezina (*lien*) je největším periferním opouzdrěným orgánem lymfatického systému, tvoří největší akumulaci lymfatické tkáně v organismu. Je zapojena do krevní cirkulace podobným způsobem jako lymfatické uzliny do mízního oběhu. Lidská slezina má tvar kávového zrna, zatímco u myši je její tvar jazykovitý s trojúhelníkovitým průřezem. Mikroskopická stavba myší sleziny je až na malé odlišnosti velmi podobná stavbě lidské sleziny (Grim et al., 2016; Nejedlý, 1965).

Slezina je tvořena vazivem a parenchymem, který se dělí na bílou a červenou pulpu. Kolagenní vazivo tvoří na povrchu sleziny tuhé pouzdro. Z vazivového pouzdra po celém obvodu odstupují směrem do sleziny vazivové pruhy (trabekuly). Krev do sleziny přivádí *arteria lienalis*, která do sleziny vstupuje v oblasti hilu, a její větve (*arteriae trabeculares*) dále pokračují do trabekul. Z arterií odstupují tenké větve (*arteriae centrales*), které přecházejí z trabekul do bílé pulpy. Centrální arterie se po výstupu z bílé pulpy mnohonásobně dělí na arterioly (*arterioly penicillatae*), které se nacházejí v červené pulpě (Horký and Čech, 2014).

Bílá pulpa obklopuje na způsob pouzdra centrální arterie od jejich výstupu z trabekul až po jejich větvení v tenké arterioly. Její stroma je tvořeno retikulárním vazivem, ve kterém jsou obsaženy četné volné buňky – makrofágy, dendritické buňky a B- či T-lymfocyty. Bílou pulpu můžeme rozdělit na tři složky, a to na periarteriální lymfatickou pochvu (PALS), lymfatické folikuly (uzlíky) a na marginální zónu (Horký and Čech, 2014).

Periarteriální lymfatická pochva je tzv. thymodependentní oblastí, která obsahuje převážně T-lymfocyty. PALS se místy ztlušťuje v lymfatické uzlíky, kde se vyskytují zejména B-lymfocyty. Na rozhraní mezi červenou a bílou pulpou se nachází marginální zóna, která obsahuje B-lymfocyty, makrofágy a dendritické buňky. Marginální zóna spolu s lymfatickými uzlíky dohromady tvoří tzv. periferní bílou pulpu (Konrádová et al., 2005).

Červená pulpa tvoří většinu parenchymu sleziny. Skládá se z Billrothových provazců a venózních sinusů. Billrothovy provazce jsou tvořeny retikulárním vazivem s četným zastoupením makrofágů, lymfocytů, granulocytů a erytrocytů. Mezi provazci probíhají venózní sinusy. Jsou tvořeny protáhlými endotelovými buňkami, mezi kterými jsou úzké prostory umožňující výměnu látek a především krevních elementů mezi krví a pulpou sleziny. V okolí sinusů se hojně vyskytují makrofágy, které jsou schopny pronikat mezi endotelovými buňkami a cirkulovat tak mezi pulpou a krví (Horký and Čech, 2014).

Slezina plní v organismu řadu důležitých funkcí. Je součástí imunitního systému a zastává funkci lymfopoetického orgánu. Ke tvorbě lymfocytů dochází v bílé pulpě, ty následně přecházejí do červené pulpy a sinusy jsou vypuzeny do krevního oběhu. Ve slezině jsou také vychytávány cizorodé antigeny z krve lymfatickými uzlíky či makrofágy. Přítomnost antigenů způsobí aktivaci přítomných B-lymfocytů, které proliferují a diferencují do plazmatických buněk produkujících protilátky. Přítomné makrofágy plní taktéž imunitní funkci, fagocytózou čistí a filtrují krev protékající slezinou (Lüllmann-Rauch, 2012).

Významnou funkcí sleziny je odbourávání poškozených a starých erytrocytů. Destrukce červených krvinek probíhá v červené pulpě, kde jsou erytrocyty zadrženy a fagocytovány přítomnými makrofágy (Horký and Čech, 2014).

U myši ve slezině, na rozdíl od člověka, probíhá navíc trombopoéza, tedy vznik krevních destiček. Krevní destičky jsou fragmenty cytoplasmy megakaryocytů, které se nacházejí v pulpě myši sleziny (Nakorn et al., 2003). Spolu s kostní dření (a játry) je myší slezina také místem erytropoézy (Scudamore, 2014).

### 3 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce je posoudit vliv inhalace nanočástic PbO na živé organismy s využitím modelového organismu – laboratorní myši.

Náš projekt si klade za úkol tyto konkrétní dílčí cíle:

- stanovit histopatologické změny v cílových orgánech (plíce, játra, ledviny, mozek, slezina) po inhalaci nanočástic PbO
- porovnat vliv inhalace nanočástic PbO na tyto orgány ve dvou časových intervalech, a to po šestitýdenní a jedenáctitýdenní inhalaci NPs PbO
- s využitím selektivních histochemických metod provést analýzu změn v množství kolagenních vláken, glykogenu v játrech a myelinu v mozku
- stanovit změny v buněčné dynamice (proliferace buněk a apoptóza) cílových orgánů pomocí imunohistochemické detekce proteinu PCNA a metody TUNEL
- imunohistochemicky analyzovat neurofilamenta a provést porovnání v jejich expresi v jednotlivých částech mozku
- imunofluorescenčními metodami určit změny v expresi Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy a v množství progenitorových buněk s využitím detekce faktorů SOX2 nebo SOX9
- provést analýzu změn genové exprese NFκB1 pomocí qPCR v plicích a ledvinách

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Probandi

V této práci byla pro analýzu jako modelový organismus použita outbrední linie myši laboratorní ICR (CD-1). Experimenty byly provedeny v souladu s etickým zákonem Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky (no. 081/2010; 29. 3. 2010).

Myši samice o průměrné hmotnosti do 24 g byly obdrženy z Masarykovy univerzity (Brno, Česká republika). Jedinci byly pro aklimatizaci ponechány 1 týden před začátkem experimentů v laboratorních podmínkách. Krmivo a voda byly poskytovány dle libosti.

### 4.2 Experimentální design

Příprava nanočástic PbO probíhala ve spolupráci s Ústavem analytické chemie AV ČR, v.v.i. s využitím odpařovacího-oxidačního-kondenzačního postupu při teplotě 830°C.

Inhalační komora obsahovala 4 inhalační klece (viz Obr. č. 5). Stálé parametry vzduchu (teplota, relativní vlhkost a tlak), který proudil přes inhalační klec, byly udržovány pomocí klimatizace a zaznamenávány v jednominutových intervalech. Osvětlení bylo nastaveno na 12 hodin světla a 12 hodin tmy. V klecích byl taktéž po celou dobu všech experimentů umístěn kamerový systém, který monitoroval chování a zdravotní stav jedinců.



*Obr. č. 5: Inhalační komora na Ústavu analytické chemie*

V práci byla analyzována data ze čtyř inhalačních experimentů. Jednalo se o dva experimenty trvající 6 týdnů a dva trvající 11 týdnů. V každém inhalačním experimentu bylo sledováno 5 kontrolních a 5 experimentálních myší (informace o probandech v jednotlivých inhalačních experimentech viz Přílohy, kapitola 11.1).

Experimentální myši samice byly po týdenní aklimatizaci v inhalačních klecích vystaveny působení nanočástic oxidu olovnatého 24 hodin denně, 7 dní v týdnu po dobu šesti nebo jedenácti týdnů. Koncentrace nanočástic PbO v inhalovaném vzduchu se ve všech experimentech pohybovala kolem hodnoty  $10^6$  částic/cm<sup>3</sup>. Vzhledem ke skutečnosti, že při generování nanočástic není možné vždy nastavit naprosto stejné podmínky, charakteristika nanočástic a jejich koncentrace se v jednotlivých nezávislých experimentech nepatrně lišily, a tedy byly stanovovány pro každý z experimentů zvlášť (více viz Přílohy, kapitola 11.1).

Kontrolní myši byly taktéž umístěny do klecí, kde inhalovaly stejný vzduch jako exponované myši, ale bez přítomnosti nanočástic PbO.

### **4.3 Odběr vzorků**

Po ukončení inhalačních pokusů byly vždy z každé exponované i kontrolní myši odebrány cílové orgány (plíce, játra, ledviny, mozek a slezina). Usmrcení jedinců bylo provedeno pomocí cervikální dislokace v souladu s projektem pokusů 214/2011 dle vyhlášky č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat.

Cílové orgány byly opatrně vyjmuty z myšního těla a jejich hmotnost byla zjištěna na analytických váhách (s váživostí do 200 g a přesností na 0,0001 g).

Části orgánů určené pro tvorbu parafinových řezů byly odebrány do 10% roztoku paraformaldehydu a vzorky určené pro analýzu genové exprese byly uloženy při teplotě - 80°C.

### **4.4 Histologické zpracování**

Odebrané vzorky orgánů určené pro histologickou analýzu jsou nejprve uloženy na 24 hodin v 10 % roztoku paraformaldehydu, čímž dojde k fixaci tkáně a k zabránění autolýze buněk. Dalším krokem je vyprání vzorků ve vodě po dobu 2 hodin. Poté následuje vzestupná alkoholová řada, která slouží k odvodnění tkáně. Orgány uložené v tkáňovém bločku postupně promýváme 30%, 50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% roztokem ethanolu, kdy je tkáň v každé koncentraci ponechána 2 hodiny. Pokračujeme prosycením třemi lázněmi xylenů po

2 hodinách. Dále před zalitím tkáně do konečného parafínu musíme orgány prosytit třemi za sebou jdoucími lázněmi parafínu (v každé lázni je tkáň opět ponechána 2 hodiny).

V dalším kroku následuje samotné zalití vzorků do čistého parafínu na zalévací stanici. Vzorek vyjmeme z tkáňového bločku, vložíme do zalévací formy a přelijeme rozeřtým parafínem o teplotě 56°C. Pomocí laboratorních jehel naorientujeme daný orgán do správné polohy, poté přikryjeme víčkem a necháme při pokojové teplotě tuhnout 24 hodin. Poté vzorky uložíme v lednici.

Následujícím krokem je krájení vzorků na rotačním mikrotomu. Začneme s odřezáním přebytečného parafínu okolo vzorku tak, aby vznikla pyramida s orgánem uprostřed. Poté vzorky připevníme na mikrotom a krájíme na řezy o tloušťce 5 µm, které následně vkládáme do vodní lázně o teplotě 39°C, kde dojde k narovnání a vyhlazení řezů. Následně řezy „nalovíme“ na podložní sklíčka a necháme uschnout na ploténce temperované na teplotu 38°C. Skla dále vložíme do termostatu na 12 hodin, poté uchováváme v lednici.

Informace o použitých roztocích a pufrech viz Přílohy, kapitoly 11.3 a 11.4.

## 4.5 Přehledné metody histologického barvení

### 4.5.1 Barvení hematoxylinem-eosinem

Histologická barviva dělíme na zásaditá, která barví jádra buněk, a kyselá, barvící buněčnou cytoplasmu. Nejpoužívanějším zásaditým barvivem je v dnešní době hematoxylin a kyselým eosin (Vacek, 1995).

**Postup** – Prvním krokem je odparafinování vzorků, které provádíme pomocí dvou lázní s xylenem po 10 minutách. Následuje zavodnění tkáně, kdy vložíme sklíčka do 96 % alkoholu na dobu 10 minut a poté na stejnou dobu do druhé kádinky s alkoholem. Poté sklíčka vyndáme a krátce opláchneme ve vodě. V následujícím kroku dochází k barvení jader pomocí hematoxylinu. Sklíčka vložíme do kádinky s Mayerovým hematoxylinem, kde je ponecháme 5 minut. Poté je opláchneme v teplé vodě a 5 minut je necháme modrat. Dalším krokem je barvení cytoplasmy buněk pomocí eosinu, které probíhá 3 minuty. Následně sklíčka se vzorky krátce opláchneme ve vodě. Pokračujeme odvodněním tkáně, což je stejný proces jako při zavodňování, tedy dvakrát 10 minut v 96 % alkoholu. Poté pro projasnění sklíčka vložíme do dvou lázní xyleny po 10 minutách. Nakonec preparáty zamontujeme – vzorky zakápneme montovacím médiem a přikryjeme krycím sklem.

**Výsledek** – Jádra buněk jsou zbarvena modrofialově, cytoplasmata většinou růžově.

## 4.6 Speciální metody histologického barvení

### 4.6.1 Barvení zeleným trichromem

Barvení zeleným trichromem patří mezi tzv. barvení Massonovými trichromy. Toto barvení se užívá zejména při znázornění kolagenního vaziva (Vacek, 1995).

**Postup** – Řezy odparafinujeme pomocí dvou lázní xylenu po 10 minutách a zavodníme v 96 % alkoholu, kdy sklíčka dvakrát vložíme do dvou lázní na 10 minut. Následně řezy vypereme ve vodě a 5 minut barvíme jádra pomocí Weigertova železitého hematoxylinu (roztok A smísíme s roztokem B v poměru 1:1). Dále sklíčka opláchneme ve vodě a za kontroly v mikroskopu diferencujeme v kyselém ethanolu. Dalším krokem je oplach pod tekoucí vodou po dobu 5 minut a oplach destilovanou vodou. Následně vzorky barvíme 5 minut ve směsi ponceau – kyselý fuchsin (roztok A smísíme s roztokem B v poměru 1:1) a po uplynutí stanovené doby diferencujeme v 1% roztoku kyseliny fosfowolframové. Dále 6 minut barvíme roztokem světlé zeleně a oranže G a poté opláchneme destilovanou vodou, kterou okyselíme několika kapkami kyseliny octové. Vzorky nakonec zamontujeme montovacím médiem.

**Výsledek** – Jádra buněk jsou obarvena modře, svalstvo červeně a vazivo zeleně.

### 4.6.2 Barvení luxolovou modří

Barvení luxolovou modří (LFB) je metoda, která se běžně používá ke znázornění myelinových pochev. Myelinové pochvy jsou elektricky izolující obaly axonů (Vacek, 1995).

**Postup** – Řezy odparafinujeme ve dvou lázních xylenu po 10 minutách a poté vložíme dvakrát na 10 minut do 96 % alkoholu, kde dojde k zavodnění. Následně vzorky opláchneme v destilované vodě a vložíme do 0,1% roztoku luxolové modří. Řezy v roztoku ponecháme po dobu 5 hodin při teplotě 57°C. Poté opláchneme 70% ethanolem a následně destilovanou vodou. Pokračujeme diferenciací v 0,05% roztoku uhličitanu vápenatého po dobu 2 minut. Opět opláchneme v destilované vodě a pro dobarvení jader vložíme na 5 minut do jádrové červeně. Poté opakovaně opláchneme v destilované vodě. Pokračujeme odvodněním tkáně ve dvou lázních s ethanolem. V každé lázni vzorky ponecháme 10 minut. Poté pro projasnění vložíme do dvou lázní xylenu po 10 minutách a zamontujeme montovacím médiem.

**Výsledek** – Myelinová vlákna jsou zbarvena modře, neuropil růžově a perikarya neuronů tmavě růžově.



### 4.6.3 PAS reakce

PAS reakce<sup>6</sup> je reakcí k zobrazení polysacharidů, mezi které řadíme i glykogen. Podstatou PAS reakce je oxidace polysacharidů kyselinou jodistou, při které vznikají aldehydy. Aldehydy následně reagují se Schiffovým reagens za vzniku nové komplexní sloučeniny fialově červeného zbarvení (Vacek, 1995).

**Postup** – Řezy odparafinujeme ve dvou lázních xylenu po 10 minutách a dvakrát po dobu 10 minut zavodníme v 96% ethanolu. Následně vzorky opláchneme 70% ethanolom a oxidujeme 5 minut v kyselině jodisté. Pokračujeme oplachem řezů v 70% ethanolu a redukcí 1 minutu v redukční lázni. Následně opláchneme 70% ethanolom a přeneseme do Schiffova reagens, kde je ponecháme 20 minut. Dále řezy vypíráme 10 minut pod tekoucí vodou. V dalším kroku barvíme 5 minut jádra buněk v Mayerově hematoxylinu. Pokračujeme odvodněním ve dvou lázních 96% ethanolu po 10 minutách. Následně sklíčka s řezy pro projasnění vložíme dvakrát do xylenu na 10 minut. Zakončíme zamontováním do montovacího média.

**Výsledek** – Jádra buněk jsou zbarvena modře, PAS-pozitivní substance (glykogen, neutrální mukopolysacharidy, mukoproteiny) jsou zbarveny fialově červeně.

## 4.7 Imunohistochemické metody

Imunohistochemie (IHC) je technika barvení histologických preparátů, která umožňuje znázornit přítomnost jedné konkrétní látky pomocí specifických protilátek. Základem je vazba molekul protilátky s antigeny ve tkáni. Existuje několik typů IHC metod. Patří mezi ně přímá metoda, nepřímá metoda dvojstupňová a nepřímá trojstupňová metoda (Lukáš et al., 1997).

Přímá metoda patří mezi nejjednodušší lokalizaci antigenu v dané tkáni. Primární protilátka, která se naváže na antigen, je označena fluorescenční značkou (viz kapitola 4.8), enzymem nebo kovovými nanočásticemi (Lukáš et al., 1997).

Nepřímá metoda dvojstupňová patří mezi komplikovanější a složitější metody, ale je vhodnější při detekci menšího množství proteinů ve tkáni. Nejprve se na řezy aplikuje neoznačená primární protilátka, která je specifická proti prokazovanému antigenu. Poté je nanášena značená sekundární protilátka proti imunoglobulinům zvířete, které bylo dárce primární protilátky (Lukáš et al., 1997).

---

<sup>6</sup> Zkratka PAS je složena z počátečních písmen názvů reagensů, které jsou při této metodě použity – kyselina jodistá (Periodic Acid) a Schiffova reagens (Vacek, 1995).

Nepřímá trojstupňová metoda se používá v případě, pokud je množství molekul Ag v tkáni nízké. V prvním kroku reaguje primární specifická protilátka s antigenem, ve druhém kroku je aplikována sekundární neoznačená specifická protilátka proti imunoglobulinům zvířete, jehož protilátky byly použity v prvním a následném třetím kroku. Tato sekundární protilátka je nazývána jako spojovací a tvoří tzv. „můstky“. Ve třetím kroku nanášíme značený komplex, například PAP (peroxidáza-anti-peroxidázový komplex) nebo komplex s alkalickou fosfatázou APAAP (alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza) (Lukáš et al., 1997).

Je možno také využít techniku avidin-biotin komplexu (ABC metoda), která je založena na tvorbě pevné ireverzibilní vazby mezi biotinem (vitamín H) a avidinem (bílkovina vaječného bílku). Avidin může vázat až 4 molekuly biotinu. Při reakci jsou některá vazebná místa avidinu volná, jiná jsou obsazena biotinem značeným peroxidázou (Lukáš et al., 1997).

### **Detekce pomocí nepřímé trojstupňové metody**

Jako pretreatment byl při všech imunohistochemických metodách použit citrátový pufr (96°C/čas působení viz jednotlivé markery). Detekci cílových markerů jsme provedli pomocí nepřímé trojstupňové metody s využitím avidin-biotin komplexu (ABC).

Jako první bylo nanášeno blokační sérum (myší/králičí kit), které bylo ředěno 1:65 PBS. Následně byla aplikována neoznačená primární protilátka (viz jednotlivé markery) ředěná Dako Antibody Diluentem (ředění viz jednotlivé markery). Na primární protilátku byla navázána sekundární protilátka (myší/králičí kit) ředěná PBS v poměru 1:200, která tvořila spojovací můstek pro avidin-biotin komplex značený křenovou peroxidázou. ABC reagent (myší/králičí kit) byl připraven smícháním stejného množství A i B reagentu v poměru 1:10 s PBS (ABC reagent bylo nutné připravovat 30 minut před aplikací). Vizualizace markerů byla provedena pomocí DAB substrátu, po jehož rozložení křenovou peroxidázou byly pozitivní struktury zbarveny hnědě. DAB byl připraven přidáním jedné kapky DAB chromogenu do 1 ml Liquid DAB+ substrátu. Vzorky byly dobarveny hematoxylinem.

**Králičí kit** – *VECTASTAIN ABC Kit (Rabbit IgG), PK-4001, Vector Laboratories, USA*

**Myší kit** – *VECTASTAIN ABC Kit (Mouse IgG), PK-4002, Vector Laboratories, USA*

**Dako Antibody Diluent** – *Dako Antibody Diluent, S3022, DAKO, USA*

**DAB** – *Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, K3468, DAKO, USA*

#### 4.7.1 PCNA

Pro stanovení proliferační aktivity buněk v tkáních byla použita imunohistochemická metoda detekce PCNA (Proliferating cell nuclear antigen). PCNA je nepostradatelný DNA replikační protein, který hraje ústřední roli v replikační vidlici při vazbě mnoha enzymů potřebných pro replikaci DNA. Důležitou funkci plní také při opravách DNA a reparačních mechanismech (Baple et al., 2014). Pomocí vizualizace PCNA proteinu v buněčných jádrech tkáňových řezů lze detekovat buňky procházející buněčným dělením (Lukáš et al., 1997).

Úroveň PCNA je velice nízká v klidových buňkách, ale během buněčného cyklu jeho množství výrazně narůstá. Zvýšená produkce začíná na konci G<sub>1</sub> fáze, během S fáze je produkce maximální a klesá během G<sub>2</sub> a M fáze (Lukáš et al., 1997).

**Anti-PCNA** – *Proliferating Cell Nuclear Antigen, M0879, Dako Cytomation, DK*

<b>Citrátový pufr</b>	<b>Kit</b>	<b>Ředění AbI</b>	<b>Doba působení AbI</b>
20 minut/96°C (všechny orgány)	myší	1:500	60 minut/RT (všechny orgány)

#### 4.7.2 Rodina SOX genů

Rodina SOX transkripčních faktorů patří mezi jedny z nejdůležitějších regulátorů určování buněčného osudu v průběhu embryonálního i postnatálního vývoje. Zásadní roli hrají také při udržování homeostázy a regeneraci dospělých tkání (Sarkar and Hochedlinger, 2013). Deregulace SOX faktorů je spojována s mnoha onemocněními, včetně rakoviny (Bass et al., 2009; Weina and Utikal, 2014). U člověka a u myši zahrnuje SOX rodina 20 transkripčních faktorů, včetně cílových faktorů SOX2 a SOX9 (Schepers et al., 2002).

Při imunohistochemických metodách se SOX faktory využívají jako markery progenitorových buněk. Je nutné také zmínit, že SOX faktory jsou relativně tkáňově specifické (Rex et al., 1998; Sarkar and Hochedlinger, 2013). Jako příklad lze uvést právě SOX2 a SOX9 (viz kapitola 4.8.1), jejichž exprese byla v práci zkoumána v plicích a játrech. Zatímco v plicích je poměrně výrazná exprese SOX2 i SOX9 (Gontan et al., 2008; Rockich et al., 2013), v játrech je množství SOX2 velice nízké (URL 2) a zvýšená exprese je typická pro jiné SOX faktory (například právě pro zkoumaný SOX9 faktor) (Kawaguchi, 2013; Yin, 2017).

#### 4.7.2.1 SOX2

K vizualizaci progenitorových buněk v plicích byla použita imunohistochemická metoda detekce SOX2 (SRX (Sex determinant region Y)-BOX 2). Tento transkripční faktor hraje významnou roli při určování buněčného osudu a pluripotenci embryonálních a neurálních kmenových buněk (URL 3). SOX2 má také nemalý vliv na vývoj nervové soustavy a může působit jako iniciátor diferenciaci neuronů (Pevny and Nicolis, 2010; Takemoto et al., 2011). Tento faktor je dále potřebný pro vývoj a diferenciaci buněk dýchací soustavy (Gontan et al., 2008; Tompkins et al., 2011).

**Anti-SOX2** – SOX2, 2748S, Cell Signaling, USA

Citrátový pufr	Kit	Ředění AbI	Doba působení AbI
20 minut/96°C (plíce)	králíčí	1:100	přes noc/4°C (plíce)

#### 4.7.3 Neurofilamenta

Neurofilamenta (NF) jsou intermediální filamenta, která se specificky nacházejí jen v cytoplasmě neuronů a v jejich výběžcích (axonech a dendritech). NF tvoří největší složku cytoskeletu nervových buněk (Lüllmann-Rauch, 2012). NF jsou tvořena třemi typy podjednotek – lehké, středně těžké a těžké podjednotky (Petzold, 2005). Při IHC detekci je markerem právě střední podjednotka neurofilament (NF-M).

**Anti-NF-M** – 2H3, P12839, Developmental Studies Hybridoma Bank, USA

Citrátový pufr	Kit	Ředění AbI	Doba působení AbI
15 minut/96°C (mozek)	myší	1:80	přes noc/4°C (mozek)

#### 4.7.4 Detekce vybraných markerů

Nejprve umístíme histologická skla se vzorky do termostatu (56°C) na 1 hodinu. Následně pro odstranění veškerého parafínu necháme projít xylenovou řadou (dvě lázně xylynu po 10 minutách). Poté pokračujeme sestupnou alkoholovou řadou (ethanol 100%/96%/70% po 5 minutách) a 5 minut oplachujeme v destilované vodě. V dalším kroku vzorky orgánů vaříme

v citrátovém pufru (96°C/čas viz jednotlivé markery) a následně 15 minut chladíme v digestoři. Poté vzorky necháme 3 minuty v 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a dále oplachujeme v PBS (3x3 minuty).

Při následujících krocích již přistupujeme k detekci samotných markerů. Při aplikaci séra, primární a sekundární protilátky vzorky necháváme ve vlhké komůrce při pokojové teplotě (RT). Jako první použijeme blokační sérum (RT/20 minut pro všechny markery), které blokuje nespecifické vazby protilátek. Poté tekutinu sklepneme a na vzorky aplikujeme primární protilátku (anti-PCNA/anti-SOX2/anti-2H3) ředěnou Antibody Diluentem (ředění, doba působení a teplota viz jednotlivé markery). Následuje opakovaný oplach v PBS (3x3 minuty) a aplikace sekundární protilátky (RT/30 minut pro všechny markery). Pokračujeme oplachem v PBS (3x3 minuty) a nanesením ABC reagentu (RT/30 minut pro všechny markery). V dalším kroku sklíčka opět opláchneme v PBS (3x3 minuty).

Sklíčka poté přeneseme k mikroskopu, kde na vzorky aplikujeme DAB substrát. Pod mikroskopem pozorujeme tkáň orgánů, kde pozitivně reagující struktury začínají hnědnout. Po zhnědnutí okamžitě přendáme do destilované vody, aby došlo k zastavení reakce. V destilované vodě pak následně opakovaně oplachujeme (3x1 minuta).

Pro dobarvení okolních tkání vložíme vzorky na 3 minuty do hematoxylinu a následně je 10 minut oplachujeme pod tekoucí vodou. Pokračujeme vzestupnou alkoholovou řadou (ethanol 70%/96%/100% po 5 minutách) a projasněním ve dvou lázních s xylenem po 10 minutách. Nakonec vzorky zamontujeme pomocí montovacího média.

**Výsledek detekce PCNA** – PCNA-pozitivní buňky mají hnědá jádra, ostatní tkáňové struktury jsou zbarveny modře.

**Výsledek detekce SOX2** – SOX2-pozitivní buňky mají hnědá jádra, ostatní tkáňové struktury jsou zbarveny modře.

**Výsledek detekce NF-M** – Neurofilamenta jsou zbarvena hnědě, ostatní tkáňové struktury jsou zbarveny modře.

## 4.8 Imunofluorescenční metody

Imunofluorescence (IF) je metoda, která je stejně jako imunohistochemie založena na principu reakce antigenu s protilátkou. Při imunofluorescenci se ale na rozdíl od klasické IHC pro zviditelnění vazby antigen-protilátka (Ag-Ab) využívá vlastností fluorochromů, kterými jsou značeny protilátky (Bartůňková and Paulík, 2005).

Mezi fluorescenční metody řadíme přímou a nepřímou metodu. Při přímé imunofluorescenci je antigen detekován primární protilátkou, která je přímo konjugována

s fluorochromem. Při nepřímé metodě se na primární neznačenou protilátku váže sekundární protilátka značená fluorescenčním barvivem (Bartůňková and Paulík, 2005; Spring, 2003).

Principem fluorescenční mikroskopie je zobrazení cílového markeru díky fluorescenci molekuly fluorochromu po dopadu ultrafialového záření (Spring, 2003). Fluorescence je fyzikálně chemický děj, při kterém po absorpci UV záření atomem dochází k excitaci elektronů. Elektron není schopen v excitovaném stavu dlouho setrvat, a proto opět přechází na hladinu s nižší energií. Při přechodu na nižší energetickou hladinu je jeho přebytečná energie vyzářena v podobě světla o delší vlnové délce, které pozorujeme mikroskopem (Opekar et al., 2003).

### **Detekce pomocí nepřímé metody**

Jako pretreatment byl při všech imunofluorescenčních metodách použit citrátový pufr (96°C/čas působení viz jednotlivé markery). V případě IF byla detekce cílových markerů provedena pomocí nepřímé metody. Po nanesení blokačního séra (králíčí kit), které bylo ředěno 1:65 PBS, byla aplikována neznačená primární protilátka (viz jednotlivé markery) ředěná Dako Antibody Diluentem (ředění viz jednotlivé markery). Poté byly vzorky orgánů inkubovány se sekundární protilátkou (Ab II) značenou fluorochromem. Sekundární protilátka byla ředěna 1:200 PBS. Preparáty byly nakonec zhotoveny přidáním montovacího média s DAPI, které barví jádra buněk. Detekce byla provedena fluorescenčním mikroskopem.

**Králíčí kit** – *VECTASTAIN ABC Kit (Rabbit IgG), PK-4001, Vector Laboratories, USA*

**AbII** – *Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488, R37116, Invitrogen, USA*

**Montovací médium s DAPI** – *Fluoroshield with DAPI, D9564, Sigma-Aldrich, USA*

#### **4.8.1 SOX9**

SOX9 (SRY (Sex determining Region Y)-BOX 9) patří mezi další možné markery progenitorových buněk (Sarkar and Hochedlinger, 2013). Tento transkripční faktor hraje významnou roli v průběhu embryonálního vývoje, především pak při formování skeletu savců (Matsushita et al., 2013) a regulaci exprese genů, které ovlivňují vývoj a determinaci pohlavních orgánů (Alankarage et al., 2016; Kobayashi et al., 2005). Uplatňuje se také při vývoji, diferenciaci a regeneraci mnoha dalších tkání, včetně jater, žlučových a slinivky (Antoniou et al., 2009; Lefebvre et al., 2007; Furuyama et al., 2011).

**Anti-SOX9** – *SOX9 Antibody, OAAF00840, Aviva Systems Biology, USA*

Citrátový pufr	Kit	Ředění AbI	Doba působení AbI
25 minut/96°C (játra)	králíčí	1:100	přes noc/4°C (játra)

#### 4.8.2 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza (sodno-draselná pumpa) je jedním z nejrozšířenějších typů aktivního přenašeče, který zabezpečuje přenos sodíkových a draslíkových iontů přes membránu buněk. Využitím hydrolyzy jedné molekuly ATP jsou transportovány 3 ionty Na<sup>+</sup> ven z buňky a 2 ionty K<sup>+</sup> dovnitř buňky (Koolman and Röhm, 2012).

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza hraje roli při regulaci osmotického tlaku, čímž zároveň napomáhá udržování buněčného objemu. Tato pumpa je také důležitým regulačním enzymem nervových buněk – svou činností vyrovnává gradient iontů po proběhnutí akčního potenciálu (Glynn, 1993). Významnou roli zastává Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza v ledvinách, kdy se podílí na reabsorpci sodných iontů. Pumpa je také součástí některých transcelulárních procesů ve střevech nebo žlázách (Jorgensen et al., 2003).

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza je složena z 3 podjednotek –  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  (Jorgensen et al., 2003). Při imunofluorescenční detekci je markerem této pumpy  $\alpha$  podjednotka.

**Anti-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza** – *Sodium Potassium ATPase Antibody, EP1845Y, Abcam, UK*

Citrátový pufr	Kit	Ředění AbI	Doba působení AbI
25 minut/96°C (plíce) 20 minut/96°C (játra, ledviny)	králíčí	1:80	přes noc/4°C (plíce) 60 minut/RT (játra, ledviny)

#### 4.8.3 Detekce vybraných markerů

Nejprve umístíme histologická skla se vzorky orgánů do termostatu při teplotě 56°C na 1 hodinu. Následně vzorky necháme pro odstranění veškerého parafínu projít xylenovou řadou (dvě lázně xylenu po 10 minutách). Dále pokračujeme sestupnou alkoholovou řadou (ethanol 100%/96%/70% po 5 minutách), následně 5 minut oplachujeme v destilované vodě. V dalším kroku vzorky vaříme v citrátovém pufru (96°C/viz jednotlivé markery), poté 15 minut chladíme v digestoři a následně opakovaně oplachujeme v PBS (3x3 minuty).

V dalším kroku již přistoupíme k detekci samotných cílových markerů. Jako první použijeme blokační sérum (RT/20 minut), které blokuje nespecifické vazby protilátek. Následně na vzorky aplikujeme primární protilátku (anti-SOX9/anti-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza) ředěnou Antibody Diluentem (ředění, doba působení a teplota viz jednotlivé markery). Pokračujeme oplachem v PBS (3x3 minuty), poté inkubujeme se sekundární protilátkou (RT/40 minut). Aplikace sekundární protilátky a všechny následující kroky již musí probíhat bez přítomnosti světla. Vzorky poté opakovaně oplachujeme v PBS (3x3 minuty) a nakonec preparáty zamontujeme montovacím médiem s DAPI. Hotové preparáty uchováváme v temnu.

**Výsledek** – SOX9-pozitivní buňky jsou pozorovatelné v zeleném spektru, jádra barvená DAPI v modrém.

**Výsledek** – Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza-pozitivní struktury jsou pozorovatelné v zeleném spektru, jádra barvená DAPI v modrém.

## 4.9 Metoda TUNEL

Jednou z možností, jak můžeme detekovat buňky podstupující buněčnou smrt, je metoda nazvaná TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling). TUNEL je běžnou metodou pro znázornění fragmentované DNA, která je důsledkem apoptotické signální kaskády (Huerta et al., 2007). Základem této metody je detekce fragmentované DNA, která je zprostředkována pomocí specifického navázání určitých molekul v místě jedno a dvou řetězcových zlomů DNA (Gavrieli et al., 1992).

Principem této metody je označení 3'OH volných konců fragmentované DNA modifikovaným analogem báze (uridin) pomocí terminální deoxynukleotidyl transferázy (TdT). Určitý počet nukleotidů je značen digoxigeninem, na který se následně váže komplex obsahující protilátku proti digoxigeninu (anti-digoxigenin) a na něj navázanou křenovou peroxidázu. Pro vizualizaci cílových buněk se používá DAB substrát, který rozkládá enzym peroxidáza (Gavrieli et al., 1992; Gorczyca et al., 1992).

### Detekce pomocí metody TUNEL

Jako pretreatment byla použita proteináza K, která byla připravena smícháním v poměru 1:50 s PBS. Souprava pro detekci apoptózy obsahovala ekvilibrační pufr, reakční pufr, TdT enzym, „Stop/Wash Buffer“ a anti-digoxigenin s navázanou křenovou peroxidázou. Pro vizualizaci TUNEL-pozitivních buněk byl opět použit DAB substrát. Všechny reagenty kromě reakční směsi nukleotidů s enzymem TdT byly bez ředění ihned aplikovány na řezy.



**Proteináza K** – *Proteinase K, P2308, Sigma-Aldrich, USA*

**TUNEL kit** – *ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, S7100, Merck, USA*

#### **Reakční směs nukleotidů s enzymem TdT**

Reakční směs nukleotidů .....	90 $\mu$ l
Destilovaná voda.....	35 $\mu$ l
TdT enzym.....	15 $\mu$ l

#### **4.9.1 Detekce TUNEL-pozitivních buněk**

Nejprve umístíme skla se vzorky orgánů do termostatu při teplotě 56°C na 1 hodinu. Poté vyndáme a pro odstranění parafínu vložíme do dvou za sebou jdoucích lázní s xylenem na 10 minut. Pokračujeme sestupnou alkoholovou řadou (ethanol 100%/96%/70% po 5 minutách) a poté 5 minut oplachujeme v PBS. V dalším kroku vzorky vystavíme působení proteinázy K (RT/20 minut), která zpřístupní jádra pro působení enzymu TdT. Pokračujeme oplachem v destilované vodě (2x2 minuty), následně na 3 minuty přendáme do 3% peroxidu vodíku a poté opakovaně oplachujeme v PBS (2x2 minuty).

Při následujících krocích již použijme kit k detekci apoptózy. V prvním kroku necháme 1 minutu působit ekvilibrační pufr. Poté na vzorky aplikujeme reakční směs nukleotidů s enzymem TdT a necháme 30 minut působit při teplotě 37°C v termostatu. V dalším kroku pro zastavení aktivity enzymu použijeme oplachovací „Stop/Wash Buffer“, který necháme působit 10 minut. Vzorky dále opakovaně opláchneme v PBS (4x2 minuty) a poté aplikujeme komplex protilátky (anti-digoxigenin) s navázanou křenovou peroxidázou (RT/30 minut). Poté tekutinu sklepneme a vzorky pro ustálení pH opláchneme v PBS (4x2 minuty). V dalším kroku již přistoupíme k vizualizaci TUNEL-pozitivních buněk pomocí rozkladu DAB substrátu peroxidázou. DAB aplikujeme pod mikroskopem, kde pozorujeme pozitivní jádra barvicí se hnědě. Po zhnědnutí ihned přendáme do destilované vody, aby nedošlo k falešné pozitivní reakci. Oplach v destilované vodě poté opakujeme (3x1 minuta).

Tkáně následně dobarvíme 3 minuty v hematoxylinu. Pokračujeme 10 minut oplachem pod tekoucí vodou. Poté sklíčka necháme nejprve projít alkoholovou řadou (70%/96%/100% ethanol po 5 minutách), kterou následují dvě lázně s xylenem. V každé lázni xylenu ponecháme sklíčka 10 minut. Nakonec vzorky zamontujeme montovacím médiem.

**Výsledek** – TUNEL-pozitivní buňky mají hnědou barvu, ostatní tkáňové struktury jsou zbarveny modře.

## 4.10 Analýza genové exprese

Pro qPCR analýzu exprese transkripčního faktoru NF $\kappa$ B1 bylo vybráno 10 vzorků plic z šestitýdenního experimentu, 10 vzorků plic z jedenáctitýdenního experimentu, 10 vzorků ledvin z šestitýdenního experimentu a 10 vzorků ledvin z jedenáctitýdenního experimentu. Vždy bylo vybráno 5 kontrolních a 5 experimentálních orgánů (více viz Přílohy, kapitola 11.1).

Z tkání byla nejprve izolována mRNA, kterou jsme následně reverzní transkripcí přepsali do cDNA. Výsledná exprese byla stanovena pomocí qPCR.

### 4.10.1 NF $\kappa$ B rodina a protein NF $\kappa$ B1

NF $\kappa$ B je rodina transkripčních faktorů, která ovlivňuje expresi řady genů důležitých pro imunitu, zánětlivou odpověď a další procesy odpovídající na různé podněty jako jsou například cytokiny, ultrafialové záření, volné radikály či bakteriální a virové antigeny. NF $\kappa$ B také patří mezi hlavní regulátory oxidativního stresu a u některých buněk blokuje apoptózu (Baeuerle and Baltimore, 1991; Jimi and Ghosh, 2005; Napetschnig and Wu, 2013). NF $\kappa$ B rodina bývá často označována jako hlavní zprostředkovatel imunitní odpovědi (Ghosh et al., 1998).

NF $\kappa$ B rodina zahrnuje celkem pět členů rozdělených do dvou podrodin – Rel proteiny a NF $\kappa$ B proteiny. Do první rodiny patří RelA (p65), RelB a c-Rel. Rodina NF $\kappa$ B proteinů zahrnuje pro nás cílový NF $\kappa$ B1 (p50) a dále NF $\kappa$ B2 (p52) (Ghosh and Hayden, 2008).

### 4.10.2 Izolace mRNA

Izolace byla provedena pomocí kitu pro izolaci mRNA, který obsahoval RLT pufr, RW1 pufr a RPE pufr.

**RNA Kit** – *RNeasy Mini Kit, 74106, Qiagen*

**Postup** – Z připraveného orgánu vyřízneme malý vzorek (ideální váha je okolo 30 mg), který vložíme do předem zchlazené zkumavky. Ke vzorku následně přidáme 300  $\mu$ l lyzačního pufru (RLT pufr smíchaný s  $\beta$ -Mercaptoethanolem v poměru 99:1) a homogenizujeme. Dále přidáme 300  $\mu$ l 70% ethanolu, krátce propipetujeme a centrifugujeme (10 000 rpm/15 s). Po vyjmutí z centrifugy opatrně, aniž bychom pipetou nasáli i sediment vzniklý při centrifugaci, přeneseme supernatant do kolonky a dále centrifugujeme (11 000 rpm/15 s). Tekutinu ve sběrné nádobce vylijeme a do kolonky přidáme 700  $\mu$ l RW1 pufru. Poté znovu centrifugujeme

(11 000 rpm/15 s). Po ukončení centrifugace kolonky opatrně vyjmeme, tekutinu ze sběrné nádoby vylijeme a pokračujeme přidáním 300  $\mu$ l RW1 pufru s následnou centrifugací (11 000 rpm/15 s). Poté obsah sběrné nádoby vylijeme a přidáme 500  $\mu$ l RPE pufru. Pokračujeme opětovnou centrifugací (11 000 rpm/15 s). Předchozí krok zopakujeme, přidáme opět 500  $\mu$ l RPE pufru a centrifugujeme při stejných otáčkách 15 sekund. Následně tekutinu vylijeme, přidáme 500  $\mu$ l RPE pufru a centrifugujeme (11 000 rpm/2 min).

Po ukončení centrifugace kolonky vyjmeme, slijeme tekutinu, vyměníme sběrnou nádobku a centrifugací při maximální rychlosti (14 000/1 min) odstraníme zbytky promívacích pufrů. Následně kolonky přendáme do nové ependorfky a pomocí pipety na kolonku opatrně přidáme 25  $\mu$ l depc vody. Poté centrifugujeme (10 000/15 s). Při tomto kroku již dochází k uvolnění mRNA do ependorfky.

Koncentraci a čistotu výsledné mRNA měříme na spektrofotometru. Získaný vzorek mRNA poté uchováváme při teplotě - 80°C.

#### 4.10.3 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je proces, při kterém dochází k přepisu mRNA do cDNA. V rámci přepisu do cDNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy dochází k tvorbě tzv. templátu, který hraje důležitou roli při qPCR (Ruijter et al., 2013).

**Postup** – Podle naměřené koncentrace mRNA na spektrofotometru vypočítáme složení reakční směsi pro přepis 1 vzorku do cDNA. Přidáváme vždy množství vzorku mRNA, které odpovídá koncentraci 500 ng/ $\mu$ l. Reakční směs, jejíž celkový objem musí činit 20  $\mu$ l, obsahuje:

10  $\mu$ l Master Mixu +  $x$   $\mu$ l vzorku mRNA (500 ng/ $\mu$ l) + doplnit depc H<sub>2</sub>O do objemu 20  $\mu$ l

**Reverse Transcription Master Mix** – *gb Reverse Transcription Kit, 3012, Generi Biotech, Czech Republic*

Zkumavky s namíchanou reakční směsí vložíme do termocykleru a inkubujeme 60 minut při teplotě 42°C. Výslednou koncentraci cDNA poté změříme na spektrofotometru. Získaný vzorek cDNA uchováváme při teplotě - 20°C.

#### 4.10.4 qPCR

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR) je metoda, která umožňuje stanovení množství sledovaného úseku DNA pomocí speciálního cykleru, který v průběhu PCR kontinuálně zaznamenává přírůstek množství amplifikované DNA. Metoda je založena na klasické PCR, ale zatímco u PCR je analyzován výsledný produkt, u qPCR je zaznamenáván přírůstek intenzity fluorescence v každém cyklu reakce. Měření množství DNA je umožněno přidáním fluorescenčního substrátu, který se váže na přítomnou DNA a na základě vazby vyzařuje světelný signál. Hladina fluorescence je zachycena detektorem, zpracována počítačem a převedena do grafu (Ruijter et al., 2013; Zima et al., 2004).

Jako fluorescenční reportér jsme použili dvojité barvené TaqMan sondy. Tyto sondy nesou na 5' konci fluorofor, jehož aktivita je blokována molekulou zhášecí. Dokud není sonda hydrolyzována činností DNA-polymerázy (v našem případě Taq-polymerázy), zhášecí blokuje fluorofor a k fluorescenci nedochází. Jakmile během syntézy DNA podle vloženého templátu DNA-polymeráza narazí na navázanou TaqMan sondu, rozloží ji, a tím separuje zhášecí od fluoroforu, čímž dochází k emisi fluorescenčního signálu (Livak et al., 1998)

Při kvantifikaci sledovaného úseku je také nezbytné vyhodnotit tzv. vnitřní kontrolu, která nám stanoví, do jaké míry bylo použito stejné množství vstupní reakční směsi u testovaných vzorků – tedy jestli rozdíl v expresi sledovaného genu mezi jednotlivými vzorky není způsoben nestejnou koncentrací reakčních směsí. Jako vnitřní geny jsou nejčastěji využívány referenční geny, jejichž exprese by měla být stabilní a stejná u všech testovaných vzorků. Mezi referenční geny řadíme tzv. „housekeeping“ geny, kam spadá například gen pro aktin nebo tubulin (Kozera and Rapacz, 2013).

**Postup** – U každého cílového orgánu, kontrolního i exponovaného, byla v triplicátech na 96 jamkové destičce stanovena exprese cílového genu (NF $\kappa$ B1) a také „housekeeping“ genu ( $\beta$ -aktin). Celkový objem triplikátu byl 30  $\mu$ l. Jeden vzorek o 10  $\mu$ l obsahoval:

5  $\mu$ l Master Mixu + 0,5  $\mu$ l Taq man sondy + 0,5  $\mu$ l cDNA analyzovaného vzorku  
(koncentrace cDNA 100 ng/  $\mu$ l) + 4  $\mu$ l depc H<sub>2</sub>O

**PCR Master Mix** – *gb Ideal PCR Master Mix, 3007, Generi Biotech, Czech Republic*

**Taq Man Sonda pro NF $\kappa$ B1** – *Mm00476361\_m1*

**Taq Man Sonda pro  $\beta$ -aktin** – *Mm00607939\_s1*

Při reakci nejprve proběhl 1 cyklus preinkubační denaturace (95°C – 10 minut), po kterém následovalo 55 amplifikačních cyklů (95°C – 15 sekund; 60°C – 60 sekund).

Pro kvantifikaci exprese je zásadní tzv. Cycle Treshold (CT). Tato hodnota udává číslo cyklu, při kterém dochází k překročení prahu detekce. CT hodnota cílového genu je následně normalizována k CT hodnotě „housekeeping“ genu. Při vyhodnocení exprese NFκB1 jsme použili tzv. metodu  $\Delta\Delta CT$  (Kozera and Rapacz, 2013).

Výpočet podle metody  $\Delta\Delta CT$ :

$$R = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Písmeno R (ratio) udává relativní změnu exprese.

Výpočet  $\Delta\Delta CT$ :

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{testovaného vzorku}} - \Delta CT_{\text{kontrolního vzorku}}$$
$$\Delta CT_{\text{testovaného vzorku}} = CT_{\text{cílového genu}} - CT_{\text{housekeeping genu}}$$
$$\Delta CT_{\text{kontrolního vzorku}} = CT_{\text{cílového genu}} - CT_{\text{housekeeping genu}}$$

Statistická významnost výsledků byla ověřena pomocí t-testu. Variabilita v experimentu je v grafech znázorněna směrodatnou odchylkou.

## 5 VÝSLEDKY

U každého orgánu byla primárně provedena histopatologická analýza. Poté byly na základě získaných výsledků vybrány selektivní histochemické, IHC a IF metody pro vytvoření komplexnějšího obrazu o změnách v cílových orgánech (plíce, játra, ledviny, mozek a slezina) po inhalaci nanočástic PbO. Práce je poté doplněna o analýzu váhy orgánů na konci inhalačních experimentů a měření exprese transkripčního faktoru NFκB1 v plicích a ledvinách (více informací o jedincích a provedených metodách viz Přílohy, kapitola 11.1).

Platy histopatologické analýzy orgánů jsou uvedeny v této kapitole. Výsledné platy s ostatními analýzami jsou uvedeny v Obrazových přílohách (kapitola 10; v textu zkratka OP).

### 5.1 Analýzy váhy orgánů na konci inhalačních experimentů

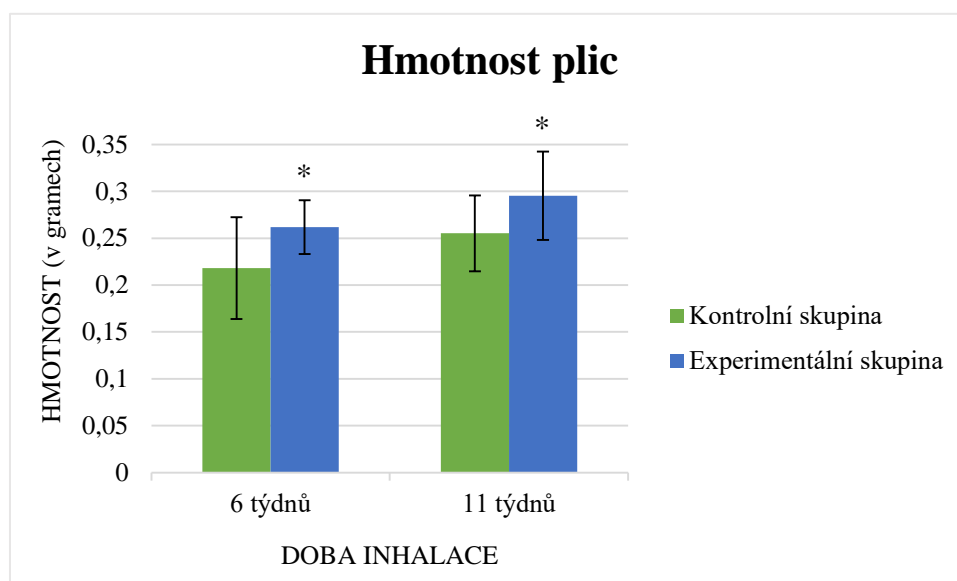
Rozhodli jsme se zhodnotit, zda inhalace nanočástic PbO ovlivňuje celkovou hmotnost vybraných orgánů (plíce, játra, ledviny, mozek a slezina). Orgány byly ihned po vyjmutí z těla myši zváženy a hodnoty zapsány. Analýza hmotnosti cílových orgánů byla provedena u všech kontrolních i experimentálních jedinců (viz Přílohy, kapitola 11.1 a 11.2). Variabilita mezi jedinci je v grafech znázorněna směrodatnou odchylkou. Statisticky signifikantní rozdíl byl stanovován pomocí t-testu.

Celková hmotnost myší nebyla porovnávána z důvodu nedostatku dat. Během experimentů A a B nebyla hmotnost jedinců zjišťována, byla stanovována pouze u experimentů C a D. Výsledky by tedy nebyly z důvodu nedostatku dat signifikantní, proto nejsou do celkové analýzy zahrnuty.

#### 5.1.1 Plíce

Po šestitýdenní inhalaci nanočástic byla pozorována změna v hmotnosti plic mezi kontrolní a experimentální skupinou (viz Graf č. 1; strana 42). U experimentálních jedinců byla hmotnost plic zvýšena. Výsledky byly statisticky signifikantní ( $p < 0,05$ ). Po jedenáctitýdenní inhalaci nanočástic PbO došlo taktéž k nárůstu hmotnosti plic u exponované skupiny. T-test potvrdil statistickou významnost výsledků měření ( $p < 0,05$ ).

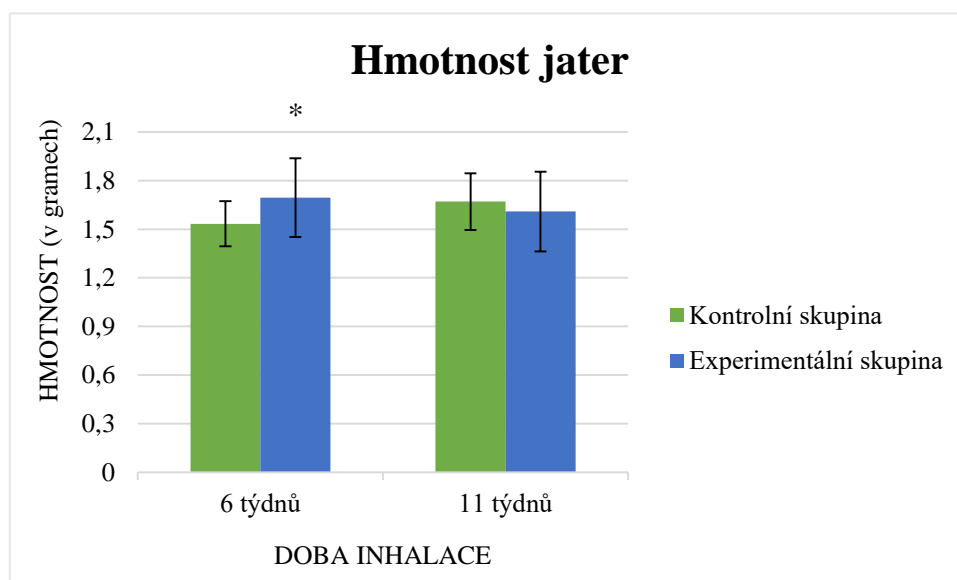
Graf č. 1: Analýza hmotnosti plic na konci inhalačních experimentů



### 5.1.2 Játra

U experimentální skupiny zvířat došlo ke statisticky signifikantnímu ( $p < 0,05$ ) zvýšení hmotnosti jater po šestitýdenní inhalaci NPs PbO (viz Graf č. 2). V analýze po jedenáctitýdenní inhalaci jsme pozorovali mírný pokles hmotnosti jater u exponovaných jedinců.

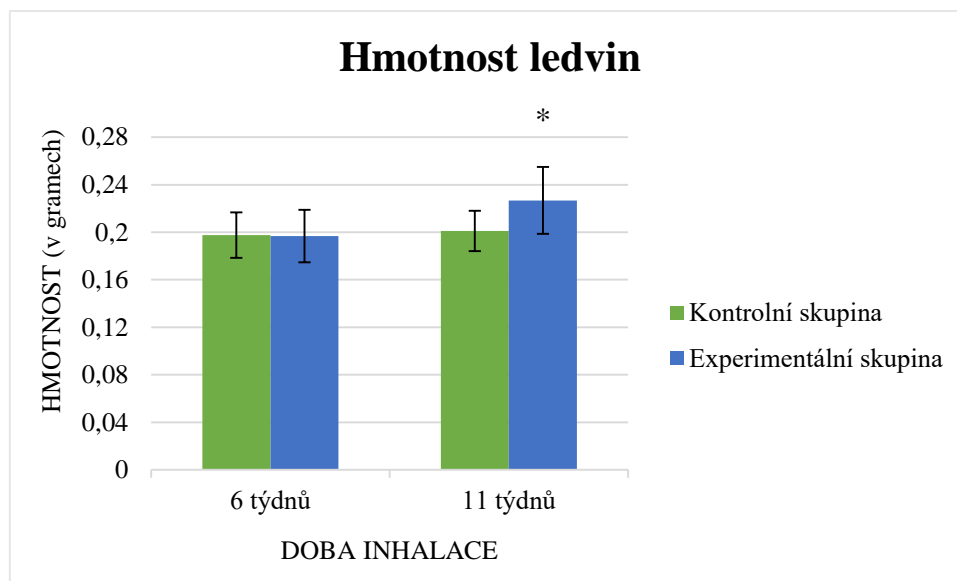
Graf č. 2: Analýza hmotnosti jater na konci inhalačních experimentů



### 5.1.3 Ledviny

Pro analýzu hmotnosti ledvin jsme vždy použili hodnotu průměru mezi pravou a levou ledvinou každé myši. V šestitýdenním experimentu nebyl patrný rozdíl v hmotnosti ledvin, ale po jedenáctitýdenní inhalaci NPs jsme pozorovali statisticky signifikantní ( $p < 0,05$ ) zvýšení hmotnosti ledvin u experimentální skupiny zvířat (viz Graf č. 3).

Graf č. 3: Analýza hmotnosti ledvin na konci inhalačních experimentů

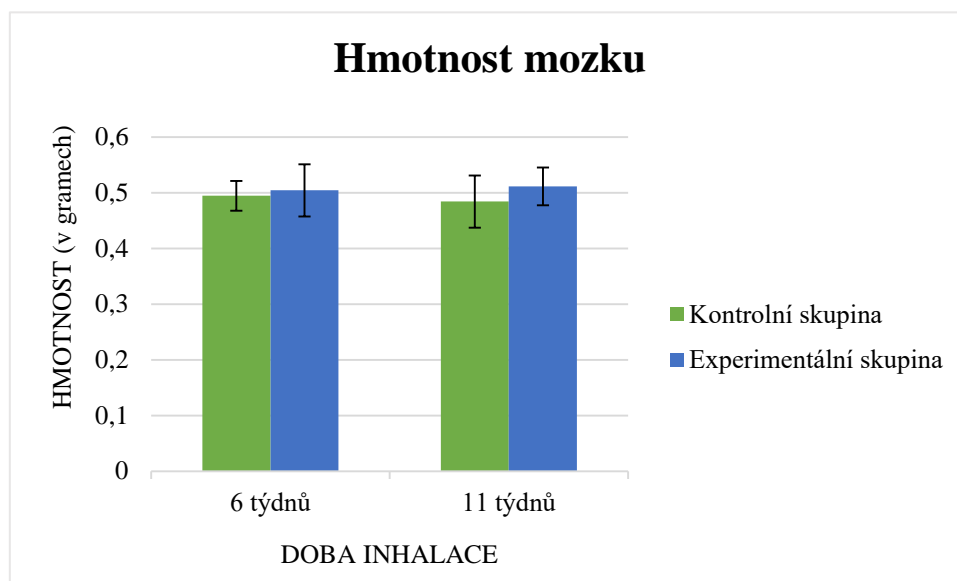


### 5.1.4 Mozek

Po expozici myši nanočásticím PbO jsme ani v jednom inhalačním experimentu nepozorovali statisticky významnou změnu hmotnosti mozku mezi experimentální a kontrolní skupinou zvířat (viz Graf č. 4; strana 44).



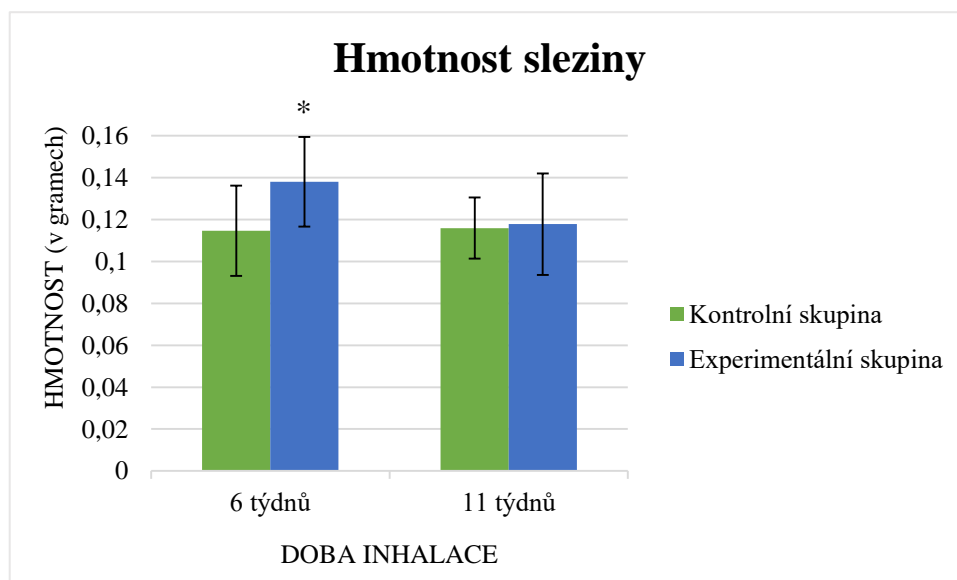
Graf č. 4: Analýza hmotnosti mozku na konci inhalačních experimentů



### 5.1.5 Slezina

U experimentálních jedinců z šestitýdenního inhalačního intervalu došlo ke statisticky významnému ( $p < 0,05$ ) zvýšení hmotnosti sleziny. Po jedenáctitýdenní inhalaci se ale hmotnosti sleziny exponovaných i kontrolních zvířat pohybovaly v podobném rozmezí (viz Graf č. 5).

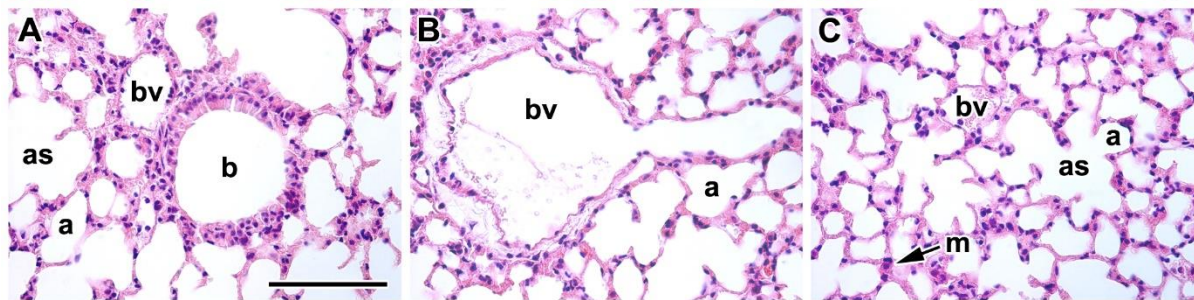
Graf č. 5: Analýza hmotnosti sleziny na konci inhalačních experimentů



## 5.2 Plíce – brána pro nanočástice

### 5.2.1 Šestitýdenní inhalace nanočástic PbO

Histopatologická analýza potvrdila značné morfologické změny v plicích u myši po šestitýdenní inhalaci NPs PbO ve srovnání s plicemi kontrolních jedinců (viz Obr. č. 6).



Obr. č. 6: *Histopatologická analýza plic kontrolních jedinců z šestitýdenního experimentu*

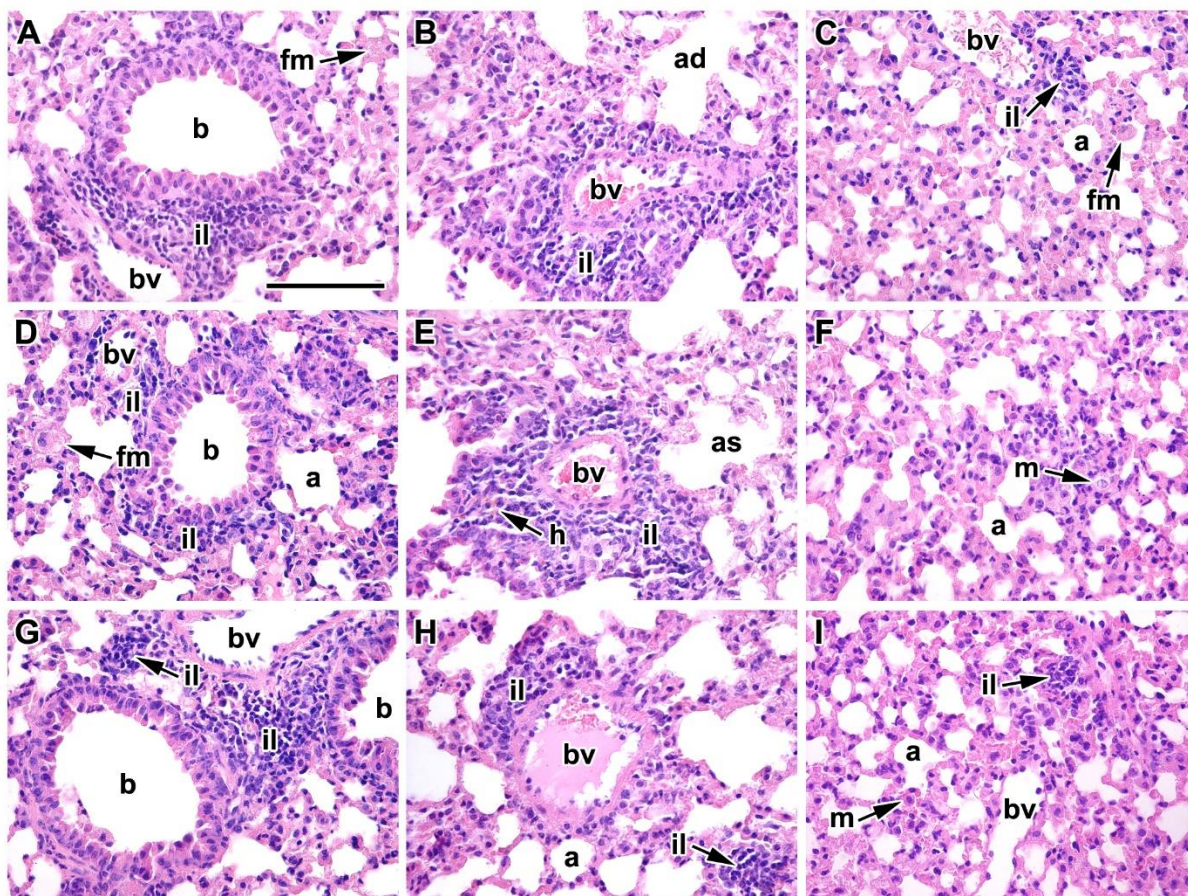
**A:** Terminální bronchiolus (**b**) je tvořený jednořadým řasinkovým kubickým až cylindrickým epitelem. Vedle bronchiolu se nachází céva (**bv**), okolí je bez přítomnosti zánětu.

**B:** Stěna cév (**bv**) je tvořená jednovrstevným plochým epitelem. Kolem je patrná řídká vrstva vaziva. Není přítomný žádný zánětlivý infiltrát.

**C:** Alveoly (**a**) jsou vystlány respiračním epitelem, který je tvořen pneumocyty I. a II. typu. Mezi alveoly probíhá spleť cév (**bv**) a drobných vlásečnic. V plicích se hojně vyskytují makrofágy (**m**).

Měřítko = 100  $\mu$ m; **a** – alveolus, **as** – alveolární váček, **b** – bronchiolus, **bv** – céva, **m** – makrofág.

U experimentálních jedinců (viz Obr. č. 7; strana 46) jsme zaznamenali remodelaci plicní tkáně, hyperemii v alveolárních septech a intersticiu, dilatované cévy, hemostázu s přítomností hemosiderinu a siderofágů, ztlustělá alveolární septa, alveolární emphyzém nebo zvýšený počet buněk v intersticiu. Byly patrné známky akutní katarální bronchiolitidy a alveolitidy. Epitel bronchiolů byl vlivem zánětu poškozený, patrná byla deskvamace epitelových buněk a přítomnost neutrofilů či erytrocytů v luminu bronchiolů. Pozorováno bylo i zvýšené množství hlenu v luminu bronchiolů, které by mohlo případně vést k atelektáze. Po inhalaci nanočástic olova taktéž došlo k vytvoření četných zánětlivých peribronchiolárních a perivaskulárních infiltrátů z leukocytů. V infiltrátech jsme pozorovali přítomnost lymfocytů, neutrofilů a makrofágů. Také došlo ke zvýšení počtu alveolárních i intersticiálních makrofágů. Místy se vyskytovali i tzv. pěnové makrofágy. V alveolech jsme kromě makrofágů pozorovali větší počet neutrofilů.



Obr. č. 7: *Histopatologická analýza plic experimentálních jedinců po šestidenní inhalaci nanočástic PbO*

**A, B, D, E, G, H:** Epitel terminálních bronchiolů (**b**) je porušený, vykazuje deskvamaci epitelových buněk. Okolo bronchiolů (**b**) a cév (**bv**) jsou patrné zánětlivé infiltráty (**il**) obsahující lymfocyty, neutrofilly a makrofágy. V infiltrátech se místy nachází hemosiderin (**h**). Respirační epitel je poškozený. Alveolární septa jsou ztlustělá, v intersticiu je patrné zmožení buněk. Makrofágy (**m**) jsou hojně přítomné jak v infiltrátech, tak i v oblasti alveolů. V alveolárních oblastech se nachází i tzv. pěnové makrofágy (**fm**).

**C, F, I:** Plicní tkáň je silně remodelovaná. Okolo cév (**bv**) se nachází drobné perivaskulární infiltráty leukocytů (**il**). Septa alveolů (**a**) jsou ztlustělá, pneumocyty jsou poškozené. Je patrná hyperémie. Mezi alveoly se nachází zvýšený počet makrofágů (**m**), místy jsou přítomné pěnové makrofágy (**fm**).

Měřitko = 100  $\mu$ m; **a** – alveolus, **ad** – alveolární chodbička, **as** – alveolární váček, **b** – bronchiolus, **bv** – céva, **fm** – pěnový makrofág, **h** – hemosiderin, **il** – infiltrát leukocytů, **m** – makrofág.

Pomocí barvení Massonovým zeleným trichromem jsme detekovali kolagenní vazivo v plicích (viz OP, kapitola 10.1.1). U experimentálních zvířat jsme vazivo stejně jako u kontrol detekovali v oblasti bronchiolů a cév. Mezi experimentálními a kontrolními jedinci jsme ale v těchto oblastech nenalezli výraznější rozdíly. V alveolárních septech exponovaných jedinců se podobně jako u kontrol nacházelo pouze málo kolagenního vaziva. I když byla septa alveolů po inhalaci nanočástic PbO ztlustělá, kolagenní vlákna se v nich ve větší míře nevyskytovala.

Pomocí imunohistochemické metody detekující PCNA jsme zobrazovali proliferující buňky (viz OP, kapitola 10.1.2). U kontrolních jedinců jsme pozorovali velmi malý počet proliferujících buněk. Po inhalaci NPs PbO jsme detekovali velké množství proliferujících buněk zejména v infiltrátech. Také došlo ke zvýšení počtu PCNA-pozitivních makrofágů. Množství PCNA-pozitivních buněk v alveolárních oblastech bylo pouze mírně zvýšeno.

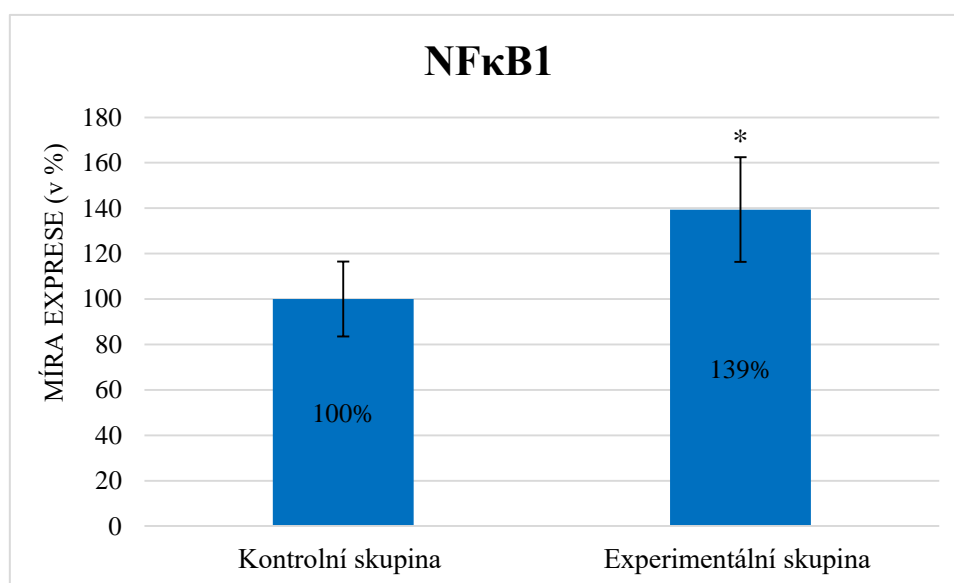
Analýza TUNEL-pozitivních buněk (viz OP, kapitola 10.1.3) u kontrolních jedinců ukázala pouze malé množství pozitivních buněk. Větší množství TUNEL-pozitivních buněk jsme detekovali u experimentální skupiny zvířat. Pozitivní buňky se stejně jako u kontrol vyskytovaly v oblasti alveolů. Množství pozitivních buněk bylo mírně zvýšeno, ale statisticky významná změna zjištěna nebyla. Ve srovnání s kontrolou se pozitivní buňky navíc vyskytovaly v peribronchiolárních a perivaskulárních infiltrátech.

V plicích jsme dále pomocí IHC metody detekovali SOX2 transkripční faktor (viz OP, kapitola 10.1.4). Zvýšenou expresi SOX2 faktoru vykazovaly především buňky epitelu bronchiolů. Množství a lokalizace pozitivních buněk v plicích experimentálních jedinců se nelišily ve srovnání s kontrolní skupinou. V alveolárních oblastech byl počet SOX2-pozitivních buněk u obou skupin velmi malý, pozitivní buňky se vyskytovaly jen ojedinelé.

Množství enzymu Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy (viz OP, kapitola 10.1.5) v plicní tkáni nebylo u experimentálních zvířat oproti kontrolním výrazně změněno.

Po šestitýdenní inhalaci NPs PbO jsme pozorovali statisticky signifikantní zvýšení v expresi NFκB1 v plicích experimentálních jedinců (viz Graf č. 6).

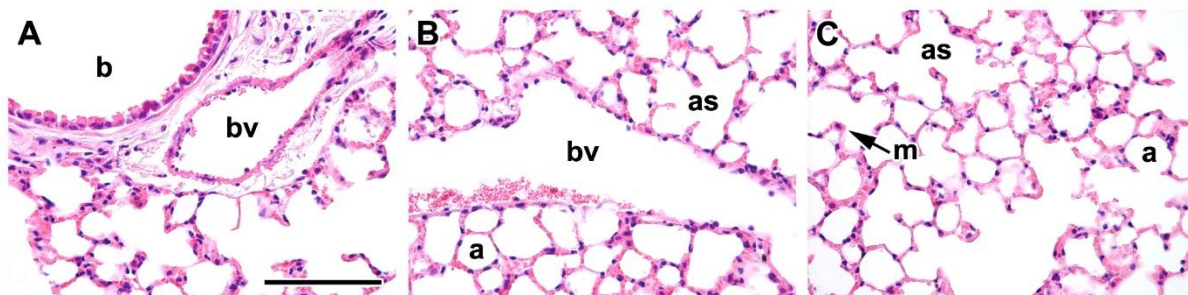
Graf č. 6: Analýza exprese NFκB1 v plicích po šestitýdenní inhalaci NPs PbO





### 5.2.2 Jedenáctýdenní inhalace nanočástic PbO

Plíce kontrolních jedinců z jedenáctýdenního experimentu byly stejné strukturální stavby jako plíce neexponovaných jedinců z předchozího experimentu (viz Obr. č. 8). Bronchioly byly čisté, jejich epitel byl neporušený, okolí bylo bez výskytu zánětlivých infiltrátů, alveolární septa nebyla ztlustělá. Množství alveolárních i intersticiálních makrofágů bylo podobné.



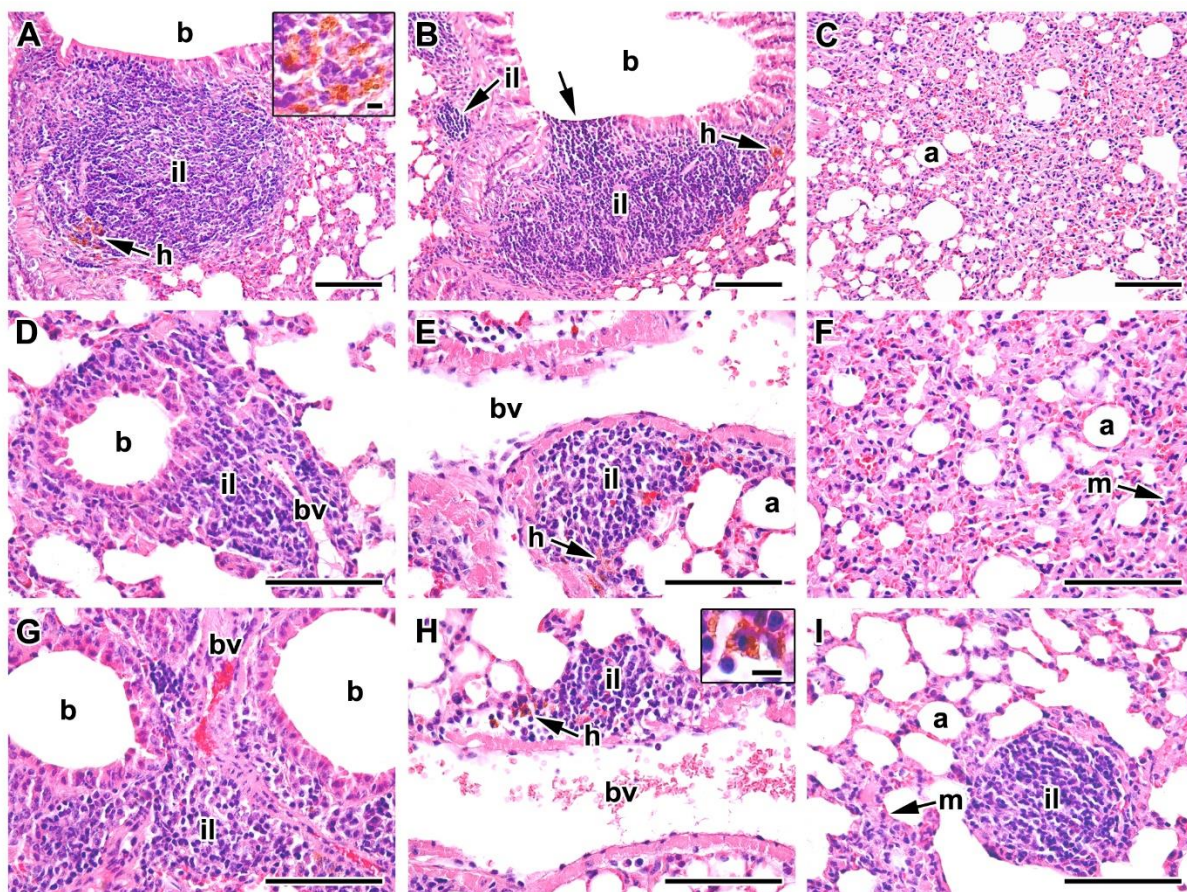
Obr. č. 8: *Histopatologická analýza plic kontrolních jedinců z jedenáctýdenního experimentu*

**A, B:** V okolí cévy (**bv**) a bronchiolu (**b**) není přítomný žádný viditelný zánětlivý infiltrát. Lumen bronchiolu je prázdný, není patrná deskvamace epitelových buněk.

**C:** Septa alveolů (**a**) jsou tvořena tenkým respiračním epitelem. Mezi pneumocyty se v plicích nacházejí četné makrofágy (**m**).

Měřítka = 100  $\mu$ m; **a** – alveolus, **as** – alveolární váček, **b** – bronchiolus, **bv** – céva, **m** – makrofág.

Histopatologická analýza plic po jedenáctýdenní inhalaci nanočástic PbO ukázala četné změny svědčící pro vážné poškození plicní tkáně (viz Obr. č. 9; strana 49). V plicích exponovaných jedinců jsme analyzovali podobné změny jako po šestitýdenní inhalaci nanočástic, ovšem závažnějšího a rozsáhlejšího charakteru. Byla patrná výrazná remodelace plicní tkáně, brochiolitida a alveolitida, atelektáza, hyperémie a dilatované cévy, dále pak alveolární emphyzém, ztlustělá septa, zmnožení buněk v intersticiu nebo ojediněle i hemoragie. Množství hemosiderinu a siderofágů v septech nebo zánětlivých infiltrátech bylo oproti šestitýdennímu experimentu zvýšeno. Počet neutrofilů a makrofágů byl rovněž zvýšen, především došlo k velkému nárůstu množství pěnových makrofágů. Zánětlivé infiltráty byly přítomny okolo brochiolů, cév nebo mezi alveoly. V mnoha případech byly zjištěny zánětlivé změny bronchiolů.



Obr. č. 9: *Histopatologická analýza plic experimentálních jedinců po jedenáctitýdenní inhalaci nanočástic PbO*

**A, B, D, E, G, H:** Kolem bronchiolů (**b**) a cév (**bv**) jsou velké zánětlivé infiltráty imunitních buněk (**il**). V některých místech dochází k poškození epitelových buněk a pronikání lymfocytů do epitelu (**B – šipka**). Místo je patrný hemosiderin (**h**) a siderofágy. **Výřezy** (A, H; měřítko = 10  $\mu$ m) – hemosiderin a siderofágy.

**C, F, I:** Plicní tkáň je silně remodelovaná, v intersticiu a septech alveolů je patrný velký nárůst buněk, alveolární septa jsou poškozená. Je patrná hyperémie a místy alveolární emphyzém. Hojně jsou přítomny makrofágy (**m**). Mezi alveoly se místy nacházejí zánětlivé infiltráty (**il**).

Měřítka = 100  $\mu$ m; **a** – alveolus, **as** – alveolární váček, **b** – bronchiolus, **bv** – céva, **h** – hemosiderin, **il** – infiltrát leukocytů, **m** – makrofág.

Množství kolagenních vláken (viz OP, kapitola 10.1.1) nebylo stejně jako po šestitýdenní inhalaci v plicích experimentálních jedinců zvýšeno. I když byla patrná silná remodelace tkáně a vyšší množství buněk v intersticiu, kolagenní vazivo zmoženo nebylo.

Imunohistochemická metoda detekce PCNA (viz OP, kapitola 10.1.2) ukázala přítomnost PCNA-pozitivních buněk v zánětlivých infiltrátech. Dále bylo patrné mnoho proliferujících alveolárních a intersticiálních makrofágů. Množství PCNA-pozitivních buněk v septech a intersticiu bylo u experimentální skupiny mírně zvýšeno.

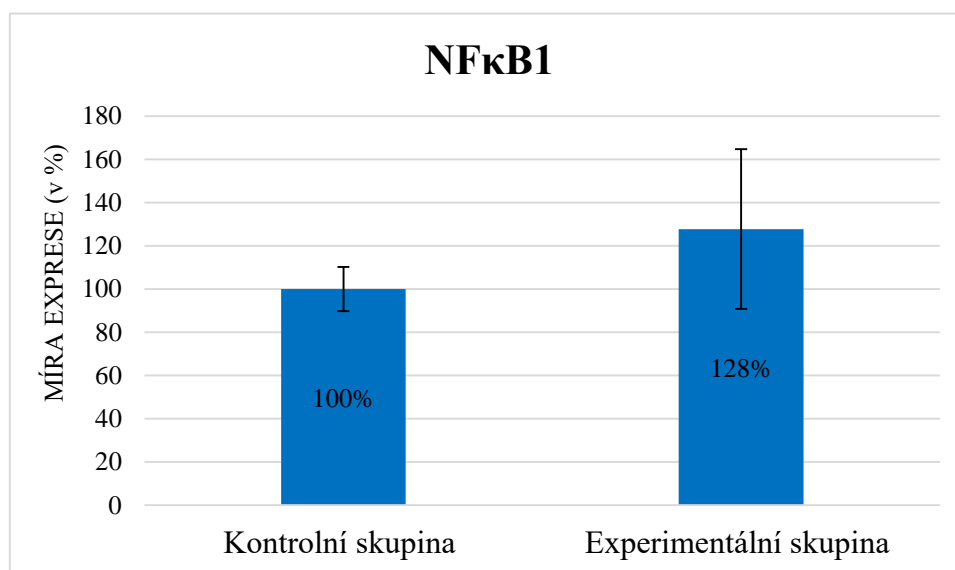
Počet TUNEL-pozitivních buněk (viz OP, kapitola 10.1.3) byl v plicích kontrolních jedinců nízký, buňky se jen ojediněle nacházely v alveolárních septech. Po jedenáctidenní inhalaci NPs jsme pozorovali nárůst počtu TUNEL-pozitivních buněk jak ve srovnání s kontrolami, tak s jedinci ze šestitýdenního inhalačního experimentu. Pozitivní buňky se vyskytovaly v zánětlivých infiltrátech, a dále pak ve větší míře i v alveolárních oblastech.

Velké množství SOX2-pozitivních buněk bylo stejně jako v šestitýdenním experimentu detekováno v epitelu bronchiolů (viz OP, kapitola 10.1.4). Po jedenáctidenní inhalaci jsme ale obdobně jako v předchozím inhalačním experimentu nezaznamenali změny v množství nebo lokalizaci SOX2-pozitivních buněk.

Imunofluorescenční analýza Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy (viz OP, kapitola 10.1.5) ukázala snížené množství enzymu v epitelu bronchiolů u exponované skupiny zvířat. Množství Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy v alveolárních septech nebylo oproti kontrolám signifikantně změněno.

Po jedenáctidenní inhalaci nanočástic PbO jsme pozorovali zvýšení exprese NFκB1 v plicích, výsledky ale nebyly statisticky signifikantní (viz Graf č. 7)

Graf č. 7: Analýza exprese NFκB1 v plicích po jedenáctidenní inhalaci NPs PbO

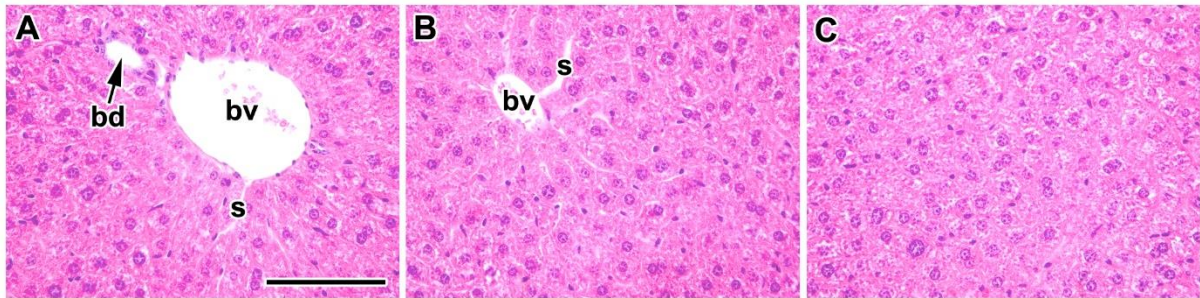




## 5.3 Játra – sídlo detoxikačních a metabolických funkcí

### 5.3.1 Šestitýdenní inhalace nanočástic PbO

Po šestitýdenní inhalaci nanočástic jsme v játrech experimentálních myší ve srovnání s kontrolními jedinci (viz Obr. č. 10) pozorovali výrazné změny, které ukazují na značné poškození jaterní tkáně.



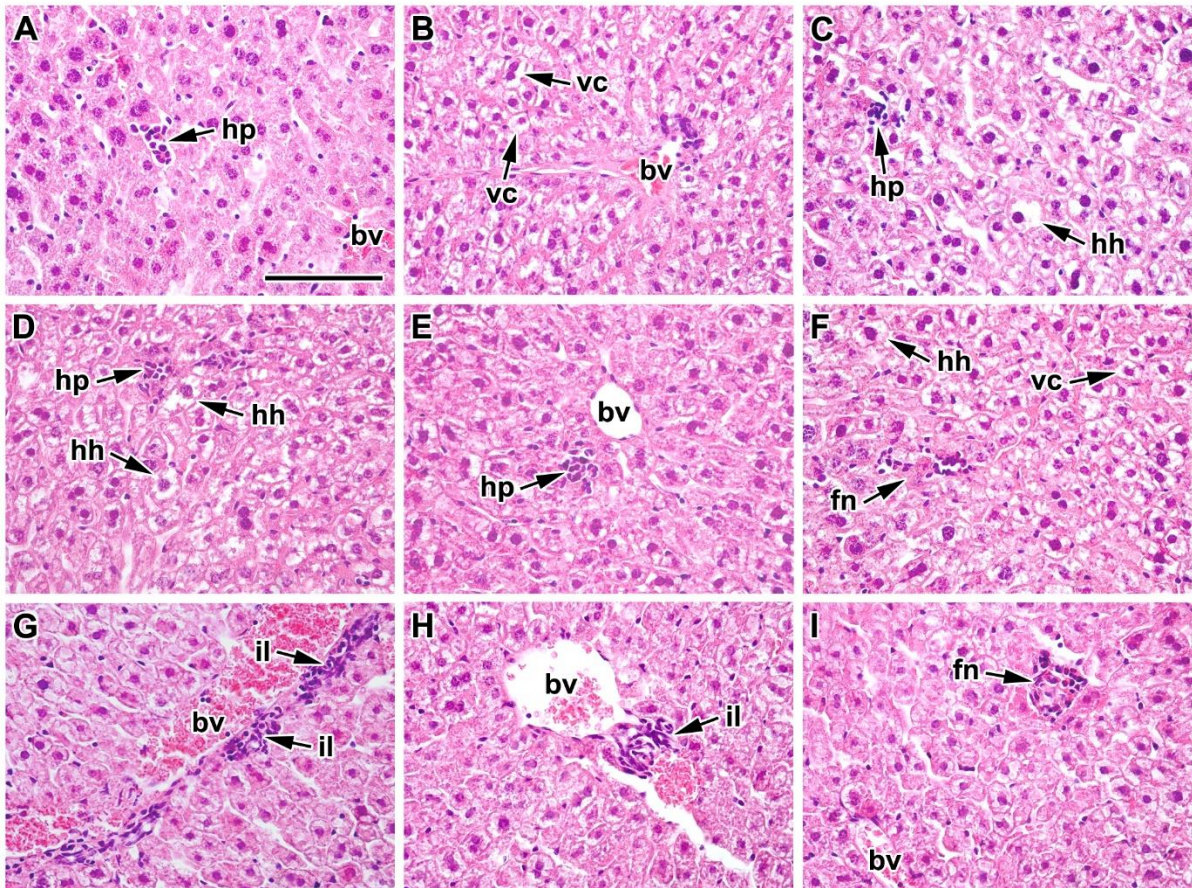
Obr. č. 10: *Histopatologická analýza jater kontrolních jedinců z šestitýdenního experimentu*

**A, B, C:** Hepatocyty tvoří jaterní trámce, mezi kterými probíhají fenestrované sinusoidy (s). Játra jsou hojně protkána cévami (bv) tvořícími nutritivní nebo funkční oběh. V hepatocytech dochází ke tvorbě žluči, která je odváděna žlučovými kapilárami a žlučovody (bd).

Měřítka = 100  $\mu$ m; **bd** – žlučovod, **bv** – céva, **s** – sinusoida.

Histopatologická analýza jater exponovaných jedinců (viz Obr. č. 11; strana 52) odhalila poškození, remodelaci a dystrofii hepatocytů. Byla patrná hydropická degenerace a vakuolizace jaterních buněk nebo hypertrofie hepatocytů (často kombinovaná s karyomegalií) převážně v centrilobulárních oblastech (tzv. centrilobulární hypertrofie). Dále bylo zaznamenáno zvýšené množství dvoujaderných hepatocytů. Také jsme pozorovali ukládání drobných tukových kapének v cytoplasmě hepatocytů, což ukazuje na mikrovesikulární steatózu. Místy jsme rovněž zaznamenali známky počínající jaterní nekrózy s infiltrací leukocytů. Také byl patrný nárůst ložisek hematopoézy, zejména kolem cév, ale i mezi hepatocyty. V játrech exponovaných myší byly přítomné i perivaskulární zánětlivé infiltráty imunitních buněk.





Obr. č. 11: *Histopatologická analýza jater experimentálních jedinců po šestitýdenní inhalaci nanočástic PbO*

**A, B, C, D, E, F, G, H, I:** Je vidět remodelace jaterní tkáně. Mnohé hepatocyty jsou dystrofické nebo hypertrofické (**hh**) s karyomegalií a vakuolizací cytoplasmy (**vc**). Přítomná je i začínající fokální nekróza hepatocytů (**fn**) s infiltrací imunitních buněk. Zánětlivé infiltráty leukocytů (**il**) jsou dále patrné kolem cév. Místa je přítomna i extramedulární hematopoéza (**hp**).

Měřítka = 100  $\mu$ m; **bv** – céva, **fn** – fokální nekróza, **hh** – hypertrofický hepatocyt, **hp** – hematopoéza, **il** – infiltrát leukocytů, **vc** – vakuolizace cytoplasmy.

Množství kolagenního vaziva, které bylo znázorněno pomocí barvení Massonovým zeleným trichromem (viz OP, kapitola 10.2.1), nebylo v játrech po inhalaci nanočástic PbO změněno. Stejně jako v játrech kontrolních jedinců bylo vazivo detekováno především kolem centrálních vén, žlučovodů nebo v okolí Glissonových triád. Ale zvýšená přítomnost vaziva mezi hepatocyty, která by mohla znamenat jaterní fibrózu, nebyla pozorována.

U kontrolních jedinců vykazovaly zvýšenou expresi PCNA především Kuppferovy a endotelové buňky (viz OP, kapitola 10.2.2). Přítomnost PCNA-pozitivních hepatocytů byla minimální. V játrech experimentálních myši byla stejně jako u kontrol zaznamenána proliferace endotelových nebo Kuppferových buněk. Změna oproti kontrolní skupině byla patrná pouze ve zvýšeném počtu PCNA-pozitivních hepatocytů (především dvoujaderných). U exponovaných

jedinců PCNA dále exprimovaly buňky v ložiscích extramedulární hematopézy nebo v zánětlivých infiltrátech.

Analýza jaterní tkáně pomocí metody TUNEL (viz OP, kapitola 10.2.3) nepřinesla žádné výsledky, které by ukazovaly na změny v množství TUNEL-pozitivních buněk. V játrech kontrolních i exponovaných jedinců vykazovaly pozitivitu především Kuppferovy a endotelové buňky. Překvapivě, v místech fokální nekrózy a v zánětlivých infiltrátech nebyly detekovány téměř žádné TUNEL-pozitivní buňky.

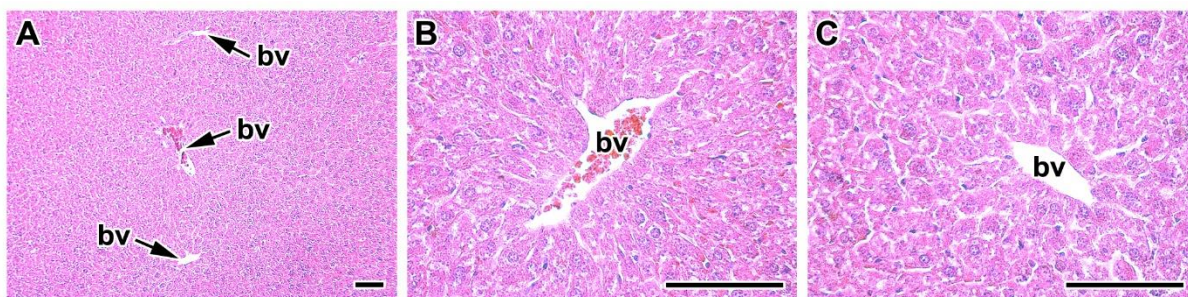
Pomocí PAS reakce jsme detekovali přítomnost glykogenu v hepatocytech (viz OP, kapitola 10.2.4). Po šestitýdenní inhalaci NPs došlo u experimentálních jedinců v jaterních buňkách k výraznému úbytku tohoto polysacharidu.

Imunofluorescenční metodou detekce SOX9 jsme analyzovali přítomnost možných progenitorových buněk vykazujících expresi právě tohoto transkripčního faktoru (viz OP, kapitola 10.2.5). U kontrolních i experimentálních jedinců jsme SOX9-pozitivní buňky detekovali okolo cév a žlučodů. V játrech experimentálních jedinců jsme pozorovali vyšší množství SOX9-pozitivních buněk v cévních oblastech.

V játrech kontrolních jedinců jsme na membránách jaterních buněk detekovali velké množství  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy (viz OP, kapitola 10.2.6). Po šestitýdenní inhalaci nanočástic PbO jsme zaznamenali výrazné snížení množství tohoto enzymu.

### **5.3.2 Jedenáctitýdenní inhalace nanočástic PbO**

Po jedenáctitýdenní inhalaci NPs PbO jsme v játrech pozorovali četné patologické změny. Histopatologická analýza pomocí barvení hematoxylinem-eosinem (viz Obr. č. 13; strana 55) potvrdila změny, které jsme pozorovali i v kratším inhalačním experimentu. Játra kontrolních jedinců můžeme vidět na Obr. č. 12 (viz strana 54).



**Obr. č. 12: Histopatologická analýza jater kontrolních jedinců z jedenáctitýdenního experimentu**

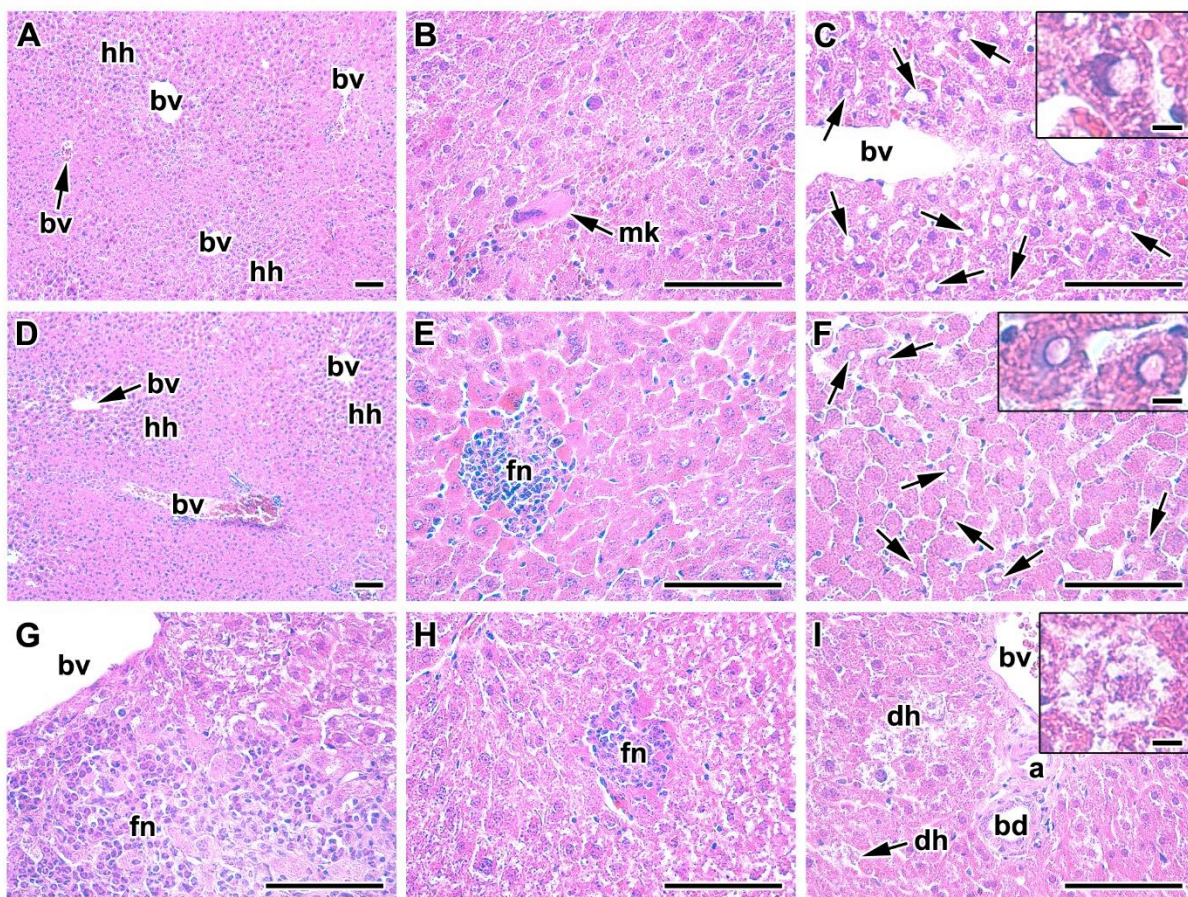
**A:** Trámce hepatocytů jsou uspořádané v lalůčku kolem centrální vény. Není patrná žádná změna ve velikosti jaterních buněk v jednotlivých částech lalůček.

**B, C:** Játra jsou hojně protkána většími cévami (**bv**) a sinusoidami probíhajícími mezi hepatocyty v trámčích.

Měřítka = 100  $\mu$ m; **bv** – céva.

Po delší expozici nanočásticím jsme zaznamenali pokročilou remodelaci, hypertrofii, dystrofii, hydropickou degeneraci a vakuolizaci hepatocytů. Přítomna byla dále i hemostáza a patrné bylo i poškození sinusoid. Mikrovesikulární steatóza, kterou jsme pozorovali po šestitýdenní inhalaci, se po delší expozici nanočásticím PbO změnila na makrovesikulární. Přítomna byla i výrazná centrilobulární hypertrofie a karyomegalie hepatocytů. Množství dvoujaderných hepatocytů bylo u exponovaných jedinců zvýšeno. Po inhalaci NPs PbO byly zaznamenány i hepatocyty s větším počtem jader (5-7). Stejně jako po šestitýdenní inhalaci jsme pozorovali zvýšenou přítomnost extramedulární hematopoézy. U experimentálních jedinců byla zaznamenána i přítomnost megakaryocytů v jaterním parenchymu. Dále došlo k nárůstu míst s fokální nekrózou. V místech fokální nekrózy se často vyskytovaly zánětlivé infiltráty leukocytů, především lymfocytů a neutrofilů. Infiltrace imunitních buněk byla pozorována i v portálních oblastech.





Obr. č. 13: *Histopatologická analýza jater experimentálních jedinců po jedenáctidenní inhalaci nanočástic PbO*

**A, D:** V játrech je přítomná centrilobulární hypertrofie hepatocytů (**hh**). Na první pohled jsou patrné rozdíly ve velikosti jednotlivých hepatocytů.

**B:** Megakaryocyt (**mk**) přítomný v jaterním parenchymu.

**E, G, H:** Fokální nekróza v játrech (**fn**) s infiltrací imunitních buněk (především lymfocytů a neutrofilů).

**C, F:** V hepatocytech je přítomná makrovesikulární steatóza. Šipky ukazují tukové kapénky v jaterních buňkách. **Výřezy** (C, F; měřítko = 10  $\mu$ m) – hepatocyty s tukovými kapénkami v cytoplasmě.

**I:** Je patrná remodelace tkáně, hepatocyty jsou dystrofické (**dh**). Pravděpodobně se jedná o počátek fokální nekrózy. **Výřez** (I; měřítko = 10  $\mu$ m) – silně dystrofický hepatocyt.

Měřítka = 100  $\mu$ m, ve výřezu měřítko = 10  $\mu$ m; **a** – arterie, **bd** – žlučovod, **bv** – céva, **dh** – dystrofické hepatocyty, **fn** – fokální nekróza, **hh** – hypertrofické hepatocyty, **mk** – megakaryocyt.

Kolagení vlákna nebyla stejně jako po šestidenní inhalaci v játrech zmnožena. Kolagení vazivo bylo u experimentálních i kontrolních myši detekováno pouze kolem cév a žlučovodů (viz OP, kapitola 10.2.1).

Imunohistochemická metoda detekce proteinu PCNA (viz OP, kapitola 10.2.2) u neexponovaných jedinců ukázala proliferaci především Kupferových a endotelových buněk,

dále pak v menší míře i hepatocytů. V jaterní tkáni experimentálních jedinců jsme vyjma Kupfferových, endotelových a jaterních buněk pozorovali PCNA-pozitivitu v ložiscích hematopoézy a v zánětlivých infiltrátech. V místech fokální nekrózy bez infiltrace byla exprese PCNA minimální.

Množství TUNEL-pozitivních buněk v játrech kontrolních jedinců bylo minimální stejně jako v kratším inhalačním experimentu, pozitivní byly především endotelové a Kupfferovy buňky (viz OP, kapitola 10.2.3). Po inhalaci nanočástic vykazovaly pozitivitu navíc i některé hepatocyty. Množství pozitivních buněk jinak nebylo oproti kontrolám výrazně změněno. TUNEL-pozitivní buňky jsme překvapivě nedetekovali v místech fokální nekrózy.

PAS barvení (viz OP, kapitola 10.2.4) odhalilo úbytek glykogenu v hepatocytech experimentálních jedinců. Zatímco u kontrol byly jaterní buňky plné glykogenu, v buňkách jedinců po inhalaci nanočástic bylo patrné výrazné snížení množství tohoto polysacharidu.

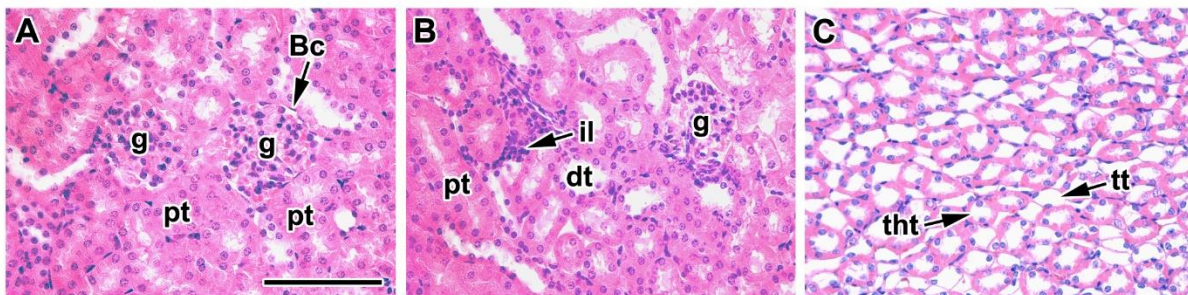
Pro analýzu SOX9 faktoru v játrech byla zvolena imunofluorescenční metoda (viz OP, kapitola 10.2.5). V játrech kontrolních jedinců byly SOX9-pozitivní buňky lokalizované okolo žlučovodů a cév. Buňky žlučovodů vykazovaly stejně vysokou expresi u kontrolních i experimentálních jedinců, ale po jedenáctidenní inhalaci jsme pozorovali zvýšené množství SOX9-pozitivních buněk okolo cév.

Množství Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy na membránách jaterních buněk (viz OP, kapitola 10.2.6) bylo u exponovaných myší oproti kontrolním snižené. Na základě IF analýzy bylo zřejmé, že na některých membránách přítomnost tohoto enzymu úplně chyběla.

## **5.4 Ledviny – orgán filtrace krve**

### **5.4.1 Šestitýdenní inhalace nanočástic PbO**

Histopatologická analýza odhalila, že šestitýdenní inhalace nanočástic PbO způsobila pouze minoritní změny v ledvinách. U experimentálních jedinců jsme zaznamenali pouze drobné odlišnosti oproti ledvinám kontrolních jedinců (viz Obr. č. 14; strana 57).



*Obr. č. 14: Histopatologická analýza ledvin kontrolních jedinců z šestitýdenního experimentu*

**A:** V ledvinové kůře se nachází mnoho Malpighiho tělísek, která jsou tvořena glomerulem (**g**) a Bowmanovým pouzdem (**Bc**). Šipka ukazuje konkrétně na parietální list Bowmanova pouzdra, který je u myších samic tvořen jednořadým dlaždicovým epitelem. Na glomerulus navazuje proximální tubulus (**pt**).

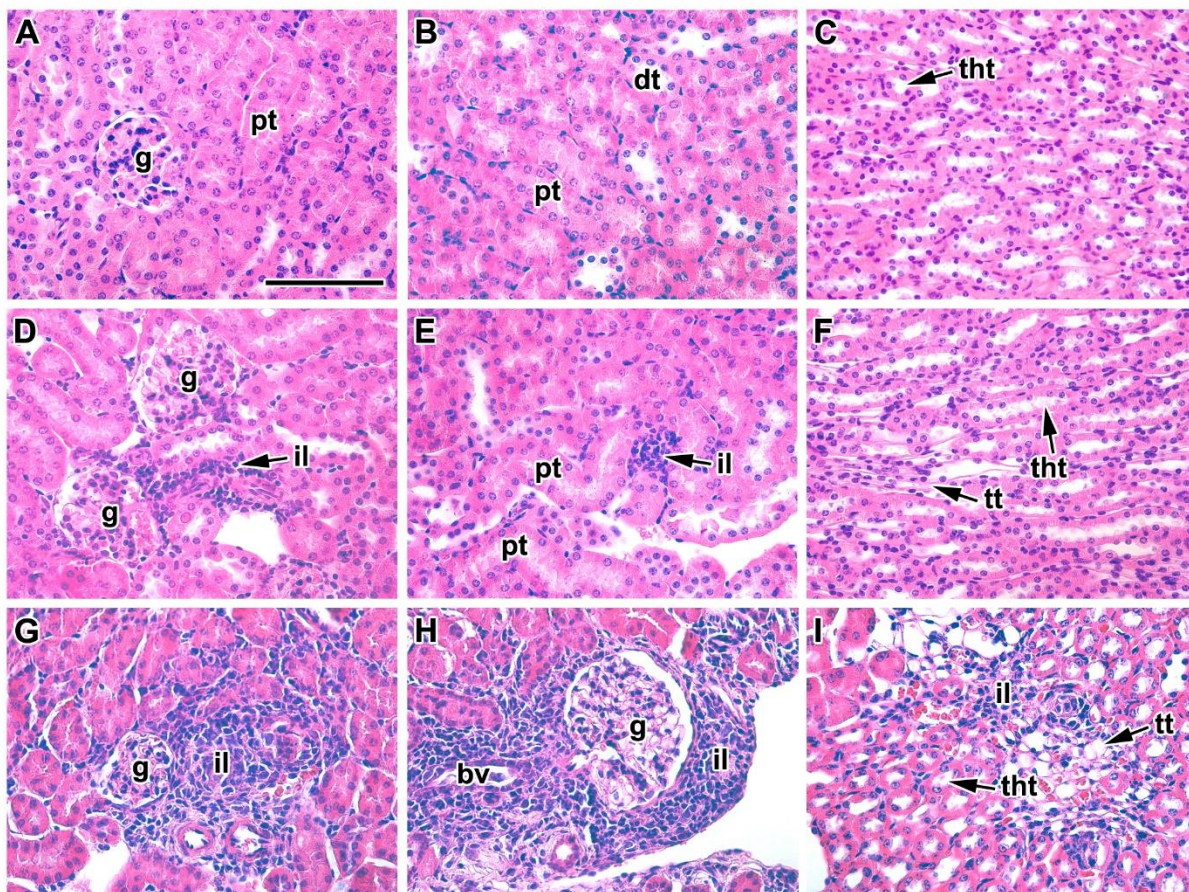
**B:** Kolem tubulů nebo Malpighiho tělísek se u hlodavců mohou vyskytovat drobné mononukleární infiltráty imunitních buněk (**il**). V tomto případě se nejedná o patologický jev.

**C:** Dřeň ledvin je tvořena převážně tenkými (**tt**) a tlustými (**tht**) segmenty Henleových kliček, dále pak sběracími kanálky, které směřují do ledvinové papily.

Měřítko = 100  $\mu$ m; **Bc** – parietální list Bowmanova pouzdra, **dt** – distální tubulus, **g** – glomerulus, **il** – infiltrát leukocytů, **pt** – proximální tubulus, **tht** – tlustý segment Henleovy kličky, **tt** – tenký segment Henleovy kličky.

U experimentálních jedinců (viz Obr. č. 15; strana 58) jsme pozorovali přítomnost mononukleárních infiltrátů v kůře kolem Malpighiho tělísek, ledvinových tubulů a cév. Ovšem drobné infiltráty obdobného typu jsme zaznamenali i v ledvinách kontrolních jedinců. Pouze u tří exponovaných jedinců byly infiltráty rozsáhlejšího charakteru a byly přítomné jak v kůře, tak v menší míře i ve dřeni. Postižená Malpighiho tělíska byla navíc lehce hypertrofická s dilatovanými kapilárami.





Obr. č. 15: *Histopatologická analýza ledvin experimentálních jedinců po šestidenní inhalaci nanočástic PbO*

**A, B:** Ledvinová kůra bez patologických změn.

**C, F:** Dřeň ledviny bez patologických změn.

**D, E:** Kolem tubulů a glomerulů (**g**) se nachází drobné mononukleární infiltráty leukocytů (**il**) srovnatelné s infiltráty v kůře kontrolních jedinců. Nejsou přítomné žádné indikátory, které by ukazovaly na přítomnost výrazných zánětlivých změn (edém, hemoragie, poškození okolní tkáně aj.).

**G, H:** U několika jedinců byly přítomny větší infiltráty imunitních buněk (**il**). Okolí je ale bez výraznější reakce. Postižený glomerulus (**H – g**) je pouze lehce hypertrofický.

**I:** Ledvinová dřeň s malými infiltráty leukocytů (**il**) mezi tenkými (**tt**) a tlustými (**tht**) segmenty Henleových kliček.

Měřítko = 100  $\mu$ m; **bv** – céva, **dt** – distální tubulus, **g** – glomerulus, **il** – infiltrát leukocytů, **pt** – proximální tubulus, **tht** – tlustý segment Henleovy kličky, **tt** – tenký segment Henleovy kličky.

Barvení vaziva Massonovým zeleným trichromem neukázalo žádné změny v množství kolageních vláken mezi kontrolní a experimentální skupinou zvířat (viz OP, kapitola 10.3.1). Vazivo bylo detekováno především okolo Bowmanových pouzder a ledvinových cév.

Analýza PCNA-pozitivních buněk neprokázala výrazné změny v počtu proliferujících buněk mezi kontrolní a experimentální skupinou (viz OP, kapitola 10.3.2). PCNA-pozitivní

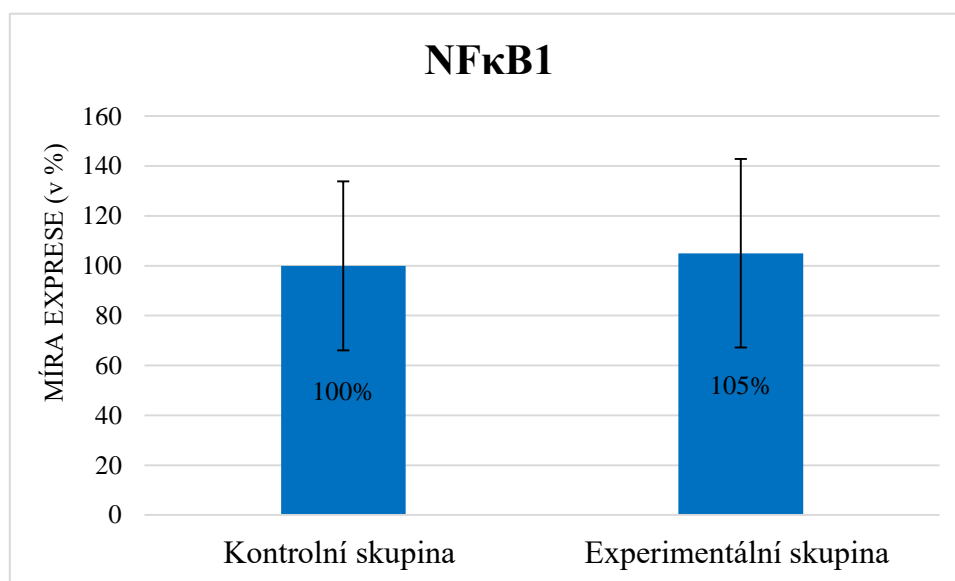
byly u obou skupiny zejména buňky tubulů jak v kůře, tak v menší míře i ve dřeni. Jediná změna v množství proliferačních buněk byla pozorována ve výraznějších mononukleárních infiltrátech u třech zmíněných experimentálních jedinců, kdy v nich bylo detekováno velké množství PCNA-pozitivních buněk.

Metodou TUNEL byly v ledvinách znázorněny TUNEL-pozitivní buňky (viz OP, kapitola 10.3.3). Rozdíl v množství pozitivních buněk mezi kontrolními a exponovanými zvířaty nebyl pozorován. TUNEL-pozitivní buňky se sporadicky vyskytovaly v kůře a ve dřeni, pouze v infiltrátech bylo zaznamenáno jejich větší množství.

Imunofluorescenční analýza Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy (viz OP, kapitola 10.3.4) prokázala její snížené množství po inhalaci NPs PbO. Expres byla snížena zejména v proximálních tubulech.

Analýza exprese transkripčního faktoru NFκB1 po šestitýdenní inhalaci nanočástic PbO neukázala rozdíl mezi kontrolní a experimentální skupinou zvířat (viz Graf č. 8).

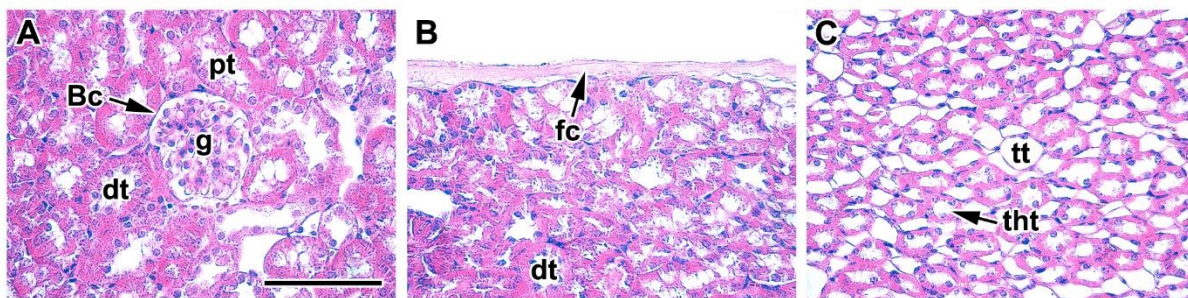
Graf č. 8: Analýza exprese NFκB1 v ledvinách po šestitýdenní inhalaci NPs PbO



#### 5.4.2 Jedenáctitýdenní inhalace nanočástic PbO

Po jedenáctitýdenní inhalaci jsme zaznamenali mírný nárůst množství patologických změn v ledvinách ve srovnání s kontrolami (viz Obr. č. 16; strana 60) i s exponovanými jedinci ze šestitýdenního experimentu.





Obr. č. 16: *Histopatologická analýza ledvin kontrolních jedinců z jedenáctidenního experimentu*

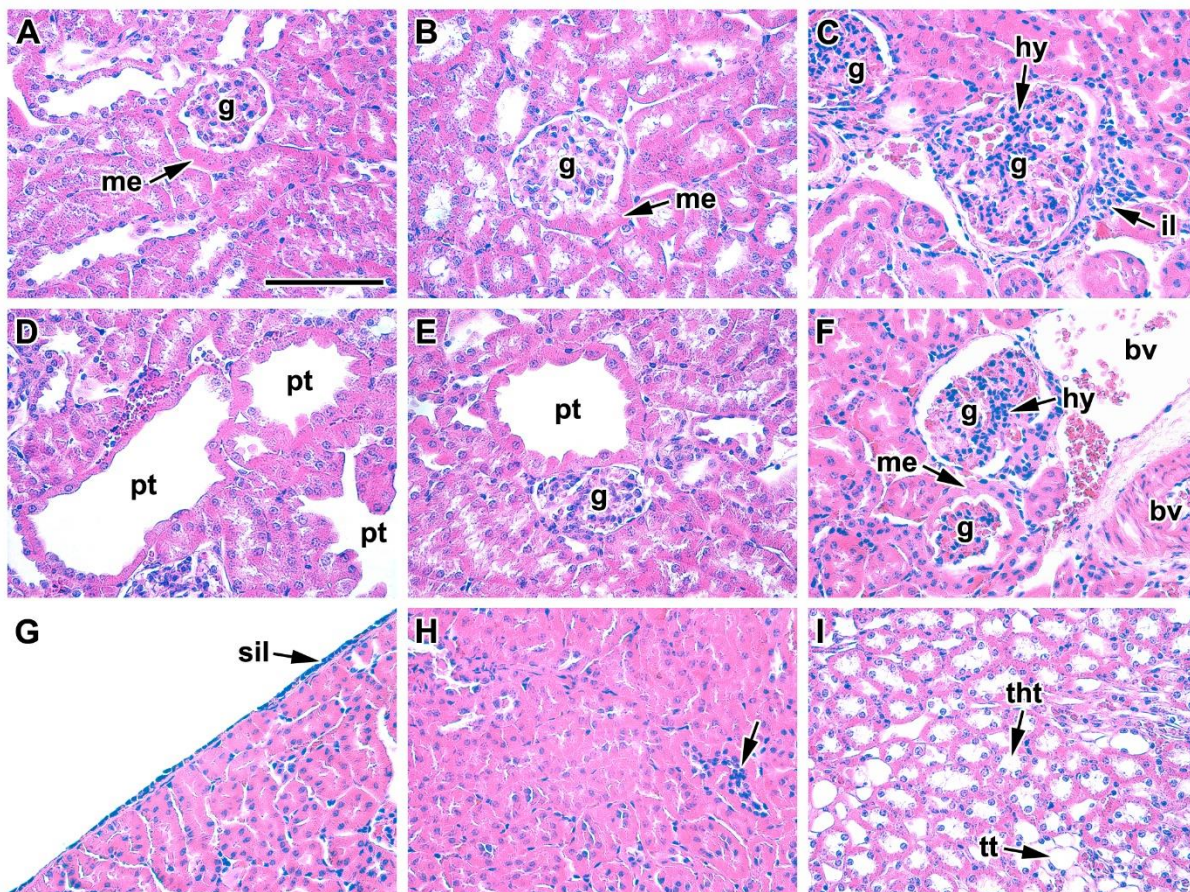
**A:** Ledvinová kůra s Malpighiho tělísky, proximálními (**pt**) a distálními tubuly (**dt**).

**B:** Ledvina je na povrchu kryta tenkým vazivovým pouzdrém (**fc**). Pod pouzdrém se nachází kůra ledviny.

**C:** Dřeň ledvin s tenkými (**tt**) a tlustými (**tht**) segmenty Henleových kliček.

Měřítka = 100  $\mu$ m; **Bc** – parietální list Bowmanova pouzdra, **dt** – distální tubulus, **fc** – vazivové pouzdro, **g** – glomerulus, **pt** – proximální tubulus, **tht** – tlustý segment Henleovy kličky, **tt** – tenký segment Henleovy kličky.

Stejně jako v krátkodobějším experimentu jsme pozorovali drobné mononukleární infiltráty kolem ledvinových tělísek, tubulů a cév jak u exponované (viz Obr. č. 17; strana 61), tak u kontrolní skupiny zvířat. U několika experimentálních myší jsme ale v jedenáctidenním experimentu navíc pozorovali přítomnost subkapsulárních infiltrátů. Po inhalaci NPs byla dále zaznamenána metaplazie parietálního listu Bowmanova pouzdra, dilatace proximálních tubulů a akumulace jader v distálních tubulech. V kůře byly navíc přítomné četné hypertrofické juxtamedulární glomeruly. V některých glomerulech byla patrná hypercelularita.



Obr. č. 17: *Histopatologická analýza ledvin experimentálních jedinců po jedenáctitýdenní inhalaci nanočástic PbO*

**A, B:** V kůře je kolem glomerulů (**g**) patrná metaplazie parietálního listu Bowmanova pouzdra (**me**), kdy je dlaždicový epitel změněn na kubický epitel.

**C, F:** Hypertroffické juxtamedulární glomeruly (**g**) s přítomnou hypercelularitou (**hy**). Kolem glomerulů jsou patrné drobné mononukleární infiltráty (**il**).

**D, E:** Dilatované proximální tubuly (**pt**) v kůře ledviny.

**G, H:** Subkapsulární infiltrát imunitních buněk (**sil**) a akumulace jader v distálních tubulech (**šipka**) v kůře ledvin.

**I:** Dřeň ledviny bez patologických změn.

Měřítko = 100  $\mu\text{m}$ ; **bv** – céva, **g** – glomerulus, **hy** – hypercelularita, **me** – metaplazie parietálního listu Bowmanova pouzdra, **il** – infiltrát leukocytů, **pt** – proximální tubulus, **sil** – subkapsulární infiltrát leukocytů, **tth** – tlustý segment Henleovy kličky, **tt** – tenký segment Henleovy kličky.

Pomocí barvení Massonovým zeleným trichromem jsme detekovali kolagenní vazivo (viz OP, kapitola 10.3.1). Mezi kontrolní a experimentální skupinou jsme změny v množství přítomného kolagenního vaziva nepozorovali.

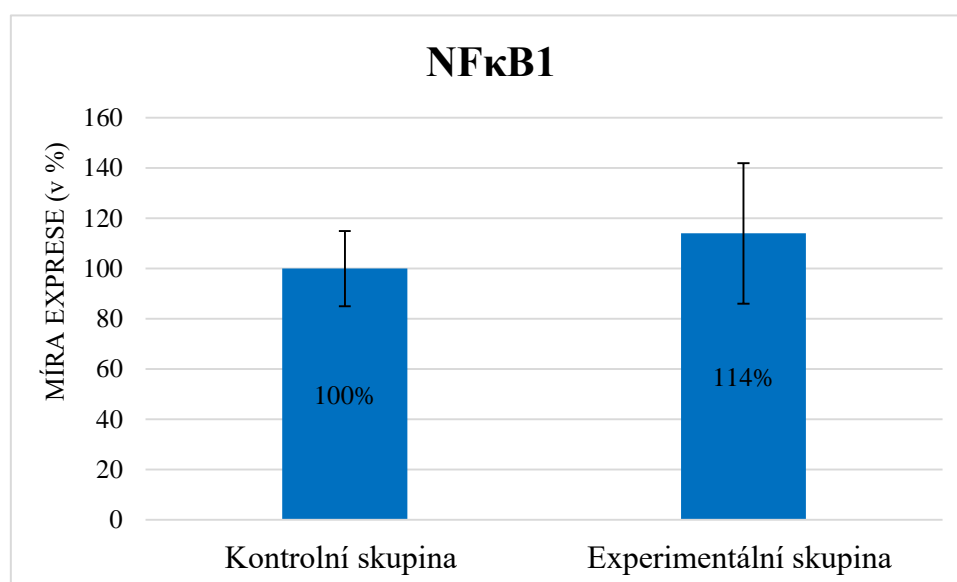
IHC metoda detekující PCNA (viz OP, kapitola 10.3.2) neprokázala změny v počtu proliferujících buněk. PCNA-pozitivní buňky se nacházely u obou skupin zvířat zejména v tubulech (v kůře i ve dřeni).

Analýza TUNEL-pozitivních buněk (viz OP, kapitola 10.3.3) u kontrolních jedinců ukázala velmi málo pozitivních buněk. Jejich počet byl srovnatelný s množstvím v ledvinách experimentálních jedinců.

Analýza  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy pomocí imunofluorescenční metody (viz OP, kapitola 10.3.4) prokázala snížení množství sodno-draselné pumpy v ledvinách experimentálních zvířat, a to zejména v proximálních tubulech.

Po šestitýdenní inhalaci nanočástic PbO jsme stejně jako v krátkodobějším experimentu nezaznamenali signifikantní změnu v expresi NF $\kappa$ B1 (viz Graf č. 9).

Graf č. 9: Analýza exprese NF $\kappa$ B1 v ledvinách po jedenáctitýdenní inhalaci NPs PbO

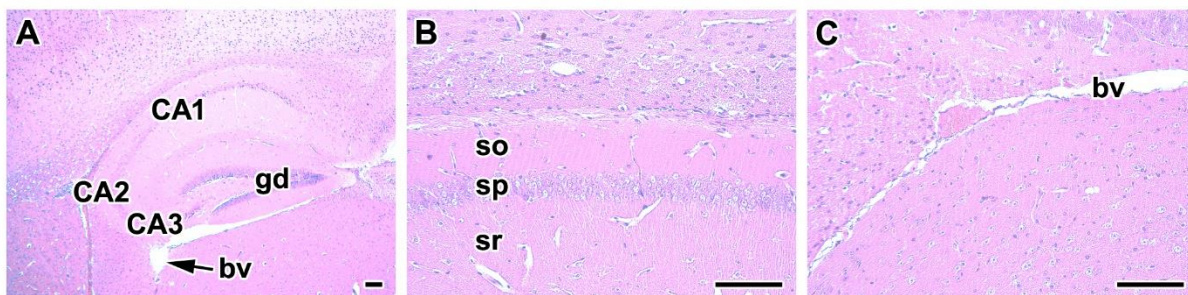


## 5.5 Mozek – řídicí centrum nervové soustavy

### 5.5.1 Šestitýdenní inhalace nanočástic PbO

Analýza mozků myší byla provedena na longitudinálních řezech. Při hodnocení patologických nálezů jsme se zaměřili především na oblast hippocampu, kde jsme pozorovali patologické změny. V ostatních částech mozku jsme nezaznamenali signifikantní rozdíly mezi experimentálními a kontrolními jedinci. Hippokampus kontrolních jedinců můžeme vidět na Obr. č. 18 (strana 63).





Obr. č. 18: *Histopatologická analýza hippocampální oblasti mozku kontrolních jedinců z šestidenního experimentu*

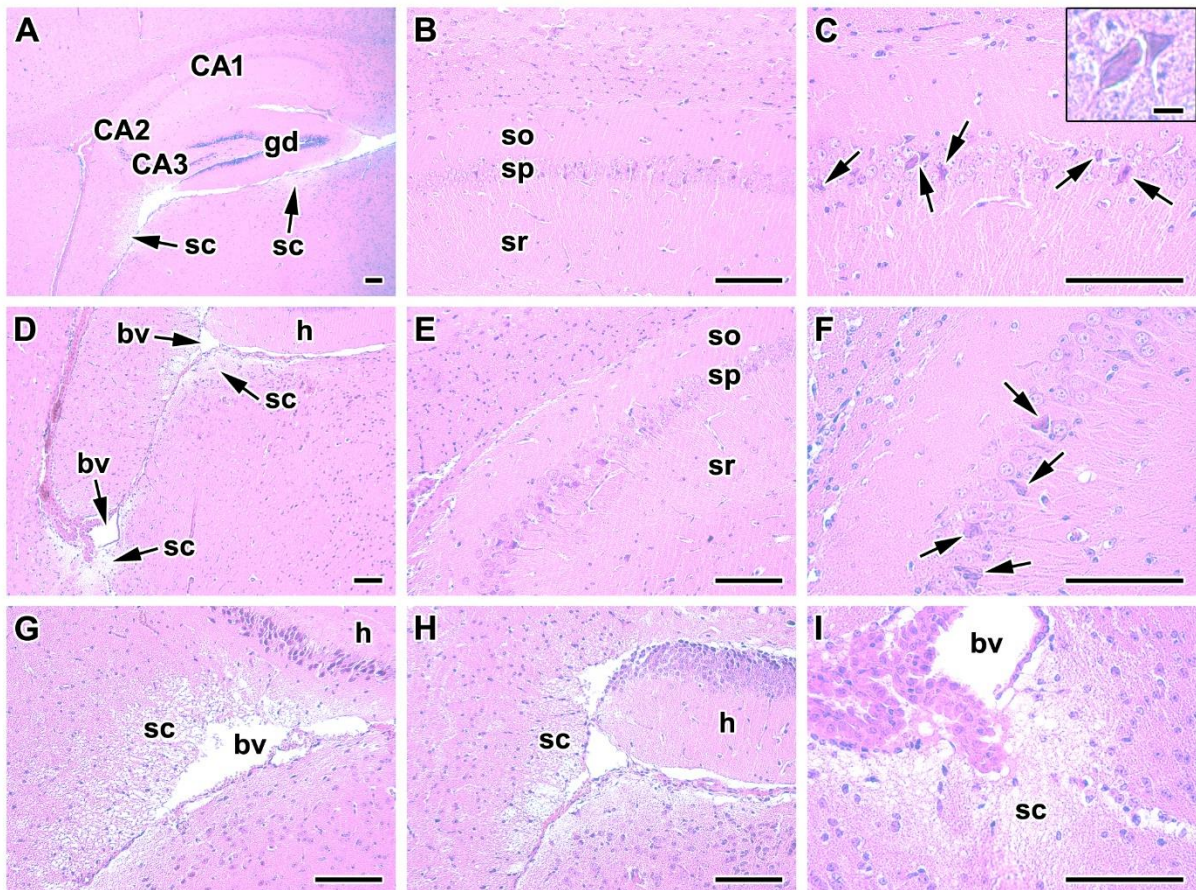
**A:** Hippokampus tvoří dvě základní struktury – Ammonův roh (*cornu Ammonis*) a gyrus dentatus (**gd**). Ammonův roh je rozdělen do tří základních polí – CA1, CA2 a CA3. Mozek je hustě protkán cévami (**bv**).

**B:** Hippokampální oblast CA1. Ammonův roh je rozdělen typicky do tří vrstev – *stratum oriens* (**so**), *stratum pyramidale* (**sp**) s perikaryi neuronů a *stratum radiatum* (**sr**). V pyramidové vrstvě (**sp**) nejsou patrné žádné nekrotické neurony.

**C:** Céva (**bv**) v okolí hippocampální formace.

Měřítko = 100  $\mu\text{m}$ ; **bv** – céva, **CA1** – *cornu Ammonis 1*, **CA2** – *cornu Ammonis 2*, **CA3** – *cornu Ammonis 3*, **gd** – *gyrus dentatus*, **so** – *stratum oriens*, **sp** – *stratum pyramidale*, **sr** – *stratum radiatum*.

Histopatologická analýza odhalila, že expozice NPs způsobuje patologické změny v mozkové tkáni (viz Obr. č. 19; strana 64). Po inhalaci nanočástic PbO jsme zaznamenali přítomnost nekrotických neuronů v pyramidové vrstvě Ammonova rohu (CA). Změny byly pozorovány především v oblasti CA1, dále v menší míře v CA2 poli. Dále byly přítomny spongiformní změny v bílé hmotě v okolí hippocampální formace (zejména okolo cév).



Obr. č. 19: *Histopatologická analýza hippokampální oblasti mozku experimentálních jedinců po šestidenní inhalaci nanočástic PbO*

**A, D:** V okolí hippokampální formace jsou patrné spongiformní změny (sc). Hippokampus tvoří Ammonův roh a gyrus dentatus (gd). V mozku je přítomno mnoho cév (bv).

**B, C:** Hippokampální oblast CA1. V pyramidové vrstvě (sp) Ammonova rohu jsou přítomné nekrotické neurony (C – šipky). **Výřez** (C; měřítko = 10 µm) – detail nekrotických neuronů.

**E, F:** Hippokampální oblast CA2 s poškozenými neurony (F – šipky) v pyramidové vrstvě (sp).

**G, H, I:** Detail spongiformních změn bílé hmoty (sc) v okolí hippokampu (h). Většina spongiformních změn je kolem mozkových cév (bv).

Měřítka = 100 µm; **bv** – céva, **CA1** – cornu Ammonis 1, **CA2** – cornu Ammonis 2, **CA3** – cornu Ammonis 3, **gd** – gyrus dentatus, **h** – hippocampus, **sc** – spongiformní změny bílé hmoty, **so** – stratum oriens, **sp** – stratum pyramidale, **sr** – stratum radiatum.

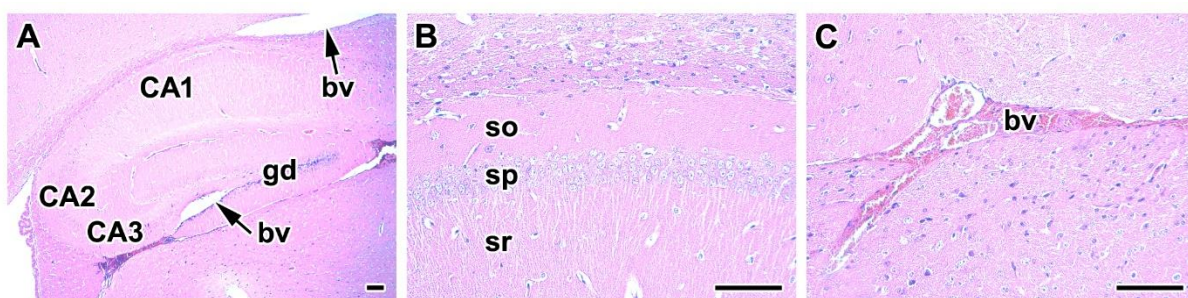
Barvení luxolovou modří (viz OP, kapitola 10.4.1) potvrdilo spongiformní změny v bílé hmotě. Myelinová vlákna byla v těchto oblastech poškozená. Mimo oblasti se spongiformními změnami jsme nezaznamenali změny v myelinizaci.

Pomocí IHC metody jsme detekovali neurofilamenta, která jsou přítomna v cytoplasmě neuronů (viz OP, kapitola 10.4.2). Poruchu v množství těchto intermediálních filament ve srovnání s kontrolami jsme u exponovaných myši pozorovali v místech spongiformních změn.



### 5.5.2 Jedenáctýdenní inhalace nanočástic PbO

Po jedenáctýdenní expozici nanočásticím jsme v ostatních částech mozku oproti kontrolám nepozorovali signifikantní změny, proto jsme se při hodnocení patologických změn stejně jako v předchozí analýze soustředili výhradně na hippokampální oblast. Longitudinální řezy hippokampem kontrolních myší jsou vidět na Obr. č. 20.



Obr. č. 20: *Histopatologická analýza hippokampální oblasti mozku kontrolních jedinců z jedenáctýdenního experimentu*

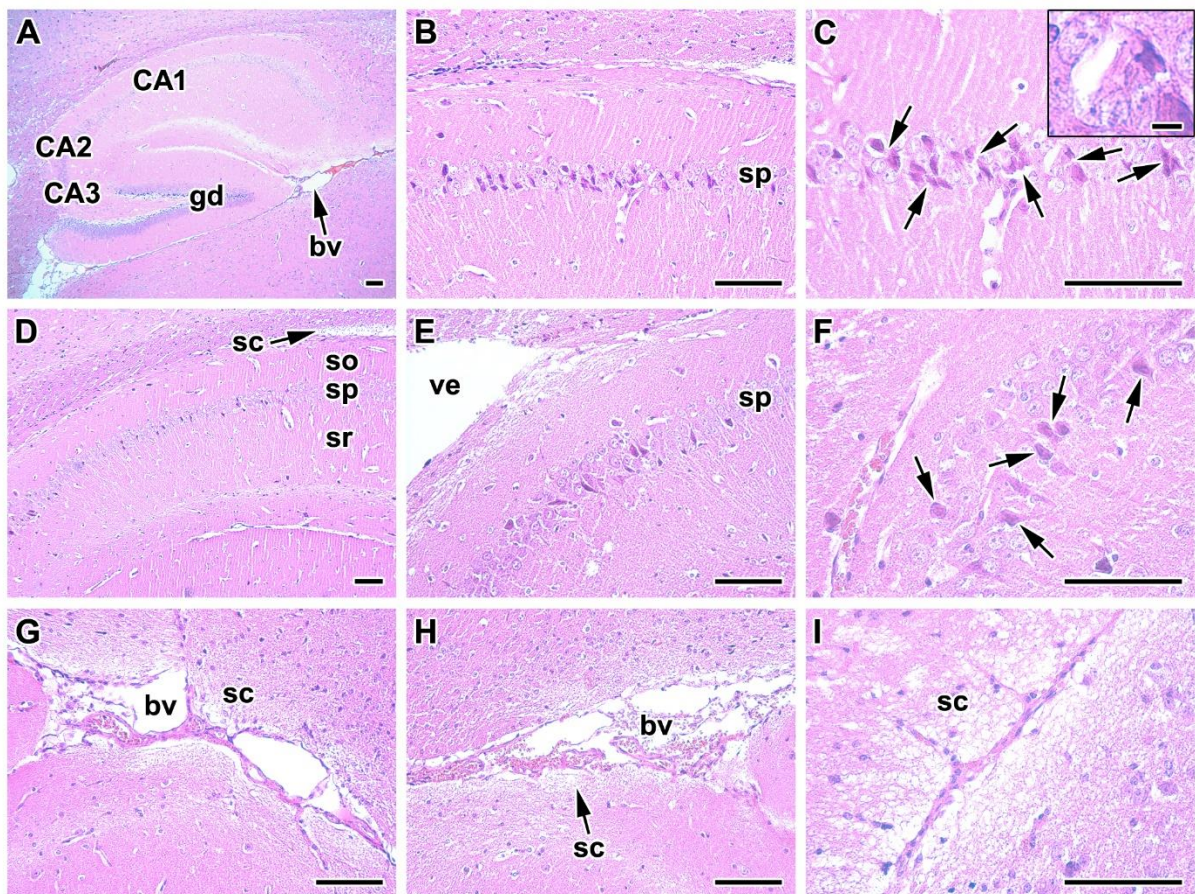
**A:** Ammonův roh a gyrus dentatus (**gd**) společně vytváří hippokampální formaci. Okolo hippokampu se nachází mnoho cév (**bv**).

**B:** Hippokampální oblast CA1. V pyramidové vrstvě (**sp**) nejsou patrné žádné nekrotické neurony.

**C:** Okolí cév (**bv**) je bez spongiformních změn.

Měřítko = 100  $\mu$ m; **bv** – céva, **CA1** – cornu Ammonis 1, **CA2** – cornu Ammonis 2, **CA3** – cornu Ammonis 3, **gd** – gyrus dentatus, **so** – stratum oriens, **sp** – stratum pyramidale, **sr** – stratum radiatum.

Histopatologická analýza mozku exponovaných jedinců ukázala přítomnost četných patologických změn v hippokampu (viz Obr. č. 21; strana 66). Stejně jako po krátkodobější inhalaci byly zaznamenány spongiformní změny bílé hmoty v okolí hippokampální formace a četné nekrotické neurony v CA1 a CA2 poli pyramidové vrstvy Ammonova rohu. Oproti šestitýdenní inhalaci jsme zaznamenali nárůst nekrotických neuronů v CA2 poli.



Obr. č. 21: *Histopatologická analýza hippocampální oblasti mozku experimentálních jedinců po jedenáctidenní inhalaci nanočástic PbO*

**A:** Ammonův roh a gyrus dentatus (**gd**) v hippocampu. *Cornu Ammonis* je tvořený CA1, CA2 a CA3 polem. Nejsou patrné žádné změny v anatomické struktuře.

**B, C:** Hippokampální oblast CA1. V pyramidové vrstvě (**sp**) je mnoho nekrotických neuronů (**C – šipky**). **Výřez** (C; měřítko = 10  $\mu\text{m}$ ) – detail nekrotických neuronů.

**D:** Ammonův roh tvořený třemi vrstvami - *stratum oriens* (**so**), *stratum pyramidale* (**sp**) a *stratum radiatum* (**sr**). Nad hippocampální formací jsou přítomny spongiformní změny (**sc**).

**E, F:** Hippokampální oblast CA2 s nekrotickými neurony (**F – šipky**) v pyramidové vrstvě (**sp**) Ammonova rohu.

**G, H, I:** Detail spongiformních změn (**sc**) v okolí hippocampální formace.

Měřítka = 100  $\mu\text{m}$ ; **bv** – céva, **CA1** – *cornu Ammonis 1*, **CA2** – *cornu Ammonis 2*, **CA3** – *cornu Ammonis 3*, **gd** – *gyrus dentatus*, **sc** – spongiformní změny bílé hmoty, **so** – *stratum oriens*, **sp** – *stratum pyramidale*, **sr** – *stratum radiatum*, **ve** – postranní mozková komora.

Barvení luxolovou modří (viz OP, kapitola 10.4.1) ukázalo změny a poškození myelinových vláken v místech spongiformních změn bílé hmoty. V jiných oblastech jsme nepozorovali změny oproti kontrolním jedincům.

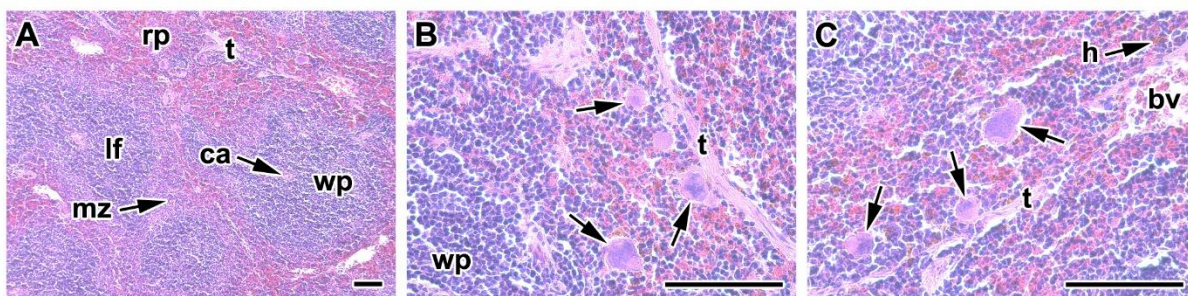


Pro znázornění neurofilament v cytoplasmě neuronů byla použita IHC metoda (viz OP, kapitola 10.4.2), která potvrdila poškození mozkové tkáně v místech spongiformních změn. Neurofilamenta byla v takovýchto oblastech poškozena a jejich množství sníženo.

## 5.6 Slezina – místo zániku erytrocytů

### 5.6.1 Šestitýdenní inhalace nanočástic PbO

Po šestitýdenní inhalaci NPs PbO jsme ve slezině nepozorovali žádné signifikantní patologické změny. Nebyly patrné žádné známky nekrózy, zánětlivé infiltrace nebo hemostázy. Jedinou výraznou změnou oproti kontrolním jedincům (viz Obr. č. 22) bylo zvýšené množství megakaryocytů a megakaryoblastů v červené pulpě sleziny u experimentální skupiny zvířat (viz Obr. č. 23; strana 68).



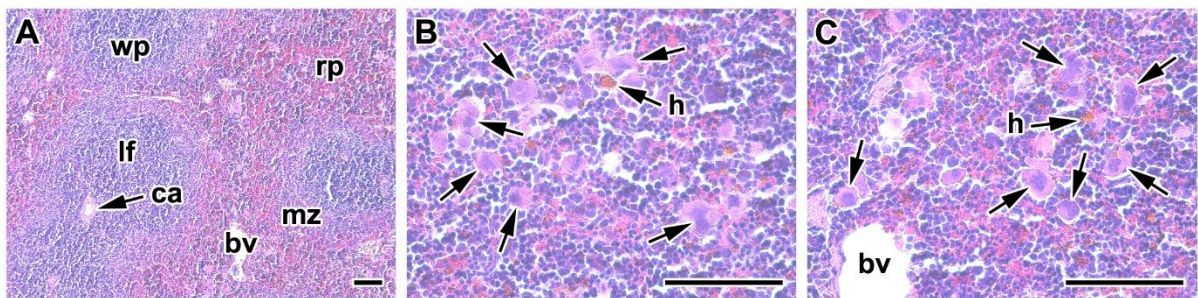
Obr. č. 22: *Histopatologická analýza sleziny kontrolních jedinců z šestitýdenního experimentu*

**A:** Z vazivového pouzdra odstupují do nitra sleziny trabekuly, které jsou doprovázeny postupně se větvcími cévami (**bv**). Parenchym sleziny je členěn na bílou (**wp**) a červenou (**rp**) pulpu. Největší objem bílé pulpy tvoří lymfatické folikuly (**lf**). Obvodovou zónu lymfatických folikulů tvoří marginální zóna (**mz**). Středem bílé pulpy prochází centrální arterie (**ca**).

**B, C:** V červené pulpě myši sleziny se hojně vyskytují megakaryocyty (**šipky**). V retikulárním vazivu je patrné i velké množství hemosiderinu (**h**).

Měřítka = 100  $\mu$ m; **bv** – céva, **ca** – centrální arterie, **h** – hemosiderin, **lf** – lymfatický folikul, **mz** – marginální zóna, **rp** – červená pulpa, **t** – trabekula, **wp** – bílá pulpa.





Obr. č. 23: *Histopatologická analýza sleziny experimentálních jedinců po šestitýdenní inhalaci nanočástic PbO*

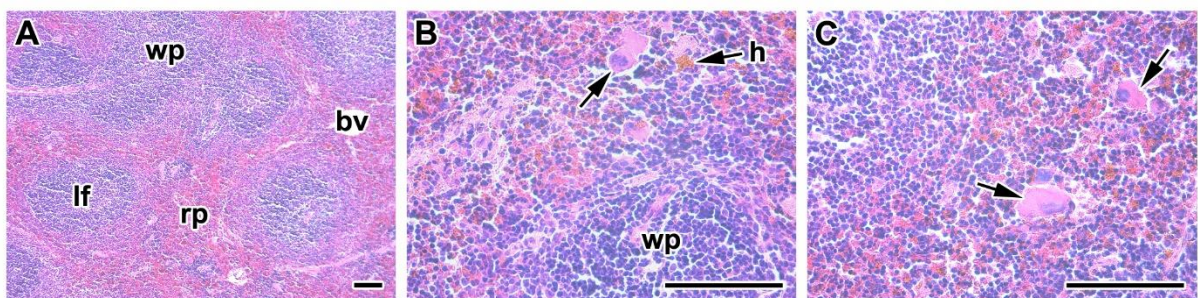
**A:** Převážnou část bílé pulpy (**wp**) tvoří lymfatické folikuly (**lf**). Folikuly jsou obklopeny marginální zónou (**mz**), která vytváří přechodnou hranici mezi bílou a červenou pulpou (**rp**). Parenchym sleziny je hustě protkán cévami (**bv**).

**B, C:** V červené pulpě myši sleziny je mezi imunitními buňkami a červenými krvinkami přítomno velké množství megakaryocytů (**šipky**).

Měřítka = 100  $\mu\text{m}$ ; **bv** – céva, **ca** – centrální arterie, **h** – hemosiderin, **lf** – lymfatický folikul, **mz** – marginální zóna, **rp** – červená pulpa, **t** – trabekula, **wp** – bílá pulpa.

### 5.6.2 Jedenáctitýdenní inhalace nanočástic PbO

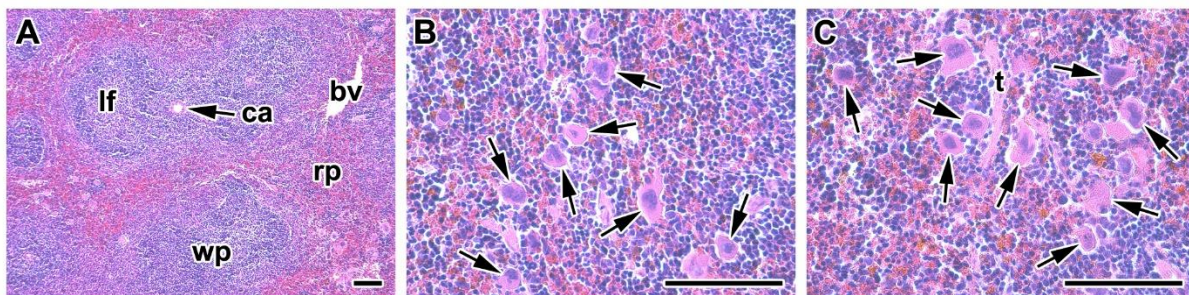
Jedenáctitýdenní inhalace nanočástic PbO stejně jako šestitýdenní nezpůsobila výrazné patologické změny ve slezině. Stejně jako v předchozím experimentu jsme pozorovali pouze vyšší množství megakaryocytů a megakaryoblastů (viz Obr. č. 25; strana 69). Řezy slezinou kontrolních myši můžeme vidět na Obr. č. 24.



Obr. č. 24: *Histopatologická analýza sleziny kontrolních jedinců z jedenáctitýdenního experimentu*

**A, B, C:** Většinu parenchymu sleziny tvoří červená pulpa (**rp**), která se skládá Billrothových provazců a venózních sinusů. Provazce jsou tvořeny především retikulárním vazivem s četným zastoupením erytrocytů, lymfocytů, granulocytů nebo megakaryocytů (**šipky**). Mezi provazci probíhají venózní sinusy.

Měřítka = 100  $\mu\text{m}$ ; **bv** – céva, **ca** – centrální arterie, **h** – hemosiderin, **lf** – lymfatický folikul, **mz** – marginální zóna, **rp** – červená pulpa, **t** – trabekula, **wp** – bílá pulpa.



Obr. č. 25: *Histopatologická analýza sleziny experimentálních jedinců po jedenáctidenní inhalaci nanočástic PbO*

**A, B, C:** V ose lymfatického folikulu (**lf**) bílé pulpy (**bw**) probíhá centrální arterie (**ca**). Bílou pulpu obklopuje převažující červená pulpa (**rp**) tvořená retikulárními vlákny a venózními sinusy. Hranici mezi bílou a červenou pulpou vytváří marginální zóna (**mz**). V silně prokrveném parenchymu myši sleziny jsou vedle četných imunitních buněk a erytroctů přítomné megakaryocyty (**šipky**).

Měřítko = 100  $\mu\text{m}$ ; **bv** – céva, **ca** – centrální arterie, **h** – hemosiderin, **lf** – lymfatický folikul, **mz** – marginální zóna, **rp** – červená pulpa, **t** – trabekula, **wp** – bílá pulpa.

## 6 DISKUZE

V dnešní době nacházejí nanočástice své uplatnění prakticky ve všech odvětvích lidské činnosti včetně medicíny, farmaceutické výroby, potravinářství, kosmetiky, stavebnictví či elektrotechniky. Jejich produkce tak stále více roste a nanočástice se postupně stávají běžnou součástí životního prostředí (Nowack and Brucheli, 2007; Skřehot and Rupová, 2011).

Nicméně se ukazuje, že látky v nanočásticové podobě mají často odlišné toxikologické vlastnosti než ve své makroskopické formě. Toxický účinek NPs závisí na mnoha faktorech, jako je například místo vstupu, jejich velikost, povrchové vlastnosti nebo i pH v jednotlivých tkáních a orgánech organismů (Buzea et al., 2007; Maynard et al., 2006; Nel et al., 2006; Skřehot and Rupová, 2011).

Z hlediska toxického vlivu na organismy je jedním z nejdůležitějších faktorů právě rozměr nanočástic, který hraje roli při prostupu nanočástic přes buněčné membrány. Dosud provedené experimenty ukazují, že menší částice způsobují mnohem vážnější poškození než jejich větší ekvivalenty (Li et al., 2003; Oberdorster, 2001). Při interakcích s buněčnou membránou pak nanočástice způsobují mechanické či chemické poškození, které často vede k zániku buňky. V případě biologicky aktivních látek může vzájemné působení způsobit změnu jejich konformace, což vede k výraznému ovlivnění jejich funkce (Karlsson et al., 2013). V proteinech nebo enzymech vede interakce k inhibici jejich aktivity (Rim et al., 2013) a v případě DNA mohou vykazovat mutagenní nebo genotoxické účinky (Dizaj et al., 2014).

Mezi hlavní cesty vstupu nanočástic do organismu patří inhalace, dermální přístup nebo ingesce (Casals et al., 2008). Absorpce nanočástic přes kůži je relativně nízká, což prokazuje její účinnou funkci v podobě bariéry zabraňující vstupu nanočástic do organismu ve srovnání s více prostupným gastrointestinálním traktem nebo plícemi (Labouta and Schneider, 2013).

Inhalace v současnosti patří mezi nejpravděpodobnější cestu vstupu nanočástic do organismu (Casals et al., 2008). V naší studii jsme se tedy rozhodli zaměřit právě na tento způsob aplikace nanočástic. Jedním z největších zdrojů kontaminace vzduchu nanočásticemi je v dnešní době automobilová doprava, kdy v okolí dálnic byla i v našich zeměpisných šířkách naměřena koncentrace dosahující až hodnoty milionu částic v krychlovém metru (Vojtíšek, 2011; Ždímal, 2010). Studie prováděné v hustě zalidněných oblastech ukazují, že úmrtnost pacientů s respiračními, kardiovaskulárními a či jinými dalšími onemocněními, které souvisí právě s nanočásticovým znečištěním, již překonává mortalitu pacientů s nemocemi způsobenými kouřením, jež je samo o sobě poměrně velkým zdrojem nanočástic vdechovaných do plic (Holgate, 2010).

Nanočástice olova nacházejí již teď své využití v moderním průmyslu. Uplatňují se například jako polovodiče v LED diodách, infračervené detektory nebo aditiva do mazacích olejů. Nicméně samotné výrobní procesy využívající aplikace nanočástic olova netvoří největší zdroj znečištění životního prostředí těmito nanočásticemi. Problémem jsou v dnešní době především nanočástice, které jsou do ovzduší emitovány jako vedlejší produkt spalovacích a průmyslových procesů (Li et al., 2003; Zhao et al., 2004). Hlavním zdrojem částic olova ve vzduchu je pak automobilová nebo letecká doprava, olověné hutě či rychle se rozvíjející elektrotechnický průmysl (Maynard et al., 2006).

Světová zdravotnická organizace (WHO) stanovuje limit množství částic olova ve vzduchu na hodnotu  $0,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Poulakis et al., 2015). Ovšem tento limit není dodržován na mnohých místech po celém světě. Množství olova okolo  $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$  bylo naměřeno ve městech jako je Teherán, Athény, Lahore nebo mnohá průmyslově města ve Španělsku (Querol et al., 2007; Shah et al., 2012). Množství částic olova ve vzduchu pohybující se od 10 do  $77 \mu\text{g}/\text{m}^3$  bylo naměřeno v některých španělských městech se silným petrochemickým nebo ocelářským průmyslem (Querol et al., 2007). Mnohem vyšší koncentrace pak byly naměřeny ve velkých asijských městech (Gurjar et al., 2016; Huang et al., 2013) nebo v místech, kde se lidé dostávají do přímého kontaktu s olovem (URL 1). V našem experimentu byla hodnota nanočástic ve vzduchu ( $121,7 - 192,5 \mu\text{g PbO}/\text{m}^3$ ) srovnatelná právě s množstvím, kterému jsou vystaveni pracovníci v průmyslu nebo obyvatelé asijských megaměst.

Při inhalaci je rozhodujícím parametrem pro jejich toxicitu právě velikost, která určuje jejich průnik a depozici v dýchacím systému organismů. Částice větší než  $10 \mu\text{m}$  jsou zachycovány již v nosní dutině a netvoří s největší pravděpodobností potenciální nebezpečí pro plíce. Menší částice již pronikají hlouběji, dostávají se až do dýchacích cest, kde jsou zachyceny pomocí přítomného hlenu a řasinek. Pokud jsou partikule menší než  $2 \mu\text{m}$ , dostávají se přes dýchací cesty až do alveolů (Hoet et al., 2004; Li et al., 2003), odkud mohou pronikat do krevního oběhu (Oberdorster, 2001).

Inhalované částice jsou považovány za jednu z příčin vzniku plicních onemocnění u lidí. Výskyt těchto onemocnění pak narůstá zejména u pracovníků, kteří se často dostávají do kontaktu s velkým množstvím mikro a nanočástic. Inhalace minerálního prachu například způsobuje pneumokoniózy, v případě inhalace kamenného prachu nebo azbestu pak vznikají závažné plicní fibrózy v mnohých případech následované rakovinou plic. Dlouhodobé vystavování se uhelnému prachu pak vede ke vzniku silikóz (Churg and Wiggs, 1984; Churg and Wiggs, 1987). V našem případě jsme po inhalaci NPs PbO nepozorovali žádnou přítomnost

fibrózy v plicích. Pozorovali jsme sice velkou remodelaci tkáně, ale podle našeho pozorování se jedná pouze o nárůst počtu buněk, především pneumocytů. Zde se ukazuje odlišný vliv na plicní tkáň právě například v porovnání s vdechováním azbestu nebo uhlíkových nanotrubiček (Donaldson et al., 2006; Muller et al., 2005; Shvedova et al., 2008), kdy byla pozorována přítomnost silné plicní fibrózy. Ovšem zda s rostoucím časem inhalace NPs PbO nedojde k podobným patologickým změnám, bude nutné v budoucnu experimentálně ověřit.

Z dýchacího systému mohou být nanočástice odstraňovány pomocí tzv. hlenového eskalátoru. V případě jeho dlouhodobého přetěžování dochází k nárůstu hlenových žláz a buněk vylučujících hleny, což může vést k bronchiolitidě. Tento jev je například pozorován u kuřáků a při inhalaci dráždivých substancí (Holgate, 2010). V souladu s tímto pozorováním jsme i v našem experimentu zaznamenali bronchiolitidu v plicích experimentálních jedinců po inhalaci nanočástic PbO.

Samotné respirační ústrojí má svoji vlastní schopnost rozlišit podněty běžně přítomné ve vzduchu od patogenních činitelů. Součástí této imunity jsou jak odpovědi přirozené imunity, tak antigen-specifické reakce. V alveolech představuje prvotní reakci makrofágy, které patogenní objekty fagocytují (Mühlfeld et al., 2008; Yacobi et al., 2011). Pokud je ale množství částic v plicích příliš velké i s ohledem na fagocytární činnost makrofágů, dochází k zánětům a alveolární destrukci s následnou fibrózou (Holgate, 2010).

Efektivita fagocytózy závisí mimo jiné i na velikosti pohlcovaných částic. Některé studie ukazují, že fagocytóza alveolárních makrofágů je méně účinná vůči malým částicím oproti těm větším (Lee et al., 2011). I když tedy bylo v našem experimentu množství makrofágů po inhalaci nanočástic výrazně zvýšeno, nemusí se jednat o efektivní obranu plic proti přítomným nanočásticím. Stejná reakce plic, tedy zvýšení počtu makrofágů, bylo pozorováno při intratracheální expozici nanočásticím titanu nebo kadmia (Blum et al., 2014; Lee et al., 2011; Nemmar et al., 2008; Takenaka et al., 2004). Makrofágy jsme se pokoušeli analyzovat pomocí IHC metody detekující receptor CD68 typický právě pro tyto imunitní buňky. Nicméně tato analýza nebyla úspěšná, pravděpodobně z důvodu použití protilátky pro lidskému CD68. V našem experimentu jsme po inhalaci NPs PbO pozorovali větší množství PCNA-pozitivních makrofágů, které také může přispívat k vyššímu množství těchto imunitních buněk v plicích exponovaných jedinců.

Pokud tedy nanočástice nejsou fagocytovány, dochází k jejich depozici v plicních buňkách. Po inhalaci nanočástic PbO jsme v souladu s tímto poznatkem pozorovali největší množství nanočástic právě v pneumocytech I. typu (Dumková et al., 2017).



Plíce představují orgán, který je vystaven největší koncentraci inhalovaných nanočástic. I vzhledem k aktivaci četných obranných mechanismů způsobila inhalace NPs vážné změny v plicích, které ukazují na chronický zánět plicní tkáně. Podobné změny, především tedy zánětlivé infiltráty s převahou lymfocytů, makrofágů a neutrofilů, byly pozorovány ve studiích s nanočásticemi TiO<sub>2</sub> a CdO (Blum et al., 2014; Dumková et al., 2016; Cho et al., 2010; Lee et al., 2011; Nemmar et al., 2008; Takenaka et al., 2004). Tento typ infiltrátů je typický právě pro chronický zánět. Na druhou stranu chronická nebo akutní inhalace nanočástic oxidů kovů jako je CeO<sub>2</sub>, NiO, ZnO a CuO způsobila odlišný druh zánětlivých infiltrátů (Cho et al., 2010). Potenciální možnost toxicity tak nemůže být hodnocena jednotně, ale musí být stanovována odděleně pro každý typ nanočástic. Po inhalaci NPs PbS byl stejně jako v našem experimentu pozorován nárůst hmotnosti plic u experimentálních jedinců, vznik zánětlivých infiltrátů, poškození pneumocytů a zvýšená přítomnost makrofágů (Li et al., 2003). Ostatní patologické změny pozorované v plicích, jako například atelektáza, alveolární emphyzém, bronchiolitida nebo alveolitida, odpovídají poměrně vážnému poškození plic, které může způsobit vážné zdravotní potíže. Histopatologická analýza plic po inhalaci NPs PbO potvrdila dále přítomnost siderofágů a hemosiderinu pravděpodobně v důsledku dlouhodobé plicní kongesce.

Poškození plic po inhalaci NPs PbO odpovídá i větší množství TUNEL-pozitivních buněk u experimentálních jedinců. S delší dobou inhalace jsme pozorovali nárůst množství těchto buněk. TUNEL je metoda typická pro barvení apoptotických buněk na základě detekce fragmentové DNA. Ale vzhledem ke skutečnosti, že k fragmentaci DNA dochází během apoptózy i nekrózy, nebyli jsme schopni přesně rozlišit mezi těmito procesy. V práci tedy buňky detekované touto metodou nazýváme obecně jako TUNEL-pozitivní buňky.

Schopnost nanočástic přecházet snadno přes membrány buněk byla potvrzena již v mnoha předchozích studiích (Blum et al., 2014; Dumková et al., 2016; Hoet et al., 2004; Cho et al., 2010; Lee et al., 2011; Li et al., 2003; Nemmar et al., 2008; Takenaka et al., 2004). Další osud nanočástic v organismu velmi závisí i na jejich velikosti. Menší NPs pronikají přes buněčné membrány mnohem snadněji a mohou tedy velice efektivně přestupovat přes plicní bariéru do krve. V experimentech s nanočásticemi TiO<sub>2</sub> byla jejich přítomnost v epitelových a endotelových buňkách plic pozorována již po 1 hodině inhalace (Geiser et al., 2005).

Z plic jsou pak nanočástice krví již po poměrně krátké době a ve velkém počtu distribuovány do dalších tkání a orgánů (Li et al., 2003; Oberdorster, 2001). Po inhalaci nanočástic CdO byla v játrech zaznamenána signifikantní akumulace NPs již po 24 hodinách a v ledvinách, mozku a slezině po 72 hodinách (Lebedová et al., 2016). V případě akutní

inhalace NPs PbO (koncentrace  $4.05 \times 10^6$  PbO NPs/cm<sup>3</sup>) byla signifikantní koncentrace olova v ledvinách naměřena již po 4 hodinách, v játrech po 12 hodinách a v mozku po 72 hodinách (Lebedová et al., 2018). I v našem experimentu můžeme potvrdit, že nanočástice přecházejí z plic do krve a jsou distribuovány do dalších orgánů, kde způsobují patologické změny.

Játra jsou orgánem, který se účastní mnoha důležitých detoxikačních nebo metabolických pochodů. Předchozí studie již potvrdily negativní vliv nanočástic na tento orgán. Po inhalaci NPs PbO jsme v naší studii pozorovali zvýšenou akumulaci tukových kapének v cytoplasmě hepatocytů, která potvrzuje poškození procesu syntézy a eliminace triglyceridů. V játrech, která jsou hlavním sídlem metabolismu tuků, tento poznatek indukuje probíhající jaterní steatózu. Právě porucha skladování a metabolismu lipidů v játrech je často považována za významný znak hepatotoxicity (Broeg et al., 2005). Inhalace nanočástic PbO pak dále způsobila fokální nekrózu, infiltraci imunitních buněk, hydropickou degeneraci, dystrofii a hypertrofii hepatocytů. Tyto patologické změny pak ukazují typické znaky probíhající steatohepatitidy (Farrell and Larter, 2006; Paschos and Paletas, 2009). Hypertrofie hepatocytů je běžně spojována s indukcí některých jaterních enzymů. Hypertrofie nejčastěji postihuje centrilobulární hepatocyty, ale v mnohých případech se může rozšířit i do středu lalůček. Právě hypertrofie spojená s karyomegalii a mnohoaderností jaterních buněk je často pozorována při chronických expozicích toxickým látkám. Následkem hypertrofie dochází ke snížení průtoku krve sinusoidami, což může být následováno degenerací nebo nekrózou jaterních buněk (Haschek et al., 2010; Thoolen et al., 2010). Obdobné změny zahrnující právě fokální nekrózu s infiltrací imunitních buněk, hydropickou degeneraci, dystrofii nebo hypertrofii hepatocytů byly pozorovány po expozici nanočásticím mědi (Liu et al., 2009), kadmia (Dumková et al., 2016) nebo ceru (Nalabotu et al., 2011). Extramedulární hematopoéza, která byla po inhalaci NPs PbO pozorována, je pro zdravé dospělé myši jedince netypická a je často spojována právě s expozicí toxickým látkám a vyčerpáním organismu (Scudamore, 2014; Thoolen et al., 2010). S vyčerpáním organismu vlivem intoxikace nanočásticemi PbO souvisí také úbytek glykogenu v jaterních buňkách (Thoolen et al., 2010). Ve studii chronické toxicity trihydrátu octanu olovnatého na krysách došlo k podobným mikroskopickým defektům jako po inhalaci NPs PbO. Byla pozorována fokální nekróza, infiltrace imunitních buněk, hydropická degenerace hepatocytů nebo snížení obsahu glykogenu v jaterních buňkách (Jarrar and Taib, 2012).

Překvapivě jsme v našem experimentu nezaznamenali přítomnost jaterní fibrózy. Tento fakt kontrastuje například se studií s nanočásticemi SiO<sub>2</sub>, kde expozice vedla ke vzniku fibrózy

jaterní tkáně (Nishimori et al., 2009). Nicméně zda po delší expozici nanočásticím PbO nedojde k podobným patologickým změnám, je nutné v budoucnu experimentálně ověřit.

V játrech experimentálních jedinců jsme pozorovali změnu v aktivitě Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy. Fluorescenční značení tohoto enzymu potvrdilo, že vlivem inhalace NPs PbO došlo ke snížení jeho množství na membránách hepatocytů. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza hraje významnou roli při regulaci osmotického tlaku, čímž zároveň napomáhá udržování buněčného objemu. Právě inhibice nebo snížení funkce tohoto enzymu mohou být následovány poruchou osmoregulace, která vede ke zvýšené akumulaci intracelulární tekutiny s následným buněčným edémem (Jorgensen et al., 2003; Páral, 2012; Yang et al., 1992). Podobný efekt, tedy snížení exprese Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy, byl pozorován u dání pruhovaného po expozici nanočásticím stříbra (Katuli et al., 2014) nebo po expozici sladkovodní ryby *Catostomus commersonii* nanočásticím ZnO (Bessemmer et al., 2014).

SOX9 je transkripční faktor se významně uplatňuje vývoji, diferenciaci a také regeneraci jater (Furuyama et al., 2011; Lefebvre et al., 2007). Již dříve bylo potvrzeno, že zvýšení exprese SOX9 může být spojeno právě s poškozením jaterní tkáně a opravnými procesy (Wang et al., 2013). Po inhalaci NPs PbO jsme tuto skutečnost pozorovali také.

Ledviny jsou důležitým orgánem, který slouží k filtraci krve a odstraňování nečistot z těla v podobě moči. Při otravě olovem dochází k poškození ledvin, které často bývá nevratné a má pro organismus fatální účinky. Studie zabývající se toxicitou olova popisují jak vznik četných funkčních změn ledvin, jako je například dysfunkce proximálních tubulů, tak četné patologické nálezy v tkáni ledvin, jako například vznik intersticiálních fibróz (Loghman-Adham, 1998; Papanikolaou et al., 2005). Nicméně vliv olova v nanočásticové podobě je stále neobjasněný. V naší studii jsme po šestitýdenní inhalaci NPs PbO překvapivě nezaznamenali žádné signifikantní změny v tkáni ledvin. Přítomné mononukleární infiltráty v kůře se v ledvinách hlodavců nacházejí běžně a jejich počet se obvykle zvyšuje s rostoucím věkem (Maronpot, 1999). U některých experimentálních jedinců byly mononukleární infiltráty rozsáhlejšího charakteru, nicméně nebyla patrná žádná reakce okolní tkáně (edém, hemoragie, nekróza tkáně aj.), která by ukázala na vážnější druh mikroskopického defektu.

V ledvinách jsme v naší studii pozorovali velmi zajímavý paradox – i když chemické měření obsahu olova v naší studii ukázalo v ledvinách vysokou koncentraci tohoto těžkého kovu (plíce > ledviny > játra > slezina > mozek), tento fakt nevedl ke vzniku vážných patologických změn v oblasti ledviny. Nutno také podotknout, že analýza nanočástic PbO pomocí transmisní elektronové mikroskopie prokázala sporadický výskyt olova v nanočásticové podobě v tkáni ledvin. Vysoká koncentrace olova prokázaná chemickou



analýzou se tedy neshoduje s malým výskytem nanočástic PbO. Předpokládáme tedy, že většina olova se v ledvinách nachází v rozpuštěné nebo metabolizované formě (Dumková et al., 2017). Zda právě minoritní změny v ledvinách souvisí s jinou formou přítomného olova, bude nutné v budoucnu experimentálně ověřit.

Mikroskopické defekty v ledvinách byly pozorovány až po jedenáctitýdenní expozici nanočásticím. Změny jako dilatace proximálních tubulů, akumulace jader v distálních tubulech, metaplazie parietálního listu Bowmanova pouzdra, hypercelularita v glomerulech nebo hyperplazie juxtamedulárních glomerulů ukazují, že toxicita inhalace nanočástic PbO je zřetelná jak na glomerulární, tak na tubulární úrovni. Nutno ale říci, že uvedené změny byly lokalizované pouze v kůře, ve dřeni nebyly pozorovány žádné patologické změny.

Ve studii zabývající se vlivem šestitýdenní inhalace nanočástic CdO nebyly v ledvinách myši pozorovány stejně jako v našem krátkodobém inhalačním experimentu žádné signifikantní mikroskopické změny (Dumková et al., 2016). Naopak intraperitoneální injekce nanočástic zlata krysám způsobila poškození epitelu proximálních i distálních tubulů (Doudi and Setorki, 2014) a expozice krys nanočásticím TiO<sub>2</sub> dilataci glomerulů a degenerativní změny ledvinové tkáně (Farthooni et al., 2016).

Imunofluorescenční značení Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy ukázalo snížené množství tohoto enzymu v ledvinách po šestitýdenní i jedenáctitýdenní inhalaci NPs PbO. Největší deficit Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy byl pozorován v proximálních tubulech. Ve dřeni nebyla pozorována žádná signifikantní změna v expresi sodno-draselné pumpy. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza zastává v ledvinách významnou funkci, kdy se podílí na hospodaření těla se sodnými a draselnými ionty. Porucha její činnosti může tak vést jak k poškození jak samotných ledvinových buněk, tak k vychýlení homeostázy nebo poruše osmoregularity buněk (Jorgensen et al., 2003; Páral, 2012; Yang et al., 1992). Naše výsledky jsou v souladu s poznatky z předchozích studií, kde byla prokázána schopnost olova inhibovat funkci enzymu Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy v ledvinách (Kramer et al., 1986).

Mozek je významnou cílovou oblastí pro mnoho toxických látek – včetně olova (Grandjean, 2010; Toscano and Guilarte, 2005; Ware, 1993). Intoxikace olovem může u lidí vést k axonální degeneraci a u některých organismů může dále způsobovat demyelinizační polyneuropatie (Thomson and Parry, 2006). Ukazuje se, že i v případě expozice nanočásticím patří mozek (a obecně nervová soustava) mezi ohrožené orgány. Naše studie navíc potvrdila, že nanočástice olova se dostávají do mozkové tkáně a prostupují přímo do nervových buněk (Dumková et al., 2017). Po inhalaci NPs PbO jsme zaznamenali signifikantní změny pouze v hippocampální oblasti. Nicméně tento nález se shoduje s pozorováním v ostatních studiích,

kdy byly mikroskopické defekty lokalizované také především v oblasti hippocampu (Bagheri-Abassi et al., 2015; Cao et al., 2013; Skalska et al., 2015; Ze et al., 2014). Studie zabývající se neurotoxicitou nanočástic PbS po intratracheální expozici a jejím vlivem na výkon paměti a schopnost učení pomocí bludiště prokázala, že zvyšováním koncentrace olova roste doba potřebná k nalezení východu z bludiště a počet udělaných chyb. Neurotoxicita nanočástic PbS byla dále prokazována analýzou neuronů v hippocampu a testováním hladiny vápníku. U exponovaných jedinců došlo ke zvýšení hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplasmě neuronů a nárůstu vápníkových kanálů typu L, které slouží ke vstupu vápníku do buňky při šíření vzruchu. Došlo také k nárůstu koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPázy, což je enzym sloužící k přenosu vápníku ven z buňky či zajišťující jeho uskladnění v endoplazmatickém retikulu. Analýza neuronů rovněž ukázala změny v jejich struktuře. Dále byly detekovány mikroskopické defekty v hippocampu (Cao et al., 2013). Přítomnost nekrotických neuronů v pyramidové vrstvě Ammonova rohu byla stejně jako v naší studii pozorována po expozici krys nanočásticím stříbra (Bagheri-Abassi et al., 2015). Intranasální expozice nanočástic  $\text{TiO}_2$  pak způsobila zánět v hippocampální oblasti a signifikantní zvýšení exprese některých cytokinů spojených právě se zánětlivou odpovědí organismu (Ze et al., 2014).

Jednou z možných cest vstupu nanočástic do centrální nervové soustavy je překonání hematoencefalické bariéry. V našem experimentu jsme prokázali, že nanočástice PbO jsou hematoencefalickou bariéru schopny překonat (Dumková et al., 2017). Druhá cesta vstupu nanočástic do mozku zahrnuje jejich zachycení na čichovém epitelu v nosní dutině a následný transport po axonech čichového nervu do centrální nervové soustavy. Vstup touto cestou byl pozorován u nanočástic mědi (Liu et al., 2009) nebo  $\text{TiO}_2$  (Wang et al., 2008). Nicméně zda jsou i nanočástice PbO schopné přestupu přes čichový epitel, jsme v naší studii dosud nepotvrdili (Dumková et al., 2017). Tento možný vstup bude v příštích experimentech analyzován a pokusíme se objasnit, zda nanočástice PbO přecházejí do mozku i touto cestou.

Jedním z faktorů, které se významně podílí na regulaci zánětlivé odpovědi organismu je NF $\kappa$ B1 (p50) – protein patřící do rodiny transkripčních faktorů NF $\kappa$ B (Baeuerle and Baltimore, 1991; Jimi and Ghosh, 2005; Napetschnig and Wu, 2013). Deregulace exprese tohoto transkripčního faktoru již byla popsána v několika studiích zabývajících se toxickým vlivem nanočástic. Po šestihodinové intranasální expozici myši nanočásticím vybraných kovů o  $\text{PM}_{2.5}$  (Particulate Matter) byla v plicích signifikantně zvýšena exprese NF $\kappa$ B1 a Rel A (Shukla et al., 2000). Podobné výsledky jsou popisovány po expozici plicních buněk částicím směsice kovů (jako je železo, vanad, nikl, měď, zinek nebo olovo) po dobu 18 hodin (Kennedy et al., 1998).

Stejný efekt pak měla i expozice lidských epiteliálních amniových buněk nanočásticím  $ZnFe_2O_4$  po dobu 48 hodin (Saqib et al., 2013). Zvýšená exprese NF $\kappa$ B1 v plicích byla dále zaznamenána po expozici krys směsici nanočástic po dobu 20 hodin (Kadiiska et al., 1997).

Po šestitýdenní inhalaci NPs PbO jsme v plicích zaznamenali signifikantní nárůst exprese NF $\kappa$ B1, což odpovídá přítomnému zánětu plicní tkáně. Jedenáctitýdenní inhalace ukázala také zvýšení v expresi tohoto transkripčního faktoru, rozdíl ale nebyl statisticky signifikantní. V ledvinách jsme ani v jednom inhalačním experimentu nepozorovali výraznou změnu v expresi. V šestitýdenním experimentu by nezměněná exprese odpovídala minoritním změnám ledvin po inhalaci NPs PbO, nicméně po jedenáctitýdenní inhalaci je výsledek překvapivý vzhledem k přítomným mikroskopickým defektům.

Vzhledem k tomu, že NF $\kappa$ B rodina patří při zánětu k okamžitě aktivovaným faktorům, které dále ovlivňují expresi řady genů (Napetschnig and Wu, 2013), je otázkou, zda i po několikátitýdenní inhalaci je exprese NF $\kappa$ B1 nutně deregulovaná. Po jedenáctitýdenní inhalaci nanočástic PbO jsme totiž v našem experimentu nepozorovali výrazné zvýšení exprese tohoto transkripčního faktoru i vzhledem k přítomným mikroskopickým změnám, které ukazují na probíhající zánět a poškození tkáně plic a ledvin. Dosavadní studie totiž popisují deregulaci po expozici v rámci hodin. Nicméně tuto hypotézu bude nutné v budoucnu experimentálně ověřit. V současné době plánujeme nové odběry vzorků cílových orgánů po několikahodinové inhalaci NPs PbO a jejich podrobení analýze exprese NF $\kappa$ B1. V budoucnu se také hodláme zaměřit na analýzu exprese dalších faktorů a cytokinů souvisejících s imunitní reakcí organismu.

Nanočástice mají obrovský potenciál využití v mnohých odvětvích lidské činnosti jako je medicína, farmaceutická výroba, potravinářství, kosmetika, stavebnictví aj. Nicméně jejich specifické vlastnosti, které určují jejich unikátní chování v ekosystémech, nejsou dosud zcela objasněny a podrobně popsány. V pozadí také stále zůstává otázka jejich toxicity. Je důležité si ale uvědomit, že ne všechny nanočástice musí být nutně toxické. Jejich případná toxicita pak závisí na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech, jako je velikost, povrchové vlastnosti, chemické složení, způsob vniknutí do organismu aj. Tato obrovská rozmanitost vlastností nás tak nutí se podívat na každé nanočástice zvlášť (Luyts et al., 2013). V této práci jsme se zaměřili na nanočástice PbO a pokusili se objasnit efekt jejich inhalace na živé organismy. Doufáme, že výsledky naší práce přispějí k pochopení specifického chování nanočástic a zejména k objasnění jejich interakcí s tkáněmi živých organismů. Neboť podrobné objasnění chování nanočástic ve styku s organismy a především jejich potenciální toxicita musí být známy ještě před jejich praktickým využitím.

## 7 ZÁVĚR

Cílem tohoto projektu bylo odhalit patologické změny vznikající v cílových orgánech (plíce, játra, ledviny, mozek a slezina) laboratorní myši následkem inhalace nanočástic PbO. Ve studii byla zpracována data ze dvou nezávislých inhalačních experimentů, přičemž cílové orgány byly odebrány ve dvou časových intervalech – po šestitýdenní a jedenáctitýdenní inhalaci nanočástic PbO.

- Výsledky potvrdily, že nanočástice PbO prostupují plicní bariérou a krví jsou distribuovány do sekundárních orgánů, kde způsobují četné patologické změny.
- V plicích, játrech, ledvinách a mozku došlo s prodlužujícím se časem inhalace nanočástic PbO k vážnějším mikroskopickým defektům. Ve slezině pak byly v obou časových bodech zaznamenány pouze minoritní změny.
- Histopatologická analýza plic exponovaných jedinců ukázala na probíhající silný chronický zánět.
- V játrech způsobila inhalace nanočástic PbO steatohepatitidu a zřetelnou remodelaci jaterního parenchymu.
- Analýza ledvin po šestitýdenní inhalaci nanočástic PbO překvapivě, v kontrastu s dříve popisovanou nefrotoxicitou olova, neukázala žádné signifikantní poškození tkáně. Přítomnost patologických změn byla patrná až po dlouhodobější inhalaci NPs PbO.
- V mozku se signifikantní mikroskopické defekty vyskytovaly pouze v hippokampální oblasti. Po inhalaci nanočástic PbO byly pozorovány nekrotické neurony v pyramidové vrstvě Ammonova rohu a spongiformní změny bílé hmoty v okolí hippokampu.
- Ve slezině bylo po inhalaci NPs PbO pozorováno pouze zvýšení počtu megakaryocytů a megakaryoblastů.

V současné době v souvislosti s progresivně se zvyšující koncentrací nanočástic olova v životním prostředí bude tak nezbytná snaha jejich produkci snížit, a to právě s ohledem na možná vážná zdravotní rizika.

Výsledky práce jsou součástí publikovaného impaktovaného článku v časopise *Nanoparticle and Fibre Toxicology* (impact factor: 8,577). Dílčí výsledky byly dále formou posteru prezentovány na konferenci Morphology 2017 v Plzni.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ALANKARAGE, D., LAVERY, R., SVINGEN, T., KELLY, S., LUDBROOK, L., BAGHERI-FAM, S., KOOPMAN, P., HARLEY, V. **SOX9 regulates expression of the male fertility gene Ets variant factor 5 (ETV5) during mammalian sex development.** *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2016; 79: 41-51.
- AL-SALEH, I., SHINWARI, N., MASHHOUR, A. **Heavy metals (lead, cadmium and mercury) in maternal, cord blood and placenta of healthy women.** *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* 2011; 214: 79-101.
- ANDERSEN, P. et al. **The Hippocampus Book.** 1. vyd. Oxford: Oxford University Press, 2006. 872 s. ISBN 9780195100273
- ANTONIOU, A. RAYNAUD, P., CORDI, S., ZONG, Y., TRONCHE, F., STANGER, B., Z., JACQUENIN, P., PIERREUX, C., E., CLOTMAN, F., LEMAIGRE, F., P. **Intrahepatic bile ducts develop according to new mode of tubulogenesis regulated by the transcription factor SOX9.** *Gastroenterology.* 2009; 136: 2325-2333.
- BAEUEERLE, P., A. **The inducible transcription activator NF-KB: regulation by distinct protein subunits.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1991; 1072: 63-80.
- BAGHERI-ABASSI, F., ALAVI, H., MOHAMMADIPOUR, A., MOTEJADED, F., EBRAHIMZADEH-BIDESKAN, A. **The effect of silver nanoparticles on apoptosis and dark neuron production in rat hippocampus.** *Iran J. Basic Med. Sci.* 2015; 18: 644-648.
- BAI, Y., YINGYING, S., CHANGQING, S. **Pt-Pb nanowire array electrode for enzyme-free glucose detection.** *Biosensors and Bioelectronics.* 2008; 24: 579-85.
- BAPLE, E., L., CHAMBERS, H., CROSS, H., E., FAWCETT, H., NAKAZAWA., Y., CHIOZA, B., A., HARLALKA, G., V., MANSOUR, S., et al. **Hipomorphic PCNA mutation underlines a human DNA repair disorder.** *J. Clin. Invest.* 2014; 124: 3137-3146.
- BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M. **Vyšetřovací metody v imunologii.** 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2005. 176 s. ISBN 80-247-0691-1
- BASS, A., J., WATANABE, H., MERMEL, C., et al. **SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas.** *Nat. Genet.* 2009; 41: 1238-1242.
- BESSEMER, R., A., BUTLER, K., M., TUNNEH, L., CALLAGHAN, N., I., RUNDLE, A., CURRIE, S. et al. **Cardiorespiratory toxicity of environmentally relevant zinc oxide nanoparticles in the freshwater fish *Catostomus commersonii*.** *Nanotoxicology.* 2015; 9: 861-870.
- BLUM, J., L., ROSENBLUM, L., K., GRUNIG, G., BEASLEY, M., B., XIONG, J., Q., ZELIKOFF, J., T. **Shortterm inhalation of cadmium oxide nanoparticles alters pulmonary dynamics associated with lung injury, inflammation, and repair in a mouse model.** *Inhal. Toxicol.* 2014; 26: 48-58.
- BORM, P., J., ROBBINS, D., HAUBOLD, S., KUHLBUCHS, T., FISSAN, H., DONALDSON, K., SCHINS, R., STONE, V., KREYLING, W., LADEMANN, J., KRUTMAN, J., WARHEIT, D., OBERDORSTER. **The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC.** *Particle and Fibre Toxicology.* 2006; 3: 1-11.

- BROEG, K., WESTERNHAGEN, H., V., ZANDER, S., KÖRTING, W., KOEHLER, A. **The “bioeffect assessment index” (BAI). A concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach.** *Mar. Pollut. Bull.* 2005; 50: 495-503.
- BUTLER, A., B., HODOS, W. **Comparative vertebrate neuroanatomy: evolution and adaptation.** 2. vyd. John Wiley and Sons, 2005. 744 s. ISBN 978-0-471-21005-4
- BUZEA, C., PACHECO, I., I., ROBBIE, K. **Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity.** *Biointerphases.* 2007; 2: 17-71.
- CAO, Y., LIU, H., LI, Q., WANG, Q., ZHANG, W., CHEN, Y., WANG, D., CAI, Y. **Effect of lead sulfide nanoparticles exposure on calcium homeostasis in rat hippocampus neurons.** *Journal of Inorganic Biochemistry.* 2013; 126: 70-75.
- CASALS, E., VÁZQUEZ-CAMPOS, S., BASTÚS, N., G., PUNTES, V. **Distribution and potential toxicity of engineered inorganic nanoparticles and carbon nanostructures in biological systems.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2008; 27: 672-683.
- ČIHÁK, R. et al. **Anatomie 2.** 3. vyd. Praha: Grada Publishing, 2013. 488 s. ISBN 978-80-247-4788-0
- ČIHÁK, R. et al. **Anatomie 3.** 3. vyd. Praha: Grada Publishing, 2016. 832 s. ISBN 978-80-247-5636-3
- DANIHELKA, P. **Overview of nanosafety in the Czech Republic.** *The European Network on the Health and Environmental Impact of Nanomaterials.* Nanoimpact Net Press Release, 2010.
- DIZAJ, S., LOTFIPOUR, F., BARZEGAR-JALALI, M., ZARRINTAN, M., H., ADIBKIA, K. **Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles.** *Mater. Sci. Eng.* 2014; 44: 278-284.
- DONALDSON, K., AITKEN, R., TRAN, L., STONE, V., DUFFIN, R., FORREST, G., ALEXANDER, A. **Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety.** *Toxicol. Sci.* 2006; 92: 5-22.
- DOUDI, M., SETORKI, M. **The effect of gold nanoparticles on renal function in rats.** *Nanomedicine Journal.* 2014; 1: 171-179.
- DRUGA, R., GRIM, M., DUBOVÝ, P. **Anatomie centrálního nervového systému.** 2. vyd. Praha: Galén, 2011. 219 s. ISBN 978-80-7262-706-6
- DUMKOVÁ, J., SMUTNÁ, T., VRLÍKOVÁ, L., LE COUSTUMER, P., VEČEŘA, Z., DOČEKAL, B., MIKUŠKA, P., ČAPKA, L., FICTUM, P., HAMPL, A., BUCHTOVÁ, M. **Sub-chronic inhalation of lead oxide nanoparticles revealed their broad distribution and tissue-specific subcellular localization in target organs.** *Particle and Fibre Toxicology.* 2017; 14: 55.
- DUMKOVÁ, J., VRLÍKOVÁ, L., VEČEŘA, Z., PUTNOVÁ, B., DOČEKAL, B., MIKUŠKA, P., FICTUM, P., HAMPL, A., BUCHTOVÁ, M. **Intracellular Fate of Inhaled Cadmium Oxide Nanoparticles and Their Effect on Target Organs.** *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17: 874-893.
- DYLEVSKÝ, I. **Základy funkční anatomie člověka.** 1. vyd. Praha: Nakladatelství Manus, 2007. 194 s. ISBN 978-80-86571-00-3
- EMORY, E., PATTILLO, R., ARCHIBOLD, E., BAYORH, M., SUNG, F. **Neurobehavioral effects of lowlevel lead exposure in human neonates.** *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1999; 181: 2-11.
- FARREL, G., C., LARTER, C., Z. **Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis.** *Hepatology.* 2006; 43: 99-112.

- FARTHOONI, M., NOORI, A., MOHAMMADI, A. **Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles Toxicity on the Kidney of Male Rats.** *International Journal of Life Science.* 2016; 10: 65-69.
- FURUYAMA, K. KAWAGUCHI, Y., AKIYAMA, H., HORIGUCHI, M., KODAMA, S., KUHARA, T., HOSOKAWA, S., ELBAHRAWY, A., SOEDA, T., KOIZUMI, M., MASUI, T., KAWAGUCHI, M., TAKAORI, K., et al. **Continuous cell supply from a SOX9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine.** *Nat. Genet.* 2011; 43: 34-41.
- GAVRIELI, Y., SHERMAN, Y., BEN-SASSON, S., A. **Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation.** *J. Cell Biol.* 1992; 119: 493-501.
- GEISER, M., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., KAPP, N., SCHÜRCH, S., KREYLING, W., SCHULZ, H., SEMMLER, M., HOF, V., I., HEYDER, J., GEHR, P. **Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Nonphagocytic Mechanism in Lungs and in Cultured Cells.** *Environ. Health Perspect.* 2005; 113: 1555-1560.
- GHOSH, S., HAYDEN, M., S. **New regulators of NF-kappaB in inflammation.** *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8: 837-848.
- GHOSH, S., MAY, M., J., KOPP, E., B. **NF-kB and Rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses.** *Annu. Rev. Immunol.* 1998; 16: 225-260.
- GLYNN, I., M. **Annual review prize lecture: All hands to the sodium pump.** *J. Physiol.* 1993; 462: 1-30.
- GONTAN, C., DE MUNCK, A., VERMEIJ, M., GROSVELD, F., TIBBOEL, D., ROTTIER, R. **SOX2 is important for two crucial processes in lung development: branching morphogenesis and epithelial cell differentiation.** *Dev. Biol.* 2008; 317: 296-309.
- GORCZYCA, W., BRUNO, S., DARZYNKIEWICZ, R., J., GONG, J., DARZYNKIEWICZ, Z. **DNA strand breaks occurring during apoptosis: Their early *in situ* detection by terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors.** *Int. J. Oncol.* 1992; 1: 639-648.
- GRANDJEAN, P. **Even low-dose lead exposure is hazardous.** *Lancet.* 2010; 376: 855-856.
- GREENWOOD, N., EARNSHAW, A. **Chemie prvku I. a II. díl.** 1. vyd. Praha: Informatorium, 1993. 1635 s. ISBN 978-80-85427-38-7
- GRIM, M., DRUGA, R., et al. **Základy anatomie 2. Kardiovaskulární a lymfatický systém.** 1. vyd. Praha: Galén, 2016. 117 s. ISBN 978-80-7492-235-0
- GRIM, M., DRUGA, R., et al. **Základy anatomie 3. Trávicí, dýchací, močopohlavní a endokrinní systém.** 1. vyd. Praha: Galén, 2005. 117 s. ISBN 978-80-7262-302-0
- GURJAR, B., RAVINDRA, K., NAGPURE, A. **Air pollution trends over Indian megacities and their local-to-global implications.** *Atmos. Environ.* 2016; 142: 475-495.
- HAMPEL, H., BÜRGER, K., TEIPEL, S., J., BOKDE, A., L., ZETTERBERG, H., BLENNOW, K. **Core candidate neurochemical and imaging biomarkers of Alzheimer's disease.** *Alzheimer's & Dementia.* 2008; 4: 38-48.
- HASCHEK, W., M., ROUSSEAUX, C., G., WALLIG, M., A. **Fundamentals of Toxicologic Pathology.** 2. vyd. San Diego: Academic Press, 2010. 238 s. ISBN 978-0-12-370469-6
- HOET, P., H., BRÜSKE-HOHLFELD, I., SALATA, O., V. **Nanoparticles – known and unknown health risks.** *Journal of Nanobiotechnology.* 2004; 8: 2-12.

- HOFER, S., GRANDGIRARD, D., BURRI, D., FRÖHLICH, T., K., LEIB, S., L. **Bacterial meningitis impairs hippocampal neurogenesis.** *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2011; 70: 890-899.
- HOLGATE, S., T. **Exposure, uptake, distribution and toxicity of nanomaterials in humans.** *J. Biomed. Nanotechnol.* 2010; 6: 1-19.
- HORKÝ, D., ČECH, S. **Mikroskopická anatomie.** 3. přeprac. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2014. 203 s. ISBN 978-80-210-5550-6
- HU, H. **Bone Lead as a New Biologic Marker of Lead Dose: Recent Findings and Implications for Public Health.** *Environmental Health Perspectives.* 1998; 106: 961-967.
- HUANG, K., ZHUANG, G., LIN, Y., WANG, Q., FU, J., FU, Q., LIU, T., DENG, C. **How to improve the air quality over megacities in China: pollution characterization and source analysis in Shainghai before, during and after 2010 world expo.** *Atmos. Chem. Phys.* 2013; 13: 5927-5942.
- HUERTA, S., GOULET, E., J., HUERTA-YEPEZ, S., LIVINGSTON, E., H. **Screening and Detection of Apoptosis.** *Journal of Surgical Research.* 2007; 139: 143-156.
- CHO, W., DUFFINN, R., POLAND, C., A., HOWIE, S., E., M., MACNEE, W., BRADLEY, M., MEGSON, L., I., DONALDSON, K. **Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing.** *Environ. Health Perspect.* 2010; 118: 1699-1706.
- CHURG, A., WIGGS, B. **Accumulation of long asbestos fibres in the peripheral upper lobe in cases of mesothelioma in man.** *Am. J. Ind. Med.* 1987; 11: 563-570.
- CHURG, A., WIGGS, B. **Fiber size and number in amphibole-asbestos-induced mesothelioma.** *Am. J. Pathol.* 1984; 115: 437-442.
- JARRAR, B., M., TAIB, N. **Histological and histochemical alterations in the liver induced by chronic lead toxicity.** *Saudi J. Biol. Sci.* 2012; 19: 203-210.
- JIMI, E., GHOSH, S. **Role of nuclear factor-kappaB in the immune system and bone.** *Immunol Rev.* 2005; 208: 80-7.
- JORGENSEN, P., L., HAKANSSON, K., O., KARLISH, S., J. **Structure and mechanism of Na, K-ATPase: functional sites and their interactions.** *Annual review of physiology.* 2003; 65: 817-849.
- JUNQUEIRA, L., X., C., CARNEIRO, J. **Basic Histology.** 11. vyd. New York: McGraw-Hill, 2005. 502 s. ISBN 0-07-111887-X
- KADIISKA, M., B., MASON, R., P., DREHER, K., L., COSTA, D., L., GHIO, A., J. **In Vivo Evidence of Free Radical Formation in the Rat Lung after Exposure to an Emission Source Air Pollution Particle.** *Chem. Res. Toxicol.* 1997; 10: 1104-1108.
- KARLSSON, H., L. CRONHOLM, P., HEDBERG, Y., TORNBERG, M., DE BATTICE, L., SVEDHEM, S., WALLINDER, I., O. **Cell membrane damage and protein interaction induced by copper containing nanoparticles-importance of the metal release process.** *Toxicology.* 2013; 313: 56-69.
- KATULI, K., K., MASSARSKY, A., HADADI, A., POURMEHRAN, Z. **Silver nanoparticles inhibit the gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and erythrocyte AChE activities and induce the stress response in adult zebrafish (*Danio rerio*).** *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2014; 106: 173-180.
- KAWAGUCHI, Y. **SOX9 and programming of liver and pancreatic progenitors.** *J. Clin. Invest.* 2013; 123: 1881-1886.



- KENNEDY, T., GHIO, A., J., REED, W., SAMET, J., ZAGORSKI, J., QUAY, J., CARTER, J., DAILEY, L., HOIDAL, J., R., DEVLIN, R., B. **Copper-dependent Inflammation and Nuclear Factor- $\kappa$  B Activation by Particulate Air Pollution.** *Am. J. Res. Cell Mol. Biol.* 1998; 19: 366-378.
- KOBAYASHI, A., CHANG, H., CHABOISSIER, M., C., SCHEDL, A., BEHRINGER, R., R. **SOX in testis determination.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005; 1061: 9-16.
- KONRÁDOVÁ, V., VAJNER, L., UHLÍK, J. **Histologie: přednášky pro bakalářské studium.** 1. vyd. Praha: H&H, 2005. 186 s. ISBN 80-7319-009-5
- KOOLMAN, J., RÖHM, K., H. **Barevný atlas biochemie.** 4. vyd. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0
- KOPECKÝ, J. et al. **Somatologie.** 1. vyd. Olomouc: UPOL, 2010. 309 s. ISBN 978-80-244-2271-8
- KOZERA, B., RAPACZ, M. **Reference genes in real-time PCR.** *J. Appl. Genet.* 2013; 54: 391-406.
- KRAMER, H., J., GONICK, C., LU, E. **In vitro Inhibition of Na-K-ATPase by Trace Metals: Relation to Renal and Cardiovascular Damage.** *Nephron.* 1986; 44: 329-336.
- LABOUTA, H., SCHNEIDER, M. **Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: current status and critical review.** *Nanomedicine.* 2013; 9: 39-54.
- LEBEDOVÁ, J., BLÁHOVÁ, L., VEČEŘA, Z., MIKUŠKA, P., DOČEKAL, B., BUCHTOVÁ, M., MÍŠEK, I., DUMKOVÁ, J., HAMPL, A., HILSCHEROVÁ, K. **Impact of acute and chronic inhalation exposure to CdO nanoparticles on mice.** *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2016; 23: 24047-24060.
- LEBEDOVÁ, J., NOVÁKOVÁ, Z., VEČEŘA, Z., BUCHTOVÁ, M., DUMKOVÁ, J., DOČEKAL, B., BLÁHOVÁ, L., MIKUŠKA, P., MÍŠEK, I., HAMPL, A., HILSCHEROVÁ, K. **Impact of acute and subchronic inhalation exposure to PbO nanoparticles on mice.** *Nanotoxicology.* 2018; In press.
- LEE, S., CHOI, J., SHIN, S., IM, Y., M., SONG, J., KANG, S., S., NAM, T., H., WEBSTER, T., J., KIM, S., H., KHANG, D. **Analysis on migration and activation of live macrophages on transparent flat and nanostructured titanium.** *Acta Biomater.* 2011; 7: 2337-2344.
- LEFEBVRE, V., DUMITRIU, B., PENZO-MENDEZ, A., HAN, Y., PALLAVI, B. **Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors.** *Int J. Biochem. Cell Biol.* 2007; 39: 2195-2214.
- LI, Q., HU, X., BAI, Y., ALATTAR, M., MA, D., CAO, Y., HAO, Y., WANG, L., JIANG, C. **The oxidative damage and inflammatory response induced by lead sulfide nanoparticles in rat lung.** *Food and chemical toxicology.* 2003; 60: 213-217.
- LIU, C., L., SIESJÖ, B., K., HU, B., R. **Pathogenesis of hippocampal neuron death after hypoxia-ischemia changes during brain development.** *Neuroscience.* 2004; 127: 113-123.
- LIU, Y., GAO, Y., ZHANG, L., WANG, T., WANG, J., JIAO, F., LI, W., LIU, Y., LI, B., et al. **Potential health impact on mice after nasal instillation of Nano-sized copper particles and their translocation in mice.** *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2009; 9: 6335-6343.
- LIVAK, K., J., FLOOD, S., J., A., MARMARO, J., GIUSTI, W., DEETZ, K. **Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridisation.** *PCR Methods Appl.* 1998; 4: 357-362.
- LOGHMAN-ADHAM, M. **Aminoaciduria and glycosuria following severe childhood lead poisoning.** *Pediatr. Nephrol.* 1998; 12: 218-221.

- LUKÁŠ, Z., DRÁBEROVÁ, E., FEIT, J., VOJTĚŠEK, B. **Imunohistochemické metody v biologii a v bioptické diagnostice**. Brno: Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, 1997. 129 s. ISBN 80-210-0620-X
- LÜLLMANN-RAUCH, R. **Histologie**. 3. vyd. Praha: Grada Publishing, 2012. 576 s. ISBN 978-80-247-3729-4
- LUYTS, K., NAPIERSKA, D., NEMERY, B., HOET, P., H., M. **How physico-chemical characteristics of nanoparticles cause their toxicity: complex and unresolved interrelations**. *Environmental Science-Processes & Impacts*. 2013; 15: 23-38.
- MARONPOT, R. **Pathology of the Mouse: Reference and Atlas**. 1. vyd. Dallas: Cache River, 1999. 700 s. ISBN 1-889899-02-X
- MARTIN, J., H. **Neuroanatomy: text and atlas**. 3. vyd. Columbus: McGraw-Hill Companies, 2003. 532 s. ISBN 0-07-121237-X
- MATSUSHITA, M., KITO, H., KANEKO, H., MISHIMA, K., KADONO, I., ISHIGURO, N., NISHIMURA, G. **A novel SOX9 H169Q mutation in a family with overlapping phenotype of mild campomelic dysplasia and small patella syndrome**. *Am. J. Med. Genet. A*. 2013; 161: 2528-2534.
- MAYNARD, A., D., AITKEN, R., J., BUTZ, T., COLVIN, V., DONALDSON, K., et al. **Safe handling of nanotechnology**. *Nature*. 2006; 444: 267-269.
- MUELLER-HOECKER, J., BEITINGER, F., FERNANDEZ, B., BAHLMANN, O., ASSMAN, G., TROIDL, C., DIMOMELETIS, I., KÄÄB, S., DEINDL, E. **Of rodents and humans: a light microscopic and ultrastructural study on cardiomyocytes in pulmonary veins**. *Int. J. Med. Sci*. 2008; 5: 152-158.
- MÜHLFELD, C., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., BLANK, F., VANHECKE, D., OCHS, M., GEHR, P. **Interactions of nanoparticles with pulmonary structures and cellular responses**. *Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2008; 1: 817-829.
- MULLER, J. HUAUX, F., MOREAU, N., MISSON, P., HEILIER, J., F., DELOS, M., ARRAS, M., FONSECA, A., NAGY, J., B., LISON, D. **Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes**. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2005; 207: 221-231.
- NAKORN, T., N., MIYAMOTO, T., WEISSMAN, I., L. **Characterization of mouse megakaryocyte progenitors**. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 2003; 100: 205-210.
- NALABOTU, S., K., KOLLI, M., B., TRIEST, W., E., MA, J., Y., MANE, N., D., P., K., KATTA, A., ADDAGARLA, H., S., RICE, K., M., BLOUGH, E., R. **Intratracheal instillation of cerium oxide nanoparticles induces hepatic toxicity in male Sprague-Dawley rats**. *Int. J. Nanomedicine*. 2011; 6: 2327-2335
- NAPETSCHNIG, J., WU, H. **Molecular Basis of NF- $\kappa$ B Signaling**. *Biophysics*. 2013; 42: 443-468.
- NEJEDLÝ, K. **Biologie a soustavná anatomie laboratorních zvířat**. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1965. 629 s. ISBN 978-807-3870-232
- NEL, A., XIA, T., MÄDLER, L., LI, N. **Toxic potential of materials at the nanolevel**. *Sci*. 2006; 311: 622-627.
- NEMMAR, A., MELGHIT, K., ALI, B., H. **The acute proinflammatory and prothrombotic effects of pulmonary exposure to rutile TiO<sub>2</sub> nanorods in rats**. *Exp. Biol. Med*. 2008; 233: 610-619.
- NISHIMORI, H., KONDOH, M., ISODA, K., TSUNODA, S., TSUTSUMI, Y., YAGI, K. **Silica nanoparticles as hepatotoxicants**. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009; 72: 469-501.
- NOWACK, B., BRUCHELI, T., D. **Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment**. *Environmental Pollution*. 2007; 150: 5-22.

- OBERDORSTER, G. **Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles.** *International Archives of Occupational and Environmental Health.* 2001; 74: 1-8.
- OPEKAR, F., JELÍNEK, I., RYCHLOVSKÝ, P., PLZÁK, Z. **Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem.** 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003. 201 s. ISBN 80-246-0553-8
- OSZLÁNCZI, G., EDINA, H., ANDREA, S. **Subacute exposure of rats by metal oxide nanoparticles through the airways: general toxicity and neuro-functional effects.** *Acta Biologica Szegediensis.* 2010; 54: 165-170.
- OW, Y., P., GREEN, D., R., HAO, Z., MAK, T., W. **Cytochrome c: functions beyond respiration.** *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2008; 9: 532-542.
- PAPANIKOLAOU, N., C., HATZIDAKIE., G., BELIVANIS, S., TZANAKAKIS, G., N., TSATSAKIS, A., M. **Lead toxicity update. A brief review.** *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research.* 2005; 11: 329-336.
- PÁRAL, J. **Akutní mezenteriální ischemie: Moderní diagnostika a léčba akutní ischemie střeva.** 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2012. 112 s. ISBN 978-80-247-3996-0
- PASCHOS, P., PALETAS, K. **Nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome.** *Hippokratia.* 2009; 13: 9-19.
- PETZOLD, A. **Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss.** *J. Neurol. Sci.* 2005; 233: 183-198.
- PEVNY, L., H., NICOLIS, S., K. **SOX2 roles in neural stem cells.** *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010; 42: 421-424.
- POULAKIS, E., THEODOSI, C, BRESSI, M., SCIARE, J., GHERSI, V., MIHALOPOULOS, N. **Airborne mineral components and trace metals in Paris region: spatial and temporal variability.** *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2015; 22: 14663-14672.
- QU, W., DIWAN, A., B., LIU, J., GOYER, A., R. **The Metallothionein-Null Phenotype Is Associated with Heightened Sensitivity to Lead Toxicity and an Inability to Form Inclusion Bodies.** *The American Journal of Pathology.* 2002; 160: 1047-1056.
- QUEROL, X., VIANA, M., ALASTUEY, A., AMATO, F., MORENO, T., CASTILLO, S., PEY, J., DE LA ROSA, J., SÁNCHEZ DE LA CAMPA, A., ARTINANO, A., et al. **Source origin of trace elements in PM from regional background, urban and industrial sites of Spain.** *Atmospheric Environment.* 2007; 41: 7219-7231.
- REX, M., CHURCH, R., TOINTON, K., ICHIHASHI, R., M., MOKHTAR, S., UWANOGHO, D., SHARPE, P., T., SCOTTING, P., J. **Granule cell development in the cerebellum is punctuated by changes in SOX gene expression.** *Molecular Brain Research.* 1998; 55: 28-34.
- RIM, K., T., SONG, S., KIM, H. **Oxidative DNA damage from nanoparticle exposure and its application to workers' health: a review.** *Saf. Health Work.* 2013; 4: 177-186.
- ROCKICH, B., E., HRYCAJ, S., M., SHIH, P., H., NAGY, M., S., FERGUSON, M., A., H., KOPP, J., L., SANDER, M., WELLIK, D., M., SPENCE, J., R. **SOX9 plays multiple roles in the lung epithelium during branching morphogenesis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110: 4456-4464.

- ROURSGAARD, M., JENSEN, K., A., POULSEN, S., S., JENSEN, N., E., POULSEN, L., K., HAMMER, M., NIELSEN, G., D., LARSEN, S., T. **Acute and subchronic airway inflammation after intratracheal instillation of quartz and titanium dioxide agglomerates in mice.** *Scientific World Journal*. 2011; 11: 801-825.
- RUIJTER, J., M., PFAFFL, M., W., ZHAO, S., SPIESS, A., BOGGY, G., BLOM, J., RUTLEDGE, R., G., SISTI, D., LIEVENS, A., DE PRETER, K., et al. **Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications.** *Methods*. 2013; 59: 32-46.
- SAQUIB, Q., AL-KHEDHAIRY, A., A., AHMAD, J., SIDDIQUI, M., A., DWIVEDI, S., KHAN, S., T., MUSARRAT, J. **Zinc ferrite nanoparticles activate IL-1b, NFKB1, CCL21 and NOS2 signaling to induce mitochondrial dependent intrinsic apoptotic pathway in WISH cells.** *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2013; 273: 289-297.
- SARKAR, A., HOCHEDLINGER, K. **The SOX Family of Transcriptions Factors: Versatile Regulators of Stem and Progenitor Cell Fate.** *Cell Stem Cell*. 2013; 12: 15-30.
- SCUDAMORE, C, L. **A Practical Guide to the Histology of the Mouse.** 1. vyd. Hoboken: John Wiley and Sons, 2014. ISBN 1119941202
- SEN, R., BALTIMORE, D. **Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences.** *Cell*. 2006; 46: 705-716.
- SHAH, M., H., SHAHEEN, N., NAZIR, R. **Assessment of the trace elements level in urban atmospheric particulate matter and source apportionment in Islamabad, Pakistan.** *Atmospheric Pollution Research*. 2012; 3: 39-45.
- SHUKLA, A., TIMBLIN, C., BERUBE, K., GORDON, T., MCKINNEY, W., DRISCOLL, K., VACEK, P., MOSSMAN, B., T. **Inhaled Particulate Matter Causes Expression of Nuclear Factor (NF)- $\kappa$  B-Related Genes and Oxidant-Dependent NF- $\kappa$  B Activation *In Vitro*.** *Am. J. Res. Cell Mol. Biol*. 2000; 23: 182-187.
- SHVEDOVA, A., A., KISIN, E., MURRAY, A., R., JOHNSON, V., J., GORELIK, O., AREPALLI, S., HUBBS, A., F., MERCER, R., R., KEOHAVONG, P., SUSSMAN, N., et al. **Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis.** *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol*. 2008; 295: 552-565.
- SCHEPERS, G., E., TEASDALE, R., D., KOOPMAN, P. **Twenty pairs of SOX: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human SOX transcription factor gene families.** *Dev. Cell*. 2002; 3: 167-170.
- SILBERGELD, E., K. **Lead in bone: implications for toxicology during pregnancy and lactation.** *Environ Health Perspect*. 1991; 91: 63-70.
- SKALSKA, J., FRONTCZAK-BANIEWICZ, M., STRUZYNSKA, L. **Synaptic degeneration in rat brain after prolonged oral exposure to silver nanoparticles.** *Neurotoxicology*. 2015; 46: 145-154.
- SKŘEHOT, P., RUPOVÁ, M. **Nanobezpečnost.** 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav bezpečnosti práce, 2011. 240 s. ISBN 978-808-6973-890
- SPRING, K., R. **Fluorescence Microscopy.** *Encyclopedia of Optical Engineering*. 2003; 270: 548-555.

- TAKEMOTO, T., UCHIKAWA, M., YOSHIDA, M., BELL, D., M., LOVELL-BADGE, R., PAPAIOANNOU, V., E., KONDOH, H. **Tbx6-dependent SOX2 regulation determines neural or mesoderm fate in axial stem cells.** *Nature*. 2011; 470: 394-398.
- TAKENAKA, S., KARG, E., KREYLING, W., G., LENTNER, B., SCHULZ, H., ZIESENIS, A., SCHRAMMEL, P., HEYDER, J. **Fate and toxic effects of inhaled ultrafine cadmium oxide particles in the rat lung.** *Inhal. Toxicol.* 2004; 16: 83-92.
- THOMSON, R., M., PARRY, G., J. **Neuropathies associated with excessive exposure to lead.** *Muscle Nerve*. 2006; 33: 732-741.
- THOOLEN, B., MARONPOT, R., R., HARADA, T., NYSKA, A., ROUSSEAU, C., NOLTE, T., MALARKEY, D., KAUFMANN, W., KUTTER, K., DESCHL, U., et al. **Hepatobiliary lesion nomenclature and diagnostic criteria for lesions in rats and mice (INHAND).** *Toxicol. Pathol.* 2010; 38: 5-81.
- TOMPKINS, D., H., BESNARD, V., LANGE, A., W., KEISER, A., R., WERT, S., E., BRUNO, M., D., WHITSETT J., A. **SOX2 activates cell proliferation and differentiation in the respiratory epithelium.** *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2011; 45: 101-110.
- TOSCANO, C., D., GUILARTE, T., R. **Lead neurotoxicity: From exposure to molecular effects.** *Brain Research Reviews*. 2005; 49: 529-554.
- VACEK, Z. **Histologie a histologická technika, II. část.** 1. vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. 185 s. ISBN 80-7013-202-7
- VOJTÍŠEK, M. **Measurement of nanoparticles emitted by internal combustion engines during real world urban operation.** ETH – Conference on Combustion Generated Nanoparticles, 26. – 29. června 2011, Zurich 2011.
- WANG, J., LIU, Y., JIAO, F., LAO, F., LI, W., GU, Y., LI, Y., GE, C., ZHOU, G., LI, B. et al. **Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO<sub>2</sub> nanoparticles.** *Toxicology*. 2008; 254: 82-90.
- WANG, S., LEE, Y., KIM, J., HYUN, J., LEE, K., KIM, Y., JUNG, Y. **Potential role of Hedgehog pathway in liver in response to radiation.** *PLoS One*. 2013; 16: 741-760.
- WARE, G., W. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.** 1. vyd. New York: Springer-Verlag, 1993. 127 s. ISBN 978-1-4612-4362-5
- WEINA, K., UTIKAL, J. **SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic.** *Clinical and Translational Medicine*. 2014; 3: 19-27.
- YACOBI, N., R., FARNOOSH, F., KIM, Y., H., SIPOS, A., BOROK, Z., KIM, K., CRANDALL, E., D. **Nanomaterial interactions with and trafficking across the lung alveolar epithelial barrier: implications for health effects of air-pollution particles.** *Air Quality Atm. Health*. 2011; 4: 65-78.
- YANG, G., Y., CHEN, S., F., KINOUCI, H., CHAN, P., H., WENSTEIN, P., R. **Edema, cation content, and ATPase activity after middle cerebral artery occlusion in rats.** *Stroke*. 1992; 23:1331-1336.
- YIN, C. **Molecular mechanisms of SOX transcription factors during the development of liver, bile ducts, and pankreas.** *Semin. Cell Dev. Bio*. 2017; 63: 68-78.
- ZE, Y., SHENG, L., ZHAO, Y., HONG, J., ZE, X., YU, X., PAN, X., LIN, A., ZHAO, Y., ZHANG, C., ZHOU, Q., WANG, L., HONG, F. **TiO<sub>2</sub> Nanoparticles Induces Hippocampal Neuroinflammation in Mice.** *PLoS One*. 2014; 9: 922-930.

- ZHAO, Y., ZHANG, Z., DANG, H. **Fabrication and tribological properties of Pb nanoparticles.** *Journal of Nanoparticle Research.* 2004; 6: 47-51.
- ZHU, F., QIAN, W., ZHANG, H., LIANG, Y., WU, M., ZHANG, Y., ZHANG, X., GAO, Q., LI, Y. **SOX2 Is a Marker for Stem-like Tumor Cells in Bladder Cancer.** *Stem Cell Reports.* 2017; 9: 429-437.
- ZIMA, J., MACHOLÁN, M., MUNCLINGER, P., PÍÁLEK, J. **Genetické metody v zoologii.** 1. vyd. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2004. 239 s. ISBN 80-246-0795-6
- ŽDÍMAL, V. **Number and mass size distribution of atmospheric aerosol in various environments in the CR.** Symposium on Nanotechnology Safety, 29. – 30. listopadu 2010, Ústav experimentální medicíny AV ČR, Praha 2010.

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH INTERNETOVÝCH ZDROJŮ

- (URL 1) **Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).** (online); [cit. 19. 12. 2017].  
Dostupné z URL: <https://www.atsdr.cdc.gov/>
- (URL 2) **Tissue expression of SOX2.** *The Human Protein Atlas.* (online); [cit. 5. 6. 2017].  
Dostupné z URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000181449-SOX2/tissue/liver>
- (URL 3) **SOX2 Gene.** *Gene Cards: HUMAN GENE DATABASE.* (online); [cit. 2. 6. 2017].  
Dostupné z URL: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SOX2>