

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie a vědy o Zemi

Inhalace nanočástic olova způsobuje
degenerativní změny v mozkové tkáni

Adriena Jedličková
Jihomoravský kraj

Brno 2023

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie a vědy o Zemi

**Inhalace nanočástic olova způsobuje
degenerativní změny v mozkové tkáni**

*Lead nanoparticle inhalation causes
degenerative alterations in brain tissue*

Autor: Adriena Jedličková

Škola: Gymnázium, Brno, tř. Kpt. Jaroše 14, p.o.

Kraj: Jihomoravský kraj

Konzultanti: doc. RNDr. Marcela Buchtová, Ph.D.

RNDr. Iva Kubištová, Ph.D.

Brno 2023

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Nepřeji si, aby byla tato práce zpřístupňována vzhledem k datům, která dosud nebyla publikována.

V Brně dne 15. května 2023

Adriena Jedličková

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji **doc. RNDr. Marcele Buchtové, Ph.D.** za její odborné vedení, vstřícnost, trpělivost, čas, který mi věnovala a možnost vypracovat i moji druhou práci SOČ v Laboratoři molekulární morfogeneze na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i. Děkuji také za všechny další cenné příležitosti související s mým rozvojem v oblasti přírodních věd.

Děkuji **MUDr. Janě Dumkové, Ph.D.** za pomoc při korektuře práce a pomoc při histopatologických analýzách. Děkuji **Mgr. Bc. Daniele Kristekové** za pomoc při korektuře práce, za pomoc při konfokální mikroskopii a dalších analýzách mozkové tkáně. Děkuji **Ing. Lucii Vrlíkové a Bc. Denise Luskové** za pomoc při histologickém zpracování vzorků. Děkuji všem z Laboratoře molekulární morfogeneze za krásné 4 roky na pracovišti, jejich podporu, výborný smysl pro humor i v nepříznivých situacích a za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

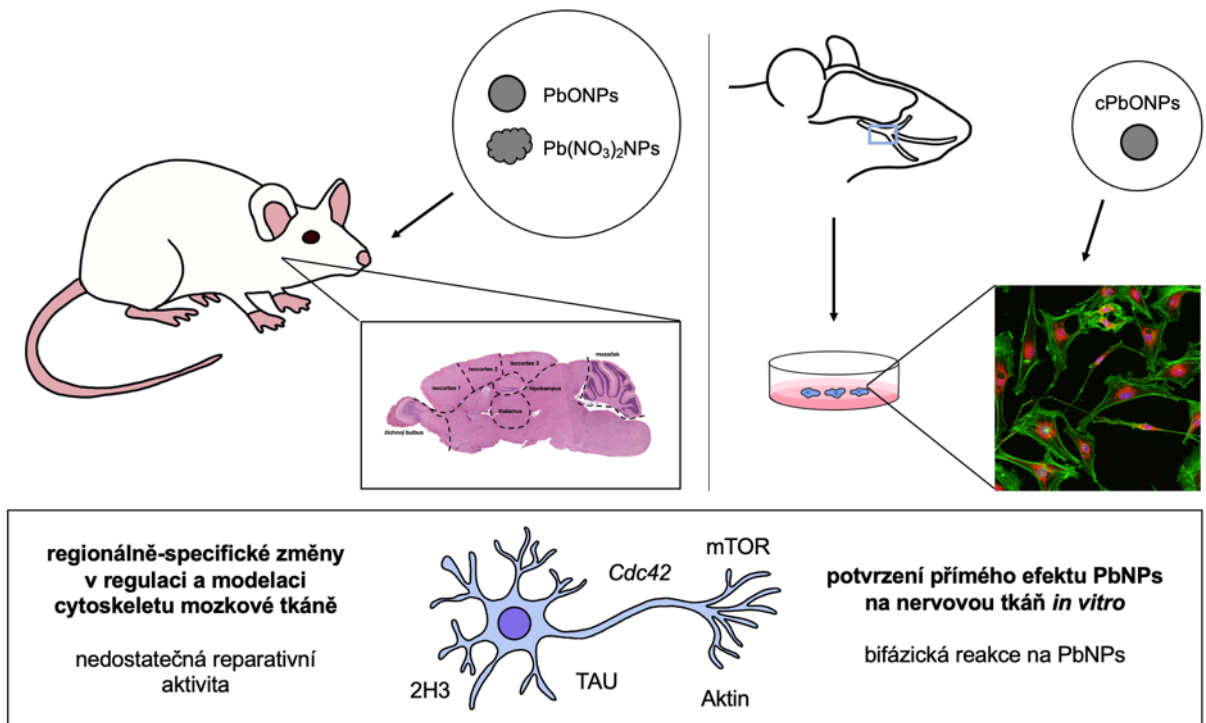
Děkuji **RNDr. Ivě Kubištové, Ph.D.** za pomoc při sestavování formální stránky práce a za komentáře k obhajobě. Děkuji mému třídnímu profesorovi **Mgr. Petru Stupkovi**, vedení školy a všem mým vyučujícím za vstřícnost a podporu mých mimoškolních aktivit.

Děkuji mému milému za neskutečnou podporu a kolektivu Kruchta, Natce, Kláře a všem kamarádům za vlídné slovo.

ABSTRAKT

Vysoké koncentrace nanočástic olova (PbNPs) v ovzduší znečištěných oblastí a velkých měst představují riziko pro živé organismy, a proto je třeba zkoumat účinky jejich dlouhodobé inhalace. Díky svým vlastnostem se mohou inhalované PbNPs z dýchacích cest šířit do dalších orgánů a negativně tak ovlivnit celý organismus. V současné době, vzhledem k využívání některých druhů nanočástic jako nosičů léčiv, jsou nanotoxikologické studie zcela nezbytné. Mechanismy působení PbNPs na nervovou tkáň však dosud nebyly podrobně popsány. V této práci byl prokázán negativní vliv inhalovaných PbNPs na mozkovou tkáň. Ve vybraných oblastech mozku jsme prokázali alterace v regulaci a modelaci mikrotubulů, mikrofilament i intermediárních filament, tyto změny byly regionálně specifické. Determinovali jsme také signifikantní morfologické alterace čichového epitelu až po inhalaci PbNPs a potvrdili jsme rovněž prostup inhalovaných PbNPs přes tuto strukturu do mozkové tkáně. Nakonec jsme naše výsledky ověřili pomocí *in vitro* modelu. Detekované změny v mozkové tkáni byly podobné patologiím během rozvoje neurodegenerativních onemocnění, mj. jsme potvrdili regionálně-specifické změny ve fosforylaci proteinu TAU. Eliminace PbNPs z mozkové tkáně se ukázala jako neefektivní, proto bude v budoucnu nutné hledat způsoby, jak kompenzační procesy v mozkové tkáni podpořit.

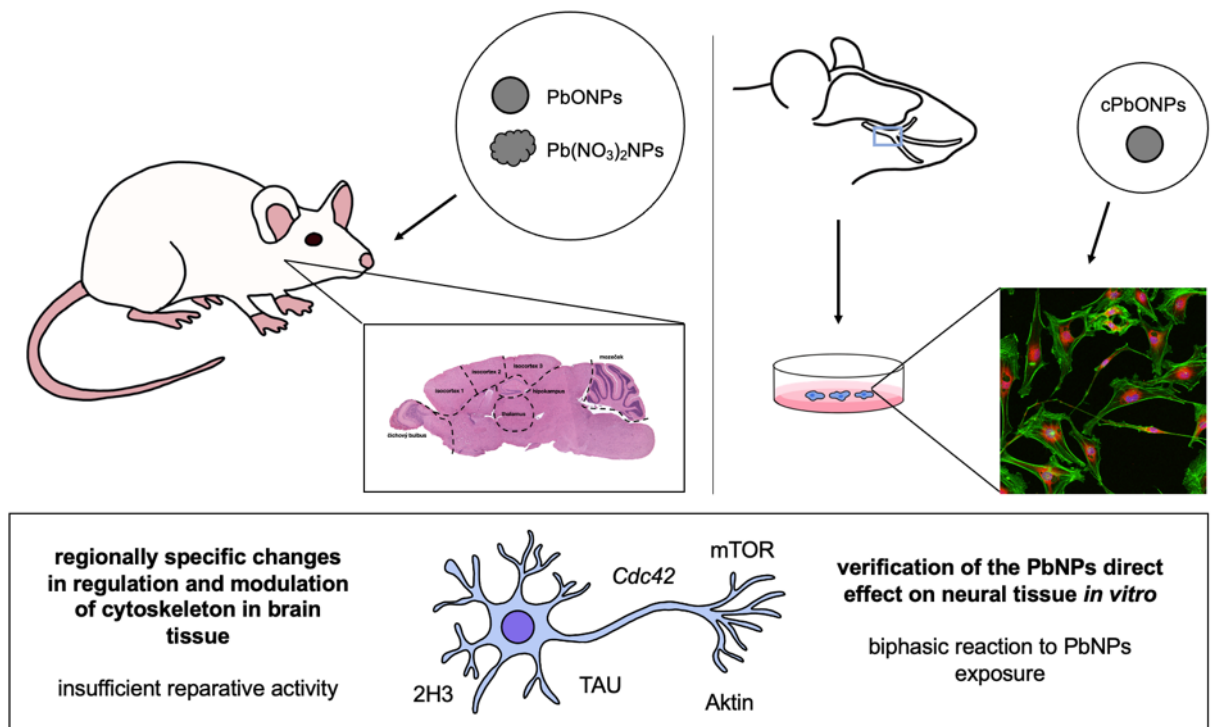
klíčová slova: čichový epitel; mozek; trigeminální ganglia; nanočástice olova; reparativní procesy; neurodegenerativní onemocnění



ABSTRACT

High concentrations of lead nanoparticles (PbNPs) in the air of polluted areas and megacities pose a risk to all living organisms, and therefore the effects of their long-term inhalation must be investigated. Due to their properties, inhaled PbNPs are able to spread from the respiratory tract to other organs and thus negatively affect the entire organism. Currently, as some types of nanoparticles are used as drug carriers, nanotoxicological studies are necessary. However, the mechanisms of PbNPs on neural tissue have not been described yet. This work demonstrated the negative effect of inhaled PbNPs on brain tissue. In selected areas of the brain, we showed alterations in the regulation and modeling of microtubules, microfilaments, and intermediate filaments, these changes were regionally specific. We also determined significant morphological alterations of the olfactory epithelium after inhalation of PbNPs, we also confirmed the penetration of inhaled PbNPs through this structure into the brain tissue. Finally, we verified our results using an *in vitro* model. The detected changes in the brain tissue were similar to the pathologies during the development of neurodegenerative diseases. Furthermore, we confirmed regionally specific changes in TAU protein phosphorylation. The elimination of PbNPs from the brain tissue proved as ineffective, it will be necessary to look for tools supporting compensatory processes in the brain tissue in the future.

key words: olfactory epithelium; brain; trigeminal ganglia; lead nanoparticles; reparative processes; neurodegenerative diseases



OBSAH

1	ÚVOD	18
2	TEORETICKÁ ČÁST	19
2.1	NANOČÁSTICE A JEJICH CHARAKTERISTIKA	19
2.1.1	Přítomnost nanočástic v životním prostředí	19
2.1.2	Toxicita nanočástic	19
2.1.3	Využití nanočástic v klinické praxi	20
2.2	OLOVO, JEHO APLIKACE A MOŽNÁ RIZIKA	20
2.2.1	Využití olova v průmyslu	20
2.2.2	Úskalí a rizika utilizace olova	21
2.2.3	Nanočástice olova	21
2.3	ČIHOVÝ EPITEL	22
2.3.1	Dutina nosní (cavitas nasi)	22
2.3.2	Mikroskopická stavba čichového epitelu	23
2.3.3	Související patologie	24
2.4	MOZEK (CEREBRUM, ENCEPHALON).....	25
2.4.1	Makroskopická stavba mozkové tkáně	25
2.4.2	Mikroskopická stavba mozkové tkáně.....	26
2.4.3	Cévní zásobení mozku.....	31
2.4.4	Neurodegenerativní onemocnění	31
3	CÍLE PRÁCE	33
4	MATERIÁL A METODY	34
4.1	EXPERIMENT IN VIVO.....	34
4.1.1	Modelový organismus	34
4.1.2	Generované nanočástice olova	34
4.1.3	Experimentální design	34
4.1.4	Odběr a fixace vzorků.....	37
4.1.5	Histologické zpracování tkání	38
4.1.6	Hematoxylin-Eosin.....	38
4.1.7	Nisslovo barvení.....	39
4.1.8	Luxolová modř.....	30
4.1.9	Imunohistochemické analýzy	30
4.1.10	Imunofluorescenční analýza	36
4.1.11	Analýza genové exprese	37
4.1.12	Kvantitativní analýza exprese proteinů	40
4.2	EXPERIMENT IN VITRO	43

4.2.1	Primární buněčné kultury trigeminálních ganglií	43
4.2.2	Komerčně dostupné nanočástice olova.....	44
4.2.3	Experimentální design	45
4.2.4	MTT Assay.....	46
4.2.5	Odběr a fixace vzorků.....	46
4.2.6	Imunocytochemická analýza	46
4.2.7	Analýza genové exprese	47
4.2.8	Kvantitativní analýza exprese proteinů.....	47
4.3	STATISTICKÉ HODNOCENÍ DAT.....	48
5	VÝSLEDKY	49
5.1	SIGNIFIKANTNÍ POŠKOZENÍ ČICHOVÉHO EPITELU NASTÁVÁ PO JEDENÁCTI TÝDNECH INHALACE PBNPS	50
5.1.1	Na povrchu čichového epitelu se po 11 týdnech inhalace PbNPs vyskytují vysoké vrstvy sekretu.....	50
5.1.2	Jedenáctitýdenní inhalace PbNPs iniciuje v čichovém epitelu reparativní mechanismy	50
5.2	INHALACE PBNPS ZPŮSOBUJE ZÁVAŽNÉ MORFOLOGICKÉ ZMĚNY MOZKOVÉ TKÁŇE	53
5.2.1	Po inhalaci PbNPs nedochází ke změně hmotnosti mozku.....	53
5.2.2	Nekrotické neurony v hipokampální oblasti po inhalaci PbNPs.....	53
5.2.3	Nekrotické neurony v isocortexu po inhalaci PbNPs.....	54
5.2.4	Morfologické změny bílé hmoty mozečku po inhalaci PbNPs.....	54
5.3	INHALOVANÉ PBNPS REGIONÁLNĚ-SPECIFICKY OVLIVŇUJÍ CYTOSKELET A ASOCIOVANOU SIGNALIZACI V MOZKOVÉ TKÁŇI.....	56
5.3.1	Remodelace aktinového cytoskeletu a deregulace Cdc42 po inhalaci PbNPs.....	56
5.3.2	Signifikantní změny v expresi TAU a asociované signální dráhy PI3K/Akt/mTOR v exponované mozkové tkáni.....	57
5.3.3	Intermediární filamenta v mozkové tkáni nejsou po inhalaci PbNPs zásadně poškozena	58
5.4	IN VITRO EXPERIMENT POTVRDIL PŘÍMÝ EFEKT PBNPS NA NERVOVOU TKÁŇ.....	61
5.4.1	Charakterizace TGs kultur	61
5.4.2	Změna exprese regulátoru aktinového cytoskeletu byla patrná již po 24 hodinách expozice cPbONPs.....	61
5.4.3	Deregulace exprese signální dráhy PI3K/Akt/mTOR v exponovaných kulturách	62
6	DISKUSE.....	64
6.1	NANOČÁSTICE TĚŽKÝCH KOVŮ V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ A ZPŮSOB JEJICH VSTUPU DO ŽIVÝCH ORGANISMŮ.....	65
6.1.1	Modelový organismus	66
6.1.2	Trigeminální ganglia – model pro in vitro experiment	66

6.2	TRANSPORT NPS DO MOZKOVÉ TKÁNĚ	67
6.3	MOZKOVÁ TKÁŇ PO INHALACI NPS	68
6.3.1	Olovo v mozkové tkáni	68
6.3.2	Patologické nálezy v mozkové tkáni po inhalaci NPs	68
6.3.3	Nanočástice olova a jejich souvislost s neurodegenerativními onemocněními	70
6.3.4	Regionálně-specifický efekt inhalovaných PbNPs na mozkovou tkáň	71
6.4	OLOVO A VÁPŇÍK V ŽIVÝCH SYSTÉMECH	72
6.5	ŘEŠENÍ PROBLEMATIKY NANOČÁSTIC V OVZDUŠÍ	74
7	ZÁVĚR	75
8	SEZNAM OBRÁZKŮ	76
9	SEZNAM TABULEK	79
10	SEZNAM PŘÍLOH	80
11	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	81
P1:	DETAILY PRAKTICKÉ ČÁSTI PRÁCE	97
P2:	PŘÍLOHY K VÝSLEDKŮM	102
P3:	SEZNAM POUŽITÉHO MATERIÁLU	150
P4:	STŘEDOŠKOLSKÉ SOUTĚŽE A KONFERENCE	161
P6:	PUBLIKACE, MANUSKRIPTY	163

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- Ab** – protilátka (*Antibody*)
- AbI** – primární protilátka (*Primary Antibody*)
- AbII** – sekundární protilátka (*Secondary Antibody*)
- ABC** – avidin-biotinový komplex (*Avidin Biotin Complex*)
- Ag** – antigen (*Antigen*)
- AD** – Alzheimerova choroba (*Alzheimer's Disease*)
- ALS** – Amyotrofická laterální skleróza (*Amyotrophic Lateral Sclerosis*)
- B3T** – beta-III-tubulin (*Beta-III-Tubulin*)
- BBB** – bariéra krev-mozek (*Blood-Brain Barrier*)
- BSA** – hovězí sérový albumin (*Bovine Serum Albumine*)
- Ca** – vápník (*Calcium*)
- CA** – Ammonův roh (*Ammon's Horn*)
- CA1** – Ammonův roh, region 1 (*Ammon's Horn, Region 1*)
- CA2** – Ammonův roh, region 2 (*Ammon's Horn, Region 2*)
- CA3** – Ammonův roh, region 3 (*Ammon's Horn, Region 3*)
- Cd** – kadmium (*Cadmium*)
- CDC42** – cyklus buněčného dělení 42 (*Cell Division Cycle 4*)
- CNS** – centrální nervová soustava (*Central Nervous System*)
- ctr** – kontrolní skupina (*Control Group*)
- ctr/6w** – šestitýdenní kontrolní skupina (*6week Control Group*)
- ctr/11w** – jedenáctitýdenní kontrolní skupina (*11week Control Group*)
- ctrl/24h** – kontrolní vzorky primárních kultur TGs, 24h experiment (*Control Samples of TGs Primary Cultures, 24h Experiment*)
- ctrl/48h** – kontrolní vzorky primárních kultur TGs, 48h experiment (*Control Samples of TGs Primary Cultures, 48h Experiment*)
- ctrl/72h** – kontrolní vzorky primárních kultur TGs, 72h experiment (*Control Samples of TGs Primary Cultures, 72h Experiment*)
- Cu** – měď (*Copper*)
- cDNA** – komplementární kyselina deoxyribonukleová (*Complementary Deoxyribonucleic Acid*)
- cPbONPs/24h** – exponované vzorky primárních kultur TGs, 24h experiment (*Exposed Samples of TGs Primary Cultures, 24h Experiment*)
- cPbONPs/48h** – exponované vzorky primárních kultur TGs, 48h experiment (*Exposed Samples of TGs Primary Cultures, 48h Experiment*)
- cPbONPs/72h** – exponované vzorky primárních kultur TGs, 72h experiment (*Exposed Samples of TGs Primary Cultures, 72h Experiment*)

DAB – diaminobenzidin (*Diaminobenzidine*)
DEPC voda – diethylpyrokarbonát voda (*Diethyl Pyrocarbonate Water*)
DRGs – dorzální ganglia (*Dorsal Root Ganglia*)
DNA – deoxyribonukleová kyselina (*Deoxyribonucleic Acid*)
EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)
F-actin – fibrilární aktin (*Fibrillary Actin*)
FBS – hovězí bovinní sérum (*Fetal Bovine Serum*)
GAPDH – glycerinaldehyd-3-fosfatáza dehydrogenáza (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*)
HD – Huntingtonova choroba (*Huntington's Disease*)
HE – Hematoxylin-Eosin (*Hematoxylin-Eosin*)
ICC – imunocytochemie (*Immunocytochemistry*)
IF – imunofluorescence (*Immunofluorescence*)
Ig – imunoglobulin (*Immunoglobulin*)
IHC – imunohistochemie (*Immunohistochemistry*)
GD – *gyrus dentatus* (*Dentate Gyrus*)
Hg – rtuť (*Mercury*)
LB – Luxolová modř (*Luxol Fast Blue Stain*)
MAPT – s mikrotubuly asociovaný protein Tau (*Microtubule-Associated Protein Tau*)
Mn – mangan (*Manganese*)
mRNA – mediátorová kyselina ribonukleová (*Messenger Ribonucleic Acid*)
NP – nanočástice (*Nanoparticle*)
NPs – nanočástice (*Nanoparticles*)
NTS – Nisslova tigroidní substance (*Nissl Tigroid Substance*)
p-Tau – fosforylovaný protein Tau (*Phosphorylated Tau Protein*)
PAP – peroxidáza anti-peroxidázový komplex (*Peroxidase Anti-Peroxidase Complex*)
PFA – formaldehyd (*Formaldehyde*)
Pb – olovo (*Lead*)
Pb(NO₃)₂ – dusičnan olovnatý (*Lead II Nitrate*)
Pb(NO₃)₂NPs – nanočástice dusičnanu olovnatého (*Lead II Nitrate Nanoparticles*)
Pb(NO₃)₂NPs/6w – skupina, který byla exponovaná nanočásticím dusičnanu olovnatého po dobu 6 týdnů (*Group That Was Exposed To Lead II Nitrate Nanoparticles for 6 Weeks*)
Pb(NO₃)₂NPs/11w – skupina, který byla exponovaná nanočásticím dusičnanu olovnatého po dobu 11 týdnů (*Group That Was Exposed To Lead II Nitrate Nanoparticles for 11 Weeks*)
Pb(NO₃)₂NPs/CL – skupina s šestitýdenní inhalací nanočástic dusičnanu olovnatého následovanou pětítýdenním eliminačním obdobím (*Group with 6week Inhalation of Lead II Nitrate Nanoparticles Followed Up With 5week Elimination Period*)

PbO – oxid olovnatý (*Lead Oxide*)

PbONPs – nanočástice oxidu olovnatého (*Lead Oxide Nanoparticles*)

PbONPs/6w – skupina, který byla exponovaná nanočásticím oxidu olovnatého po dobu 6 týdnů (*Group That Was Exposed To Lead Oxide Nanoparticles for 6 Weeks*)

PbONPs/11w – skupina, který byla exponovaná nanočásticím oxidu olovnatého po dobu 11 týdnů (*Group That Was Exposed To Lead Oxide Nanoparticles for 11 Weeks*)

PbONPs/CL – skupina s šestitýdenní inhalací nanočástic oxidu olovnatého následovanou pětítýdenním eliminačním obdobím (*Group with 6week inhalation of Lead Oxide Nanoparticles Followed Up With 5week Elimination Period*)

PBS – fosfátový pufr (*Phosphate Buffer*)

PCNA – jaderný antigen proliferujících buněk (*Proliferating Cell Nuclear Antigene*)

PCR – polymerázový řetězová reakce (*Polymerase Chain Reaction*)

PD – Parkinsonova choroba (*Parkinson's Disease*)

PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza (*Phosphoinositide 3-Kinase*)

PM – hmota pevných a kapalných částic v ovzduší (*Particulate Matter*)

PNS – periferní nervová soustava (*Peripheral Nervous System*)

PVDF – polyvinylidifluorid (*Polyvinylidifluoride*)

qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

RNA – ribonukleová kyselina (*Ribonucleic Acid*)

Rpm – otáčky za minutu (*Revolutions Per Minute*)

SC – kmenové buňky (*Stem Cells*)

SOX2 – *Sex Determinant Region Y BOX 2*

Tau – jednotka asociovaná s tubulinem (*Tubulin Associated Unit*)

TB – Toluidinová modř (*Toluidine Blue*)

TEM – transmisní elektronová mikroskopie (*Transmission Electron Microscopy*)

TGs – trigeminální ganglia

WHO – Světová zdravotnická organizace (*World Health Organization*)

Zn – zinek (*Zinc*)

1 ÚVOD

Významnou součástí znečištění v průmyslových oblastech jsou malé částice těžkých kovů, zejména olova či kadmia, jejichž koncentrace často přesahují stanovené limity. Díky svým rozměrům snadno cestují atmosférou a mohou tak ovlivnit i organismy ve vzdálených oblastech. Přibližně jedna třetina všech olovnatých nanočástic (PbNPs) je ve vodě rozpustná a jejich efekty na organismus se od těch nerozpustných mohou významně lišit.

Inhalované nanočástice olova se dokáží z plic, primárního orgánu, snadno šířit přes plasmatické membrány či pomocí krevního oběhu do sekundárních orgánů, jako jsou např. játra, ledviny, slezina apod., jak jsme popsali v našich přechozích studiích [1–3], nicméně působení nanočástic olova, které mají oproti olovu v jiných formách odlišné vlastnosti, na mozkovou tkáň dosud podrobně popsáno nebylo a případné morfologické a molekulární alterace tak zůstávají neodhaleny. Předpokládáme, že PbNPs se do mozku mohou dostat prostupem přes hematoencefalickou bariéru nebo prostupem přes čichový epitel a čichový nerv. Vzhledem k možné souvislosti intoxikace olovem a presumpce neurodegenerativních onemocnění se chceme zaměřit na analýzy molekul podílejících se na regulaci a modelaci cytoskeletu, jehož alterace v mozkové tkáni jsou fatální.

Předložená práce je součástí projektu „**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., Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně a další výzkumné instituce. Projekt se zabývá toxickým vlivem inhalovaných aerosolů obsahujících nanočástice kovů na živé organismy.

V rámci tohoto projektu již byla vypracována práce SOČ s názvem „**Imunitní odpověď a reparace cílových orgánů po inhalaci rozpustných nanočástic olova**“, která byla odevzdána v rámci 43. ročníku Středoškolské odborné činnosti (školní rok 2020/2021), tato práce je jejím volným pokračováním. Předchozí výsledky byly prezentovány v rámci několika vědeckých konferencí (**P5**) a jiných středoškolských soutěží (**P4**), jsou také součástí dvou impaktovaných publikací a dalších připravovaných manuskriptů (**P6**). Práce získala Cenu České učené společnosti 2023 v kategorii Středoškolský student.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Nanočástice a jejich charakteristika

Nanočástice (NP) (předpona nano- z řeckého *trpaslík*) je definována jako částice s průměrem 1–100 nm v alespoň jednom rozměru [4]. Nanočástice (NPs) mají mnoho unikátních vlastností, které je odlišují od stejného materiálu v jiné formě [5], a to zejména díky své velikosti a velké povrchové ploše [4].

Obor, který se NPs a jejich aplikacemi zabývá se nazývá nanotechnologie. Jeho počátkem byla idea profesora fyziky Richarda Feynmana, který v roce 1959 navrhl výrobu strojů, jež by vyráběly menší stroje, které by vyráběly ještě menší stroje apod. a na konci tohoto řetězce by byl stroj o velikosti v řádech desítek až stovek atomů [6]. Tento pohled je v nanotechnologickém oboru zachován i v současné době [7,8].

2.1.1 Přítomnost nanočástic v životním prostředí

Nanočástice jsou nedílnou součástí přírody, vyskytují se např. jako produkty sopečné činnosti, zvětrávání či přírodních požárů. Mohou být také vytvořeny lidskou činností za účelem implementace do technologií či bezúčelně, jako vedlejší produkt jiných procesů, v tomto případě se jedná zejména o nanočástice uhlíku, křemíku, kovů či kovových oxidů. Množství lidmi vytvořených NPs, zejména kovů, výrazně stoupl během průmyslové revoluce v 19. století. V této době také jejich syntézu poprvé popsal Michael Faraday [9–13]. Lidmi byly NPs nicméně využívány již od starověku, a to především díky jejich optickým vlastnostem (práce se sklem – dichroické sklo ve starověkém Římě) [14,15].

Atmosférické NPs jsou díky své velikosti těžko odchyťovány z ovzduší, kterým se mohou snadno šířit do vzdálených oblastí, a následně ohrozit živé organismy [9,16–18]. Bylo také prokázáno, že jejich přítomnost v atmosféře ovlivňuje světové klima [10,19]. Jejich koncentrace jsou proto důležitým ukazatelem kvality ovzduší [9]. Přestože Světová zdravotnická organizace (WHO) stanovila limity pro koncentrace vybraných druhů nanočástic [20], ohrožujících zdraví populace, na mnoha místech jsou tyto limity stále překračovány. Jedná se především o Asii, oblast s vysokou mírou urbanizace, automobilovou dopravou a množstvím přírodních katastrof [21–23].

2.1.2 Toxicita nanočástic

Mezi vlastnosti určující toxicitu NPs patří jejich průměr, velikost a struktura povrchu, tvar, poměr stran, krystalinita, rozpustnost či schopnost aglomerace [13,18,24]. U těžkých kovů je navíc důležitým faktorem neschopnost degradace [25,26]. Nejčastějším vstupem NPs do organismu je inhalace – díky své velikosti se NPs dostanou až do dolních cest dýchacích, odkud se dokáží šířit do sekundárních orgánů. Hlavní riziko představuje oxidativní stres, tedy deregulace mezi oxidanty a antioxidanty, jež vede k aktivaci prozánětlivých cytokinů

a poškození DNA, které může zapříčinit karcinogenezi [27]. Expozice NPs může vést k buněčné smrti, supresi proliferační aktivity nebo k zastavení buněčného cyklu [18,24].

2.1.3 Využití nanočástic v klinické praxi

Třebaže u mnohých druhů nanočástic byl prokázán jejich negativní vliv na živé organismy (NPs oxidu olovnatého, NPs dusičnanu olovnatého, NPs oxidu kademnatého, NPs oxidu ceričitého, NPs oxidu železitého, NPs stříbra, NPs oxidu křemičitého, NPs zlata aj.) [1–3,28–33], v současné době jsou některé druhy NPs používány jako nosiče léčiv např. pro karcinogenní onemocnění, mnoho je také ve fázi klinického testování. Předpokládá se, že vzhledem k výhodám používání NPs jako nosičů léčiv se toto množství bude zvyšovat. Díky možnostem úpravy povrchu je možné léčivo doručovat velmi specificky a předejít mnoha vedlejším účinkům [34–38].

2.2 Olovo, jeho aplikace a možná rizika

Olovo (Pb) je chemický prvek s protonovým číslem 82 a relativní atomovou hmotností 207,19. Jedná se o těžký kov světle šedého zabarvení [12]. Typickými vlastnostmi je kujnost, vysoká hustota, relativně nízký bod tání (327 °C) a schopnost pohlcovat záření gama. Jako prvek se vyskytuje obvykle jako součást nerostů (galenit, anglesit – celkem je známo okolo 240 druhů minerálů [39]), nejčastěji má oxidační číslo +II [40]. Těžké kovy jsou charakteristické svojí toxicitou, která je v případě olova známá již od dob starověkého Říma, ale i přesto je tento kov stále hojně využíván v mnoha odvětvích lidské činnosti [41].

2.2.1 Využití olova v průmyslu

Olovo je nedílnou součástí přírody a díky svým vlastnostem má širokou škálu využití, známé odhadem již od roku 6400 př. n. l. Antické civilizace využívaly olovo k výstavbě potrubí, výrobě skla, kosmetiky či krytí podlah. S extenzivní těžbou a zpracováním olova se pokračovalo i ve středověku [42]. V roce 2003 bylo vytěženo 6,7 milionů tun kovu, nicméně zhruba 60 % olova je získáno recyklací. Mezi nejdůležitější naleziště patří Austrálie a jihovýchodní Missouri [43]. V současné době se celosvětově spotřebuje více než 10 milionů tun ročně a jeho spotřeba stále stoupá [12].

Do nedávna se olovo využívalo jako aditivum do barev na zdi, výrobu potrubí, jako součást olovené pájky v plechovkách na uskladnění potravin či jako přídavek do benzínu. Tyto zdroje znečištění jsou v současné době legislativně omezovány. V menší míře se využívá při výrobě glazur, je součástí munice a také se přidává do závaží rybářských prutů, některých plastů a křišťálového skla [44]. V současné době jsou tři čtvrtiny produkce olova využívány na výrobu olovených akumulátorů (využití v automobilovém průmyslu). Dále je tento kov využíván ve stavebnictví a malířství, elektronickém průmyslu, potravinářství atd. [45].

2.2.2 Úskalí a rizika utilizace olova

Do atmosféry se olovo dostává během procesů tavení a rafinace, a to nejčastěji v podobě mikro- a nanočástic (PM – particulate matter; PM_{10} , PM_5 , PM_1). Koncentrace olova v zemské kůře jsou cca 15 mg/g, tato výše se vysvětluje tím, že olovo je součástí uranové rozpadové řady [46]. Expozice olovu je spojena s jeho negativními účinky na organismus – vyvolává oxidativní stres, a dle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) je označováno za karcinogen skupiny 2A. Přestože jsou limity olova v prostředí legislativně kontrolovány, k efektu na organismy dochází i pod hranicemi těchto limitů [47–49].

Olovo je nebezpečné zejména pro těhotné ženy a pro děti. Může narušovat reprodukční systém a v krajních případech vést k potratům [50]. Patologie byly také prokázány v kardiovaskulární soustavě [51], vylučovací soustavě [52], imunitním systémem [53] či hormonální rovnováze [54]. Olovo také negativně působí na nervový systém. U dětí může vést expozice k encephalopatiím, u dospělých k bolestem hlavy, umírání buněk CNS nebo kómatu, narušuje také funkci periferního nervového systému (PNS). Exponovaní jedinci se také potýkají s defekty kognitivních funkcí, inteligence, emočními problémy a úzkostmi [55–60].

Olovnatý kation (Pb^{2+}) může díky podobnosti ve velikosti atomového průměru (132 a 133 pm) nahrazovat v některých anorganických sloučeninách draselný kation (K^+). Může být také substituentem jiných atomů, např. barnatého kationtu (Ba^{2+}), stroncnatého kationtu (Sr^{2+}), ale také vápenatého (Ca^{2+}) a sodného kationtu (Na^+) – iontů, které jsou důležitými prvky živých systémů [39,61–63]. Je tedy nutné zkoumat účinky olova na živé organismy, zejména pak jeho souvislost s případnými změnami v chemické rovnováze iontů.

2.2.3 Nanočástice olova

Olovo se ve formě částic uvolňuje do atmosféry při přírodních procesech, zejména při zvětrávání hornin, nicméně tyto částice mají průměr větší než 50 μm . Naopak při antropogenních procesech během zpracování olova při vysokých teplotách, se uvolňují částice menší než 0,5 μm . Tyto částice se dokáží šířit atmosférou a zasáhnout tak nejen oblasti svého vzniku, ale i oblasti vzdálené [64–66]. Mikro- a nano- částice olova (PbNPs) je možné snadno vdechnout, mohou proniknout do dolních cest dýchacích a odtud se potenciálně šířit do dalších orgánů [67]. Dle některých studií je přibližně jedna třetina PbNPs v ovzduší je rozpustná ve vodě [68–70]. Nejvíce zasažené oblasti znečištěním PbNPs představují velká města a průmyslové oblasti, zejména v Asii, nicméně vysoké koncentrace PbNPs byly naměřeny v některých evropských metropolích [17,71–73]. Rovněž v České republice (v Brně) byla provedena studie zabývající se měřením koncentrací nanočástic olova a dalších kovů. Dle výsledků ani nejvyšší koncentrace olovnatých částic PM_1 v ovzduší, 0,265 $\mu g/m^3$ v zimě roku 2009, nepřekračují stanovené limity [74,75].

Pro naši studii jsme vybrali nanočástice oxidu olovnatého (PbONPs) a nanočástice dusičnanu olovnatého [$Pb(NO_3)_2$ NPs]. Oxid olovnatý (PbO) je sloučenina se širokým

průmyslovým využitím; používá se např. pro výrobu baterií či detektorů plynu [13,76,77]. Dusičnan olovnatý $[Pb(NO_3)_2]$ je dnes, oproti dřívějšímu, kdy byl používán jako textilní barvivo, využíván naprosto minimálně [78]. V naší studii jsme nanočástice dusičnanu olovnatého použili pro jejich vysokou rozpustnost – $Pb(NO_3)_2$ NPs se rozpustí téměř okamžitě po interakci se sliznicí.

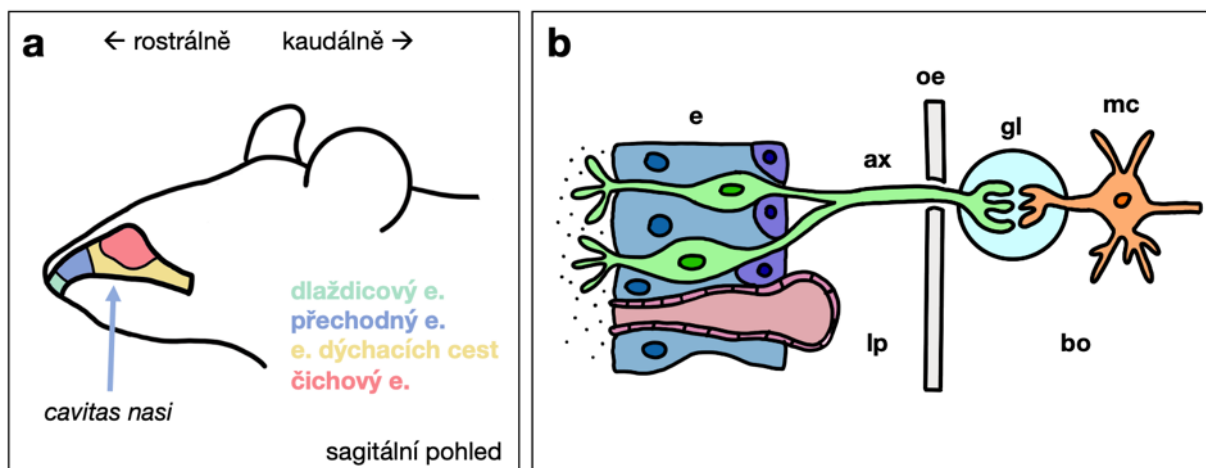
2.3 Čichový epitel

Čichový epitel je významným sensorickým orgánem nacházejícím se v dutině nosní (*cavitas nasi*) (obr. 1a). Dutina nosní slouží k úpravě vzduchu před vstupem do plic, na rozdíl od člověka ji myši k dýchání využívají obligátně. Tato oblast je velmi náchylná k infekcím, alergickým reakcím a poškození, a proto se toxikologie nosu stala rychle rozvíjejícím se oborem, který se zabývá vlivem krátkodobé i dlouhodobé expozice xenobiotik ve vzduchu na nosní dutinu [79].

2.3.1 Dutina nosní (*cavitas nasi*)

Dutina nosní se dělí na tři části; nosní předsíň (*vestibulum nasi*), dýchací oblast (*pars respiratoria*) a čichovou oblast (*regio olfactoria*) [80]. Mikroskopicky pozorujeme v dutině nosní čtyři typy epitelu (**obr. 1a**); v nosní předsíni dlaždicový epitel, mezi předsíní a dýchací oblastí přechodný epitel, v dýchací oblasti epitel dýchacích cest a v čichové oblasti čichový epitel [81,82]. Vzduch prochází nosními dírkami (*nares*) do nosní předsíně. Dutina je pomocí nosní přepážky (*septum nasi*) rozdělena na dvě poloviny, ve kterých se nacházejí nosní skořepy (*concha nasalis*), významně se lišící mezi člověkem a myší. Zatímco člověk má 3 páry jednoduše strukturovaných nosních skořep (*concha nasalis superior, media, inferior*), nosní skořepy myši jsou komplexně rozvětvené, díky čemuž jsou dolní cesty dýchací efektivně chráněny. Účelem nosních skořep je „zvětšit“ plochu nosní dutiny; v porovnání s člověkem má myš vůči své velikosti zhruba 5x větší plochu nosní dutiny [83].

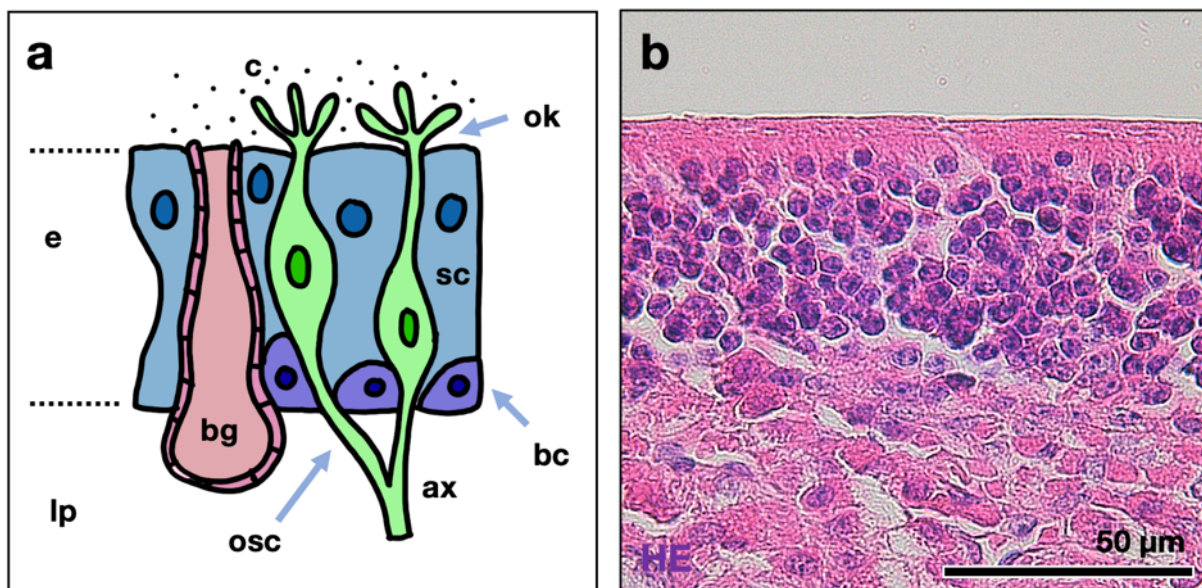
Následně vzduch pokračuje do dýchací a čichové části, kde je přechištěván a pomocí čichového epitelu, který je napojen na mozek, dochází ke vnímání pachu (**obr. 1b**). Součástí čichového epitelu jsou čichové sensorické buňky, jež přijímají signál pomocí cilií na povrchu čichového epitelu, jejichž axony vybíhají do *lamina propria* a přes čichovou kost (*os ethmoidale*) pokračují do čichového bulbu, kde se v glomerulech napojují na mitrální buňky. Axony mitrálních buněk se shlukují a vytváří čichovou dráhu, která pokračuje dále do mozku [80–82].



Obrázek 1. Umístění čichového epitelu v dutině nosní a jeho napojení na mozek (převzato z [81,82], upraveno). **a)** V dutině nosní (šipka) rozlišujeme 4 typy epitelu. V nosní předsíni se nachází dlaždicový epitel (zeleně), mezi nosní předsíní a dýchací částí pozorujeme „přechodný“ epitel (modře), v dýchací části nalezneme epitel dýchacích cest (žlutě), v čichové části je přítomen čichový epitel (červeně). **b)** Z čichových sensorických neuronů (zeleně), které jsou součástí čichového epitelu (e), vybíhají svazky axonů (ax) do lamina propria (lp) a dále přes kost čichovou (*os ethmoidale*) (oe) do čichového bulbu (bo). Axony jsou zde napojeny na dendrity mitrálních buněk (mc) v útvech zvaných glomeruly (gl). Axony mitrálních buněk tvoří čichovou dráhu, jež pokračuje dále do mozku. ax – axony; bo – čichový bulbus (*bulbus olfactorius*); e – epitel; gl – glomerulus (*glomerulus*); lp – lamina propria; mc – mitrální buňka; oe – čichová kost (*os ethmoidale*).

2.3.2 Mikroskopická stavba čichového epitelu

Čichový epitel (**obr. 2**) je víceřadý typ epitelu, který je tvořen čichovými sensorickými neurony, (bipolárními buňkami), jež zajišťují smysl čichu, podpůrnými buňkami a bazálními buňkami (progenitorové). Dendrity čichových neuronů jsou tvořeny nepohyblivými řasinkami, jež přes čichové knoflíky vybíhají a jsou „položeny“ na povrchu epitelu. Pod epitelem se nachází lamina propria, která zahrnuje nemyelinizované nervy, tvořené axony čichových sensorických neuronů, cévy a Bowmanovy žlázy. Jedná se o žlázy tuboalveolární, zajišťující produkci sekretu, který rozpouští čichové stimuly [84].



Obrázek 2. Mikroskopická stavba čichového epitelu. a) Čichový epitel (e) se skládá z několika typů buněk, pod ním se nachází *lamina propria* (lp). Čichové sensorické buňky (osc) posílají signál získaný z cilií (c) přes čichové knoflíky (ok) pomocí axonů (ax) do čichového bulbu. Čichové neurony jsou obnovovány bazálními buňkami (bc). Neurony jsou podporovány podpůrnými buňkami (sc). Na povrchu epitelu se nachází mimo cilií také vodnatý sekret, vylučovaný Bowmanovými žlázami (bg). b) Snímek čichového epitelu. Histologický řez je obarvený Hematoxylinem-Eosinem (HE). Měřítko – 50 µm. ax – axony; bc – bazální buňka; bg – Bowmanova žláza; c – řasinky (*cilia*); e – epitel; lp – *lamina propria*; ok – čichový knoflík; osc – čichový sensorický neuron; sc – podpůrná buňka.

2.3.3 Související patologie

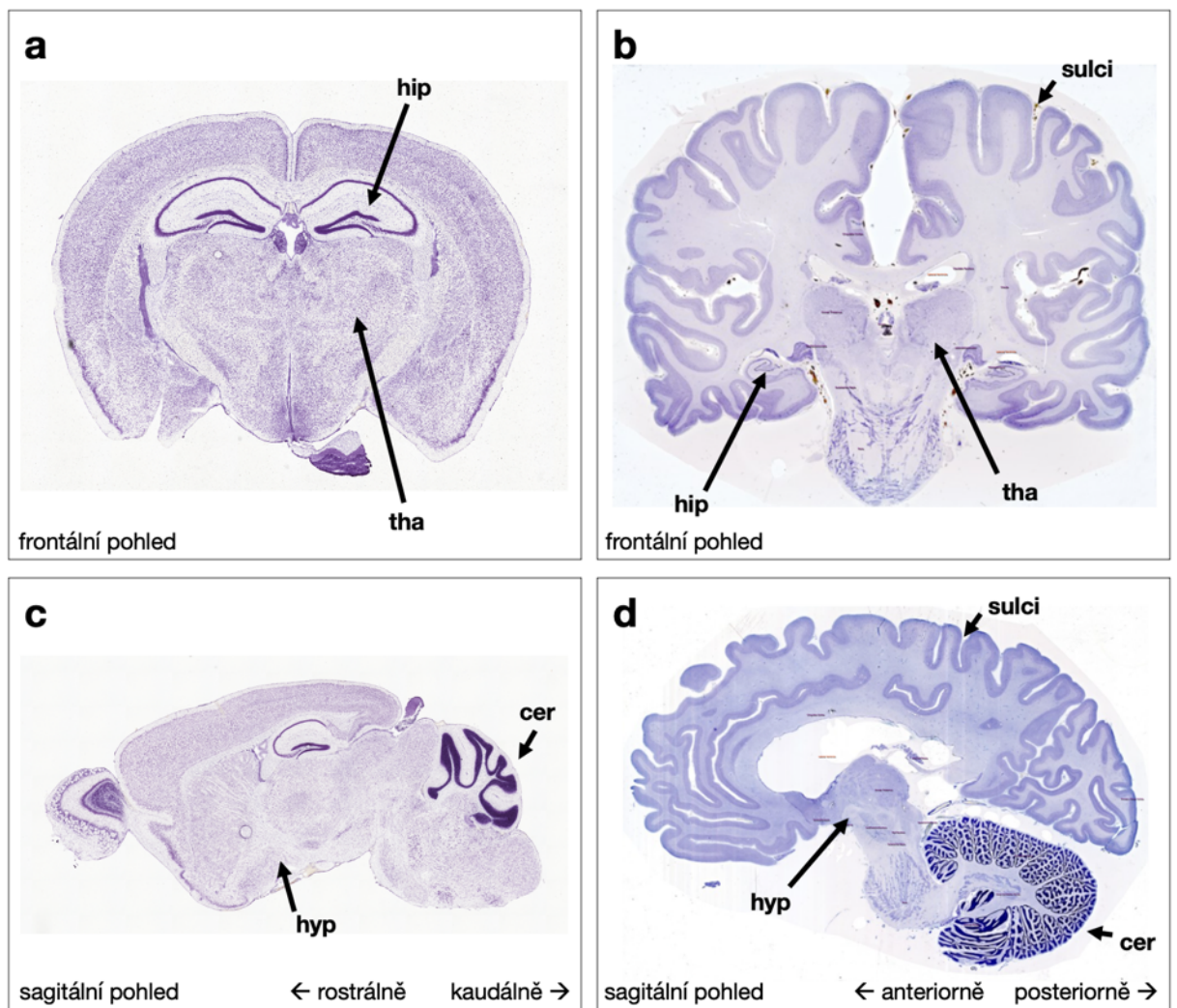
Poruchy čichu významně snižují kvalitu života postižených osob a zvyšují jejich úmrtnost. Odhaduje se, že problémy s čichem je zasaženo 3–20 % populace. Mezi hlavní příčiny poruch čichu patří virové infekce, záněty nosních dutin a neurodegenerativní onemocnění [85–89]. Zejména u neurodegenerativních onemocnění, Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby, jsou poruchy čichu jedním z prvních příznaků [90].

Permanentní dysfunkce čichu nejčastěji souvisí s poškozením cilií a jejich chemoreceptorů, tedy s genetickou informací. Naopak dočasná ztráta čichu může být způsobena otokem a zánětem okolní tkáně. Patofyziologie čichového epitelu je dnes, zejména po pandemii Sars-Cov-19, velmi diskutovaným tématem a k úplnému pochopení souvislostí narušení čichového epitelu s klinickými výstupy jsou třeba další studie [90].

2.4 Mozek (*cerebrum, encephalon*)

2.4.1 Makroskopická stavba mozkové tkáně

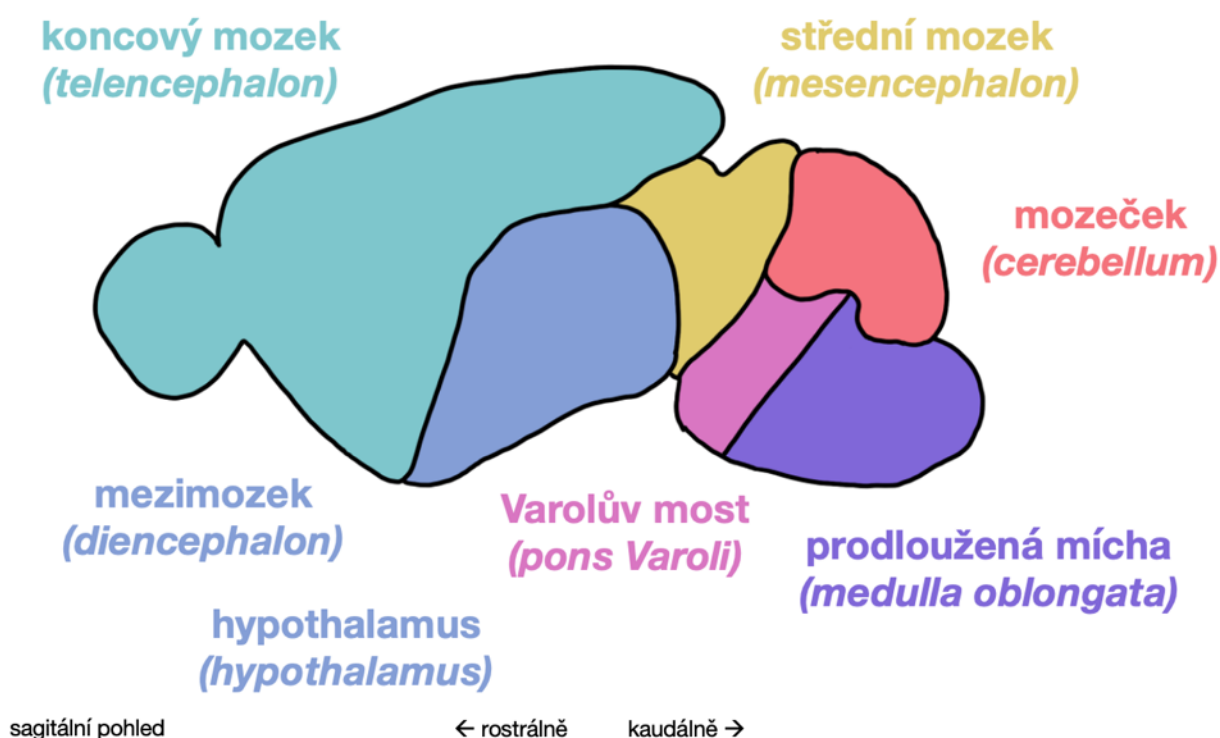
Mozek (*cerebrum, encephalon*) je řídicím orgánem nervové soustavy a společně s míchou (*medulla spinalis*) je součástí centrálního nervového systému (CNS). Rozdíly ve stavbě mozku myši laboratorní a člověka jsou již na první pohled patrné (**obr. 3**), jedná se zejména o velikost – lidský mozek má hmotnost okolo 1300 g, myši zhruba 0,4 g; o povrchovou strukturu – myší mozek je lissencefalický, nemá vytvořené *gyri* a *sulci*, lidský je naopak opticky rozdělen na laloky, dalším rozdílem je pak také podíl mozkové kůry, který je u člověka v porovnání s myší násobně větší [91].



Obrázek 3. Porovnání struktury mozku myši laboratorní a člověka (histologické fotografie převzaty z [92,93]). a) Koronární řez mozkiem myši laboratorní. b) Koronární řez mozkiem člověka. c) Sagitální řez mozkiem myši laboratorní. d) Sagitální řez mozkiem člověka. Povrch lidského mozku je pomocí zářezů (*sulci*) opticky rozdělen na laloky, zářezy také zvětšují plochu mozkové kůry. Její podíl je u člověka několikrát větší než u myši a poloha některých struktur (šípky) je tak mezi těmito druhy odlišná. Všechny histologické řezy na fotografiích byly obarveny pomocí Nisslova barvení. Drsné endoplasmatické retikulum – Nisslova substance je obarvena tmavě modře až fialově.

Měřítka není uvedeno. **cer** – mozeček (*cerebellum*), **hip** – hipokampus (*hippocampus*), **hyp** – hypothalamus (*hypothalamus*), **sulci** – zářezy (*sulci*).

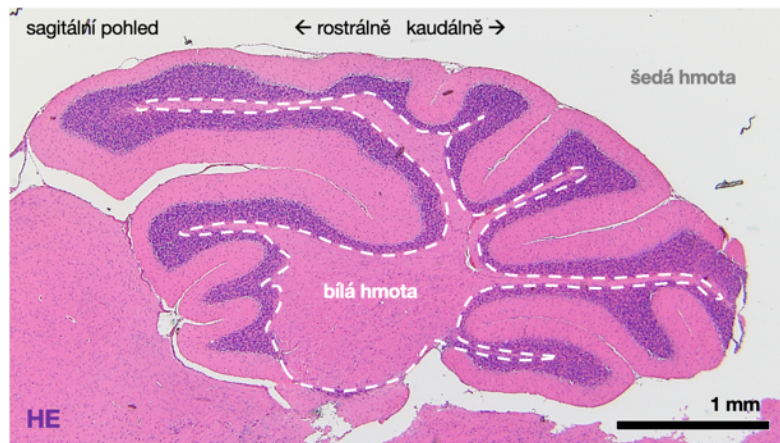
Mozek můžeme rozdělit na tři základní části: přední mozek (*prosencephalon*), střední mozek (*mesencephalon*) a zadní mozek (*rhombencephalon*). Součástí předního mozku je mezimozek (*diencephalon*) a koncový mozek (*telencephalon*), zadní mozek je rozdělen na prodlouženou míchu (*medulla oblongata*), Varolův most (*pons Varoli*) a mozeček (*cerebellum*) (**obr. 4**) [94,95]. Mozek také obsahuje systém čtyř mozkových komor (*ventriculi*) [95]. Vzhledem k zaměření této práce jsou blíže popsány pouze vybrané oblasti mozku.



Obrázek 4. Schéma sagitálního řezu mozku myši laboratorní (převzato a upraveno dle [95]). Mozek myši laboratorní můžeme rozdělit na několik částí. Koncový mozek (*telencephalon*) (zeleně) je evolučně nejmladší strukturou. Oblast mezimozku (*diencephalon*), propojující periferní nervový systém se zbytkem mozku, a hypothalamu (*hypothalamus*) je označena modře. Varolův most (*pons Varoli*) (růžově) je napojen na mozeček (*cerebellum*) (červeně). Prodloužená mícha (*medulla oblongata*), rostrální pokračování hřbetní míchy, je pomocí Varolova mostu napojena na střední mozek a ve schématu je zobrazena fialově.

2.4.2 Mikroskopická stavba mozkové tkáně

Mikroskopicky můžeme CNS rozdělit do dvou typů: bílá a šedá hmota (**obr. 5**). Zatímco šedou hmotu tvoří těla neuronů, synapse, bílá hmota je tvořena axonovými výběžky neuronů a spojuje jednotlivé úseky šedé hmoty. Obsah bílé hmoty u myši je výrazně nižší než u člověka [91].

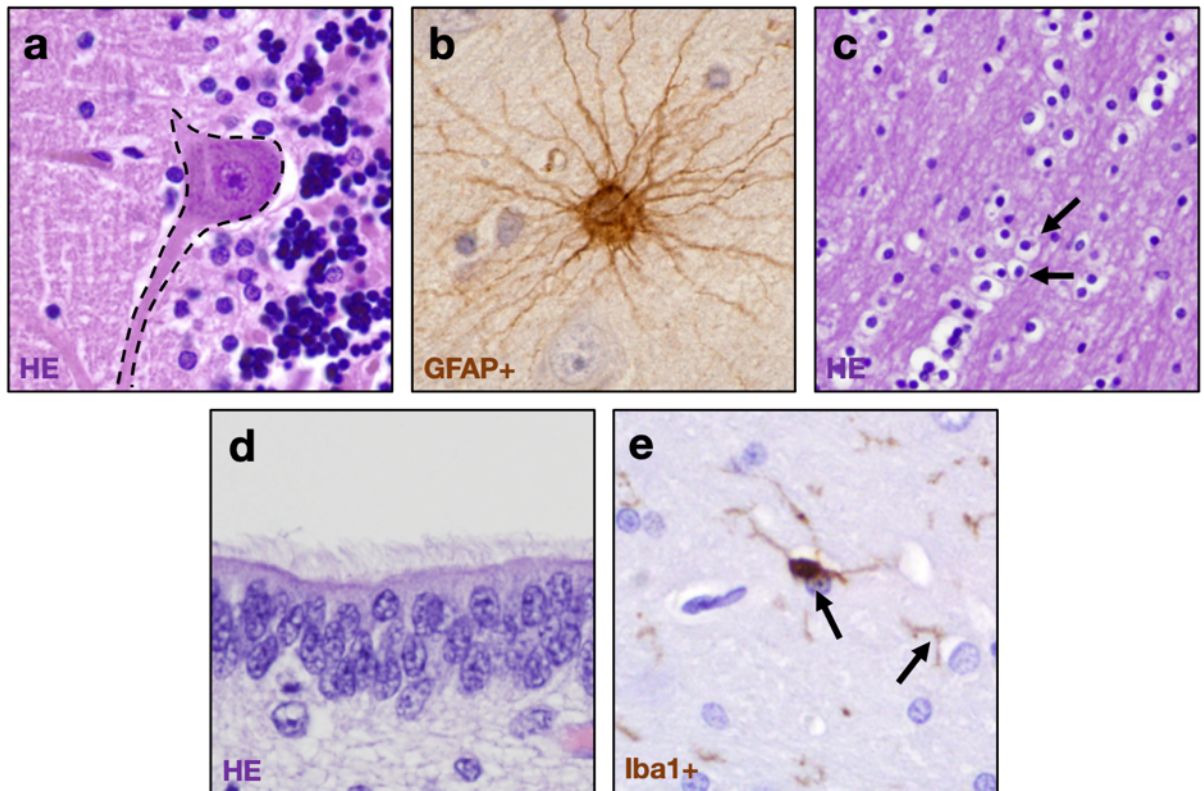


Obrázek 5. Bílá a šedá hmota mozková. Snímek ukazuje rozdíl mezi šedou a bílou hmotou na příkladu mozečku myši laboratorní. Bílá hmota je ohraničena bílou přerušovanou čarou, šedá hmota tvoří zbytek mozečku. Histologický řez je obarven pomocí Hematoxylinu-eosinu (HE). Měřítko – 1 mm.

Buňky CNS mají neuroektodermální (neurony, astrocyty, oligodendrocyty a ependymální buňky) či mesodermální původ (mikroglie, buňky tvořící cévy a meningy) [95]. Neurony (**obr. 6a**) jsou vysoce diferencované buňky s významnou metabolickou aktivitou [96], jsou základní funkční jednotkou nervové soustavy [95]. Neurony mají dva druhy cytoplasmatických výběžků: axon a dendrity [97]. Zatímco dendrity slouží k přijímání nervového signálu, axon tvoří synapsi s další buňkou, které signál předává. Axon může být uložen v myelinové pochvě. Existuje mnoho druhů neuronů s různou morfologií a vlastnostmi. Hlavním rozdílem mezi myší a člověkem je velikost neuronu (myší neurony jsou menší než lidské), ale jejich hustota je vyšší u myši než u člověka. Velikost neuronů oproti podpurným buňkám je výrazně větší [95].

Astrocyty (**obr. 6b**) jsou nejrozšířenější podpurné buňky v CNS, mají charakteristický tvar hvězdice. Tyto buňky regulují metabolismus neuronů pomocí akumulace neurotransmiteru v synaptické štěrbině. Také hrají roli v hematoencefalické bariéře. Dalším druhem podpurných buněk v CNS jsou oligodendrocyty (**obr. 6c**). Vytvářejí myelinové pochvy kolem axonů a tím zefektivňují přenos nervového vzruchu. Jediný oligodendrocyt myelinové obaly kolem více axonů [95]. Ependymální buňky (**obr. 6d**) jsou buňky kubického tvaru s ciliemi vystýlající vnitřní povrch ventrikulárního systému a centrálního míšního kanálku [98]. Mikroglie (**obr. 6e**) jsou buňky vrozené nespecifické imunity (v případě detekce patogenu reagují uvolněním prozánětlivých cytokinů, mají také schopnost fagocytózy). V některých oblastech mozku jsou mikroglie úzce asociovány s neurony a zastávají trofickou funkci.

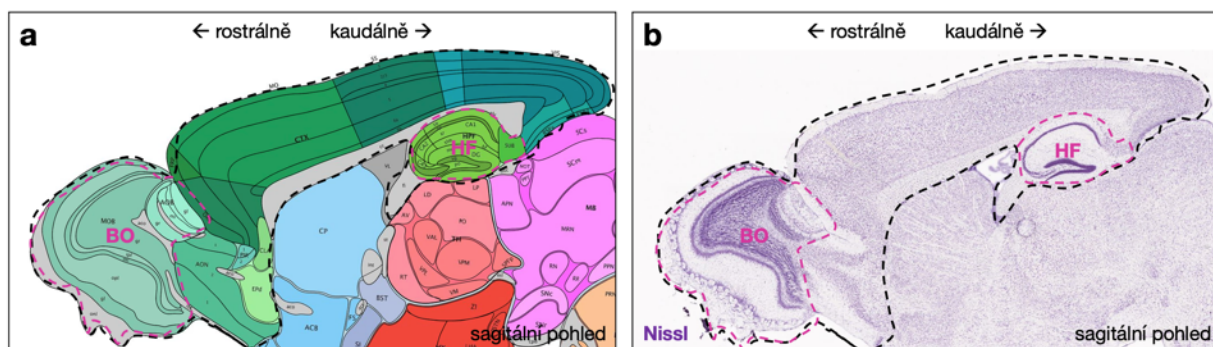
Součástí mozkové tkáně jsou také gliové progenitorní buňky – polydendrocyty (prekurzory oligodendrocytů) a radiální gliové buňky (prekurzory nových neuronů a ependymálních buněk). Bylo prokázáno, že malé populace těchto buněčných typů jsou součástí tkáně dospělých jedinců [95], nicméně schopnost regenerace mozkové tkáně je velmi omezená. Navzdory těmto limitacím probíhá intenzivní výzkum na poli tkáňového inženýrství, aby regenerace, např. po závažných úrazech CNS, byla usnadněna [99].



Obrázek 6. Buněčné typy mozkové tkáně (převzato z [100,101], upraveno). **a)** Neuron (černý obrys) je základní jednotkou nervové soustavy, která může mít mnoho morfologických podob (na obrázku Purkyňovy buňky v mozečku). Oproti podpůrným gliovým buňkám jsou významně větší. Histologický řez je obarven pomocí Hematoxylinu-Eosinu. **b)** Astrocyty jsou jedním z typů podpůrných buněk CNS, jsou typické svým hvězdicovitým tvarem. Na histologickém řezu je astrocyt vizualizován pomocí IHC a markeru GFAP. **c)** Oligodendrocyty (šípky) jsou dalším typem podpůrných buněk v CNS, nachází se okolo myelinových pochev axonů. Histologický řez je obarven pomocí Hematoxylinu-Eosinu. **d)** Ependymální buňky jsou typické svým kubickým tvarem a přítomností cilií, vystylají lumen mj. ventrikulárního systému. Histologický řez je obarven pomocí Hematoxylinu-Eosinu. **e)** Mikroglie (šípky) jsou součástí nespecifické imunity se schopností fagocytózy. Na histologickém řezu jsou mikroglie vizualizovány pomocí IHC a markeru Iba1. Jádra jsou obarvena pomocí Hematoxylinu modře. Měřítko nejsou uvedena.

Koncový mozek (*telencephalon*)

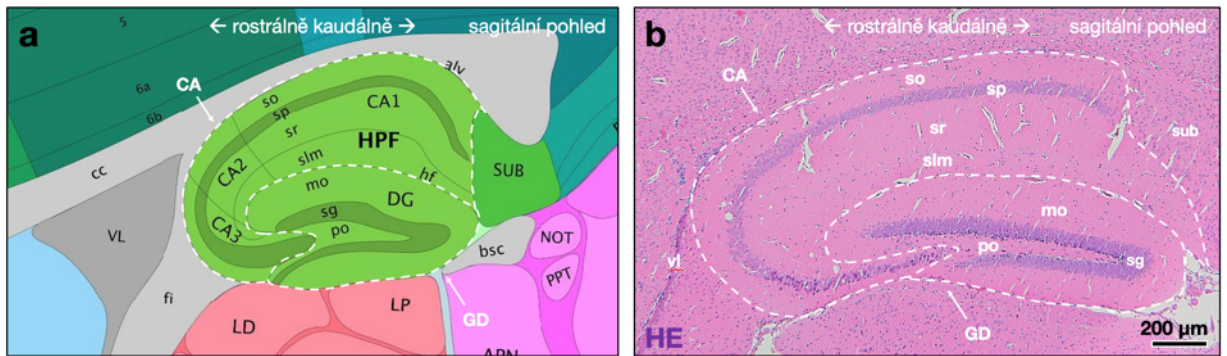
Koncový mozek z vývojového hlediska dělíme na dvě části: pallium a subpallium. Zatímco pallium se nachází na povrchu a tvoří mozkovou kůru, subpallium tvoří bazální ganglia. Mozková kůra je rozdělena na šestivrstvý isocortex (neocortex) a třívrstvý, méně komplexní, allocortex (zahrnující hipokampus (*hippocampus*) – dříve archicortex a čichový bulbus (*bulbus olfactorius*) – dříve paleocortex) (**obr. 7**) [95].



Obrázek 7. Mikroskopická stavba koncového mozku myši laboratorní (převzato z [92]; upraveno). **a, b)** Koncový mozek je vyznačen černou přerušovanou čarou. Tato struktura se dále dělí na isocortex a allocortex. Allocortex zahrnuje mj. čichový bulbus (BO) a hipokampální formaci (HF) (struktury jsou ohraničeny růžovou přerušovanou čarou). Sagitální pohled. Histologický řez je obarven pomocí Nisslova barvení. Měřítko nejsou uvedena.

Isocortex zahrnuje několik oblastí, které mají specifickou funkci; somatomotorickou, somatosenzorickou a vizuální oblast [92]. Myší isocortex je tvořen sedmi vrstvami neuronů, nicméně tato šíře se liší mezi jednotlivými oblastmi. Zhruba dvě třetiny neuronů jsou principální pyramidální neurony, zajišťující výstup signálu z isocortexu, zbylou třetinu tvoří interneurony, které jsou distribuovány ve všech vrstvách isocortexu. Tyto buňky jsou produkovány v subpalliu, odkud migrují do oblasti isocortexu. Jedná se o inhibiční neurony, jež jsou nezbytné pro správnou funkci mozku. Isocortex je propojen s většinou dalších částí mozku (kortikospinální dráha, kortikothalamická dráha aj.) [95].

Hipokampus (z řeckého *mořský koník*) se skládá z hipokampální formace a parahipokampální oblasti (**obr. 8**). Hipokampální formace je tvořena třemi strukturami; Ammonovým rohem (*cornu Ammonis*) (CA), *gyrem dentatem* (*gyrus dentatus*) (GD) a subiculum, jejich vzájemná poloha souvisí s embryonálním vývojem [91,95,98]. Ammonův roh je tvořen čtyřmi vrstvami; *stratum oriens*, vrstvou pyramidálních buněk, *stratum radiatum* a *stratum lacunosum-moleculare*. CA je dále rozdělen na 3 podoblasti; CA1, CA2 a CA3. *Gyrus dentatus* je tvořen obdobnými vrstvami; polymorfní vrstvou, vrstvou granulovalých buněk a molekulární vrstvou. Okolo hipokampální formace probíhají nervová vlákna, anteriorně od hipokampu se nachází mozková komora [92]. Signál se z *gyrus dentatusu* šíří přes oblasti CA3, CA2, CA1 do subiculla a dále do isocortexu nebo zpátky do *gyrus dentatusu* a dochází k jakési „filtraci“ signálu. Hipokampus je součástí limbického systému, jenž také zahrnuje struktury mezimozku spjaté s emocemi a pamětí [95].

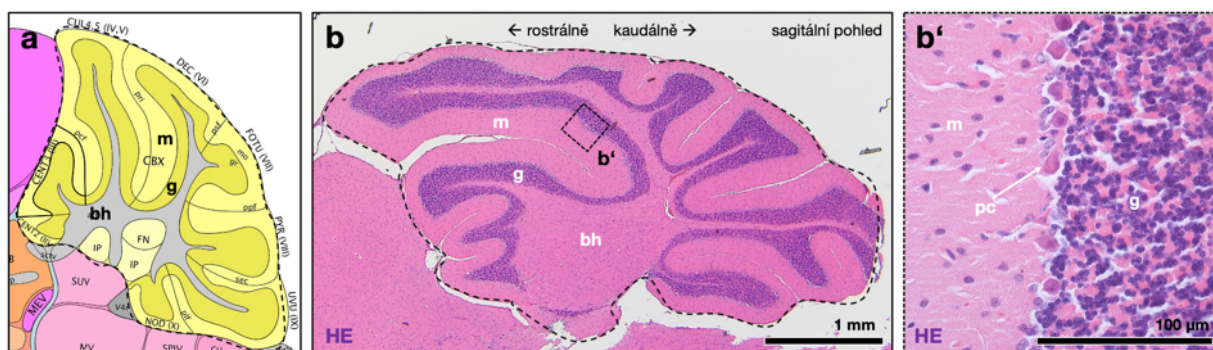


Obrázek 8. Mikroskopická stavba hipokampu myši laboratorní (převzato z [92], upraveno). **a, b)** Hipokampální formace se skládá z hipokampu a subicula (sub). Okolo hipokampu se nachází nervová vlákna (světle šedě), anteriorně od hipokampu je umístěna mozková komora (vl). Hipokampus je tvořen Ammonovým rohem (CA) a *gyrus dentatus* (GD). V CA rozlišujeme podoblasti CA1, CA2, CA3, Ammonův roh je tvořen čtyřmi vrstvami; *stratum oriens* (so), pyramidální vrstvou neuronů (sp), *stratum radiatum* (sr) a *stratum lacunosum-moleculare* (slm). *Gyrus dentatus* je tvořen podobnými vrstvami; polymorfní vrstvou (po), vrstvou granulových buněk (sg) a molekulární vrstvou (mo). Sagitální pohled. Histologický řez je obarven pomocí Hematoxylinu-Eosinu (HE). Měřítko – 200 µm. CA – Ammonův roh (*cornu Ammonis*); CA1 – Ammonův roh, oblast 1; CA2 – Ammonův roh, oblast 2; CA3 – Ammonův roh, oblast 3; GD – *gyrus dentatus*; mo – molekulární vrstva; po – polymorfní vrstva; sg – vrstva granulových buněk; slm – *stratum lacunosum-moleculare*; so – *stratum oriens*; sp – pyramidální vrstva buněk; sr – *stratum radiatum*; sub – subicullum.

Čichový bulbus je významnou strukturou pro vnímání čichu. U myši tato struktura zaujímá poměrově větší objem než u člověka. Čichový bulbus je uložen v blízkosti k čichové kosti a je tvořen třemi vrstvami; vrstvou mitrálních buněk, molekulární vrstvou a granulární vrstvou, nicméně lze jej také rozdělit na 7 vrstev. Obsahuje okolo 2000 glomerulů, kde se setkávají axony čichových sensorických neuronů s dendrity mitrálních buněk [91,95].

Mozeček (*cerebellum*)

Mozeček (*cerebellum*) (**obr. 9**) je součástí zadního mozku a je k němu přichycen pomocí svazků nervových vláken – tři párů stvolů. Je členěn na dvě hemisféry, mezi kterými se nachází mozečkový červ (*vermis cerebelli*). Tyto struktury jsou dále členěny pomocí příčných brázd (*fissurae cerebelli*). Mozeček u myši je velmi podobný mozečku člověka. Histologicky se mozeček člení na kůru a dřev. Kůra je tvořena třemi vrstvami; molekulární, tvořenou dendrity Purkyňových buněk; granulární, která je tvořena granulárními buňkami; a vrstvou Purkyňových buněk [95]. Dřev představuje bílou hmotu mozečku, zvanou strom života (*arbor vitae*). Mozeček je významnou strukturou pro koordinaci jemných pohybů, udržování rovnováhy i kognitivní funkce [102].



Obrázek 9. Mikroskopická stavba mozečku myši laboratorní (převzato z [92]; upraveno). **a, b)** Řez mozečkem – kůrou a dřeví. Bílá hmota (bh) tvoří dřev, strukturu *arbor vitae*, nachází se uvnitř mozečku a přechází v granulární vrstvu (g), která je součástí kůry. Na granulární vrstvě nalezneme těsně přiloženy Purkyňovy buňky (pc) a povrch mozečku je tvořen molekulární vrstvou (m). Sagitální pohled. Histologické řezy jsou obarveny pomocí Hematoxylinu-Eosinu (HE). Měřítko – 1 mm, 100 μ m. bh – bílá hmota; g – granulární vrstva; m – molekulární vrstva; pc – Purkyňovy buňky.

2.4.3 Cévní zásobení mozku

Mozek je vyživován dvěma krevními oběhy. Krev je přiváděna cestou *arteria vertebralis* a *arteria carotis interna*, které jsou na bázi mozku propojeny. *A. vertebralis* vyživuje zejména část mozkového kmene a mozeček, zatímco *a. carotis interna* vyživuje ostatní části mozku [91,95].

Krev a mozkovou tkáň odděluje hematoencefalická bariéra (*claustrum haematoencephalicum*) (BBB) [80], jejíž funkcí je zajistit výživu a zabránit intoxikaci mozkové tkáně. Tato struktura je vysoce selektivně propustná a představuje tak bariéru nejen pro toxiny, ale také pro léčiva šířená krví, která cílí na mozkovou tkáň [103].

2.4.4 Neurodegenerativní onemocnění

Onemocnění spjatá s centrálním i periferním nervovým systémem jsou označována jako neurologická onemocnění a dále je dělíme na tři kategorie: neurotraumatická, neurodegenerativní a neuropsychiatrická [96]. Protože intoxikace olovem je spjata s poškozením nervového systému, tato práce se dále soustředí zejména na neurodegenerativní choroby, nicméně nezapomíná na souvislost neuropsychiatrických onemocnění s limbickým systémem.

Neurodegenerativní onemocnění postihuje neuronální struktury a funkce, způsobuje jejich smrt a vede k demenci a kognitivním poruchám [104,105]. Proces neurodegenerace je velmi komplexní a závisí na mnoha faktorech, například na genetických předpokladech, problémech s imunitním systémem, mechanických a metabolických zásazích do mozkových či míšních tkání [96]. Mezi nejběžnější neurodegenerativní onemocnění řadíme Alzheimerovu, Parkinsonovu a Huntingtonovu chorobu (HD) a amyotrofickou laterální sklerózu (ALS) [96,106].

Neurodegenerativní onemocnění bývá často spjato s oxidativním stresem, deregulovanou interakcí gliových buněk s neurony, či s neuronálním zánětem, který může být dlouhé roky nedetekován a při chronickém působení tak může poškozovat mozkovou tkáň [96]. Dalším významným faktorem jejich vzniku neurodegenerativních onemocnění je změna uspořádání cytoskeletu a proteinů s ním spojených [97]. V případě narušení těchto struktur může docházet

k problémům s transportem molekul do axonálního výběžku a tím vést k poruchám synaptického přenosu vzruchu [96]. Mezi jejich nejdůležitější znaky poruch cytoskeletu patří tvorba a agregace nesprávně poskládaných („misfolded“), často hyperfosforylovaných, proteinů, například Amyloid-beta, TAU, Alpha-synuclein apod., které jsou shromažďovány ve strukturách nazývaných amyloidy. Tyto struktury jsou specifické pro různá neurodegenerativní onemocnění, ale proces „misfoldingu“ je u všech typů nemocí velmi podobný [106]. V případě agregace hyperfosforylovaného proteinu TAU jsou choroby nazývány „tauopathies“ [107] a do této kategorie řadíme např. Alzheimerovu chorobu, Pickovu chorobu atd. [108]. Protein TAU, stabilizující mikrotubuly, hraje také roli při regulaci signální dráhy PI3K/Akt/mTOR, kde je inhibítoem proteinu PTEN [109].

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce je analyzovat vliv šestitýdenní a jedenáctitýdenní inhalace generovaných rozpustných a nerozpustných nanočástic olova na mikroskopickou stavbu čichového epitelu a mozku *in vivo* s využitím myši laboratorní jako modelového organismu a určit efektivitu reparativních procesů v těchto tkáních. Vliv nanočástic olova na nervové buňky a jejich působení na signalizaci asociovanou se změnami cytoskeletu pak i potvrdit s využitím primárních buněčných kultur trigeminálních ganglií *in vitro*.

Dále byly stanoveny tyto dílčí cíle:

- provést analýzy hmotnosti mozku
- určit histopatologické alterace v čichovém epitelu a v mozkové tkáni
- detekovat proliferační aktivitu a progenitorové buňky v čichovém epitelu, determinovat efektivitu reparativních procesů a eliminačního období
- detekovat potenciální změny v modelaci cytoskeletu v mozkové tkáni pomocí:
 - determinace genové exprese *Cdc42* a vizualizace proteinu Beta-Aktin ve zvolených oblastech mozku
 - určení genové exprese *Mapt* a proteinové exprese p-TAU a t-TAU ve zvolených oblastech mozku
 - stanovení genové exprese vybraných členů PI3K/Akt/mTOR dráhy ve zvolených oblastech mozku, určení proteinové exprese mTOR
 - detekce a kvantitativní analýza intermediárních filament pomocí markeru 2H3 ve zvolených oblastech mozku
- porovnat vliv inhalace rozpustných a nerozpustných nanočástic olova na různé oblasti mozkové tkáně
- optimalizovat využití primárních buněčných kultur trigeminálních ganglií jako modelu pro určení vlivu PbNPs na nervovou tkáň *in vitro*
- ověřit přímý vliv PbNPs na nervovou tkáň *in vitro* pomocí kultury trigeminálních ganglií v různých časových bodech
 - určit genovou expresi *Mapt* a vybraných členů PI3K/Akt/mTOR signální dráhy
 - determinovat proteinovou expresi vybraných markerů cytoskeletu, p-TAU a t-TAU
 - zjistit genovou expresi *Cdc42*

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Experiment *in vivo*

4.1.1 Modelový organismus

Modelovým organismem pro *in vivo* experiment byla outbrední linie samice myši laboratorní ICR. Samice byly před začátkem experimentů 6-8 týdnů staré, jejich průměrná hmotnost se pohybovala do 24 g.

4.1.2 Generované nanočástice olova

Pro inhalační experiment byly použity dva typy nanočástic lišící se svojí rozpustností; nanočástice oxidu olovnatého (PbONPs), které představovaly hůře rozpustnou/nerozpustnou formu nanočástic olova a nanočástice dusičnanu olovnatého [Pb(NO₃)₂NPs], které naopak představovaly vysoce rozpustnou formu nanočástic olova. Nanočástice byly generovány ve spolupráci s Ústavem analytické chemie Akademie věd České republiky, v.v.i.

Nanočástice oxidu olovnatého

Nanočástice oxidu olovnatého byly kontinuálně generovány *in situ* za pomoci horkostěnného trubkového průtokového reaktoru, který využíval metodu odpařování-oxidace-kondenzace. Roztavené olovo z oloveného dráhu se odpařovalo, následně bylo zředěno vzduchem a oxidovalo se na oxid olovnatý. Konečná průměrná koncentrace byla stanovena na 78,0 µg/m³ (**P1**).

Nanočástice dusičnanu olovnatého

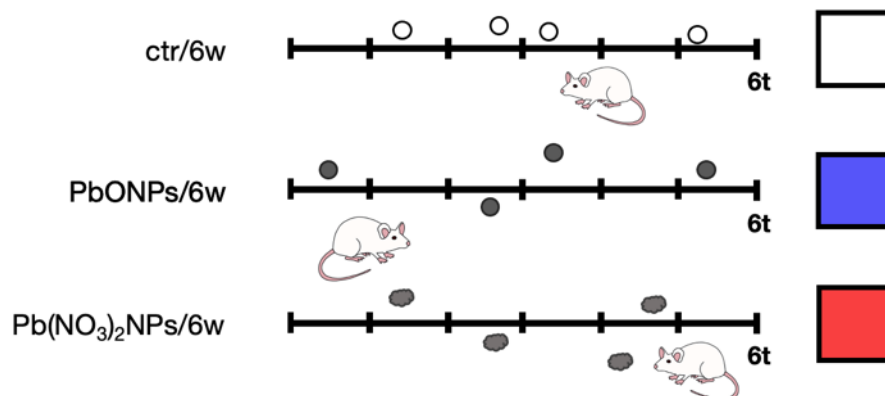
Nanočástice dusičnanu olovnatého byly kontinuálně generovány *in situ* za pomoci pneumatické atomizace 4 mM roztoku dusičnanu olovnatého. V sušící komoře byl roztok smíchán s filtrovaným vzduchem, poté byly Pb(NO₃)₂NPs dále zředěny vzduchem. Konečná průměrná hmotnostní koncentrace byla stanovena na 68,6 µg/m³ (**P1**).

4.1.3 Experimentální design

Inhalační experiment probíhal po dobu 6 a 11 týdnů. V šestitýdenním experimentu (**obr. 10**) byly použity tři experimentální skupiny po 5 jedincích (analýzy, které jsou součástí této práce byly provedeny na různých počtech jedinců, protože vzorky byly použity také pro další analýzy (**P2**)):

- Kontrolní skupina, dále označovaná jako **ctr/6w**, po dobu 6 týdnů inhalovala vzduch bez obsahu generovaných nanočástic.
- Druhá experimentální skupina, dále označovaná jako **PbONPs/6w**, inhalovala po dobu 6 týdnů vzduch s obsahem generovaných nanočástic oxidu olovnatého.

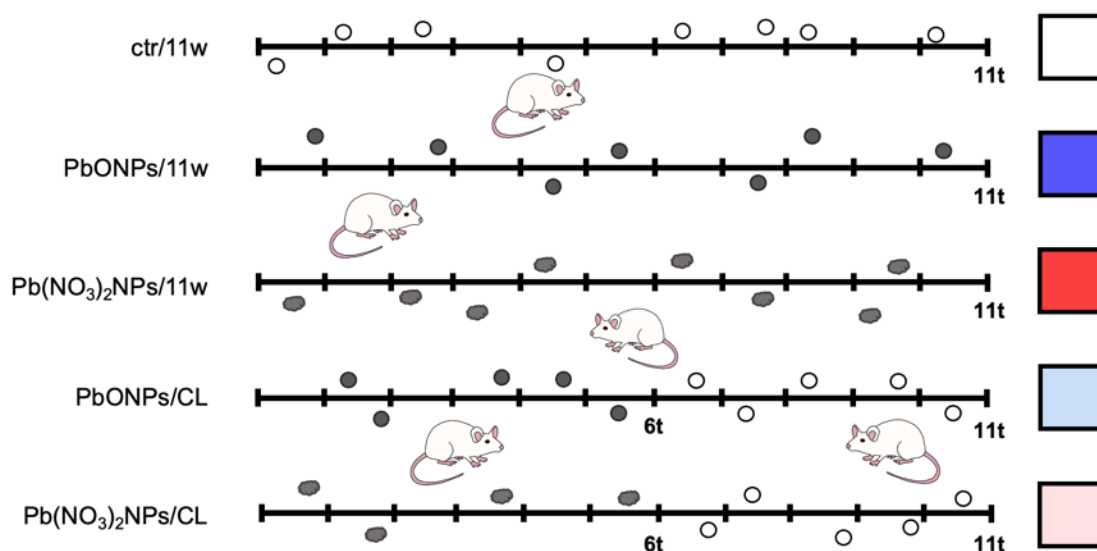
- Třetí experimentální skupina, dále označovaná jako **Pb(NO₃)₂NPs/6w**, inhalovala po dobu 6 týdnů vzduch s obsahem generovaných nanočástic dusičnanu olovnatého.



Obrázek 10. Schéma experimentálního designu šestitýdenního inhalačního experimentu. Pro šestitýdenní experiment byly použity tři experimentální skupiny. První skupina, ctr/6w, byla kontrolní, inhalovala po dobu 6 týdnů vzduch bez obsahu generovaných nanočástic, pro větší přehlednost bude označována bílou barvou. Druhá šestitýdenní experimentální skupina, PbONPs/6w, inhalovala po dobu 6 týdnů vzduch s obsahem generovaných nanočástic oxidu olovnatého, bude označována tmavě modrou barvou. Skupina Pb(NO₃)₂NPs/6w inhalovala po dobu 6 týdnů vzduch s obsahem generovaných nanočástic dusičnanu olovnatého, bude označována tmavě červenou barvou. Pro jedenáctitýdenní inhalační experiment bylo použito 5 experimentálních skupin. Ctr/11w skupina byla kontrolní a po celou dobu inhalačního experimentu inhalovala vzduch bez obsahu generovaných nanočástic, pro přehlednost ve výsledcích bude označována bílou barvou. Druhá jedenáctitýdenní experimentální skupina, PbONPs/11w, po dobu 11 týdnů inhalovala vzduch s obsahem generovaných nanočástic oxidu olovnatého, označována dále tmavě modrou barvou. Pb(NO₃)₂NPs/11w skupina po dobu 11 týdnů inhalovala vzduch s obsahem generovaných nanočástic dusičnanu olovnatého (označována dále tmavě červenou barvou). PbONPs/CL skupina po dobu 6 týdnů nejprve inhalovala vzduch s obsahem generovaných nanočástic oxidu olovnatého a následně 5 týdnů vzduch bez obsahu generovaných nanočástic (označována dále světle modrou barvou). Poslední experimentální skupina, Pb(NO₃)₂NPs/CL skupina, 6 týdnů inhalovala vzduch s obsahem generovaných nanočástic dusičnanu olovnatého a následně 5 týdnů vzduch bez obsahu generovaných nanočástic (označována světle červenou barvou).

Pro jedenáctitýdenní experiment (**obr. 11**) bylo použito pět experimentálních skupin, v každé bylo pět jedinců:

- Kontrolní skupina, dále označovaná jako **ctr/11w**, byla kontrolní a inhalovala po dobu 11 týdnů vzduch bez obsahu generovaných nanočástic,
- Druhá jedenáctitýdenní experimentální skupina, dále označovaná jako **PbONPs/11w**, inhalovala po dobu 11 týdnů vzduch s obsahem generovaných nanočástic oxidu olovnatého.
- Třetí experimentální skupina, dále označovaná jako **Pb(NO₃)₂NPs/11w**, inhalovala po dobu 11 týdnů vzduch s obsahem generovaných nanočástic dusičnanu olovnatého.
- Čtvrtá experimentální skupina, skupina s eliminačním obdobím, dále označovaná jako **PbONPs/CL**, inhalovala nejprve po dobu 6 týdnů vzduch s obsahem generovaných nanočástic oxidu olovnatého a následně 5 týdnů vzduch bez obsahu generovaných nanočástic.
- Pátá experimentální skupina, dále označována jako **Pb(NO₃)₂NPs/CL**, byla také skupina s eliminačním obdobím, nejprve po dobu 6 týdnů inhalovala vzduch s obsahem generovaných nanočástic dusičnanu olovnatého a následně 5 týdnů vzduch bez obsahu generovaných nanočástic olova.



Obrázek 11. Schéma experimentálního designu jedenáctitýdenního inhalačního experimentu.

Pro jedenáctitýdenní inhalační experiment bylo použito 5 experimentálních skupin. Ctr/11w skupina byla kontrolní a po celou dobu inhalačního experimentu inhalovala vzduch bez obsahu generovaných nanočástic, pro přehlednost ve výsledcích bude označována bílou barvou. Druhá jedenáctitýdenní experimentální skupina, PbONPs/11w, po dobu 11 týdnů inhalovala vzduch s obsahem generovaných nanočástic oxidu olovnatého, označována dále tmavě modrou barvou. Pb(NO₃)₂NPs/11w skupina po dobu 11 týdnů inhalovala vzduch s obsahem generovaných nanočástic dusičnanu olovnatého (označována dále tmavě červenou barvou). PbONPs/CL skupina po dobu 6 týdnů nejprve inhalovala vzduch s obsahem generovaných nanočástic oxidu olovnatého a následně 5 týdnů vzduch bez obsahu generovaných nanočástic (označována dále světle modrou barvou). Poslední experimentální skupina, Pb(NO₃)₂NPs/CL skupina, 6 týdnů inhalovala vzduch s obsahem generovaných nanočástic dusičnanu olovnatého a následně 5 týdnů vzduch bez obsahu generovaných nanočástic (označována světle červenou barvou).

Sedm dní před počátkem inhalací byli všichni jedinci aklimatizováni laboratorním podmínkám. Pro experiment byly použity celotělové klece simulující fyziologické podmínky (**obr. 12**). Po celou dobu experimentu měli přístup k vodě a krmivu *ad libitum*. Všechny experimentální skupiny byly umístěny do inhalační komory s inhalačními klecemi s monitorovanými stálými podmínkami. Světelné podmínky v inhalační komoře byly nastaveny na 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Chování a zdravotní stav jedinců byly sledovány pomocí kamerového systému.

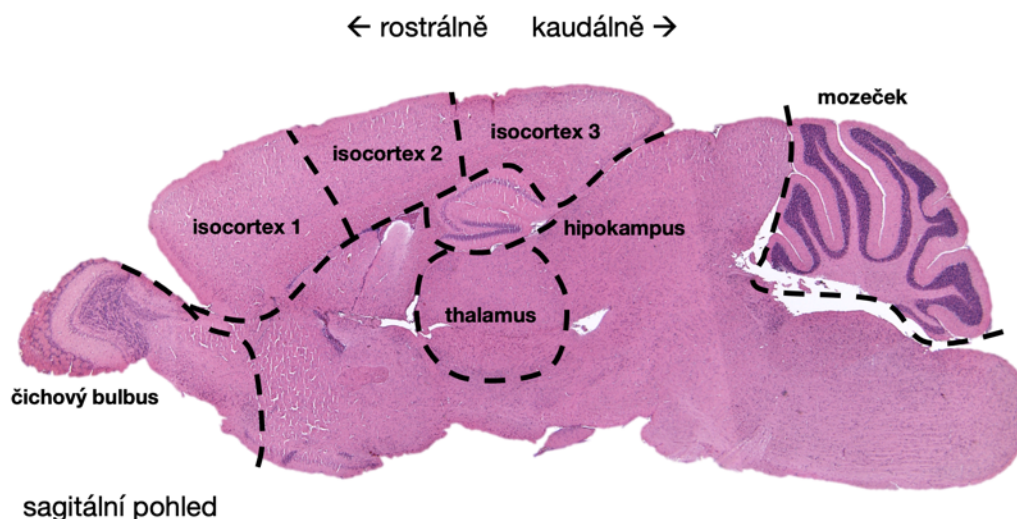


Obrázek 12. Inhalační komora s inhalačními klecemi (foto: Eva Svozilová, DiS.).

4.1.4 Odběr a fixace vzorků

Po uplynutí 6 týdnů a 11 týdnů byli všichni jedinci usmrceni pomocí cervikální dislokace v souladu s projektem pokusů a zákona 214/2011 dle vyhlášky č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat. Byly odebrány vzorky čichového epitelu a mozku, které byly následně zpracovány dle charakteru vzorku. Nejprve byla určena hmotnost mozku a následně sagitálně rozdělen napůl, jedna polovina byla zpracována histologicky, druhá byla určena pro analýzu genové exprese či pro jiné analýzy:

- Vzorky čichového epitelu určené pro histologické zpracování byly umístěny do 10% formaldehydu (PFA) a následně po dobu jednoho roku do odvápnovacího roztoku EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová). Pro analýzy bylo použito 3-5 jedinců z každé experimentální skupiny a 3-8 řezů z každého jedince (**P2**).
- Vzorky mozku určené pro histologické zpracování byly ponechány v 10% PFA a uskladněny v teplotních podmínkách 4 °C. Pro analýzy bylo použito 3-5 jedinců z každé experimentální skupiny a 2-5 řezů z každého jedince (**P2**).
- Vzorky mozku určené pro analýzu genové exprese byly umístěny do tekutého dusíku a následně uskladněny v teplotních podmínkách -80 °C. Mozek byl pro potřeby analýz rozdělen na 7 částí; hipokampus, isocortex 1, isocortex 2, isocortex 3, thalamus, mozeček a čichový bulbus (**obr. 13**). Pro analýzy bylo použito 2-4 jedinců z každé experimentální skupiny (**P2**).
- Vzorky mozku určené pro kvantitativní analýzy exprese proteinů (vzhledem k počtu vzorků pouze skupiny ctr/11w, PbONPs/11w a PbONPs/CL) byly umístěny do tekutého dusíku a následně uskladněny v teplotních podmínkách -80 °C. Pro analýzy byly použity oblasti isocortexu 1 a hipokampální oblast.



Obrázek 13. Schéma odebraných částí mozku pro analýzu genové exprese. Sagitální řez, řez byl obarven pomocí Hematoxylinu-eosinu. Mozek byl pro analýzu genové exprese rozdělen na 7 částí, které byly následně analyzovány: isocortex 1, isocortex 2, isocortex 3, čichový bulbus, hipokampus, thalamus, mozeček. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení.

4.1.5 Histologické zpracování tkání

Vzorky tkání určené pro histologické zpracování byly dvě hodiny promývány ve vodní lázni. Následovaly lázně v roztocích etanolu s jeho vzestupnou koncentrací (30%, 50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%), každá po dvou hodinách. Pro projasnění byly vzorky promývány ve třech xylenových lázních po dvou hodinách. Následovalo prosycení ve třech lázních parafínu po dvou hodinách. Vzorky byly zality do parafínu o teplotě 56 °C. Po 24 h byl z bločků odstraněn přebytečný parafín a vytvořen rovnoramenný lichoběžník. Na rotačním mikrotomu byly nakrájeny řezy tlusté 5 mm. Řezy byly napnuty na vodní hladině (teplota 39 °C), následně byly umístěny na podložní sklička, jež byla nejprve položena na horké desce (teplota 38 °C) a poté 12 hodin v termostatu (teplota 37 °C). Vzorky byly poté skladovány při teplotě 4 °C a dále zpracovány pomocí histologických barvení, imunohistochemických a imunofluorescenčních metod.

Pro examinaci odebraných tkání bylo použito několik základních i speciálních histologických barvení, které pomáhají rozlišit jednotlivé části tkáně, jež jsou za běžných podmínek průsvitné. Základní histologická barvení nám umožnila vizualizovat přehledně celou tkáň, naopak specifická histologická barvení vizualizovala konkrétní kompartmenty tkáně [80,110].

4.1.6 Hematoxylin-Eosin

Barvení Hematoxylin-Eosin (HE) je základním histologickým barvením, využívající rozdílů v afinitě barviv ke kyselým a zásaditým složkám tkáně [80,110–112].

Vzorky před barvením nejprve odparafinujeme pomocí dvou desetiminutových xylenových lázní. Dále vzorky zavodníme pomocí dvou lázní v 96% etanolu a jedné

lázně v destilované vodě po deseti minutách. Tkáň barvíme Mayerovým hematoxylinem (**P3**) 5 minut, následuje oplach v teplé vodě, ve které vzorky necháme 5 minut modrat. Dále barvíme Eosinem (**P3**) 3 minuty, následně vzorky opláchneme studenou vodou. Vzorky odvodníme ve dvou lázních v 96% etanolu po deseti minutách. Vzorky projasníme ve dvou desetiminutových xylenových lázních a zamontujeme. Výsledkem je fialové zbarvení bazofilních struktur tkáně a růžové zbarvení acidofilních struktur tkáně (**obr. 14**).

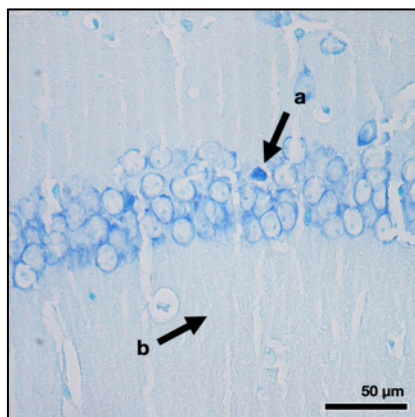


Obrázek 14. Výsledek barvení Hematoxylinem-Eosinem. a) Jádra a bazofilní struktury jsou obarvena fialově. b) Cytoplasma a acidofilní struktury jsou obarveny růžově. Řez čichového epitelu.

4.1.7 Nisslovo barvení

Nisslova tigroidní substance (NTS) je označení pro drsné endoplasmatické retikulum, zřetelné zejména v buňkách s vysokou proteosyntetickou aktivitou, kterou jsou mj. neurony [113–117].

Skla s řezy umístíme do termostatu (teplota 56 °C) po dobu alespoň 12 hodin. Tímto krokem zajistíme fixaci řezů na sklíčku a zabránění jejich případnému uvolnění. Vzorky nejprve odparafinuje pomocí dvou desetiminutových lázních v xylenu. Následuje zavodnění pomocí tří pětiminutových lázní v řadě sestupných koncentrací ethanolu (100%, 96%, 70%) a jedné pětiminutové lázni v destilované vodě. Poté vzorky umístíme do 0,1% roztoku TB (**P3**) na dobu 5 minut při teplotě 37 °C a 10 minut oplachujeme v destilované vodě. Vzorky diferencujeme pomocí desetiminutové lázně v 96% ethanolu. Následuje pětiminutové odvodnění pomocí bezvodého ethanolu a projasnění pomocí dvou desetiminutových lázní v xylenu. Výsledkem je tmavě modré zbarvení nekrotických a bazofilních neuronů (běžně se nacházejících na určitých místech v mozkové tkáni) a světle modré zbarvení ostatních struktur (**obr. 15**).

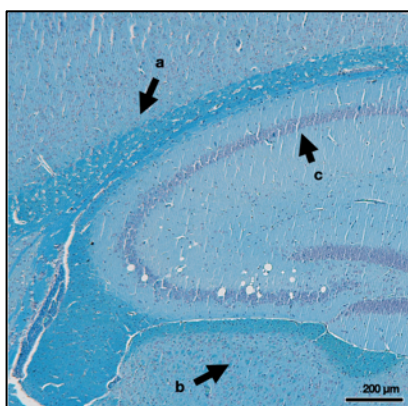


Obrázek 15. Výsledek Nisslova barvení (NTS) a) Bazofilní a nekrotické neurony jsou zbarveny tmavě modře. b) Ostatní struktury jsou zbarveny světle modře. Sagitální řez mozku, hipokampální oblast, Ammonův roh, region CA1.

4.1.8 Luxolová modř

Barvení Luxolovou modří (LB) (v anglické literatuře uváděno pod názvem Luxol Fast Blue Stain) je specifické histologické barvení, které slouží k vizualizaci myelinových pochev axonů [118]. Toto barvení je často využíváno při patologických analýzách mozkové tkáně, protože demyelinizace je procesem souvisejícím např. se sklerózami [119].

Skla s řezy umístíme do termostatu (teplota 56 °C) po dobu alespoň 12 hodin. Tímto krokem zajistíme fixaci řezů na sklíčku a zabránění jejich případnému uvolnění. Nejprve vzorky zbavíme parafinu ve dvou lázních xylenu po deseti minutách, následně je zavodníme pomocí pětiminutových lázní v sestupné řadě koncentrací ethanolu (100 %, 96 %, 70 %) a pětiminutové lázni v destilované vodě. Vzorky umístíme do lázně 0,1% roztoku Luxolové modří (**P3**) na dobu 5 hodin při teplotě 56 °C. Následuje oplach v 70% ethanolu a v destilované vodě. Vzorky poté 2 minuty diferencujeme v 0,05% roztoku uhličitanu lithného. Opláchneme v destilované vodě a pomocí hematoxylinu 1 minutu dobarvujeme buněčná jádra. Opláchneme v destilované vodě, odvodníme pomocí pětiminutových lázní ve vzestupné ethanolové řadě (70%, 96%, 100%) a projasníme pomocí dvou desetiminutových lázní v xylenu. Výsledkem je tmavě modře zbarvení myelinových pochev (**obr. 16**).



Obrázek 16. Výsledek barvení Luxolovou modří (LB). a) Myelinové pochvy jsou obarveny tmavě modře. b) Ostatní struktury jsou obarveny světle modře. c) Jádra jsou obarvena fialově. Sagitální řez mozku, hipokampální oblast.

4.1.9 Imunohistochemické analýzy

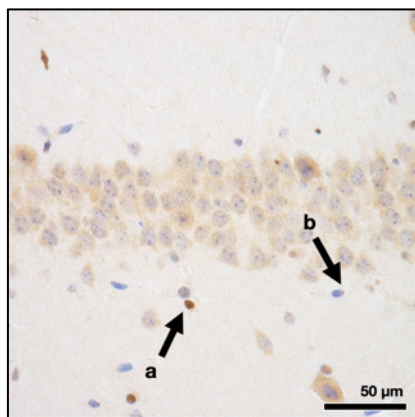
Imunohistochemická analýza (IHC) je hojně používaná histologická metoda sloužící k vizualizaci proteinů v tkáních. Využívá imunologické vazby (vazba antigenu (Ag) a protilátky (Ab)).

V této práci byla použita metoda nepřímá trojstupňová, jejímž benefitem je zejména její efektivita i v případě nízkého obsahu detekovaného antigenu v tkáni [120–122]. Výsledkem této metody je typicky hnědé zbarvení značící pozitivitu vůči detekovanému antigenu. Tkáně byly pro větší přehlednost dobarveny Hematoxylinem (**obr. 20**). Podrobnosti o použitých protilátkách jsou k nahlédnutí v následujících kapitolách a **P3**.

Skla s řezy umístíme do termostatu (teplota 56 °C) po dobu alespoň 12 hodin. Tímto krokem zajistíme fixaci řezů na sklíčku a zabránění jejich případnému uvolnění. Vzorky odparafinujeme pomocí dvou desetiminutových xylenových lázní. Vzorky zavodníme pomocí pětiminutových lázní v řadě roztoků etanolu se sestupnými koncentracemi (100%, 96%, 70%) a pětiminutové lázni v destilované vodě. Vzorky vaříme v 98°C lázni v citrátovém pufru (pH = 7) nebo DAKO pufru (pH = 9) (**P3**). Následně vzorky chladíme při pokojové teplotě. Skla opláchneme ve fosfátovém pufru (**P3**) třikrát po třech minutách.

Vzorky umístíme do lázně 3% peroxidu vodíku. Opláchneme ve fosfátovém pufru třikrát po třech minutách. Následně aplikujeme blokační sérum (z kitu, **P3**), které naředíme ve fosfátovém pufru v poměru 15:1000, které necháme působit.¹ Na vzorky aplikujeme primární protilátku, kterou ředíme v DAKO diluentu (**P3**). Konkrétní koncentrace protilátky záleží na vlastnostech dané protilátky (viz následující kapitoly). Dále skla inkubujeme přes noc při teplotě 4 °C, opláchneme ve fosfátovém pufru třikrát po třech minutách a aplikujeme na ně sekundární protilátku (proti imunoglobulinům dárce AbI) (z kitu, **P3**), ředěnou ve fosfátovém pufru v poměru 1:200. Inkubujeme po dobu 90 minut. Opláchneme ve fosfátovém pufru třikrát po třech minutách. Aplikujeme ABC komplex (z kitu, **P3**), ředěný ve fosfátovém pufru v poměru 1:1:100 (nachystaný alespoň 30 minut předem). Inkubujeme 30 minut. Opláchneme ve fosfátovém pufru třikrát po třech minutách. Antigen vizualizujeme pomocí DAB substrátu (přípravený smícháním 1 kapky DAB+ Chromogen a 1 ml DAB+ Substrate Buffer) (**P3**). Reakcí ABC komplexu a DAB vznikne hnědé zbarvení. Tuto reakci zastavíme destilovanou vodou. Vzorek následně barvíme Mayerovým Hematoxylinem (**P3**) po dobu 2 minut, oplachujeme pod tekoucí vodou po dobu 10 minut. Vzorky odvodníme v pětiminutových etanolových lázních se vzestupnými koncentracemi (70%, 96%, 100%). Vzorky projasníme ve dvou desetiminutových xylenových lázních a zamontujeme. Výsledkem je hnědé zbarvení struktur pozitivních na detekovaný antigen a modré zbarvení negativních jader (**obr. 17**). Vzorky byly dále analyzovány na světelném mikroskopu (**P3**).

¹ Lázeň v citrátovém pufru či DAKO pufru a inkubace v blokačním séru slouží k odhalení epitopů a efektivnějšímu navázání protilátky na detekovaný antigen a dle vlastností konkrétní protilátky lze jejich délku upravovat. Délky těchto kroků jsou uvedeny v tabulkách u jednotlivých použitých markerů.



Obrázek 17. Výsledek nepřímé trojstupňové IHC metody s využitím avidin-biotinového komplexu. **a)** Struktury pozitivní na detekovaný antigen jsou díky reakci ABC a DAB zbarvena tmavě hnědě. **b)** Antigen-negativní jádra jsou pomocí Hematoxylinu obarvena modře. Sagitální řez mozku, hipokampální oblast, Ammonův roh, region CA3. Detekce markeru PCNA.

Použité markery

2H3 je markerem neurofilament, specifického typu intermediárních filament, které společně s mikrotubuly a mikrofilamenty tvoří cytoskelet buněk nervové tkáně [123]. Je exprimován zejména v axonech neuronů. Změny v jeho expresi jsou spojovány mj. s presumpcí neurodegenerativních onemocnění [124]. V této práci jsme pomocí tohoto markeru detekovali neurofilamenta v mozkové tkáni (**P3**).

Tabulka 1. Podrobné informace o postupu při detekci 2H3-pozitivních struktur.

Pufr	3% H ₂ O ₂	Blokovací sérum	Kit	Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
DAKO 15' + 10'	8'	30'	myší	1:50	přes noc (4 °C)

Beta-III-tubulin (B3T) je protein z rodiny tubulinů specificky exprimovaný v cytoskeletu neuronů. V několika studiích je také jeho pozitiva v tkáních plic a prsu asociována s maligním karcinomem [125–127]. V této práci jsme pomocí beta-III-tubulinu detekovali neurony v tkáni čichového epitelu (**P3**).

Tabulka 2. Podrobné informace o postupu při detekci B3T-pozitivních struktur.

Pufr	3% H ₂ O ₂	Blokovací sérum	Kit	Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
Citrát 15' + 10'	8'	30'	králičí	1:100	přes noc (4 °C)

Cytokeratin je markerem cytokeratinu, proteinu, který je součástí intermediárních filament [128]. Exprimován je výhradně v buňkách epitelu, kde zajišťuje oporu proti mechanickému stresu [129]. Je také používaným diagnostickým nástrojem při klasifikaci karcinomů [130]. V této práci jsme použili cytokeratin pro detekci jeho případného poškození čichového epitelu (**P3**).

Tabulka 3. Podrobné informace o postupu při detekci Cytokeratin-pozitivních struktur.

Pufr	3% H ₂ O ₂	Blokovací sérum	Kit	Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
Citrát 15' + 10'	8'	35'	myší	-	přes noc (4 °C)

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) je protein, jehož hlavní funkcí je replikace DNA [131]. Jeho exprese se během buněčného cyklu mění, významně roste v S-fázi, kdy dochází k replikaci DNA [132,133]. V této práci jsme pomocí protilátky PCNA detekovali proliferující buňky v obou cílových oblastech (**P3**).

Tabulka 4. Podrobné informace o postupu při detekci PCNA-pozitivních struktur.

Pufr	3% H ₂ O ₂	Blokovací sérum	Kit	Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
Citrát 15' + 10'	8'	30'	králičí	1:50	přes noc (4 °C)

4.1.10 Imunofluorescenční analýza

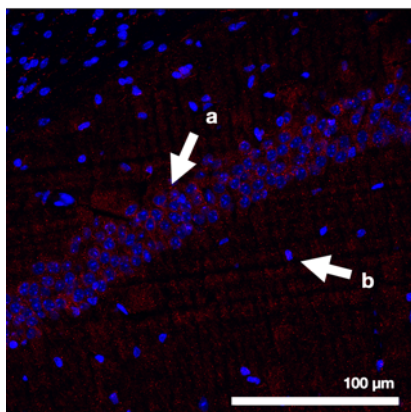
Imunofluorescenční metoda, podobně jako imunohistochemická metoda, využívá vazbu antigenu a protilátky. Existují dva typy imunofluorescenčních metod, a to metoda přímá (primární protilátka je značená fluorescentní značkou) a nepřímá (na primární protilátku se naváže sekundární značená protilátka) [122,134,135]. Pro tuto práci jsme použili nepřímou imunofluorescenční metodu.

Skla s řezy nejprve umístíme do termostatu (teplota 56 °C) po dobu alespoň 12 hodin. Tímto krokem zajistíme fixaci řezů na sklíčku a zabránění jejich případnému uvolnění. Vzorky odparafinujeme pomocí dvou desetiminutových xylenových lázní. Vzorky zavodníme pomocí pětiminutových lázní v řadě roztoků etanolu se sestupnými koncentracemi (100 %, 96 %, 70 %) a pětiminutové lázni v destilované vodě. Vzorky vaříme v 98°C lázni v citrátovém pufru (**P3**). Následně vzorky chladíme při pokojové teplotě. Opláchneme je ve fosfátovém pufru (**P3**) třikrát po třech minutách. Dále na ně aplikujeme blokační sérum (z kitu, **P3**), které naředíme ve fosfátovém pufru v poměru 15:1000.²

Na vzorky aplikujeme primární protilátku, již ředíme v DAKO diluentu (**P3**). Konkrétní koncentrace záleží na vlastnostech dané protilátky (následující kapitoly). Skla inkubujeme přes noc při teplotě 4 °C a pak opláchneme ve fosfátovém pufru třikrát po třech minutách. Aplikujeme sekundární protilátku (proti imunoglobulinům dárce AbI) (**P3**), ředěnou

² Lázeň v citrátovém pufru a inkubace v blokačním séru slouží k odhalení epitopů a efektivnějšímu navázání protilátky na detekovaný antigen a dle vlastností konkrétní protilátky lze jejich délku upravovat. Délky těchto kroků jsou uvedeny v tabulkách u jednotlivých použitých markerů.

ve fosfátovém pufru v poměru 1:200 a sklo inkubujeme po dobu 90 minut, přičemž pracujeme v prostředí s absencí světla. Následně sklo opláchneme ve fosfátovém pufru třikrát po třech minutách. Zamontujeme montovacím médiem s DAPI (**P3**) nebo inkubujeme s DRAQ5 (**P3**) po dobu 5 minut a poté zamontujeme médiem pro fluorescenci bez obsahu DAPI (**P3**). Výsledkem je rozdílná pozitivita na různé vlnové délky světla antigen-positivních a antigen-negativních oblastí (**obr. 18**). Obarvené vzorky byly dále analyzovány na konfokálním mikroskopu (**P3**).



Obrázek 18. Výsledek nepřímé IF metody. a) Struktury pozitivní na detekovaný antigen jsou vizualizovány červeně. b) Jádra jsou pomocí DAPI obarvena modře. Sagitální řez mozku, hipokampální oblast, Ammonův roh, region CA1. Detekován marker ACTB.

Použité markery

Beta-aktin (ACTB) je jednou z forem aktinu vyskytující se v buňkách, je hlavní složkou mikrofilament, složky cytoskeletu. Tento protein a jeho kódující gen se často využívají jako tzv. „house-keeping“ protein/gen [128,136,137] (**P3**).

Tabulka 5. Podrobné informace o postupu při detekci Aktin-positivních struktur v tkáních.

Pufr	Blokovací sérum	Kit	Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
Citrát 25' + 15'	35'	králičí	1:100	přes noc (4 °C)

4.1.11 Analýza genové exprese

Z jednotlivých oblastí mozku byla nejprve izolována mediátorová ribonukleová kyselina (mRNA), která byla následně přepsána do komplementární deoxyribonukleové kyseliny (cDNA). Dále jsme pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) kvantifikovali expresi vybraných genů.

Izolace messengerové RNA

Ke vzorkům jednotlivých částí o hmotnosti maximálně 10 mg přidáme 300 μ l roztoku RLT pufru (**P3**) a beta-mercaptoethanolu v poměru 99:1. Vzorky nejprve mechanicky homogenizujeme a pak je umístíme zpět do -80 °C alespoň na dobu 12 hodin.

Přípravený vzorek z -80 °C opět mechanicky homogenizujeme. Ke vzorku přidáme 300 μ l 70% EtOH, v centrifuze stáčíme po dobu 15 s při 11 000 otáčkách za minutu (rpm).

Supernatant přeneseme na kolonku a centrifugujeme 15 s při 11 000 rpm. Obsah sběrné zkumavky vylijeme. Ke vzorku přidáme 700 µl RW1 pufru (**P3**) a centrifugujeme 15 s při 11 000 rpm. Obsah sběrné zkumavky vylijeme. Ke vzorku přidáme 300 µl RW1 pufru a centrifugujeme 15 s při 11 000 rpm. Obsah sběrné zkumavky vylijeme. Ke vzorku přidáme 500 µl RPE pufru (**P3**) a centrifugujeme 15 s při 11 000 rpm. Obsah sběrné zkumavky vylijeme. Krok 8 jednou zopakujeme. Ke vzorku přidáme 500 µl RPE pufru a centrifugujeme 2 minuty při 11 000 rpm. Vyměníme sběrnou zkumavku. Centrifugujeme 60 s při 14 000 rpm. Ke vzorku přidáme 25 µl DEPC vody a centrifugujeme 15 s při 10 000 rpm. Kolonku následně vyhodíme. Koncentraci vyizolované mRNA změříme na spektrofotometru (**P3**). Vzorky uchovááme při teplotě -80 °C.

Reverzní transkripce

Dle následujícího vzorce vypočítáme složení reakční směsi pro každý vzorek:

$$x \text{ µl RNA (500 ng/ml)} + 10 \text{ µl Master Mixu (P3)} + y \text{ µl DEPC H}_2\text{O} = 20 \text{ µl}$$

Zkumavku s připravenou směsí umístíme do Thermocycleru (**P3**). Vzorky inkubujeme 60 minut při teplotě 42 °C. Koncentraci přeepsané cDNA změříme na spektrofotometru. Vzorky uchovááme při teplotě -20 °C. Vzorky naředíme na koncentraci 150 ng/µl a můžeme použít pro qPCR.

qPCR

Díky kvantitativní polymerázové řetězové reakci (qPCR) můžeme určit výsledné množství polymerázové řetězové reakce (PCR). Využití specifických primerů (v této práci využita metoda TaqMan) umožňuje kvantifikovat a porovnat expresi testovaných genů, jejichž expresi normalizujeme k housekeeping genu [138–140], kterým byl pro tuto práci *Gapdh*. Expresi vybraných genů stanovujeme pomocí technických triplikátů. Dle následujícího vzorce pro výpočet reakční směsi nachystáme obsah každého triplikátu:

$$5 \text{ µl Master Mix (P3)} + 0,5 \text{ µl TaqMan (P3)} + 0,5 \text{ µl cDNA} + 4 \text{ µl DEPC H}_2\text{O}$$

Každý triplikát napipetujeme na 96jamkovou destičku, kterou pro zabránění výparu přikryjeme fólií. Takto připravenou destičku umístíme do LightCycleru (P3). Nejprve probíhá 10 minut preinkubační amplifikace při teplotě 95 °C. Následně probíhá 50 cyklů, při kterých probíhá amplifikace. Každý takový cyklus se skládá z 15 s při 95 °C (denaturace) a následně 60 s při 60/62 °C (nasednutí primerů a syntéza cDNA). Výsledky vyhodnocujeme pomocí metody DDCT (**P1**).

Testované geny použité pro analýzu genové exprese

Akt1 (Ak – linie myši laboratorní AKR, t – „thymoma“) kóduje protein, serinovou/threoninovou kinázu, která je členem Akt rodiny. Tento protein je zapojen do mnoha významných metabolických procesů v buňce, mj. reaguje na růstové faktory a podílí se na regulaci apoptózy. Je součástí PI3K/Akt/mTOR signální dráhy [141,142] **(P3)**.

Cdc42 (Cell Division Cycle 42) kóduje protein, jenž je členem Rho/Rac rodiny malých GTPáz, které jsou důležitými regulátory aktinového cytoskeletu. Tento protein úzce souvisí s buněčnou migrací probíhající pomocí filopodií, na jejichž prodlužování se podílí, mj. je důležitým hráčem při determinaci směru migrace buňky [143–146] **(P3)**.

Gapdh (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza) je klíčovým enzymem glykolýzy, je ovšem součástí mnoha dalších buněčných procesů včetně regulace cytoskeletu, apoptózy, replikace DNA, transkripce a translace [147] **(P3)**.

Mtor (Mammalian Target of Rapamycin) kóduje serinovou/threoninovou kinázu, která je členem PI3K rodiny. V eukaryotických buňkách je součástí dvou komplexů, mTORC1 a mTORC2, je úzce propojen se signálními dráhami PI3K/Akt/mTOR a Ras-ERK. Hraje důležitou roli při růstu, proliferační aktivitě a udržování homeostázy [148,149] **(P3)**.

Pi3kr1 (fosfatidylinositol-3-kináza) je lipidová kináza, které je mj. součástí významné signální dráhy PI3K/Akt/mTOR. Třída těchto molekul je zodpovědná např. za proliferační aktivitu, supresi apoptózy nebo adhezi, souvisí také s karcinogenezí [109,150] **(P3)**.

Pten (homolog fosfatázy a tenzinu) kóduje tumor-supresorový protein. Je zapojen do signální dráhy PI3K/Akt/mTOR, kde je antagonistou signálu pro proliferaci a přežití buňky. Jeho deregulace je asociována s rozvojem karcinogenních onemocnění [109,151,152] **(P3)**.

Mapt (*Mapt* – Microtubule-Associated Protein Tau) je gen, který kóduje protein TAU (MAPT), stabilizátor mikrotubulů, související s rozvojem neurodegenerativních onemocnění [97,107–109,153,154] **(P3)**.

Tsc1 (Tuberculosis Sclerosis Complex 1) je gen kódující protein, který reguluje aktivaci rodiny Rho malých GTPáz, jež jsou mj. zodpovědné za regulaci aktinového cytoskeletu při buněčné migraci. Tsc1 je také součástí signální dráhy PI3K/Akt/mTOR, kde přímo inhibuje mTOR [109,155,156] **(P3)**.

4.1.12 Kvantitativní analýza exprese proteinů

Vzorky byly odebrány lyzačního RIPA pufru (**P3**), proběhla izolace a kvantifikace proteinů. Následně byly proteiny obsažené ve vzorku pomocí SDS-PAGE elektroforézy (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS) rozřazeny na základě jejich pohyblivosti v elektroforetickém prostředí dle jejich velikosti, poté pomocí blotování převedeny z polyakrylamidového gelu na membránu. Nakonec jsou vybrané proteiny na membráně pomocí navázání primární a sekundární, značené, protilátky vizualizovány [157–159].

Množství testovaných proteinů je normalizováno pomocí housekeeping proteinu, obvykle Aktin nebo jiný cytoskeletální protein, nicméně vzhledem k pozorované remodelaci cytoskeletu v mozkové tkáni jsme výsledky nenormalizovali k housekeeping genu, pouze jsme analyzovali stejné absolutní množství proteinu (**P1**).

Izolace proteinů

5 mg tkáně odebereme do 300 μ l vychlazeného RIPA pufru s 1% inhibitory proteáz a fosfatáz (**P3**), mechanicky rozdrtíme pomocí homogenizačních tyčinek, ultrazvuku a vortexu. Následně vzorky po dobu 30 minut uchováváme na ledu a každých 10 minut vortexujeme. Nakonec vzorky stočíme 15 minut při 13 500 rpm a 4 °C. Do nových zkumavek odebereme supernatant a koncentraci vyizolovaných proteinů určíme pomocí metody BCA Assay. Supernatant uchováváme při teplotě -80 °C.

BCA Assay a příprava vzorků pro SDS-PAGE

BCA Assay umožňuje kvantifikaci proteinů pomocí navázání Cu^{2+} iontů na proteiny a související změny zabarvení vzorku. Toto zabarvení je následně se zabarvením koncentrační řady (roztok BCA, látky schopné tvořit komplex s Cu^{2+} ionty), ze které je vytvořena kalibrační křivka.

5 μ l vzorku proteinu a 5 μ l BCA standardů koncentrační řady (1 μ g/ml, 0.75 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 0.25 μ g/ml, 0.125 μ g/ml, 0.0625 μ g/ml, 0,03125 μ g/ml, 0,015625 μ g/ml a 0,0078125 μ g/ml; naředěné v RIPA pufru) napipetujeme do 96-jamkové destičky v technických triplicátech. Ke vzorkům přidáme 100 μ l reakčního roztoku (kyselina bicinchoniniová : $\text{CuSO}_4 = 50 : 1$). Destičku inkubujeme 30 minut při teplotě 37 °C, následně měříme absorbanci při hodnotě 562 nm.

Z naměřených hodnot standardů vytvoříme kalibrační křivku, následně vypočítáme koncentrace našich vzorků. V případě, že hodnoty vzorků nejsou v rámci křivky, BCA Assay opakujeme s naředěnými vzorky. Dále přepočítáme finální objem vzorku pro SDS-PAGE dle následujícího vzorce:

$$x \mu\text{l proteinu (5 } \mu\text{g proteinu)} + y \mu\text{l H}_2\text{O} + 5 \mu\text{l 4X Laemmli pufru (P3)} = 20 \mu\text{l}$$

Takto připravené vzorky vaříme 10 minut při teplotě 97 °C pro denaturaci proteinů, následně centrifugujeme a uchováváme při teplotě -80 °C.

SDS-PAGE

Den předem připravíme polyakrylamidové gely pro elektroforézu (**P3**), ze kterých sejmeme plastový hřebínek a skla opláchneme. Gel umístíme do držátek elektroforetické vany a zalijeme ELFO pufrem (**P3**) po naplnění. Do jamek gelu napipetujeme 5 µl standardu (**P3**) a 20 µl zředěných vzorků. Elektroforéza probíhá 40 minut při konstantním napětí 90 V, po přejití vzorků ze zaostřovací části gelu do separační části zvýšíme napětí na 120 V. Elektroforézu ukončíme v okamžiku, kdy jsou nejmenší proteiny v dolní části gelu.

Western Blot

Gel s rozdělenými proteiny vyjmeme z elektroforetické vany a vložíme na 10 minut do blotovacího pufru (**P3**). Připravíme si PVDF membránu, kterou 1 minutu aktivujeme v methanolu, promyjeme destilovanou vodou a umístíme do blotovacího pufru.

Elektroforetickou vanu s blotovacím pufrem umístíme do nádoby s ledem a z gelu, membrány, blotovacího papíru a houbiček sestavíme „sandwich“ do plastového držáku (v pořadí: houbička – blotovací papír – gel – membrána – blotovací papír – houbička) tak, aby gel s negativně nabitými proteiny byl v elektroforetické vaně u anody a membrána u katody. Vanu doplníme blotovacím pufrem, blotování probíhá 70 minut při proudu 400 mA.

Imunodetekce

Po skončení blotování vyjmeme membránu, kterou blokuje v 5% mléku (**P3**) po dobu 45 minut. Následuje inkubace s primární protilátkou (u jednotlivých markerů). Po skončení inkubace promýváme v promývacím pufru (**P3**) třikrát 10 minut. Poté inkubujeme se sekundární protilátkou (konjugovanou s avidin-peroxidázou) v koncentraci 1:2000 po dobu 2 hodin a opět opláchneme v promývacím pufru třikrát po 10 minutách. Nakonec vyvoláme aplikací směsi roztoků z kitu Amersham v poměru 1:1 a fotografii pořídíme v Azure Western Blot Imaging System (**P3**) a dále kvantifikujeme v softwaru Fiji (**P3**).

Použité markery

2H3 je markerem středních neurofilament [123], v této práci bylo také analyzováno jeho absolutní množství (**P3**).

Tabulka 6. Podrobné informace o postupu při detekci proteinů **2H3** pomocí protilátky.

Kit	Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
králíčí	1:1000	přes noc (4 °C)

Aktin byl analyzován jako potenciální housekeeping protein, nicméně kvůli pozorované remodelaci aktinového cytoskeletu po inhalaci PbNPs nebyl použit [147] (**P2**, **P3**).

Tabulka 7. Podrobné informace o postupu při detekci proteinů Aktin pomocí protilátky.

Kit	Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
králičí	1:1000	přes noc (4 °C)

mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) kóduje serinovou/threoninovou kinázu, která je členem PI3K rodiny [148,149] (**P3**).

Tabulka 8. Podrobné informace o postupu při detekci proteinů mTOR pomocí protilátky.

Kit	Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
králičí	1:1000	přes noc (4 °C)

p-TAU (fosforylovaný TAU) je protein, který mj. souvisí s rozvojem neurodegenerativních onemocnění [97,107–109,153,154] (**P3**).

Tabulka 9. Podrobné informace o postupu při detekci proteinů p-TAU pomocí protilátky.

Kit	Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
králičí	1:1000	přes noc (4 °C)

t-TAU (celkový TAU) je protein, který mj. souvisí s rozvojem neurodegenerativních onemocnění [97,107–109,153,154] (**P3**).

Tabulka 10. Podrobné informace o postupu při detekci proteinů t-TAU pomocí protilátky.

Kit	Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
myší	1:1000	přes noc (4 °C)

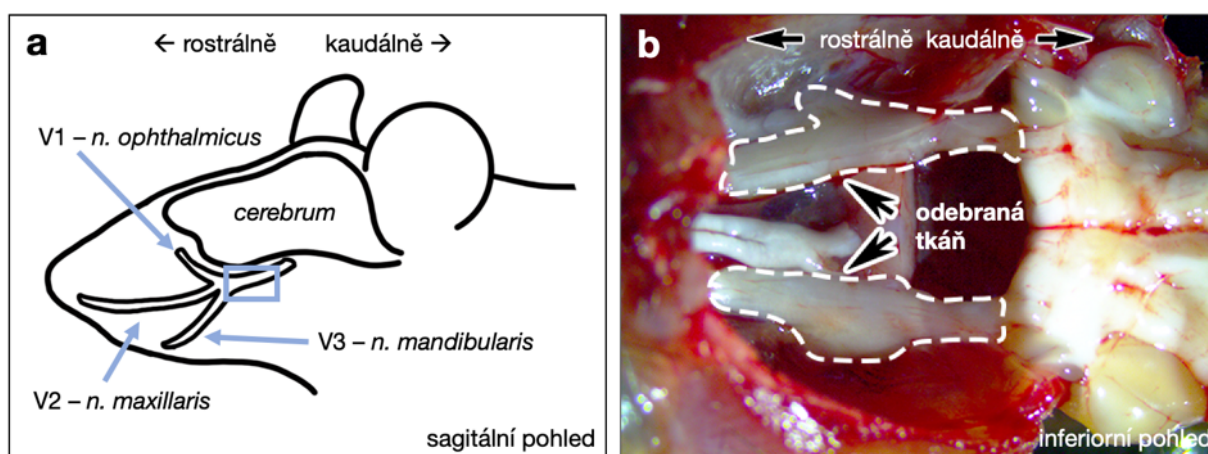
4.2 Experiment *in vitro*

Pro verifikaci výsledků z *in vivo* experimentu a potvrzení přímého efektu PbNPs na nervovou tkáň byl proveden také experiment v *in vitro* podmínkách.

4.2.1 Primární buněčné kultury trigeminálních ganglií

Trigeminální ganglia (TGs) (**obr. 19a**) jsou největší somatosensorická ganglia v orofaciální oblasti a nachází se v průběhu trojklaného nervu (V. hlavový nerv). Zpracovávají podněty zejména z anteriorní části hlavy. Vzhledem k jejich unikátním vlastnostem jsou studovanou strukturou ve výzkumech zabývajících se bolestmi v oblasti hlavy a obličeje. Z TGs vystupují anteriorně a inferiorně tři větve: nerv oční (*nervus ophthalmicus*) (V1), nerv maxilární (*nervus maxillaris*) (V2), nerv mandibulární (*nervus mandibularis*) (V3) [95,160–163].

Primární buněčná kultura trigeminálních ganglií (**obr. 19b**) byla vytvořena z odebraných TGs myši laboratorní (linie A13, fenotyp WT) dle [164]. Jedinci byli usmrceni pomocí cervikální dislokace v souladu s projektem pokusů a zákona 214/2011 dle vyhlášky č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat. Po odstranění kůže a superiorní části lebky byl odhalen mozek. Byl proveden koronární řez mezi čichovým bulbem a zbytkem mozkové tkáně, která byla následně zvednuta pro odhalení očních nervů. Oční nervy byly extrahovány a TGs nacházející se v bázi lebeční byla odhalena. Po přerýznutí nervů, kterými jsou TGs připojena do nervového systému (trojklanný, oční, maxilární a mandibulární nerv) a odstranění přebytečných okolních struktur byla TGs dále zpracována. Pro buněčné kultury byla použita obě ganglia z každého jedince.



Obrázek 19. Trigeminální ganglia – extrakce pro přípravu primárních buněčných kultur. a) Trigeminální ganglia (poloha přibližně v modrém obdélníčku) se nachází v průběhu V. hlavového nervu. Vybíhají z nich tři větve (V1, V2, V3): oční, maxilární a mandibulární. b) Extrakce trigeminálních ganglií (označena šipkami v bílém obdélníčku) byla provedena dle [164]. Po provedení rostrálního řezu mezi čichovým bulbem a posteriovní částí mozku a přerýznutí očního nervu dojde k odhalení TGs.

Po extrakci byla TGs byla umístěna do kultivačního média (**P3**) s obsahem kolagenázy I (1,00 mg/ml) po dobu 5-7 hodin, každou hodinu bylo médium s buňkami promícháno. Následně

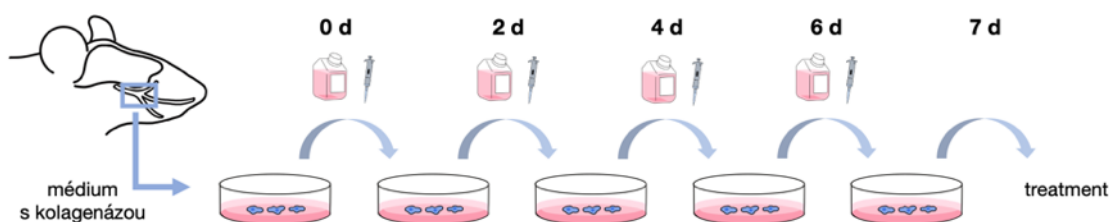
bylo médium s TGs odebráno, Petriho miska byla promyta médiem bez obsahu kolagenázy o stejném objemu, jako mělo médium s kolagenázou, a následovala centrifugace po dobu 5 minut na 1500 rpm. Po odsání média byl k suspenzi přidán 1 ml nového média. Následovala filtrace přes 40 µm nylonový filtr, filtr byl poté promyt 1 ml média. Suspenze o celkovém objemu 2 ml byla promíchána a pomocí Bürkeho komůrky byla stanovena koncentrace buněk.

Kvantifikace buněk v Bürkeho komůrce

Do Bürkeho komůrky bylo umístěno 10 µl buněčné suspenze. Bylo kvantifikováno 10 čtverců, každý o objemu 0,000004 ml. Koncentrace buněk v 1 ml suspenze byla určena vynásobením průměrného počtu buněk v jednom čtverci 250 000. Následně byla suspenze naředěna dle potřeby a uchovávána v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂.

Po 48, 96 a 144 hodinách od začátku kultivací bylo vyměněno kultivační médium. Po 168 hodinách od začátku kultivací byly kultury použity pro experimenty (**obr. 20**). V rámci experimentů byly buňky vysazovány do 8jamkových Ibidi treatment destiček a obyčejných 12jamkových, 24jamkových a 96jamkových, destiček.

- 96jamkové destičky byly použity pro MTT Assay stanovující metabolickou aktivitu buněk a míru jejich přežití při různých koncentracích cPbONPs. Buňky byly vysazovány v objemu 100 µl a v koncentraci 300 000 buněk/ml.
- Do 6jamkových, 12jamkových, 24jamkových destiček a Ibidi treat destiček byly buňky vysazovány v koncentraci 600 000 buněk/ml (vybrána po předchozím testování koncentrací 300 000, 600 000, 700 000, 800 000 a 900 000 buněk/ml). Vzorky byly použity pro analýzu relativní genové exprese, kvantitativní analýzu proteinové exprese a imunofluorescenční metody.



Obrázek 20. Příprava primární buněčné kultury trigeminálních ganglií. Po odběru trigeminálních ganglií a jejich rozmělnění v médiu s kolagenázou byly buňky kvantifikovány a v běžném kultivačním médiu vysazeny na kultivační destičky. Výměna média proběhla 2, 4 a 6 dní od nasazení, 7. den byly buňky použity pro experimenty.

4.2.2 Komerčně dostupné nanočástice olova

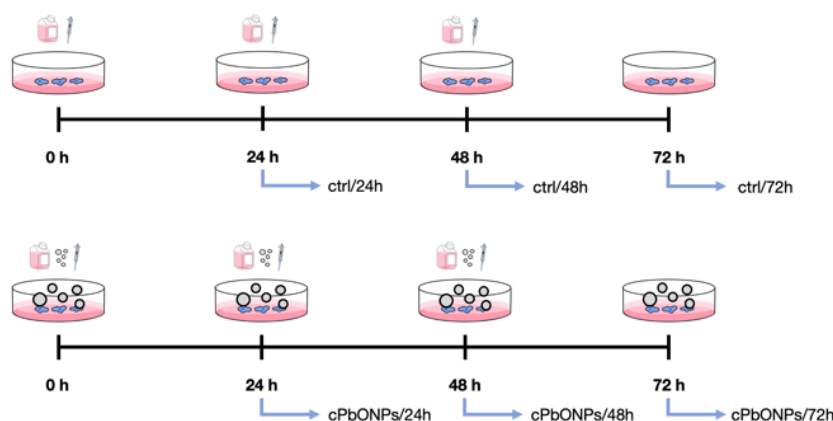
Pro *in vitro* experimenty byly také použity syntetické nanočástice oxidu olovnatého (cPbONPs) (komerčně dostupné – NANOCHEMAZONE Inc). Konečná koncentrace byla po testování různých koncentrací a zhodnocení buněčné metabolické aktivity pomocí MTT Assaye stanovena na 1,00 µg/ml média (**P1**).

4.2.3 Experimentální design

In vitro experiment probíhal po dobu 24, 48 a 72 hodin, každý z experimentů byl zopakován třikrát. Po 168 hodinách od vysazení buněčných kultur bylo médium vyměněno za médium s obsahem syntetických nanočástic. Ke každému vzorku s cPbONPs byl vytvořen kontrolní vzorek, ke kterému bylo přidáváno médium bez obsahu cPbONPs.

Nejprve bylo provedeno testování různých koncentrací cPbONPs. Testovali jsme koncentrace 0,25 µg/ml, 0,50 µg/ml, 1,00 µg/ml, 5,00 µg/ml a 10,00 µg/ml média, kterým byly buněčné kultury v 96jamkové destičce o koncentraci 300 000 buněk/ml v objemu 100 µl v technických triplikátech vystaveny po dobu 24, 48 a 72 hodin. Následně byla provedena MTT Assay pro zhodnocení buněčné metabolické aktivity a určení toxických koncentrací. Finální koncentrací pro experiment cPbONPs byla zvolena koncentrace 1,00 µg/ml. Pro podrobnější pochopení mechanismů interakcí PbNPs s nervovou tkání a srovnání výsledků s *in vivo* experimentem bylo navrženo několik experimentů (**obr. 21**):

- V rámci 24hodinového experimentu bylo ke vzorkům přidáno **ctrl/24h** běžné kultivační médium, ke vzorků **cPbONPs/24h** bylo přidáno médium s obsahem cPbONPs. Po 24 hodinách byly vzorky odebrány a zpracovány pro další analýzy.
- V rámci 48hodinového experimentu bylo ke vzorkům **ctrl/48h** přidáno běžné kultivační médium, které bylo po 24 hodinách vyměněno. Ke vzorků **cPbONPs/48h** bylo přidáno médium s obsahem cPbONPs, jenž bylo po 24 hodinách vyměněno. Po 48 hodinách byly všechny vzorky odebrány a zpracovány pro další analýzy.
- V rámci 72hodinového experimentu bylo ke vzorkům **ctrl/72h** běžné kultivační médium, které bylo vyměněno po 24 a 48 hodinách. Ke vzorkům **cPbONPs/72h** bylo přidáno médium s obsahem cPbONPs, které bylo znovu vyměněno po 24 a 48 hodinách. Po 72 hodinách byly všechny vzorky odebrány a zpracovány pro další analýzy.



Obrázek 21. Experimentální design *in vitro* experimentu. Kultury TGs byly cPbONPs exponovány po dobu 24, 48 a 72 hodin. K exponovaným skupinám byly použity kontrolní skupiny, ke kterým bylo přidáváno médium bez přidaných cPbONPs.

4.2.4 MTT Assay

Z 96jamkové destičky s buňkami v médiu o různých koncentracích cPbONPs (0,25 µg/ml, 0,50 µg/ml, 1,00 µl/ml, 5,00 µl/ml a 10,00 µl/ml), odebereme médium. Do každé jamky přidáme 50 µl kultivačního média bez FBS a 50 µl MTT Reagent (z kitu, **P3**). Protože kultivační médium obsahuje FBS, které může ovlivňovat měření, do pěti prázdných jamek přidáme 50 µl kultivačního média a 50 µl MTT Reagent. Destičku inkubujeme ve fólii 3,5 hodiny při 37 °C a 5% CO₂. Po skončení inkubace z jamek se vzorky odsajeme reagentie a přidáme 150 µl MTT Solvent (z kitu, **P3**), opět zabalíme do fólie a 15 minut mícháme na orbitální třepače.

Destičku vložíme do fotospektrometru (**P3**) a měříme při vlnové délce 590 nm. Od všech výsledků odečteme průměrnou hodnotu z jamek média se sérem a z hodnot technických triplicátů (či tetraplikátů nebo pentaplikátů) jednotlivých koncentrací cPbONPs spočítáme aritmetický průměr. Hodnota kontrolní skupiny odpovídá 100 %, podle této skupiny vypočítáme hodnoty ostatních vzorků. Jako toxickou považujeme takovou koncentraci, kdy je vypočítaná hodnota statisticky významně nižší než u kontrolní skupiny (vyhodnocení pomocí Studentova t-testu – **kap. 4.3**)

4.2.5 Odběr a fixace vzorků

Po uplynutí 24, 48 a 72 hodin bylo z jamek s buněčnými kulturami odebráno médium a kultury byly dvakrát opláchnuty ve fosfátovém pufru. Poté byly vzorky odebrány několika způsoby, dle charakteru následných analýz:

- Vzorky určené pro IF analýzy byly po dobu 10 minut fixovány v 4% PFA, následně opláchnuty a ponechány ve fosfátovém pufru, obalené v parafilmu pro zabránění výparu, při teplotě 4 °C.
- Vzorky určené pro analýzu genové exprese byly odebrány do 300 µl RLT pufru (**P3**) a skladovány při teplotě -80 °C.
- Vzorky určené pro izolaci proteinů a následnou kvantitativní analýzu exprese proteinů byly odebrány pomocí 2,5% trypsinu, promyty v PBS pufru, pelet byl uchováván při teplotě -80 °C.

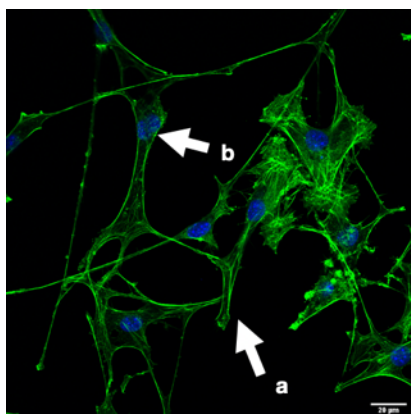
4.2.6 Imunocytochemická analýza

Imunocytochemická analýza (ICC) funguje na podobném principu jako IHC a IF metody, tj. na imunologické vazbě antigenu a protilátky [122,134,135]. Pro tuto práci jsme použili přímou i nepřímou imunocytochemickou metodu s využitím fluorescentně značených protilátek.

Z jamek bylo odsáto PBS, 45 minut promýváme v PBTA (**P3**). Následně vzorky inkubujeme s primárními protilátkami vybraných markerů ředěných v PBTA (koncentrace a doba inkubace jsou uvedeny v tabulkách s informacemi o jednotlivých markerech). Po inkubaci vzorky dvakrát promyjeme v PBS a vzorky inkubujeme 1 hodinu se sekundárními

protilátkami v koncentraci 1:200 (z kitu, **P3**) a v případě potřeby s primární značenou protilátkou Phalloidin v koncentraci 1:100.

Vzorky opět dvakrát promyjeme v PBS a přidáme DRAQ5 pro vizualizaci jader (**P3**). Nakonec vzorky promyjeme v PBS, uchovááme v PBS a obalené v parafilmu pro zabránění výparu. Výsledkem je rozdílná pozitivita na různé vlnové délky světla antigen-positivních a antigen-negativních oblastí (**obr. 22**). Obarvené vzorky byly dále analyzovány na konfokálním a fluorescenčním mikroskopu (**P3**).



Obrázek 22. Výsledek imunocytochemické metody. a) Struktury pozitivní na detekovaný antigen jsou vizualizovány zeleně. b) Jádra jsou obarvena pomocí DRAQ5 modře.

Použité markery

Aktin je významnou složkou mikrofilament [128,136,137] (**P3**).

Tabulka 11. Podrobné informace o postupu při detekci Aktin-positivních struktur v buněčných kulturách.

Kit	Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
králičí	1:100	3 h

Phalloidin je molekula, která se specificky váže na fibrilární aktin (F-actin) [165]. F-actin je mj. regulován proteiny z Rho/Rac rodiny včetně Cdc42 [166]. Protilátka Phalloidin je primární značenou protilátkou (**P3**).

Tabulka 12. Podrobné informace o postupu při detekci Phalloidin-positivních struktur v buněčných kulturách.

Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
1:100	2 h

NEUROD1 (Neurogenic Differentiation 1) je transkripční faktor z rodiny NEUROD. V mozkové tkáni je NEUROD1 markerem neuronů, má také schopnost konvertovat gliové buňky na neurony [167,168]. V této práci byla protilátka NEUROD1 použita pro charakterizaci primárních buněčných kultur TGs (**P3**).

Tabulka 13. Podrobné informace o postupu při detekci NeuroD1-pozitivních struktur v buněčných kulturách.

Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
1:100	přes noc (4 °C)

Neuropilin1 je transmembránový protein, který hraje důležitou úlohu při vývoji CNS a kardiovaskulárních struktur [169]. V této práci byla protilátka NEUROD1 použita pro charakterizaci primárních buněčných kultur TGs (**P3**).

Tabulka 14. Podrobné informace o postupu při detekci Neuropilin1-pozitivních struktur v buněčných kulturách.

Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
1:100	přes noc (4 °C)

p-TAU (fosforylovaný TAU) je exprimován zejména v neuronech, kde zajišťuje stabilizaci mikrotubulů, a tím se podílí na transportu molekul do axonového výběžku. Jeho hyperfosforylace je asociována s rozvojem Alzheimerovy choroby [97,107–109,153,154,170] (**P3**).

Tabulka 15. Podrobné informace o postupu při detekci p-TAU-pozitivních struktur v buněčných kulturách.

Kit	Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
králičí	1:100	3 h

t-TAU (celkový TAU) je protein, který mj. souvisí s rozvojem neurodegenerativních onemocnění [97,107–109,153,154] (**P3**).

Tabulka 16. Podrobné informace o postupu při detekci t-TAU-pozitivních struktur v buněčných kulturách.

Kit	Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
myší	1:100	3 h

4.2.7 Analýza genové exprese

Analýza genové exprese buněčných kultur byla provedena obdobným způsobem jako analýza vzorků mozkové tkáně. Nejprve byla vyizolována mRNA, která byla přepsána do stabilnější cDNA. Následně jsme kvantifikovali expresi vybraných genů pomocí metody qPCR, jako housekeeping gen byl použit *Gapdh*.

Testované geny: *Cdc42*, *Pi3kr1*, *Mapt*, *Mtor* (P3)

4.2.8 Kvantitativní analýza exprese proteinů

Kvantitativní analýza exprese proteinů byla provedena obdobným způsobem jako v případě tkání. Nejprve proběhla izolace proteinů a kvantifikace pomocí metody BCA Assay, proteiny byly následně separovány podle velikosti pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Poté byly proteiny přebíleny na PVDF membránu a následně inkubovány s primární a sekundární protilátkou. Nakonec proteiny vizualizujeme.

Testované proteiny: Aktin, p-TAU (stejně podmínky jako v případě analýz mozku) (P3)

4.3 Statistické hodnocení dat

Výsledky analýz byly statisticky hodnoceny pomocí Studentova nepárového t-testu. V rámci *in vivo* experimentu byly všechny exponované skupiny porovnávány s kontrolní skupinou a 11w skupiny s příslušnou skupinou s eliminačním obdobím. Signifikantní P-hodnota byla stanovena na $p < 0,05$ (*), dále ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ a **** $p < 0,0001$. Signifikance mezi 11w a skupinou s eliminačním obdobím je značena pomocí černých teček.

Sloupce v grafech znázorňují průměrnou hodnotu (AVG), variabilita mezi jedinci/vzorky je znázorněna pomocí chybové úsečky, jejíž hodnota odpovídá střední chybě průměru (SEM). Při statistickém hodnocení byli jedinci/vzorky s extrémní odchylkou od průměrné hodnoty vyloučeni (**P1**).

5 VÝSLEDKY

Inhalační experiment s využitím myši laboratorní jako modelového organismu probíhal po dobu 6 a 11 týdnů. Jedinci byli umístěni do inhalačních komor simulující běžné podmínky. Bylo vytvořeno 8 experimentálních skupin: skupiny ctr/6w a ctr/11w po celou dobu inhalovaly vzduch bez příměsi generovaných PbNPs, skupiny PbONPs/6w a PbONPs/11w po celou dobu inhalovaly generované PbONPs, skupiny Pb(NO₃)₂NPs/6w a Pb(NO₃)₂NPs/11w po celou dobu inhalovaly generované Pb(NO₃)₂NPs. Do studie byly zařazeny také dvě skupiny s eliminačním obdobím (PbONPs/CL a Pb(NO₃)₂NPs/CL), které nejprve 6 týdnů inhalovaly generované PbNPs a poté 5 týdnů vzduch bez příměsi generovaných PbNPs. Cílovými strukturami pro tuto práci byl čichový epitel a mozek, protože dle první analýzy z Ústavu histologie a embryologie, LF MUNI předpokládáme, že PbNPs se do mozku mohou dostat mj. také přes čichový nerv. Po histopatologické analýze vzorků z obou časových bodů jsme se zaměřili na jedenáctitýdenní experiment, na kterém jsme provedli podrobnější analýzy.

Po provedení histopatologické analýzy čichového epitelu (**kap. 5.1.1**) nás také zajímala efektivita reparativních procesů v této oblasti (**kap. 5.1.2**). Po analýze hmotnosti mozku (**kap. 5.2.1**) a provedení histopatologické analýzy mozkové tkáně (**kap. 5.2.2, 5.2.3, 5.2.4**) byly vybrány oblasti pro podrobnější analýzy. Zaměřili jsme na potenciální změny v regulaci a modulaci cytoskeletu a asociované signalizace (**kap. 5.3**).

Pro verifikaci výsledků, prokázání přímého efektu PbNPs na buňky nervové tkáně a popsání mechanismu poškození cytoskeletu jsme do práce zařadili také *in vitro* experimenty. Trigeminální ganglia myši laboratorní byla kultivována po dobu 24, 48 a 72 hodin v přítomnosti cPbONPs. Po charakterizaci a provedení analýzy cytotoxicity jsme podrobněji analyzovali vybrané složky cytoskeletu a jeho regulátory (**kap. 5.4**).

5.1 Signifikantní poškození čichového epitelu nastává po jedenácti týdnech inhalace PbNPs

5.1.1 Na povrchu čichového epitelu se po 11 týdnech inhalace PbNPs vyskytují vysoké vrstvy sekretu

Nejprve byla provedena histopatologická analýza čichového epitelu na řezech obarvených Hematoxylinem-Eosinem. Čichový epitel jedinců z kontrolní skupiny (**obr. 23a, S1**) byl bez známek poškození, volně průchozí, bez zahlnění, hemoragií a nekrózy. Po šestitýdenní inhalaci generovaných PbONPs jsme v čichovém epitelu jedinců ze skupin PbONPs/6w (**obr. 23a, S2**) i Pb(NO₃)₂NPs/6w (**obr. S3**) našli pouze ojedinělé morfologické změny, např. zvýšenou vrstvu sekretu, ve kterém se sporadicky nacházely odumřelé buňky.

Histopatologickou analýzu jsme provedli také v rámci jedenáctitýdenního experimentu. Čichový epitel jedinců z kontrolní skupiny (**obr. S4**) byl podobný jako v případě kontrolní skupiny v šestitýdenním experimentu; tj. bez zahlnění, odumřelých buněk a viditelného poškození. Až jedenáctitýdenní inhalace PbONPs způsobila závažné poškození čichového epitelu (**obr. 23a, S5**). Na řezech jsme pozorovali velmi vysoké vrstvy hlenu s velkým množstvím odumřelých buněk. Přestože ve skupině PbONPs/6w jsme pozorovali pouze ojedinělé patologické nálezy, ve skupině PbONPs/CL (**obr. 23a, S6**) jsme detekovali výrazně vyšší množství hlenu s odumřelými buňkami. Eliminační období se tedy neukázalo jako efektivní pro reparaci čichového epitelu. V případě skupin Pb(NO₃)₂NPs/11w a Pb(NO₃)₂NPs/CL jsme pozorovali podobný trend (**obr. S7, S8**).

5.1.2 Jedenáctitýdenní inhalace PbNPs iniciuje v čichovém epitelu reparativní mechanismy

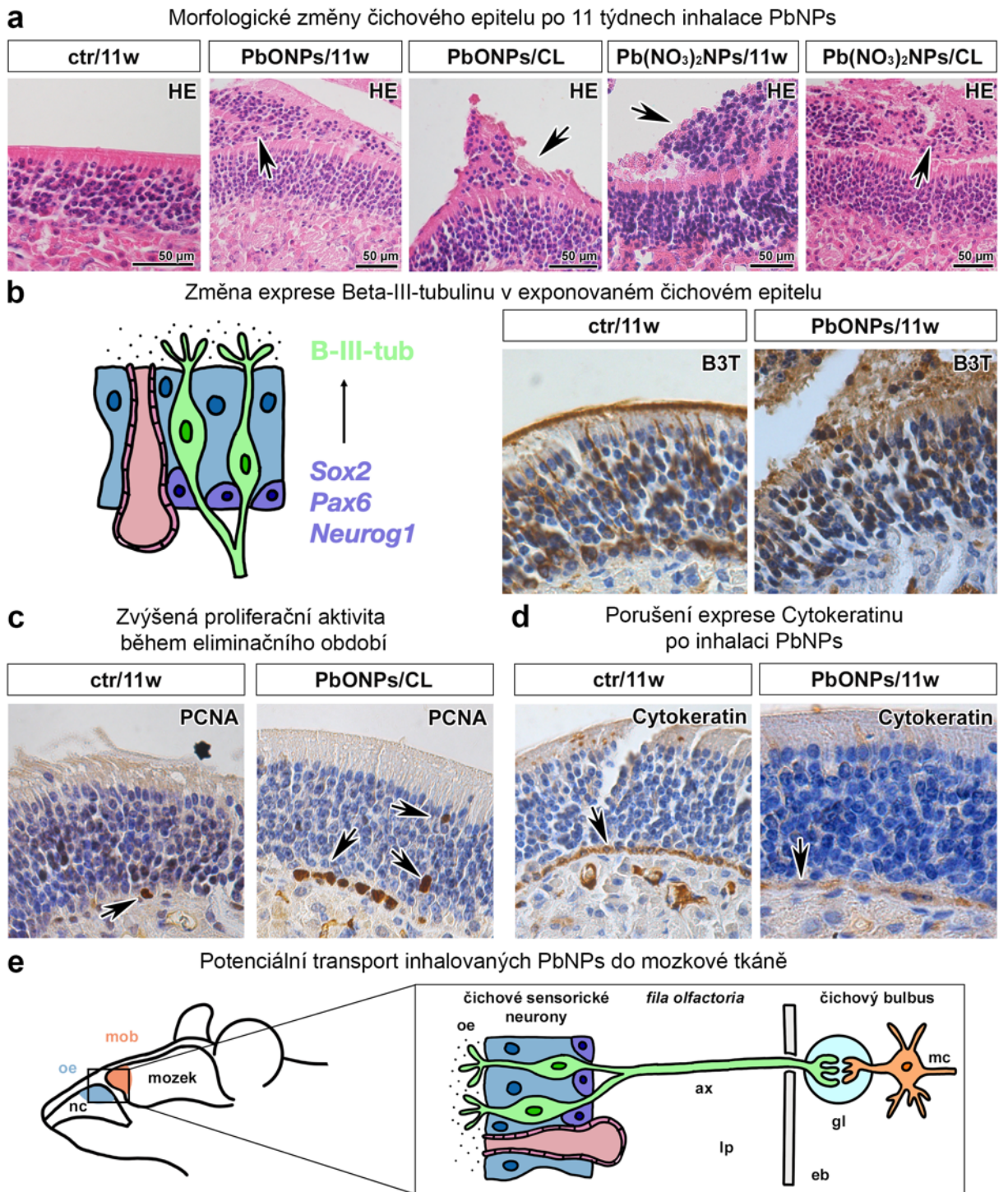
Čichový epitel je neustále vystavován mechanickým i chemickým vlivům a podobně jako další epitely má poměrně vysokou schopnost reparace. Jeho vysoký regenerační potenciál je ojedinělým v případě čichových nervů. Nejvýznamnější složkou pro regeneraci této tkáně jsou bazální buňky, které jsou progenitorové (exprimují např. geny *Sox2*, *Pax6* a *Neurog1*) a dokáží se v případě potřeby diferencovat v čichové senzorycké neurony (exprimující např. Beta-III-tubulin) či podpůrné buňky. Bazální buňky se dělí do několika populací, některé se dělí rychle, větší část však pomaleji. K obnově celého epitelu dochází u člověka každých 6–8 týdnů [171–177] (**obr. 23a**).

Pro zhodnocení případné aktivace reparativních mechanismů v rámci jedenáctitýdenního experimentu jsme detekovali Beta-III-tubulin pozitivní struktury, nervová vlákna a jejich případné poškození. Dále jsme detekovali proliferační aktivitu, abychom mohli pozorovat potenciální zvýšenou činnost bazálních buněk. Analyzovali jsme také výskyt Cytokeratin-pozitivních struktur, jejichž změny by indikovaly poškození bazální části epitelu. Zkoušeli jsme také vizualizovat progenitorové buňky pomocí markerů PAX6 a SOX2, nicméně i přes několik

optimalizací protokolu nebyla metoda úspěšná, pravděpodobně z důvodu nutnosti dlouhodobého odvádění těchto vzorků.

V kontrolní skupině jsme pozorovali Beta-III-tubulin-pozitivní struktury (**obr. 23b, S9a**) na apikální straně epitelu, vlákna v průběhu epitelu a nervové svazky v *lamina propria*. Poškození neurofilament nebylo znatelné. PCNA-pozitivní buňky (**obr. 23c, S9b**) jsme pozorovali pouze ojediněle při bazální straně epitelu. Cytokeratin-pozitivní struktury (**obr. 23d, S9c**) jsme pozorovali po celé délce bazální části epitelu. V exponované skupině PbONPs/11w jsme pozorovali změny v expresi Beta-III-tubulinu (**obr. 23b, S10a**), provázející morfologické alterace čichového epitelu. Vysoké vrstvy hlenu byly Beta-III-tubulin-pozitivní, vrstva na epitelu nebyla rovnoměrná, jednotlivá vlákna v rámci epitelu nebyla zřetelná jako v kontrolní skupině. Nervové svazky v *lamina propria* nevykazovaly známky poškození. Proliferační aktivita byla oproti kontrolní skupině zvýšená, PCNA-pozitivní buňky jsme detekovali při bazální i apikální straně epitelu (**obr. 23c, S10b**). Cytokeratin-pozitivní struktury jsme detekovali stejně jako v kontrolní skupině při bazální straně čichového epitelu (**obr. 23d, S10c**), nicméně signál nebyl po celé délce epitelu rovnoměrný. Snížená exprese Cytokeratinu potenciálně souvisí s poškozením epitelu. V ostatních exponovaných skupinách byly trendy exprese Beta-III-tubulinu, PCNA i Cytokeratinu obdobné jako v PbONPs/11w skupině (**obr. S11, S13**), pouze v případě Pb(NO₃)₂NPs/11w skupiny nebylo vzhledem k nízké kvalitě vzorků možné provést tuto analýzu (**obr. S12**).

Při takto závažném poškození čichového epitelu a analýzách na transmisní i skenovací mikroskopii (Ústav histologie a embryologie, LF MU) tedy předpokládáme, že dochází k transportu inhalovaných PbNPs do mozkové tkáně přes čichový nerv (**obr. 23e**).



Obrázek 23. Poškození čichového epitelu po 11 týdnech inhalace PbNPs a potenciální transport PbNPs do mozkové tkáně. **a)** Po 11 týdnech inhalace PbNPs jsme pozorovali výrazné morfologické změny čichového epitelu, zj. výrazné vrstvy sekretu s těly mrtvých buněk. Obarveno pomocí Hematoxylinu-Eosinu. Měřítka jsou uvedena v jednotlivých obrázcích. **b)** Markery vybraných buněk v čichovém epitelu (převzato z [171–177]; upraveno). Pozorovali jsme změnu exprese B3T po jedenáctitýdenní inhalaci PbNPs, signál nebyl tak jasný jako v případě kontrolní skupiny. Detekce B3T pomocí IHC. **c)** Po inhalaci PbNPs jsme pozorovali zvýšené počty PCNA+ buněk. Detekce PCNA pomocí IHC. **d)** Po inhalaci PbNPs jsme pozorovali deregulaci exprese Cytokeratinu. Detekce Cytokeratinu pomocí IHC. **e)** Předpokládáme, že dochází k prostupu inhalovaných PbNPs do mozkové tkáně přes čichový epitel (oe). Axony (ax) čichových neuronů prostupují přes čichovou kost (eb) do čichového bulbu, kde tvoří struktury zvané glomeruly (gl) a napojují se na mitrální buňky (mc).

5.2 Inhalace PbNPs způsobuje závažné morfologické změny mozkové tkáně

5.2.1 Po inhalaci PbNPs nedochází ke změně hmotnosti mozku

Hmotnost mozku byla změřena ihned po odběru, následně byl spočítán podíl hmotnosti mozku k celkové hmotnosti jedince (**tab. S5, S6**). Hmotnost mozku se po inhalaci PbNPs významně nezměnila (**obr. S14**), přestože u jiných orgánů k signifikantní změně hmotnosti po inhalaci PbNPs došlo, jak jsme prokázali v našich předchozích studiích [1,2,178,179].

5.2.2 Nekrotické neurony v hipokampální oblasti po inhalaci PbNPs

Hipokampální formace je komplexní struktura významná pro kognitivní funkce a procesy paměti. Vzhledem k její signifikanci je často studovanou oblastí v toxikologických, neurobehaviorálních a neuropatologických studiích [180–183].

Pomocí Nisslova barvení jsme detekovali nekrotické neurony v hipokampální oblasti. Zaměřili jsem se na oblast pyramidální vrstvy Ammonova rohu, region 1 (CA1) a vrstvu granulárních buněk v oblasti *gyrus dentatus*, kde jsme v případě kontrolních skupina pouze sporadicky pozorovali Nissl+ pozitivní neurony (**obr. 24a, S15c, e, S18c, e**). Dále jsme pomocí barvení Luxolová modř vizualizovali myelinové pochvy, které jsme v kontrolních skupinách pozorovali výhradně okolo hipokampální oblasti (**obr. S15d, S18d**). Velké množství myelinizovaných axonů se nacházelo také v okolí laterální mozkové komory (**obr. S15e, S18e**). V okolí *gyrus dentatus* (**obr. S15b, S18b**) jsme nepozorovali spongiformní či jiné morfologické změny.

Po 6 týdnech inhalace obou typů generovaných PbNPs jsme v hipokampální oblasti nepozorovali spongiformní či jiné změny uspořádání a struktury myelinových pochev (**obr. S16d, e, S17d, e**). Nissl+ buňky, nekrotické neurony, jsme občasně detekovali v pyramidální vrstvě Ammonova rohu (**obr. S16c, S17c**) a také ve vrstvě granulárních buněk v *gyrus dentatus* (**obr. S16f, S17f**). V rámci jedenáctitýdenního experimentu jsme v hipokampální oblasti pozorovali vyšší počet nekrotických neuronů v pyramidální vrstvě Ammonova rohu ve všech exponovaných skupinách (**obr. 24a, S19c, S20c, S21c, S22c**) v porovnání s kontrolní skupinou a ve vrstvě granuloých buněk v oblasti *gyru dentatu* (**obr. S19f, S20f, S21f, S22f**). Pomocí barvení Luxolová modř jsme vizualizovali myelinové pochvy axonů, nicméně nepozorovali jsme změny v jejich intenzitě či uspořádání (**obr. S19d, e, S20d, e, S21d, e, S22d, e**). Nedeterminovali jsme žádné rozdíly v efektu rozpustných a nerozpustných PbNPs na isocortex. Vzhledem k nalezeným histopatologickým změnám ve skupinách PbONPs/CL a Pb(NO₃)₂NPs/CL se námi zvolené pětítýdenní eliminační období neukázalo jako efektivní pro reparaci hipokampální oblasti.

5.2.3 Nekrotické neurony v isocortexu po inhalaci PbNPs

Isocortex je struktura kritická pro kognitivní funkce a je úzce napojena na hipokampální formaci [184]. V oblasti isocortexu jsme analyzovali přítomnost spongiformních změn, zánětu a jiných případných patologií na řezech obarvených Hematoxylinem-Eosinem, pro detekci nekrotických neuronů jsme využili barvení pomocí Nisslovy tigroidní substance.

V kontrolních skupinách jsme v oblasti isocortexu pouze vzácně pozorovali nekrotické neurony, detekované pomocí Nisslova barvení (**obr. 34b, S23, S26**).

Po šestitýdenní inhalaci obou typů generovaných PbNPs jsme pozorovali zvýšené množství nekrotických neuronů (**obr. S24, S25**). Obdobné změny jsme pozorovali také v rámci jedenáctitýdenního experimentu (**obr. 24b, S27, S28, S29, S30**), nejvíce Nissl+ neuronů jsme zaznamenali v oblasti isocortexu 1 a v okolí hipokampální oblasti. Nedetekovali jsme rozdíly v efektu rozpustných a nerozpustných PbNPs na isocortex. Eliminační období se v tomto případě neukázalo jako efektivní vzhledem k přítomnosti Nissl+ buněk v isocortexu jedinců z PbONPs/CL a Pb(NO₃)₂NPs/CL skupin.

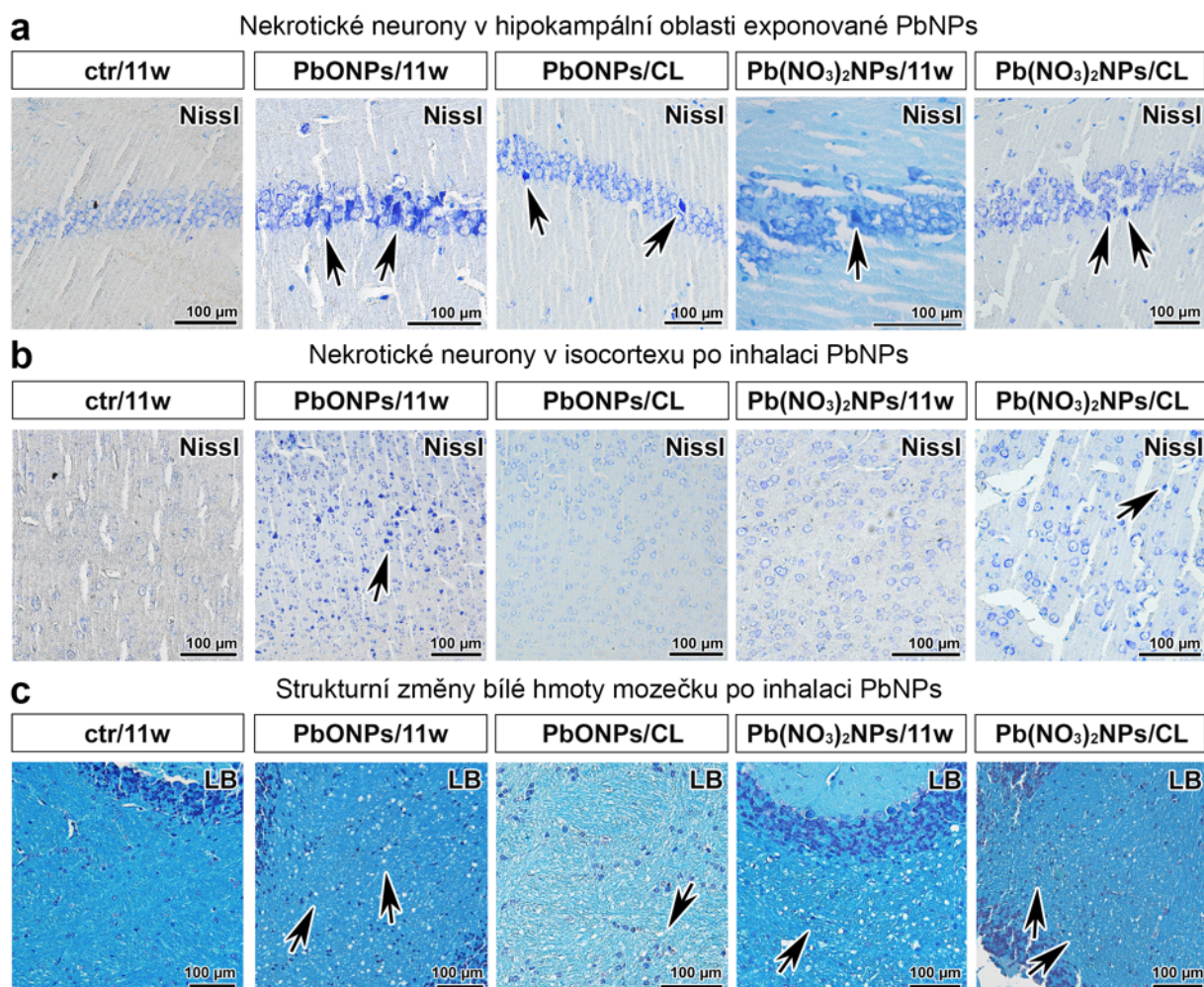
5.2.4 Morfologické změny bílé hmoty mozečku po inhalaci PbNPs

Mozeček je významnou součástí mozku, zajišťuje nejen motorické, ale i kognitivní funkce [185]. Pro analýzu oblasti mozečku jsme použili řezy obarvené HE, Luxolovou modří a pomocí Nisslova barvení, pomocí IHC jsme detekovali 2H3.

V kontrolních skupinách jsme nervová vlákna, detekovaná pomocí markeru 2H3, pozorovali ve dřeni mozečku i v kůře mozečku (**obr. S31b, e, S34b, e**). Bílá hmota mozečku v kontrolních skupinách byla celistvá, bez známek vakuolizace či jiného poškození (**obr. S31c, f, S24c, f**). Detekovali jsme také Nisslovu tigroidní substanci, nekrotické buňky v bílé hmotě mozečku jsme však nepozorovali (**obr. S31d, S34d**).

Po 6 týdnech inhalace PbONPs a Pb(NO₃)₂NPs jsme nepozorovali změny v expresi nervových vláken v kůře i dřeni mozečku (**obr. S32b, e, S33b, e**). Determinovali jsme strukturní změny bílé hmoty, připomínající vakuoly, nicméně tyto nálezy musí být dále potvrzeny pomocí transmisní elektronové mikroskopie (**obr. S32c, f, S33c, f**). V oblasti dřene mozečku jsme nepozorovali nekrotické neurony (**obr. S32d, S33d**). V rámci jedenáctitýdenního experimentu jsme ani v jedné exponovaných skupin nepozorovali změny v množství, uspořádání či struktuře nervových vláken (**obr. S35b, e, S36b, e, S37b, e, S38b, e**). Struktura bílé hmoty mozečku byla narušená obdobným způsobem jako ve skupinách PbONPs/6w a Pb(NO₃)₂NPs/6w (**obr. 24c, S35c, f, S36c, f, S37c, f, S38c, f**). Nejvýraznější změny tohoto charakteru jsme našli ve skupině Pb(NO₃)₂NPs/11w (**obr. S37f**). V oblasti mozečku jsme také detekovali četné nekrotické neurony (**obr. S35d, S36d, S37d, S38d**), které jsme vizualizovali pomocí Nisslova barvení. Vzhledem k prokázaným změnám v PbONPs/CL a Pb(NO₃)₂NPs/CL skupinách se pětítýdenní eliminační období neukázalo jako dostačující.

Analýzy čichového bulbu a thalamu nebyly vzhledem k technickým obtížím při jejich odběru provedeny. Pro analýzy bylo použito vzhledem ke kvalitě vzorků 2-5 jedinců z každé experimentální skupiny (**P2**). Na základě této histopatologické analýzy a výsledků z TEM byly pro podrobnější dále popsané evaluace vybrány tyto, nejvíce zasažené, oblasti: hipokampus a isocortex.



Obrázek 24. Histopatologická analýza mozkové tkáně exponované rozpustným a nerozpustným PbNPs. **a)** V pyramidální vrstvě Ammonova rohu jsme pozorovali po inhalaci PbNPs četné nekrotické neurony. Obarveno pomocí detekce Nisslovy tigroidní substance. Měřítko jsou uvedena v jednotlivých obrázcích. **b)** V oblasti isocortexu jsme po inhalaci PbNPs pozorovali nekrotické neurony. Obarveno pomocí detekce Nisslovy tigroidní substance. Měřítko jsou uvedena v jednotlivých obrázcích. **c)** Po inhalaci PbNPs jsme pozorovali strukturální změny bílé hmoty mozečku. Obarveno pomocí barvení Luxolová modř. Měřítko jsou uvedena v jednotlivých obrázcích.

5.3 Inhalované PbNPs regionálně-specificky ovlivňují cytoskelet a asociovanou signalizaci v mozkové tkáni

5.3.1 Remodelace aktinového cytoskeletu a deregulace *Cdc42* po inhalaci PbNPs

Souvislost olova s rozvojem neurodegenerativních onemocnění je již řadu let známá, proto jsme analyzovali vybrané regulátory a složky cytoskeletu, abychom prokázali, zda i olovo v podobě nanočástic (PbNPs) také může být příčinou takto závažného poškození. Rodina Rho malých GTPáz je důležitým regulátorem procesů jako je buněčná adheze či migrace [144,145,186–189]. Protein CDC42 zajišťuje buněčnou polaritu a tvorbu filopodií, buněčných výběžků se svazky aktinu, proto jsme analyzovali jeho genovou expresi (**obr. 25a**). Protein CDC42 dále aktivuje protein WASP, který dále aktivuje komplex Arp2/3 a dochází tak k polymeraci aktinu (**obr. 25a**) [143,145,146]. Deregulace exprese CDC42 je spojována například s karcinogenními onemocněními [190,191].

V hipokampální oblasti došlo po šestitýdenní inhalaci PbNPs k mírnému poklesu genové exprese *Cdc42* (**obr. 25a**). Po jedenácti týdnech inhalace byly PbNPs změny exprese *Cdc42* v exponovaných skupinách oproti skupině kontrolní výraznější, nicméně výsledky nebyly signifikantní ($p > 0,05$). Ve skupinách PbONPs/11w a Pb(NO₃)₂NPs/11w byla exprese *Cdc42* oproti kontrolní skupině nižší, zatímco ve skupinách s eliminačním obdobím, PbONPs/CL a Pb(NO₃)₂NPs/CL, byla exprese vyšší. Skupiny, které inhalovaly Pb(NO₃)₂NPs vykazovaly větší rozdíly vzhledem ke kontrolní skupině než skupiny, které inhalovaly PbONPs. Podobný trend jsme pozorovali také v případě oblasti isocortexu 1 (pouze PbONPs skupiny) (**obr. 25a**) a čichového bulbu (**obr. S41b**). Naopak v oblastech isocortexu 2 a 3 (**obr. S41c**) byl trend změny exprese *Cdc42* po jedenáctitýdenní inhalaci PbNPs odlišný. V případě isocortexu 2 jsme největší změnu pozorovali ve skupině PbONPs/11w, kde došlo k výraznému zvýšení exprese *Cdc42* oproti kontrolní skupině. Exprese *Cdc42* ve vzorcích jedinců z PbONPs/CL skupiny byla velmi podobná kontrolní skupině, ve skupinách, které inhalovaly rozpustné nanočástice olova došlo k mírnému zvýšení genové exprese *Cdc42*. Výsledky nebyly statisticky významné ($p > 0,05$). Ve srovnání s oblastmi isocortexu 1 a 2 byla změna exprese *Cdc42* v oblasti isocortexu 3 po jedenáctitýdenní inhalaci nanočástic olova minimální. Vzorky mozečku a thalamu byly kvůli vysoké variabilitě a předchozím výsledkům analyzovány pouze u některých experimentálních skupin (**obr. S41d**). Hypotetizujeme, že tento trend může souviset s nerovnoměrnou distribucí olova v mozkové tkáni odhalenou analýzami ICP-MS (Ústav chemie, PřF MU) (**obr. 29**).

V oblasti hipokampu a isocortexu jsme v rámci jedenáctitýdenního experimentu detekovali aktinový cytoskelet pomocí IF detekce Beta-Aktinu. V kontrolní skupině byly ACTB-pozitivní struktury rovnoměrně distribuovány v celé oblasti hipokampu i isocortexu, zatímco v exponovaných skupinách jsme determinovali shluky ACTB-pozitivního signálu, značící

remodelaci aktinového cytoskeletu. V hipokampální oblasti jsme tyto shluky pozorovali zejména v *stratum lacunosum-moleculare* a ve *stratu radiatum* v Ammonově rohu. Nejsilnější změny jsme zaznamenali ve skupině Pb(NO₃)₂NPs/CL, 5 týdnů eliminačního období se pro obnovu modelace a regulace cytoskeletu nejeví jako dostatečné (**obr. 25a, S39, S40**).

5.3.2 Signifikantní změny v expresi TAU a asociované signální dráhy PI3K/Akt/mTOR v exponované mozkové tkáni

Alterace v expresi a struktuře proteinu TAU, zejména jeho hyperfosforylace, je již dlouho spojována s průběhem neurodegenerativních onemocnění [107–109,192]. Tento protein je kódován genem *Mapt* a hraje významnou roli při stabilizaci mikrotubulů ve formujících se i ve vyspělých axonech [193,194]. Některé studie ale ukazují, že TAU také souvisí s aktinovým cytoskeletem a zprostředkovává mezi těmito dvěma systémy interakce, které jsou pro správnou koordinaci funkcí axonů kritické [195–198] (**obr. 25b**).

Analýza relativní genové exprese *Mapt* byla provedena na vzorcích z různých částí mozku. Po šestitýdenní inhalaci nanočástic rozpustných i nerozpustných PbNPs došlo k významnému snížení exprese *Mapt* (* p<0,05). V rámci jedenáctitýdenního experimentu jsme v PbONPs/11w a Pb(NO₃)₂NPs/11w skupinách pozorovali jen malé rozdíly vůči kontrole, naopak ve skupinách s eliminačním obdobím jsme detekovali vyšší expresi *Mapt* (**obr. 25b**), tedy podobný trend jako v případě analýzy relativní genové exprese *Cdc42*. Po šestitýdenní inhalaci jsme v oblasti isocortexu 1 pozorovali vyšší expresi *Mapt* ve skupinách vystaveným rozpustným a nerozpustným PbNPs (* p<0,05), trend exprese *Mapt* byl v rámci jedenáctitýdenního experimentu obdobný jako v hipokampální oblasti a oblasti čichového bulbu (**obr. S46**). Naopak v oblasti isocortexu 2 a 3 jsme pozorovali zvýšenou expresi *Mapt* ve skupině PbONPs/11w vůči kontrolní skupině (* p<0,05), v ostatních skupinách byly změny exprese *Mapt* vůči kontrolní skupině minimální (**obr. S44, S45**). Vzorky mozečku a thalamu byly kvůli technickým obtížím analyzovány pouze okrajově, relativní genovou expresi *Mapt* jsme determinovali pouze u některých experimentálních skupin (**obr. S47, S48**).

Dále jsme pomocí metody SDS-PAGE WB v oblastech hipokampu a isocortexu 1 detekovali proteiny p-TAU a t-TAU. Zatímco v hipokampální oblasti nedošlo k výrazným změnám exprese p-TAU a t-TAU po inhalaci PbONPs, v oblasti isocortexu 1 jsme v případě skupiny PbONPs/11w pozorovali stejnou expresi p-TAU jako v kontrolní skupině a naopak významně vyšší expresi t-TAU (p = 0,064) (**obr. 25b, S50a, b**). Hypotetizujeme, že v oblasti isocortexu 1 tak může docházet k hromadění nefosforylovaného – neaktivního proteinu TAU, potenciálně vedoucí k narušení homeostázy i funkce isocortexu 1.

Následně jsme detekovali genovou expresi vybraných členů signální dráhy PI3K/Akt/mTOR (*Pi3kr1, Pten, Akt1, Tsc1, Mtor*), jejíž inhibitor PTEN protein TAU inhibuje, tedy nepřímo aktivuje. Tato signální dráha je významným regulačním mechanismem buněčného cyklu. Její zvýšená aktivita, častý nález při karcinogenních onemocněních, inhibici apoptózy provázenou zvýšením proliferační aktivity [199–201]. Protein PI3K je efektor receptorů

spřažených s G proteinem a receptorů tyrosinových kináz. Fosforyluje PIP2 na formu PIP3. Protein Akt je přesunut na buněčnou membránu, kde je fosforylován. Následně buď přímo aktivuje mTORC1, nebo nepřímo aktivuje Tsc2, tím deaktivuje Tsc1/2 komplex, což vede k nepřímé aktivaci mTORC1 přes využití proteinu RHEB [109,202] (**obr. 25b**).

Již po šestitýdenní inhalaci generovaných PbNPs došlo v hipokampální oblasti k signifikantním změnám genové exprese vybraných markerů. Zatímco exprese *Pi3kr1* a *Pten* byla v obou exponovaných skupinách v porovnání s kontrolou mírně snížena, v případě genů *Akt1*, *Tsc1* a *Mtor* tomu bylo naopak. Exprese *Tsc1* a *Mtor* byla ve skupině PbONPs/6w signifikantně vyšší vůči kontrolní skupině (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). V rámci jedenáctitýdenního inhalačního experimentu došlo v hipokampální oblasti k viditelným změnám genové exprese. Změny genové exprese všech analyzovaných genů, *Pi3kr1*, *Pten*, *Akt1*, *Tsc1*, *Mtor* ukazují stejný trend. Ve skupinách PbONPs/11w a Pb(NO₃)₂NPs/11w došlo k poklesu genové exprese členů signální dráhy PI3K/Akt/mTOR vůči kontrolní skupině. Ve skupinách s eliminačním obdobím byla exprese vybraných členů signální dráhy PI3K/Akt/mTOR v porovnání se skupinami, které celých 11 týdnů inhalovaly generované PbNPs vyšší, vůči kontrolní skupině je exprese jen mírně odlišná. Eliminační období v tomto případě vedlo ke zvýšení exprese na úroveň hodnot kontrolní skupiny. Výsledky této analýzy vykazují stejný trend jako výsledky analýzy genové exprese *Mapt* a *Cdc42*. Rozdíly oproti kontrolní skupině nebyly statisticky signifikantní ($p > 0,05$) (**obr. 25b, S42**).

Obdobný trend jsme také pozorovali v případě analýz v oblasti isocortex 1 (**obr. 25b, S43**) a v oblasti čichového bulbu (**obr. S46**). V oblastech isocortexu 2 a isocortexu 3 jsme naopak ve skupinách PbONPs/11w a Pb(NO₃)₂NPs/11w pozorovali vyšší expresi analyzovaných genů ve srovnání s kontrolní skupinou, hodnoty ve skupinách s eliminačním obdobím byly oproti kontrole zvýšené nebo jí byly velmi podobné (**obr. S44, S45**). Vzhledem k nesignifikantním výsledkům, vysoké variabilitě a výsledkům dalších analýz byly vzorky mozečku a thalamu analyzovány pouze u některých experimentálních skupin, ověřovali jsme expresi pouze několika genů. V podrobnějších analýzách jsme nepokračovali (**obr. S47, S48**).

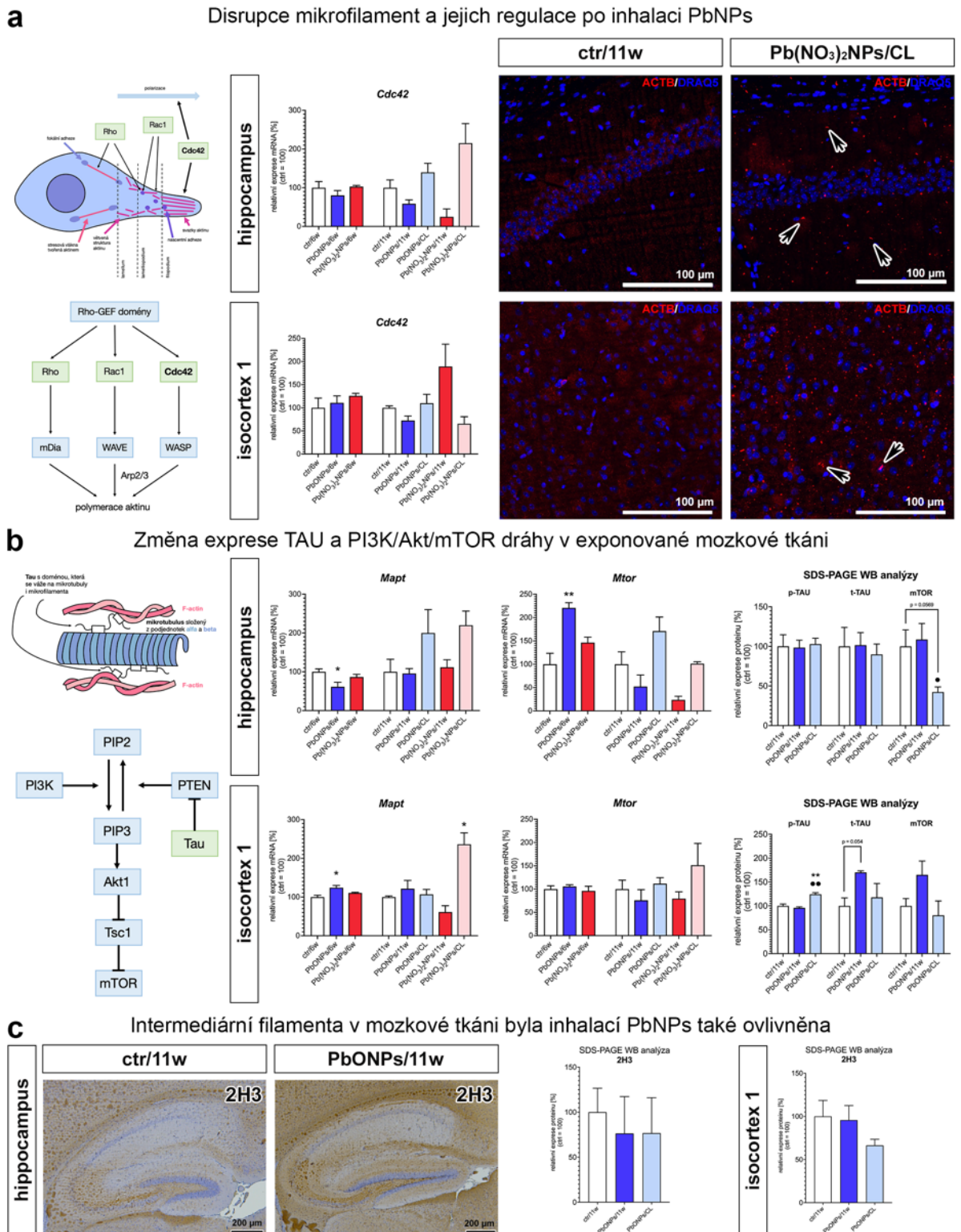
Vzhledem k významným změnám genové exprese *Mtor* po inhalaci PbNPs jsme detekovali mTOR na proteinové úrovni, změny exprese tohoto proteinu byly opět regionálně specifické. Zatímco v oblasti hipokampu jsme v případě skupiny PbONPs/11w pozorovali jen minimální změnu a v případě skupiny PbONPs/CL signifikantně nižší expresi mTOR vůči kontrolní skupině ($p < 0,05$), v oblasti isocortexu 1 jsme ve skupině PbONPs/11w pozorovali vyšší expresi mTOR a ve skupině PbONPs/CL naopak minimální změny v porovnání s kontrolní skupinou (**obr. 25b, S50c**).

5.3.3 Intermediární filamenta v mozkové tkáni nejsou po inhalaci PbNPs zásadně poškozena

Protože jsme prokázali signifikantní změny v modelaci a regulaci mikrofilament i mikrotubulů, analyzovali jsme také intermediární filamenta v hipokampální oblasti a v oblasti isocortexu 1.

V hipokampální oblasti jsme pomocí IHC detekovali protein 2H3 po 6 i 11 týdnech inhalace PbNPs, nepozorovali jsme však žádné změny týkající se uspořádání, množství či struktury neurofilament (intermediární filamenta IV typu). Ve všech skupinách jsme pozorovali 2H3-pozitivní struktury zejména v oblasti CA3 a v molekulární vrstvě *gyru dentatu* (**obr. 25c, S51a**). Protein 2H3 jsme ve vybraných experimentálních skupinách detekovali také pomocí metody SDS-PAGE WB, v exponovaných skupinách jsme pozorovali nižší expresi vůči kontrolní skupině, nicméně s velmi vysokou variabilitou (**obr. 25c, S51b**).

V případě isocortexu 1 jsme detekovali protein 2H3 pouze pomocí metody SDS-PAGE WB. Ve skupinách PbONPs/11w i PbONPs/CL jsme vůči kontrolní skupině pozorovali nižší expresi proteinu 2H3, nicméně tyto změny nebyly statisticky významné ($p > 0,05$) (**obr. S52**).



Obrázek 25. Inhalace PbNPs způsobuje regionálně-specifické změny cytoskeletu, jeho regulátorů a asociované signalizace. a) Protein CDC42 je důležitým regulátorem aktinového cytoskeletu. Pozorovali jsme změny exprese *Cdc42* v hipokampální oblasti a v oblasti isocortexu 1. V těchto oblastech jsme také pozorovali remodelaci aktinového cytoskeletu. Detekce Beta-Aktin pomocí IF. Měřítka jsou uvedena v jednotlivých obrázcích. b) Změny exprese proteinu TAU jsou asociované s rozvojem neurodegenerativních onemocnění. TAU je nepřímým aktivátorem signální dráhy PI3K/Akt/mTOR. Pozorovali jsme změny v expresi *Mapt* a *Mtor*. Detekovali jsme p-TAU, t-TAU a mTOR, pozorovali jsme změny ve skupinách PbONPs/11w i PbONPs/CL vůči kontrolní skupině. c) Změny intermediárních filament byly po inhalaci PbNPs minimální. Detekce 2H3 pomocí IHC. Měřítka jsou uvedena.

5.4 *In vitro* experiment potvrdil přímý efekt PbNPs na nervovou tkáň

5.4.1 Charakterizace TGs kultur

Pro použití primárních kultur TGs jakožto vhodného modelu pro náš experiment bylo třeba tuto kulturu charakterizovat. Detekovali jsme proteiny NEUROD1 a Neuropilin1 jakožto markery neuronů a gliových buněk – buněk nervové tkáně. Námi vytvořená primární kultura skutečně exprimovala protein NEUROD1 v jádrech a protein Neuropilin v cytoplasmě, jedná se tedy o nervovou tkáň (**obr. 26a**).

Pro výběr ideální koncentrace cPbONPs pro experimenty na buněčných kulturách jsme nejdříve otestovali několik koncentrací nanočástic a provedli MTT Assay, která hodnotí buněčnou metabolickou aktivitu a zjistí tak případnou cytotoxicitu cPbONPs. MTT Assay jsme provedli v rámci všech tří časových bodů (24 h, 48 h, 72 h) s koncentracemi 0,25 µg/ml, 0,50 µg/ml, 1,00 µg/ml, 5,00 µg/ml a 10,00 µg/ml. K téměř signifikantnímu poklesu došlo až po 72 hodinách expozice s koncentrací 10,00 µg/ml ($p = 0,066$) (**obr. 26a**). Pro další experimenty jsme zvolili koncentraci 1,00 µg/ml, která byla použita také v případě experimentů s MIHA buňkami v naší předchozí studii [179]. Vzhledem k časové tísní nebyly všechny experimenty zopakovány třikrát a některé analýzy jsou provedeny pouze na vybraných časových bodech. Naším cílem zde bylo demonstrovat přímý efekt PbNPs na nervovou tkáň, nicméně v budoucnu bude nezbytné experimenty zopakovat.

5.4.2 Změna exprese regulátoru aktinového cytoskeletu byla patrná již po 24 hodinách expozice cPbONPs

Analyzovali jsme genovou expresi *Cdc42*, regulátoru aktinového cytoskeletu, po expozici cPbONPs. Po 24 hodinách působení cPbONPs jsme pozorovali sníženou expresi *Cdc42*, po 48 hodinách působení cPbONPs jsme téměř nedetekovali změnu v expresi *Cdc42* a po 72 hodinách působení cPbONPs jsme pozorovali zvýšení exprese *Cdc42* vůči kontrolní skupině. Výsledky nebyly statisticky významné ($p > 0,05$). V případě opakování experimentů jsme pozorovali obdobné trendy. Tato „bifázická reakce“ buněk na olovo byla již v literatuře popsána [203–205] (**obr. 26b**).

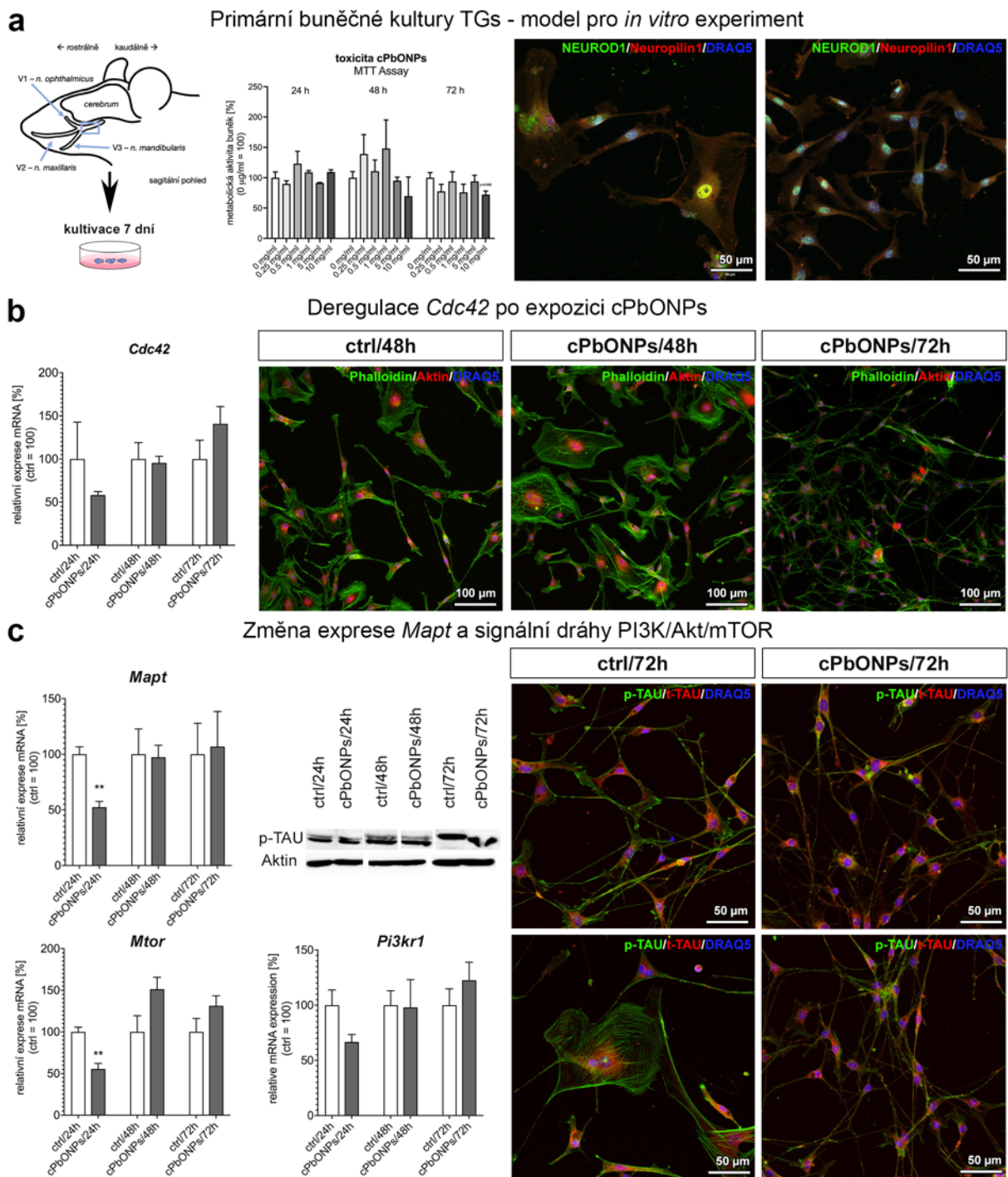
Následně jsme detekovali aktinový cytoskelet po 48 a 72 hodinách působení cPbONPs pomocí markerů Phalloidin a Aktin. V kontrolních skupinách jsme pozorovali Phalloidin-pozitivní signál v celém rozsahu buněk včetně jejich dlouhých výběžků. Aktin-pozitivní struktury byly naopak viditelné spíše u buněčného jádra a jejich exprese v dlouhých výběžcích byla slabší. Po 48 i 72 hodinách expozice cPbONPs jsme nepozorovali žádné změny ve struktuře či distribuci Phalloidin-pozitivního i Aktin-pozitivního signálu (**obr. 26b**).

5.4.3 Deregulace exprese signální dráhy PI3K/Akt/mTOR v exponovaných kulturách

Analyzovali jsme genovou expresi *Mapt* po expozici cPbONPs. Po 24 hodinách jsme v exponovaných vzorcích pozorovali signifikantní snížení genové exprese v porovnání s kontrolní skupinou (** $p < 0,01$). V případě 48h a 72h experimentu jsme detekovali pouze minimální změny v expresi *Mapt* (**obr. 26c**).

Dále jsme detekovali pomocí ICC proteiny p-TAU a t-TAU. Po 72 hodinách expozice cPbONPs jsme však nepozorovali změny intenzity p-TAU ani t-TAU signálu v porovnání s kontrolní skupinou (**obr. 26c**). Protein p-TAU jsme v buňkách detekovali také pomocí metody SDS-PAGE WB, nicméně ani tato analýza neukázala rozdíly v množství p-TAU po 24, 48 a 72 hodinách působení cPbONPs (**obr. 26c**).

Nakonec jsme detekovali změny v relativní genové expresi *Mtor*. Pozorovali jsme podobné výsledky jako v případě analýzy genové exprese *Mapt*. Exprese *Mtor* byla po 24 hodinách expozice sPbONPs signifikantně snížena (** $p < 0,01$) v porovnání s kontrolní skupinou. Naopak po 48 a 72 hodin expozice sPbONPs jsme pozorovali zvýšenou expresi *Mtor* v porovnání s příslušnými kontrolními skupinami, tyto výsledky nicméně nebyly statisticky významné ($p > 0,05$). Exprese *Pi3kr1* po 24 hodinách působení sPbONPs byla snižena v porovnání s kontrolní skupinou, po 48 a 72 hodinách působení naopak zvýšená. V případě všech analýz genové exprese jsme pozorovali bifázickou reakci olova, která byla v literatuře v případě působení mnohých kovů na organismy popsána [203–205] (**obr. 26c**).



Obrázek 26. *In vitro* experiment potvrdil přímý efekt PbNPs na nervovou tkáň. a) Pro *in vitro* experimenty jsme použili primární buněčné kultury TGs. Provedli jsme analýzu cytotoxicity, naše kultury exprimovaly NEUROD1 a Neuropilin1, markery nervových buněk. Detekce NEUROD1 a Neuropilin1 pomocí ICC metody. Měřítka jsou uvedena pro jednotlivé obrázky. b) Analyzovali jsme genovou expresi *Cdc42* po expozici cPbONPs, pozorovali jsme deregulaci již po 24 hodinách expozice cPbONPs. Změny v expresi Phalloidin a Aktin jsme však nepozorovali. Detekce Aktin a Phalloidin pomocí ICC metody. Měřítka jsou uvedena pro jednotlivé obrázky. c) Pozorovali jsme signifikantní deregulaci exprese *Mapt*, *Mtor* a *Pi3kr1* již po 24 hodinách cPbONPs expozice (** $p < 0,01$). Na proteinové úrovni jsme nepozorovali deregulaci exprese p-TAU a t-TAU. Detekce p-TAU a t-TAU pomocí ICC metody. Měřítka jsou uvedena pro jednotlivé obrázky.

6 DISKUSE

Nanočástice jsou nedílnou součástí životního prostředí a vznikají při mnoha přírodních i průmyslových procesech, nicméně po industriální revoluci v 19. století se jejich koncentrace v ovzduší zvyšují a v současné době se tak diskutuje jejich potenciální negativní vliv na živé organismy. Rizikové jsou zejména nanočástice těžkých kovů, olova, kadmia, zinku aj. Přestože toxicita těchto kovů je známá již řadu let, vzhledem k odlišnostem ve vlastnostech nanočástic a stejných kovů v jiné formě je třeba zkoumat účinky jejich dlouhodobé inhalace [4,9,11,16,18,24,206]. Negativní efekt inhalace nanočástic olova na primární orgán, plíce, i sekundární orgány, jako jsou například játra, slezina, ledviny atd., byl popsán v našich minulých studiích [1–3,179], nicméně podrobné analýzy mozkové tkáně exponované nanočásticím olova dosud provedeny nebyly a mechanismy jejich působení na neurony i gliové buňky dosud zůstávají neodhaleny.

V rámci našeho projektu jsme se zabývali působením dlouhodobé inhalace rozpustných a nerozpustných nanočástic olova na mozkovou tkáň. Ukázali jsme, že nanočástice se do mozku dostávají prostupem přes čichový epitel, v mozku jsou dále distribuovány a na molekulární úrovni negativně ovlivňují některé složky cytoskeletu. Tyto výsledky jsme ověřili na *in vitro* modelu – na buněčné kultuře trigeminálních ganglií.

V budoucnu bude třeba provést další funkční experimenty, které naše nálezy potvrdí a ukáží mechanismus, jakým způsobem dochází k disrupci cytoskeletu. Chtěli bychom například analyzovat vazebná místa nanočástic olova či přímo olovnatých kationtů na vybraných proteinech, které jsou složkami cytoskeletu či s ním jinak interagují. Tyto proteiny mají vazebná místa pro vápenatý kation, chtěli bychom zjistit, zda olovo vápník nahrazuje či s ním jinak interferuje.

6.1 Nanočástice těžkých kovů v životním prostředí a způsob jejich vstupu do živých organismů

Vzhledem k prokázané toxicitě olova a kadmia jsou v současné době stanoveny jejich maximální možné koncentrace v ovzduší, nicméně tyto limity jsou na mnoha místech významně překračovány. Mezi další kovy, které významně znečišťují prostředí patří např. mangan (Mn), zinek (Zn), kadmium (Cd), měď (Cu) či rtuť (Hg) [207]. Pro naši studii jsme použili generované rozpustné a nerozpustné nanočástice olova. Generování probíhalo kontinuálně *in situ*, nicméně vlastnosti a koncentrace nanočástic nebyly konzistentní, a mohly způsobit variabilitu mezi jedinci. Tento přístup je ale velmi podobný fyziologickým podmínkám. Koncentrace pro experiment byly zvoleny na základě předchozí literární rešerše tak, aby odpovídaly oblastem s vysokými koncentracemi olova v ovzduší [47,52,61,72,208–210].

Mezi hlavní způsoby vstupu nanočástic do živých organismů patří dýchací systém, gastrointestinální systém a dermální cesta [9,18]. Pro *in vivo* experiment byla zvolena inhalace, neboť se jedná o nejběžnější cestu NPs do organismu. Použití celotělových klecí představuje unikátní metodický přístup, díky němuž jsme docílili výborné simulace fyziologického prostředí znečištěného prostředí. Myši laboratorní si však čistí svoji srst, a proto by potenciálně mohlo dojít k prostupu přes gastrointestinální trakt. Prvkové analýzy střev (Ústav analytické chemie, AV ČR, v.v.i.) však neprokázaly zvýšenou přítomnost olova v této tkáni. V jiných studiích bývá používána také intratracheální instilace [211–213] či instilace do jazyka [213]. Poměrně jedinečný přístup využívá také nanotoxikologická interdisciplinární výzkumná skupina z Jekatěrinburgu, která využila nasální komory [214]. Přestože je díky tomuto přístupu možné velmi přesně kvantifikovat množství aplikované látky, tento vstup není fyziologicky odpovídající v takové míře jako inhalační klece.

Gastrointestinální prostup nežádoucích nanočástic může souviset i s výrobou potravin či obalů na potraviny. V potravě se mohou vyskytovat mj. nanočástice stříbra, oxidu zinečnatého a oxidů dalších kovů. Negativní účinky těchto částic na živé organismy byly již detailně popsány. Při dermálním prostupu nebyl prokázán negativní efekt nanočástic kovových oxidů, přestože jejich inhalace je škodlivá. NPs oxidu titaničitého a oxidu zinečnatého jsou přidávány do mnoha kosmetických produktů, které blokují UV záření [215].

Jak již bylo popsáno v našich předchozích studiích [1–3,179] inhalované nanočástice olova v rozpustné i v nerozpustné formě se šíří z plic pomocí krve nebo díky prostupu přes plasmatické membrány do sekundárních orgánů; jater, ledvin, sleziny a vaječnicků. Efekty inhalovaných nanočástic olova jsou orgánově specifické [1–3,179].

Pro náš experiment *in vitro* jsme použili koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Tuto koncentraci jsme zvolili na základě MTT testů a našich předchozích experimentů s liniemi MIHA (imortalizované lidské hepatocyty), THP-1 (makrofágy) a ELEP (*expandable lung epithelium*), při kterých jsme použili obdobnou koncentraci sPbONPs [179].

6.1.1 Modelový organismus

Pro toxikologické a nanotoxikologické studie jsou jako modelový organismus využíváni hlodavci – myši a krysy. Zatímco hmotnost myši se pohybuje okolo 20–30 gramů, díky tomu je nakládání s nimi jednodušší, krysy jsou až desetkrát těžší, plánování experimentů je náročnější, nicméně velikost vzorků pro různé analýzy je významně větší.

Pro studii vlivu olova na vyvíjející se organismus jsou používány ryby druhu *Danio rerio* [216]. Díky tomu, že embryonální vývoj probíhá mimo matku, velmi rychle se *Danio rerio* stalo často využívaným vhodným modelem. Jeho nevýhodou je struktura mozku v pozdějších stádiích vývoje, neboť se od člověka zásadně liší.

6.1.2 Trigeminální ganglia – model pro *in vitro* experiment

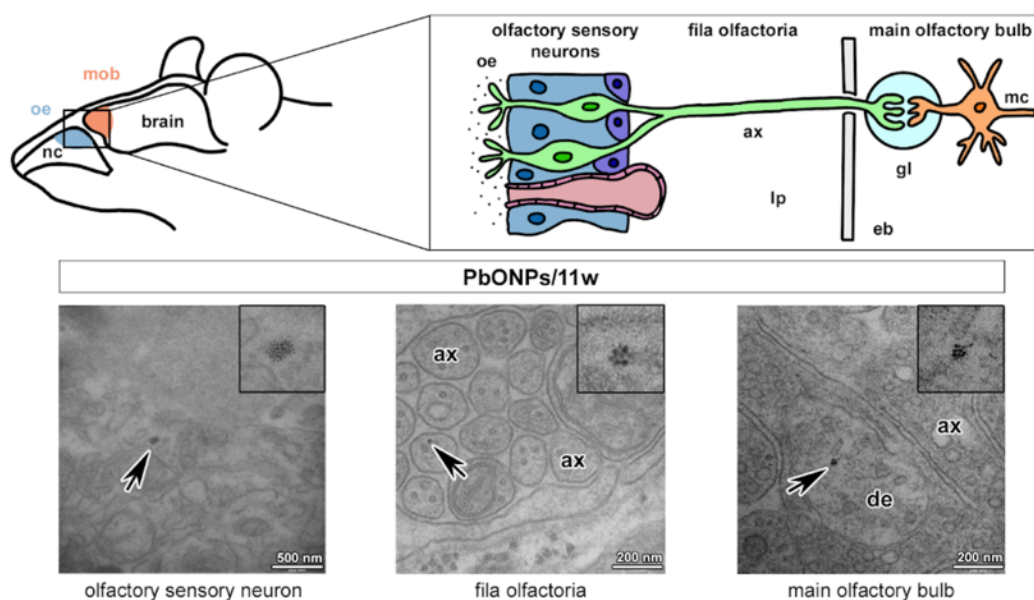
Pro *in vitro* experiment byl využit model primárních buněčných kultur trigeminálních ganglií. Jedná se o smíšené kultury, které dokáží simulovat nervovou tkáň *in vitro*.

V literatuře jsou často využívány neuronální linie, nicméně práce s nimi je nákladná a nejedná se o smíšenou buněčnou kulturu. Dále jsou časté primární buněčné kultury z mozkové tkáně či dorzálních ganglií (DRGs) [217]. Dorzální ganglia jsme testovali, nicméně vzhledem k pozitivním vlastnostem trigeminálních ganglií jsme nakonec využili tuto možnost. Důležitou součástí *in vitro* studií jsou dnes organoidy. Existují organoidy nervové tkáně, např. mozkové kůry [218,219].

6.2 Transport NPs do mozkové tkáně

Problematikou vstupu NPs různých druhů do mozku se zabývá nanotoxikologie, ale také biomedicínské inženýrství, protože NPs mohou sloužit jako nosiče léčiv. V současné době však není znám přesný mechanismus prostupu přes hematoencefalickou bariéru (BBB) [103]. Předpokládá se, že touto cestou se do mozkové tkáně mohou dostat jen NPs menší než 10 nm [24], a proto BBB představuje velkou překážku pro léčiva šířená krví, cílená na mozkovou tkáň [103]. Výsledky v rámci tohoto projektu z Ústavu histologie a embryologie, LF MU nicméně potvrdily prostup generovaných PbNPs přes hematoencefalickou bariéru.

V naší studii jsme uvažovali také prostup přes čichový nerv do čichového bulbu, tento prostup byl pomocí analýz TEM skutečně potvrzen (Ústav histologie a embryologie, LF MU) (**obr. 27**). Tato dráha je již mnoho let známá, poprvé byla popsána již v roce 1970 [220,221] a je platná např. také pro nanočástice oxidu železitého [222].



Obrázek 27. Prostup inhalovaných PbONPs do mozkové tkáně přes čichový epitel byl prokázán (obrázky TEM převzaty z Ústavu histologie a embryologie, LF MU). Inhalované nanočástice olova byly pozorovány v buňkách čichového epitelu (oe), v axonech (ax) čichových sensorických neuronů (*fila olfactoria*) i v čichovém bulbu (mob).

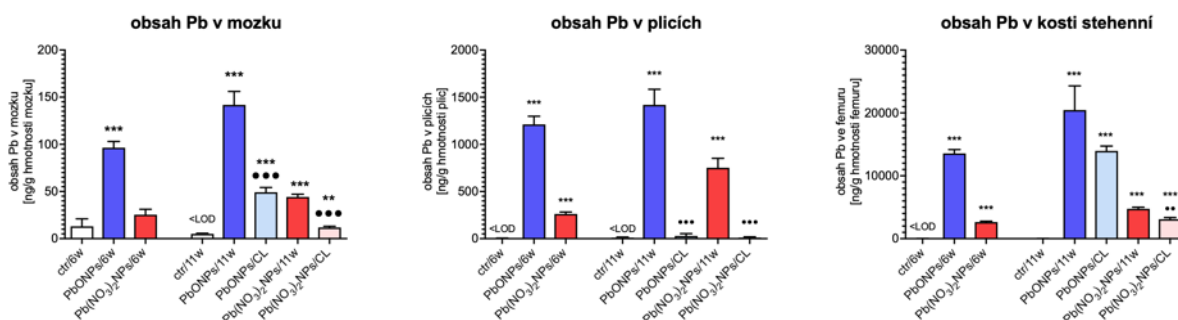
Některé studie ukazují, že prostup nanočástic je možný i přes jiné nervy, např. akustický či chuťový [223]. Tato cesta je v současné době testována jako potenciální cesta léčiv do mozkové tkáně pro léčbu neurodegenerativních onemocnění.

6.3 Mozková tkáň po inhalaci NPs

6.3.1 Olovo v mozkové tkáni

Množství olova v mozkové tkáni bylo po inhalaci generovaných PbNPs dle analýz z Ústavu analytické chemie, v.v.i. signifikantně vyšší, a to i ve skupinách s eliminačním obdobím. Schopnost mozku eliminovat PbNPs se ukázalo jako efektivní, nicméně v jiných orgánech dochází k eliminaci rychleji, zejména v plicích. Analýzy množství olova ve stehenní kosti potvrdily ukládání olova v této struktuře (**obr. 28**).

Hypotetizujeme, že během eliminačního období olovo může být vyplavováno z orgánů do krve, a proto v plicích, játrech, ledvinách i mozku dochází k prohloubení či udržení negativního efektu inhalovaných nanočástic olova. Zatímco v plicích a játrech pozorujeme výrazné změny v efektu inhalace rozpustných a nerozpustných PbNPs, v mozku nepozorujeme téměř žádné změny.



Obrázek 28. Detekované množství olova v mozkové tkáni, plicích a femuru po inhalaci generovaných nanočástic olova. Výsledky jsou z Ústavu analytické chemie, v.v.i. V mozku bylo po šestitýdenní i jedenáctitýdenní inhalaci nanočástic olova signifikantní množství olova (** $p < 0,001$), v případě skupiny Pb(NO₃)₂NPs/6w bylo detekované množství olova nízké. Během eliminačního období došlo k významnému snížení množství olova v mozkové tkáni (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), nicméně tyto hodnoty byly stále statisticky významně vyšší vůči kontrolní skupině. V plicní tkáni došlo po šestitýdenní i jedenáctitýdenní inhalaci PbNPs k významnému zvýšení množství olova (** $p < 0,001$), během eliminačního období došlo k výraznému snížení množství Pb v plicní tkáni (** $p < 0,001$). Naměřené hodnoty nebyly statisticky významně vyšší než v kontrolní skupině. Po šestitýdenní i jedenáctitýdenní inhalaci PbNPs došlo k významnému nárůstu množství olova také ve stehenní kosti (** $p < 0,001$). Během eliminačního období jsme pozorovali významné snížení detekovaného olova v této struktuře (** $p < 0,01$), nicméně tyto hodnoty byly stále signifikantně vyšší vůči kontrolní skupině (** $p < 0,001$) a odpovídají šesti týdnům inhalace PbNPs.

6.3.2 Patologické nálezy v mozkové tkáni po inhalaci NPs

Ačkoliv existuje mnoho studií zaměřených na výzkum nanočástic jako potenciálních nosičů léčiv, nanotoxikologických studií zabývajících se mozkovou tkání je výrazně méně [18]. Souvislost s výskytem zánětů nervové tkáně, indukci oxidativního stresu a zvýšenou hladinou buněčné smrti byla prokázána např. u nanočástic stříbra [224], oxidu titaničitého [225–227], oxidů železa [228,229], křemíku [230,231] a také u uhlíkových nanotrubiček [232,233].

Přestože při zpracování mozkové tkáně může dojít k vytvoření mnoha artefaktů připomínajících závažné poškození [95,98], v případě našeho experimentu byly všechny vzorky zpracovány stejným způsobem a rozdíly mezi kontrolní a exponovanými skupinami byly i přesto

signifikantní. Buněčná smrt neuronů mozkové tkáně může vést k omezení kognitivních funkcí, bolestem hlavy, problémům s emocemi a pamětí, organismus je náchylnější k rozvoji neurodegenerativních onemocnění [234,235]. I přes nákladnou léčbu je kvalita života pacienta a jeho okolí významně snížena [236]. V případě, že dojde k nekróze tkáně, následuje pak spuštění tvorby prozánětlivých cytokinů, molekul, které mohou být součástí autokrinní signalizace nádorových buněk [237]. V rámci dalších analýz jsme také detekovali myelin, asociovaný s inteligencí, nicméně oproti našemu předchozímu experimentu, při němž organismy inhalovaly po dobu 11 týdnů vyšší koncentraci generovaných PbONPs, byly změny minimální [1].

Nejvíce zasaženou oblastí v naší studii byla oblast hipokampu, která je také první negativně ovlivněnou oblastí při průběhu AD [96]. Bylo prokázáno, že neurony v této oblasti obsahují hyper-fosforylovanou formu proteinu Tau, který neumožňuje fyziologickou funkci neuronů [153]. U adolescentů konzumujících vysokou hladinu alkoholu byla v hipokampální oblasti detekována významná ztráta neurogeneze [238], podobně jako u jedinců vystavených vysoké stresové zátěži [239]. Hipokampální oblast je součástí koncového mozku, v němž je úmrtí neuronů typické v raném stádium HD [96]. Naopak čtrnáctidenní působení nanočástic oxidu železitého po intranasální instilaci nezpůsobilo žádné patologické změny [222].

Následná analýza isocortexu ukázala přítomnost nekrotických neuronů v některých exponovaných skupinách. Nekróza neuronů může také souviset s ALS, při níž dochází ke zvětšení Nisslovy substance v periferních neuronech [240]. Buněčnou smrt neuronů v isocortexu také potvrdila výzkumná skupina, která olovo ve formě dusičnanu olovnatého orálně podávala hlodavcům po dobu 21 dní [221]. Podobné patologické nálezy v oblasti hipokampu a isocortexu byly prokázány také po instilaci nanočástic oxidu zinečnatého do jazyka [241] či po injektaci nanočástic manganu po dobu 7 dní [242].

V mozečku jsme detekovali změny ve struktuře bílé hmoty. Tyto struktury vykazují charakter vakuol, nicméně pro potvrzení je třeba provést podrobnější analýzu v TEM. Již zmiňovaná studie, která orálně podávala dusičnan olovnatý krysám, potvrdila rovněž v mozku přítomnost vakuol v cytoplasmě [221]. První data také ukazují, že proliferační aktivita vybraných buněčných typů v mozečku je po inhalaci PbNPs zvýšená. Ve studii zkoumající vliv sedmidenní injektace nanočástic manganu [242] byly také popsány negativní efekty na morfologii tkáně mozečku a defekty koordinace v souvislosti s poškozením této struktury. Vakuolizace neuropylu a nekrotické neurony v oblasti mozečku byla také potvrzena při orální aplikaci nanočástic oxidu hlinitého myším po dobu 28 dní [243].

Negativní vliv olova byl také prokázán na míchu, po 3 měsících expozice olovem došlo k závažnému poškození této struktury. Autoři studie pozorovali buněčnou smrt neuronů či demyelinizaci neuronů periferního nervového systému. Počty glií byly také změněny, počty oligodendrocytů byly sníženy, naopak počty astroglíí byly zvýšeny [244].

6.3.3 Nanočástice olova a jejich souvislost s neurodegenerativními onemocněními

Vzhledem ke stárnutí populace, nepochopeným mechanismům neurodegenerace, problémům s včasnou diagnostikou a neexistující efektivní léčbou představují neurodegenerativní onemocnění velké riziko současnosti [96,105].

Souvislost olova a neurodegenerativních onemocnění je diskutována zejména díky krizi týkající se přidávání tetraethylolova do benzínu. Olovo je nebezpečné zejména pro děti a předpokládá se, že ovlivňuje i jejich dospělý život a přispívá k rozvoji AD, nicméně molekulární mechanismy nejsou známy [220]. Riziko olova pro děti a jeho pozdější efekt na rozvoj neurodegenerativních onemocnění byl také potvrzen u primátů [245]. Ve studii byla mláďata primátů vystavena olovu a ve stáří u nich byly nalezeny změny připomínající některé tauopathie a AD.

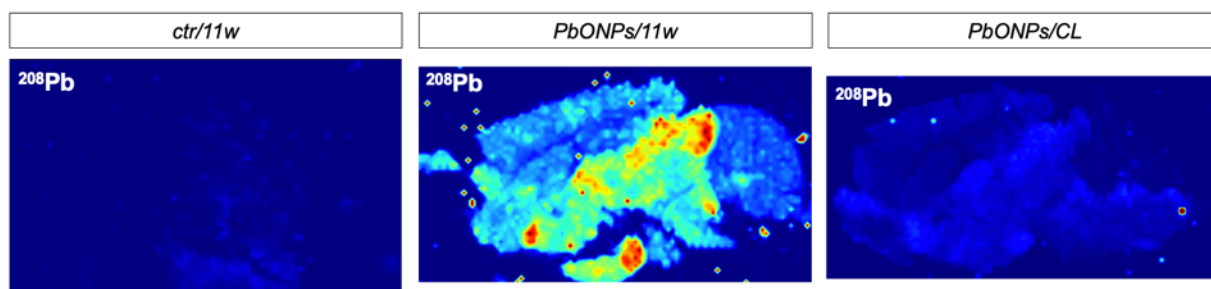
V naší studii jsme potvrdili zřetelnou remodelaci aktinového cytoskeletu a změny v jeho regulaci po inhalaci nanočástic olova. Již dlouho je známo, že defekty cytoskeletu jsou asociovány s rozvojem neurodegenerativních onemocnění, která nejsou vzájemně příbuzná. Diskutována je v současné době zejména stabilita mikrotubulů, která se i v této práci ukázala jako narušena, a změny v dynamice aktinového cytoskeletu, jež byly v této práci také potvrzeny. Právě tyto struktury jsou potenciálním cílem léčiv [246].

Významnou součástí neurodegenerativních onemocnění je také hyperfosforylace a dysfunkce některých proteinů, např. proteinu TAU. Hyperfosforylovaný protein TAU tvoří agregáty, které znemožňují správnou funkci axonů, neurony následně umírají. Tyto agregáty jsou také potenciálním cílem léčiv. Jako o potenciálních léčivech se uvažuje mj. o nanočásticích kovů, přestože jejich negativní účinky na tkáň nebyly dosud detailně popsány [247]. Prokázali jsme přítomnost zvýšeného množství neaktivního proteinu TAU v isocortexu 1 jedinců ze skupiny PbONPs/11w. Tyto potenciální shluky by mohly znemožňovat axonální transport a způsobovat tak nekrotické neurony, které jsme pozorovali při histopatologické analýze.

6.3.4 Regionálně-specifický efekt inhalovaných PbNPs na mozkovou tkáň

V této práci jsme prokázali regionálně-specifický efekt inhalovaných PbNPs na cytoskelet, jeho regulátory a asociovanou signalizaci. Předpokládáme, že tento trend souvisí s nerovnoměrnou distribucí olova v mozkové tkáni, jak prokázaly analýzy z Ústavu chemie, PřF MU (**obr. 29**).

V čichovém bulbu, se kterým sousedí i oblast isocortex 1 a v blízkosti hipokampální bylo po 11 týdnech inhalace detekováno vysoké množství olova. Naopak v oblasti mozečku byl obsah olova minimální, přesto jsme pozorovali významné změny bílé hmoty. Souvislost množství olova s histopatologickými změnami a s různou expresí kandidátních genů a proteinů však musíme ještě zjistit.



Obrázek 29. Distribuce olova v mozkové tkáni po inhalaci PbNPs je nerovnoměrná (převzato z Ústavu chemie, PřF MU – analýza ICP-MS). Ukázka distribuce olova v mozkové tkáni jedinců ze skupin *ctr/11w*, *PbONPs/11w* a *PbONPs/CL*.

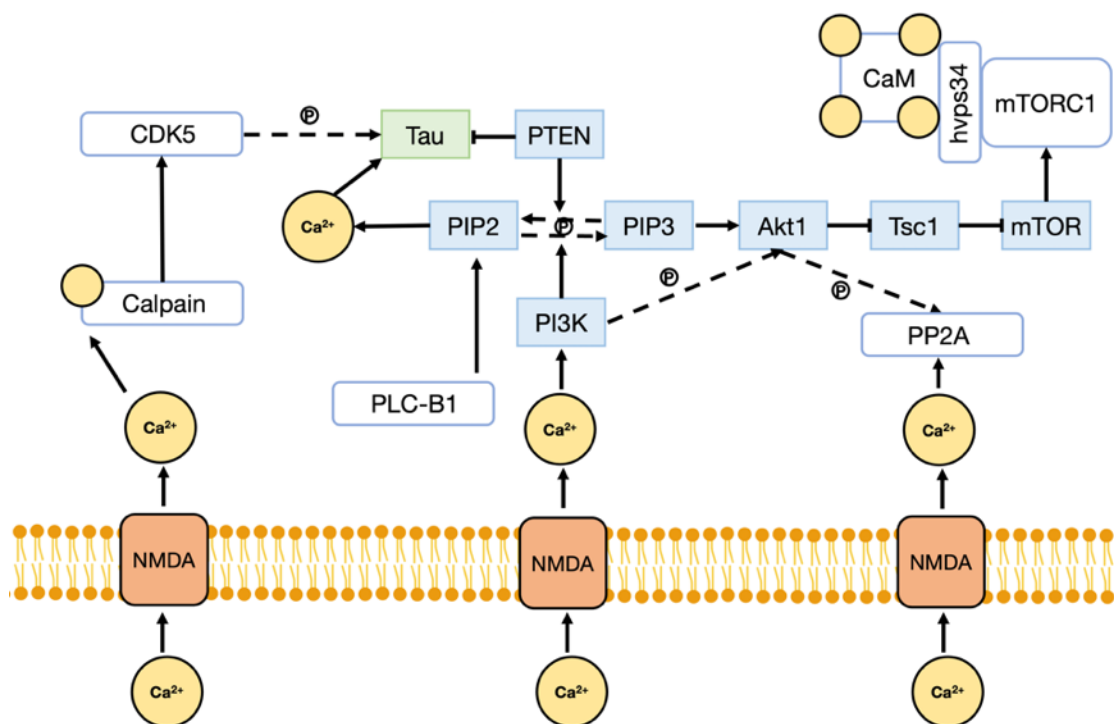
6.4 Olovo a vápník v živých systémech

Schopnost olova nahrazovat ionty v neživých i živých systémech byla již dříve popsána [39,61–63], porozumění narušení signalizace a rovnováhy iontů po jejich působení na živé systémy však není dosud úplné.

Vzhledem k signifikantním změnám relativní genové exprese vybraných členů signální dráhy PI3K/Akt/mTOR a *Mapt* a schopnosti olova nahrazovat ionty v živých systémech předpokládáme, že olovo interaguje s vápenatými kationty v nervové tkáni. Na základě literární rešerše bylo vytvořeno schéma na **obr. 30**. Vápenatý kation se do buněk dostává pomocí aktivního transportu a zejména v nervových buňkách je jeho rovnováha kritická.

Interakce vápníku a proteinu Kalmodulin (CaM) je nezbytná pro správnou funkci signalozomu mTORC1. CaM se váže na hrvps34, který se váže na mTORC1. Tento signalozom dokáže fosforylovat S6K1, kinázu, která je nezbytná pro správnou translaci. V případě působení nanočástic olova v *in vivo* experimentu jsme pozorovali významnou deregulaci relativní genové exprese *Mtor*. Za předpokladu, že proběhla také deregulace translace proteinu mTOR, lze vyvodit další deregulace translace jiných proteinů. Tato hypotéza byla částečně potvrzena také na proteinové úrovni, v oblasti isocortexu 1 jsme ve skupině PbONPs/11w pozorovali vyšší expresi vůči kontrole.

Dále byla prokázána souvislost vápníku s fosforylací proteinu Akt přes CaM, nicméně je známá také souvislost vápníku s proteinem PP2A, který protein Akt naopak defosforyluje [248–257]. Vápník také významně ovlivňuje protein Tau, nepřímý aktivátor signální dráhy PI3K/Akt/mTOR. Signální dráha PI3K/Akt/mTOR spouští proliferaci a aktivace této signální dráhy podporuje karcinogenezi. Vápník je důležitý pro signalizaci proteinu Calpain, který dále aktivuje cyklin-dependentní kinázu 5 (CDK5), jež dále fosforyluje protein Tau. Protein Tau je také ovlivňován PIP2, který je v případě aktivace signální dráhy PI3K/Akt/mTOR fosforylován na PIP3. PIP2 je downstream molekulou fosfolipázy C beta 1 (PLC-B1) a dále pomocí vápníku aktivuje protein Tau [248–257]. V jedné z našich předchozích studií jsme již popsali změny týkající se množství lipidů a asociovaných fosfolipáz. Tyto změny by mohly být přítomné také v případě mozkové tkáně i vzhledem k nálezům změn bílé hmoty mozečku, která je na lipidy bohatá [179].



Obrázek 30. Vápník a jeho možné souvislosti se signální dráhou PI3K/Akt/mTOR (převzato a upraveno dle [248–257]).

Narušení vápníkové signalizace bylo popsáno také po působení nanočástic oxidu zinečnatého. V tomto případě se autoři studie zaměřili na signální dráhu NFkB, ERK a P38 [241]. Protein ERK nepřímo reguluje pomocí mTOR komplexu uspořádání aktinového cytoskeletu [258–260], a proto se na něj v rámci dalších analýz také plánujeme zaměřit.

6.5 Řešení problematiky nanočástic v ovzduší

Problematika vysokého obsahu PbNPs i jiných nežádoucích NPs v ovzduší je důležitým tématem ve společnosti již několik desítek let. V současné době existuje mnoho legislativních opatření, které si kladou za cíl snížit množství NPs v ovzduší či zabránit jejímu zvyšování. Organizace světového významu, jako je WHO, NIOSH či OSHA, reagují na nanotoxikologické studie a stanovují limity daných prvků či koncentrace jejich částic v prostředí, popř. dávky, kterým může být pracovník v ohrožujícím prostředí vystaven. I přesto jsou stanovené limity na mnoha místech světa překračovány, a proto se mnoho vědeckých týmů zabývá možností odstranění či zachycení NPs v ovzduší [44,47,52,59,61,69,72,208,209,261].

Mezi jednodušší technologie patří filtrace, která je ale v případě malých částic ne příliš efektivní, a i samotná výroba filtrů může představovat riziko pro životní prostředí. V literatuře je také diskutován odchyt nežádoucích nanočástic olova z prostředí pomocí jiných druhů nanočástic, nicméně potenciální toxicita při interakci s živými organismy není dosud známá a mohlo by dojít k prohloubení rizika [262].

Problém PbNPs v ovzduší můžeme řešit jak na úrovni životního prostředí, tak na úrovni jednotlivých organismů a jejich tkání. V naší minulé studii [179] jsme prokázali změny v expresi vybraných ABC (*ATP Binding Cassette*) transportérů po expozici PbNPs. ABC transportéry jsou transmembránové molekuly nacházející se na plasmatických membránách buněk i membránových organel a v eukaryotických buňkách slouží k exportu molekul. Evolučně jsou velmi konzervované, nalezneme je již u prokaryotických buněk, kde slouží k exportu i importu molekul, nicméně v eukaryotických buňkách tuto schopnost ztratily. Některé studie ale ukazují, že u nižších rostlin a hub existují molekuly podobné ABC transportérům s funkcí importu molekul. U eukaryotických buněk plní funkci importu molekul rodina proteinů SLC (*Solute Carrier Proteins*), která ale dokáže transportovat molekuly i směrem ven. ABC molekuly jsou u lidí exprimovány v buňkách zpracovávajících lipidy a také v nádorových buňkách, kde mohou způsobit rezistenci vůči léčivu (zejména molekuly ABCB1, ABCC1, ABCC3, na jejichž zablokování mnohá léčiva cílí) [263–268].

V rámci projektu „Centrum toxických studií nanočástic“ jsme se v jedné z předchozích studií zabývali spojitostí mezi změnou lipidového metabolismu a molekul ABCA1 a ABCG1 [179]. V současnosti testujeme různé inhibitory vybraných ABC transportérů a jejich potenciální vliv na odlišné typy buněk, přičemž se snažíme hlouběji porozumět problematice eliminace PbNPs a její souvislosti se změnami exprese ABC transportérů. V budoucnu bychom chtěli také aktivovat ABC transportéry a pozorovat v takto ovlivněných buňkách jejich schopnost eliminace PbNPs.

7 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo analyzovat efekt inhalovaných rozpustných a nerozpustných PbNPs na čichový epitel a mozkovou tkáň, tyto výsledky pak porovnat s výsledky *in vitro* experimentu.

- **Inhalované PbNPs poškozují čichový epitel a dokáží se přes něj dostat do mozkové tkáně.** Po 11 týdnech inhalace PbNPs došlo k signifikantnímu poškození čichového epitelu včetně funkce cilií, které přetrvávalo i přes pětítýdenní eliminační období.
 - Analýza TEM (Ústav histologie a embryologie, LF MU) potvrdila cestu inhalovaných PbNPs do mozkové tkáně přes čichový epitel.
- **V mozku jsme determinovali regionálně specifické změny v regulaci a modelaci cytoskeletu související s rozvojem neurodegenerativních onemocnění.**
 - V různých oblastech mozku jsme našli morfologické změny potvrzující negativní efekt inhalovaných PbNPs na mozkovou tkáň.
 - Prokázali jsme disrupci mikrofilament, mikrotubulů, intermediárních filament a asociované signalizace v mozkové tkáni exponované PbNPs.
- **Vliv rozpustných a nerozpustných PbNPs na čichový epitel i mozkovou tkáň byl velmi podobný,** v porovnání s analýzami jiných orgánů v našich předchozích studiích jsou rozdíly mezi efektem rozpustných a nerozpustných PbNPs naprosto minimální.
- **Pětítýdenní eliminační období se ukázalo jako částečně efektivní.** Nalezené morfologické změny a změny v proteinové expresi kandidátních proteinů ve skupinách s eliminačním obdobím byly podobné změnám detekovaným ve skupinách PbONPs/11w a Pb(NO₃)₂NPs/11w. Naopak výsledky analýz genové exprese kandidátních genů ve skupinách s eliminačním obdobím se v mnoha případech hodnotami přibližovaly spíše kontrolní skupině.
- **Kultury trigeminálních ganglií se ukázaly jako vhodný model pro ověření výsledků z *in vivo* experimentu, experimenty potvrdily přímý efekt PbNPs na nervovou tkáň.**
 - Pozorovali jsme změny exprese *Cdc42* po expozici cPbONPs a v rámci 48h experimentu také současně občasně poškození aktinového cytoskeletu.
 - Detekovali jsme signifikantní deregulaci exprese *Mapt* a *Mtor* již po 24 hodinách expozice cPbONPs, nicméně proteinová exprese p-Tau byla beze změny.

V budoucnu bude nezbytné se zaměřit na podporu eliminace inhalovaných PbNPs z tkání. V současné době uvažujeme aktivaci vybraných ABC transportérů, tyto hypotézy aktuálně ověřujeme funkčními experimenty na různých typech plicních buněk. Výsledky této práce jsou součástí připravovaného manuskriptu, který bude odeslán do časopisu Nature (**P6**), dále byly dílčí výsledky projektu prezentovány na několika konferencích (**P5**) a v rámci středoškolských soutěží a vědeckých konferencí (**P4**).

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Umístění čichového epitelu v dutině nosní a jeho napojení na mozek (převzato z [81,82], upraveno).....	23
Obrázek 2. Mikroskopická stavba čichového epitelu.....	24
Obrázek 3. Porovnání struktury mozku myši laboratorní a člověka (histologické fotografie převzaty z [92,93]).....	25
Obrázek 4. Schéma sagitálního řezu mozkiem myši laboratorní (převzato a upraveno dle [95]).....	26
Obrázek 5. Bílá a šedá hmota mozková.....	27
Obrázek 6. Buněčné typy mozkové tkáně (převzato z [100,101], upraveno).....	28
Obrázek 7. Mikroskopická stavba koncového mozku myši laboratorní (převzato z [92]; upraveno).....	29
Obrázek 8. Mikroskopická stavba hipokampu myši laboratorní (převzato z [92], upraveno).....	30
Obrázek 9. Mikroskopická stavba mozečku myši laboratorní (převzato z [92]; upraveno).....	31
Obrázek 10. Schéma experimentálního designu šestitýdenního inhalačního experimentu.....	35
Obrázek 11. Schéma experimentálního designu jedenáctitýdenního inhalačního experimentu.....	36
Obrázek 12. Inhalační komora s inhalačními klecemi (foto: Eva Svozilová, DiS.).....	37
Obrázek 13. Schéma odebraných částí mozku pro analýzu genové exprese.....	38
Obrázek 14. Výsledek barvení Hematoxylinem-Eosinem.....	39
Obrázek 15. Výsledek Nisslova barvení (NTS).....	30
Obrázek 16. Výsledek barvení Luxolovou modří (LB).....	30
Obrázek 17. Výsledek nepřímé trojstupňové IHC metody s využitím avidin-biotinového komplexu....	33
Obrázek 18. Výsledek nepřímé IF metody.....	37
Obrázek 19. Trigeminální ganglia – extrakce pro přípravu primárních buněčných kultur.....	43
Obrázek 20. Příprava primární buněčné kultury trigeminálních ganglií.....	44
Obrázek 21. Experimentální design <i>in vitro</i> experimentu.....	45
Obrázek 22. Výsledek imunocytochemické metody.....	47
Obrázek 23. Poškození čichového epitelu po 11 týdnech inhalace PbNPs a potenciální transport PbNPs do mozkové tkáně.....	52
Obrázek 24. Histopatologická analýza mozkové tkáně exponované rozpustným a nerozpustným PbNPs.....	55
Obrázek 25. Inhalace PbNPs způsobuje regionálně-specifické změny cytoskeletu, jeho regulátorů a asociované signalizace.....	60
Obrázek 26. <i>In vitro</i> experiment potvrdil přímý efekt PbNPs na nervovou tkáň.....	63
Obrázek 27. Prostup inhalovaných PbONPs do mozkové tkáně přes čichový epitel byl prokázán (obrázky TEM převzaty z Ústavu histologie a embryologie, LF MU).....	67
Obrázek 28. Detekované množství olova v mozkové tkáni, plicích a femuru po inhalaci generovaných nanočástic olova.....	68
Obrázek 29. Distribuce olova v mozkové tkáni po inhalaci PbNPs je nerovnoměrná (převzato z Ústavu chemie, PŘF MU – analýza ICP-MS).....	71
Obrázek 30. Vápník a jeho možné souvislosti se signální dráhou PI3K/Akt/mTOR (převzato a upraveno dle [248–257]).....	73
Obrázek S1. Histopatologická analýza čichového epitelu – kontrolní skupina, šestitýdenní experiment.....	102
Obrázek S2. Histopatologická analýza čichového epitelu – PbONPs/6w skupina, šestitýdenní experiment.....	102
Obrázek S3. Histopatologická analýza čichového epitelu – Pb(NO ₃) ₂ NPs skupina, šestitýdenní experiment.....	102

Obrázek S4. Histopatologická analýza čichového epitelu – kontrolní skupina, jedenáctitýdenní experiment.....	103
Obrázek S5. Histopatologická analýza čichového epitelu – PbONPs/11w skupina, jedenáctitýdenní experiment.....	103
Obrázek S6. Histopatologická analýza čichového epitelu – PbONPs/CL skupina, jedenáctitýdenní experiment.....	103
Obrázek S7. Histopatologická analýza čichového epitelu – Pb(NO ₃) ₂ NPs/11w skupina, jedenáctitýdenní experiment.....	104
Obrázek S8. Histopatologická analýza čichového epitelu – Pb(NO ₃) ₂ NPs/CL skupina, jedenáctitýdenní experiment.....	104
Obrázek S9. Analýza reparativních procesů v čichovém epitelu – kontrolní skupina, jedenáctitýdenní experiment.....	105
Obrázek S10. Analýza reparativních procesů v čichovém epitelu – PbONPs/11w skupina, jedenáctitýdenní experiment.....	105
Obrázek S11. Analýza reparativních procesů v čichovém epitelu – PbONPs/CL skupina, jedenáctitýdenní experiment.....	105
Obrázek S12. Analýza reparativních procesů v čichovém epitelu – Pb(NO ₃) ₂ NPs/11w skupina, jedenáctitýdenní experiment.....	106
Obrázek S13. Analýza reparativních procesů v čichovém epitelu – Pb(NO ₃) ₂ NPs/CL skupina, jedenáctitýdenní experiment.....	106
Obrázek S14. Analýza podílu hmotnosti mozku na hmotnosti jedince.....	109
Obrázek S15. Histopatologická analýza hipokampální oblasti – kontrolní skupina, šestitýdenní experiment.....	111
Obrázek S16. Histopatologická analýza hipokampální oblasti – PbONPs/6w skupina, šestitýdenní experiment.....	111
Obrázek S17. Histopatologická analýza hipokampální oblasti – Pb(NO ₃) ₂ NPs/6w skupina, šestitýdenní experiment.....	112
Obrázek S18. Histopatologická analýza hipokampální oblasti – kontrolní skupina, jedenáctitýdenní experiment.....	112
Obrázek S19. Histopatologická analýza hipokampální oblasti – PbONPs/11w skupina, jedenáctitýdenní experiment.....	113
Obrázek S20. Histopatologická analýza hipokampální oblasti – PbONPs/CL skupina, jedenáctitýdenní experiment.....	113
Obrázek S21. Histopatologická analýza hipokampální oblasti – Pb(NO ₃) ₂ NPs/11w skupina, jedenáctitýdenní experiment.....	114
Obrázek S22. Histopatologická analýza hipokampální oblasti – Pb(NO ₃) ₂ NPs/CL skupina, jedenáctitýdenní experiment.....	115
Obrázek S23. Histopatologická analýza oblasti isocortex – kontrolní skupina, šestitýdenní experiment.....	116
Obrázek S24. Histopatologická analýza oblasti isocortex – PbONPs/6w skupina, šestitýdenní experiment.....	116
Obrázek S25. Histopatologická analýza oblasti isocortex – Pb(NO ₃) ₂ NPs/6w skupina, šestitýdenní experiment.....	116
Obrázek S26. Histopatologická analýza oblasti isocortex – kontrolní skupina, jedenáctitýdenní experiment.....	117
Obrázek S27. Histopatologická analýza oblasti isocortex – PbONPs/11w skupina, jedenáctitýdenní experiment.....	117
Obrázek S28. Histopatologická analýza oblasti isocortex – PbONPs/CL skupina, šestitýdenní experiment.....	117

Obrázek S29. Histopatologická analýza oblasti isocortex – Pb(NO ₃) ₂ NPs/11w skupina, šestitýdenní experiment.	118
Obrázek S30. Histopatologická analýza oblasti isocortex – Pb(NO ₃) ₂ NPs/CL skupina, šestitýdenní experiment.	118
Obrázek S31. Histopatologická analýza oblasti mozečku – kontrolní skupina, šestitýdenní experiment.	119
Obrázek S32. Histopatologická analýza oblasti mozečku – PbONPs/6w skupina, šestitýdenní experiment.	119
Obrázek S33. Histopatologická analýza oblasti mozečku – Pb(NO ₃) ₂ NPs/6w skupina, šestitýdenní experiment.	120
Obrázek S34. Histopatologická analýza oblasti mozečku – kontrolní skupina, jedenáctitýdenní experiment.	120
Obrázek S35. Histopatologická analýza oblasti mozečku – PbONPs/11w, jedenáctitýdenní experiment.	121
Obrázek S36. Histopatologická analýza oblasti mozečku – PbONPs/CL, jedenáctitýdenní experiment.	121
Obrázek S37. Histopatologická analýza oblasti mozečku – Pb(NO ₃) ₂ NPs/11w skupina, jedenáctitýdenní experiment.	122
Obrázek S38. Histopatologická analýza oblasti mozečku – Pb(NO ₃) ₂ NPs/CL skupina, jedenáctitýdenní experiment.	122
Obrázek S39. Analýza exprese proteinu ACTB v hipokampální oblasti.	123
Obrázek S40. Analýza exprese proteinu ACTB v oblasti isocortexu.	125
Obrázek S41. Analýza relativní genové exprese <i>Cdc42</i> ve vybraných oblastech mozku.	126
Obrázek S42. Analýza relativní genové exprese vybraných členů PI3K/Akt/mTOR signální dráhy v hipokampální oblasti.	127
Obrázek S43. Analýza relativní genové exprese vybraných členů PI3K/Akt/mTOR signální dráhy v oblasti isocortexu 1.	127
Obrázek S44. Analýza relativní genové exprese <i>Mapt</i> a vybraných členů PI3K/Akt/mTOR signální dráhy v oblasti isocortexu 2.	128
Obrázek S45. Analýza relativní genové exprese <i>Mapt</i> a vybraných členů PI3K/Akt/mTOR signální dráhy v oblasti isocortexu 3.	129
Obrázek S46. Analýza relativní genové exprese <i>Mapt</i> a vybraných členů PI3K/Akt/mTOR signální dráhy v čichovém bulbu.	130
Obrázek S47. Analýza relativní genové exprese <i>Mapt</i> a vybraných členů PI3K/Akt/mTOR signální dráhy v mozečku.	130
Obrázek S48. Analýza relativní genové exprese <i>Mapt</i> a vybraných členů PI3K/Akt/mTOR signální dráhy v oblasti thalamu.	131
Obrázek S49. Detekce proteinu Aktin pomocí metody SDS-PAGE WB v oblastech hipokampu a isocortexu 1.	132
Obrázek S50. Detekce vybraných proteinů v oblastech hipokampu a isocortexu 1 pomocí metody SDS-PAGE WB.	133
Obrázek S51. Analýza exprese 2H3 v hipokampální oblasti.	134
Obrázek S52. Analýza exprese 2H3 v oblasti isocortexu 1.	135

9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Podrobné informace o postupu při detekci 2H3-pozitivních struktur.	33
Tabulka 2. Podrobné informace o postupu při detekci B3T-pozitivních struktur.	33
Tabulka 3. Podrobné informace o postupu při detekci Cytokeratin-pozitivních struktur.	36
Tabulka 4. Podrobné informace o postupu při detekci PCNA-pozitivních struktur.	36
Tabulka 5. Podrobné informace o postupu při detekci Aktin-pozitivních struktur v tkáních.	37
Tabulka 6. Podrobné informace o postupu při detekci proteinů 2H3 pomocí protilátky.	41
Tabulka 7. Podrobné informace o postupu při detekci proteinů Aktin pomocí protilátky.	42
Tabulka 8. Podrobné informace o postupu při detekci proteinů mTOR pomocí protilátky.	42
Tabulka 9. Podrobné informace o postupu při detekci proteinů p-TAU pomocí protilátky.	42
Tabulka 10. Podrobné informace o postupu při detekci proteinů t-TAU pomocí protilátky.	42
Tabulka 11. Podrobné informace o postupu při detekci Aktin-pozitivních struktur v buněčných kulturách.	47
Tabulka 12. Podrobné informace o postupu při detekci Phalloidin-pozitivních struktur v buněčných kulturách.	47
Tabulka 13. Podrobné informace o postupu při detekci NeuroD1-pozitivních struktur v buněčných kulturách.	46
Tabulka 14. Podrobné informace o postupu při detekci Neuropilin1-pozitivních struktur v buněčných kulturách.	46
Tabulka 15. Podrobné informace o postupu při detekci p-TAU-pozitivních struktur v buněčných kulturách.	46
Tabulka 16. Podrobné informace o postupu při detekci t-TAU-pozitivních struktur v buněčných kulturách.	46
Tabulka S1. Charakteristika generovaných nanočástic oxidu olovnatého pro <i>in vivo</i> experiment.	97
Tabulka S2. Charakteristika generovaných nanočástic dusičnanu olovnatého pro <i>in vivo</i> experiment.	97
Tabulka S3. Charakteristika komerčně dostupných nanočástic oxidu olovnatého.	98
Tabulka S4. Přehled provedených histologických analýz na vzorcích čichového epitelu.	107
Tabulka S5. Analýza podílu hmotnosti mozku na hmotnosti jedince - šestitýdenní experiment.	109
Tabulka S6. Analýza podílu hmotnosti mozku na hmotnosti jedince - jedenáctitýdenní experiment.	110
Tabulka S7. Přehled provedených histologických analýz na vzorcích mozku.	136
Tabulka S8. Přehled provedených analýz genové exprese na vzorcích hipokampu.	137
Tabulka S9. Přehled provedených analýz genové exprese v oblasti isocortexu 1.	138
Tabulka S10. Přehled provedených analýz genové exprese v oblasti isocortexu 2.	139
Tabulka S11. Přehled provedených analýz genové exprese v oblasti isocortexu 3.	140
Tabulka S12. Přehled provedených analýz genové exprese v oblasti čichového bulbu.	141
Tabulka S13. Přehled provedených analýz genové exprese v oblasti thalamu.	143
Tabulka S14. Přehled provedených analýz genové exprese v oblasti mozečku.	144
Tabulka S15. Přehled analýz provedených SDS-PAGE WB analýz na vzorcích hipokampu.	145
Tabulka S16. Přehled analýz provedených SDS-PAGE WB analýz na vzorcích isocortexu 1.	145
Tabulka S17. Přehled provedených analýz primárních buněčných kultur.	147

10 SEZNAM PŘÍLOH

P1: Detaily praktické části práce

P2: Přílohy k výsledkům

P3: Seznam použitého materiálu

P4: Středoškolské soutěže a konference

P5: Konferenční abstrakta

P6: Publikace, manuskripty

11 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Dumková J, Smutná T, Vrlíková L, Le Coustumer P, Večeřa Z, Dočekal B, et al. Sub-chronic inhalation of lead oxide nanoparticles revealed their broad distribution and tissue-specific subcellular localization in target organs. *Part Fibre Toxicol* 2017;14:55. <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0236-y>.
- [2] Dumková J, Smutná T, Vrlíková L, Kotasová H, Dočekal B, Čapka L, et al. Variability in the Clearance of Lead Oxide Nanoparticles Is Associated with Alteration of Specific Membrane Transporters. *ACS Nano* 2020;14:3096–120. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b08143>.
- [3] Dumková J, Smutná T, Vrlíková L, Dočekal B, Kristeková D, Večeřa Z, et al. A clearance period after soluble lead nanoparticle inhalation did not ameliorate the negative effects on target tissues due to decreased immune response. *Int J Mol Sci* 2020;21. <https://doi.org/10.3390/ijms21228738>.
- [4] Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* 2019;12:908–31. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>.
- [5] Santhosh PB. Gold nanoparticles: Phospholipid membrane interactions, 2021, p. 173–206. <https://doi.org/10.1016/bs.abl.2021.11.006>.
- [6] Feynman R. There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics. *Caltech's Engineering and Science* 1960;23.
- [7] Freitas RA. What is nanomedicine? *Nanomedicine* 2005;1:2–9. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2004.11.003>.
- [8] Adya AK, Canetta E. Nanotechnology and its applications to animal biotechnology. *Anim Biotechnol*, Elsevier; 2020, p. 309–26. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00014-8>.
- [9] Jeevanandam J, Barhoum A, Chan YS, Dufresne A, Danquah MK. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 2018;9:1050–74. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>.
- [10] Hochella MF, Mogk DW, Ranville J, Allen IC, Luther GW, Marr LC, et al. Natural, incidental, and engineered nanomaterials and their impacts on the Earth system. *Science* (1979) 2019;363. <https://doi.org/10.1126/science.aau8299>.
- [11] Querol X, Alastuey A, Pey J, Viana M, Moreno T, et al. Nanoparticles in the atmosphere. . *Seminario Sem* 2004.
- [12] Schindler M, Santosh M, Dotto G, Silva LFO, Hochella MF. A review on Pb-bearing nanoparticles, particulate matter and colloids released from mining and smelting activities. *Gondwana Research* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.gr.2021.07.011>.
- [13] Rahim M, Rizvi SMD, Iram S, Khan S, Bagga PS, Khan MS. Interaction of green nanoparticles with cells and organs. *Inorganic Frameworks as Smart Nanomedicines*, Elsevier; 2018, p. 185–237. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813661-4.00005-5>.
- [14] Heiligttag FJ, Niederberger M. The fascinating world of nanoparticle research. *Materials Today* 2013;16:262–71. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.07.004>.
- [15] Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CJ, El-Sayed MA. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev* 2012;41:2740–79. <https://doi.org/10.1039/C1CS15237H>.
- [16] Bundschuh M, Filser J, Lüderwald S, McKee MS, Metreveli G, Schaumann GE, et al. Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? *Environ Sci Eur* 2018;30:6. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0132-6>.
- [17] Li Q, Hu X, Bai Y, Alattar M, Ma D, Cao Y, et al. The oxidative damage and inflammatory response induced by lead sulfide nanoparticles in rat lung. *Food and Chemical Toxicology* 2013;60:213–7. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.046>.

- [18] Egbuna C, Parmar VK, Jeevanandam J, Ezzat SM, Patrick-Iwuanyanwu KC, Adetunji CO, et al. Toxicity of Nanoparticles in Biomedical Application: Nanotoxicology. *J Toxicol* 2021;2021:1–21. <https://doi.org/10.1155/2021/9954443>.
- [19] Solomon S. The physical science basis. Contribution of Working Group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. . Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) 2007:996.
- [20] World Health Organization. PREVENTING DISEASE THROUGH HEALTHY ENVIRONMENTS: EXPOSURE TO LEAD: A MAJOR PUBLIC HEALTH CONCERN. World Health Organization 2020.
- [21] Nakajima T, Yoon S-C, Ramanathan V, Shi G-Y, Takemura T, Higurashi A, et al. Overview of the Atmospheric Brown Cloud East Asian Regional Experiment 2005 and a study of the aerosol direct radiative forcing in east Asia. *J Geophys Res* 2007;112:D24S91. <https://doi.org/10.1029/2007JD009009>.
- [22] Saxena P, Srivastava A, Verma S, Shweta, Singh L, Sonwani S. Analysis of Atmospheric Pollutants During Fireworks Festival ‘Diwali’ at a Residential Site Delhi in India, 2020, p. 91–105. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0540-9_4.
- [23] Sonwani S, Saxena P. Water-insoluble carbonaceous components in rainwater over an urban background location in Northern India during pre-monsoon and monsoon seasons. *Environmental Science and Pollution Research* 2021;28:53058–73. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14132-w>.
- [24] Najahi-Missaoui W, Arnold RD, Cummings BS. Safe Nanoparticles: Are We There Yet? *Int J Mol Sci* 2020;22:385. <https://doi.org/10.3390/ijms22010385>.
- [25] Tratnyek PG, Johnson RL. Nanotechnologies for environmental cleanup. *Nano Today* 2006;1:44–8. [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(06\)70048-2](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(06)70048-2).
- [26] Mueller NC, Nowack B. Exposure Modeling of Engineered Nanoparticles in the Environment. *Environ Sci Technol* 2008;42:4447–53. <https://doi.org/10.1021/es7029637>.
- [27] Li JJ, Muralikrishnan S, Ng C-T, Yung L-YL, Bay B-H. Nanoparticle-induced pulmonary toxicity. *Exp Biol Med* 2010;235:1025–33. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.010021>.
- [28] Lebedová J, Nováková Z, Večeřa Z, Buchtová M, Dumková J, Dočekal B, et al. Impact of acute and subchronic inhalation exposure to PbO nanoparticles on mice. *Nanotoxicology* 2018;12:290–304. <https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1438679>.
- [29] Rice KM, Nalabotu SK, Manne NDPK, Kolli MB, Nandyala G, Arvapalli R, et al. Exposure to Cerium Oxide Nanoparticles Is Associated With Activation of Mitogen-activated Protein Kinases Signaling and Apoptosis in Rat Lungs. *Journal of Preventive Medicine and Public Health* 2015;48:132–41. <https://doi.org/10.3961/jpmp.15.006>.
- [30] Sadeghi L, Babadi VY, Espanani HR. Toxic effects of the Fe₂O₃ nanoparticles on the liver and lung tissue. *Bratislava Medical Journal* 2015;116:373–8. https://doi.org/10.4149/BLL_2015_071.
- [31] Sung JH, Ji JH, Park JD, Yoon JU, Kim DS, Jeon KS, et al. Subchronic Inhalation Toxicity of Silver Nanoparticles. *Toxicological Sciences* 2009;108:452–61. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn246>.
- [32] Nishimori H, Kondoh M, Isoda K, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Yagi K. Silica nanoparticles as hepatotoxicants. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009;72:496–501. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.02.005>.
- [33] Sung JH, Ji JH, Park JD, Song MY, Song KS, Ryu HR, et al. Subchronic inhalation toxicity of gold nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 2011;8:16. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-16>.
- [34] Neburkova J, Vavra J, Cigler P. Coating nanodiamonds with biocompatible shells for applications in biology and medicine. *Curr Opin Solid State Mater Sci* 2017;21:43–53. <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2016.05.008>.
- [35] van der Meel R, Lammers T, Hennink WE. Cancer nanomedicines: oversold or underappreciated? *Expert Opin Drug Deliv* 2017;14:1–5. <https://doi.org/10.1080/17425247.2017.1262346>.

- [36] Björnmalm M, Thurecht KJ, Michael M, Scott AM, Caruso F. Bridging Bio–Nano Science and Cancer Nanomedicine. *ACS Nano* 2017;11:9594–613. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b04855>.
- [37] Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* 2007;2:751–60. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.387>.
- [38] Shi J, Kantoff PW, Wooster R, Farokhzad OC. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer* 2017;17:20–37. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.108>.
- [39] Sigel H, Sigel R, editors. *Metal Ions in Biological Systems, Volume 43 - Biogeochemical Cycles of Elements*. CRC Press; 2005. <https://doi.org/10.1201/9780824751999>.
- [40] THE EDITORS OF ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. Lead: chemical element. *Encyclopaedia Britannica*. Encyclopædia Britannica 2020.
- [41] The editors of encyclopedia Britannica. Lead: chemical element. *Encyclopaedia Britannica* . <https://www.britannica.com/science/Lead-chemical-element> 2022.
- [42] Wertime TA. The Beginnings of Metallurgy: A New Look. *Science* (1979) 1973;182:875–87. <https://doi.org/10.1126/science.182.4115.875>.
- [43] Sangster DF, Outridge PM, Davis WJ. Stable lead isotope characteristics of lead ore deposits of environmental significance. *Environmental Reviews* 2000;8:115–47. <https://doi.org/10.1139/a00-008>.
- [44] Hazardous Contaminants Branch OM of E and E. Rationale for the development of soil, drinking water, and air quality criteria for lead. Ontario: 1993.
- [45] Nriagu JO. Global Metal Pollution: Poisoning the Biosphere? *Environment: Science and Policy for Sustainable Development* 1990;32:7–33. <https://doi.org/10.1080/00139157.1990.9929037>.
- [46] Cullen JT, McAlister J. 2. Biogeochemistry of Lead. Its Release to the Environment and Chemical Speciation. *Lead – Its Effects on Environment and Health*, De Gruyter; 2017, p. 21–48. <https://doi.org/10.1515/9783110434330-002>.
- [47] Hse. Control of lead at work (Third edition) - Control of Lead at Work Regulations 2002 Approved Code of Practice and guidance. 2002.
- [48] Rose M, Baxter M, Brereton N, Baskaran C. Dietary exposure to metals and other elements in the 2006 UK Total Diet Study and some trends over the last 30 years. *Food Additives & Contaminants: Part A* 2010;27:1380–404. <https://doi.org/10.1080/19440049.2010.496794>.
- [49] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans., World Health Organization., International Agency for Research on Cancer. *Inorganic and organic lead compounds*. International Agency for Research on Cancer; 2006.
- [50] Nordström S, Beckman L, Nordenson I. Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. V. Spontaneous abortion among female employees and decreased birth weight in their offspring. *Hereditas* 1979;90:291–6.
- [51] Cheng Y, Schwartz J, Sparrow D, Aro A, Weiss ST, Hu H. Bone Lead and Blood Lead Levels in Relation to Baseline Blood Pressure and the Prospective Development of Hypertension The Normative Aging Study. *Am J Epidemiol* 2001;153:164–71. <https://doi.org/10.1093/aje/153.2.164>.
- [52] Rastogi S. Renal effects of environmental and occupational lead exposure. *Indian J Occup Environ Med* 2008;12:103. <https://doi.org/10.4103/0019-5278.44689>.
- [53] Gidlow DA. Lead toxicity. *Occup Med (Chic Ill)* 2015;65:348–56. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqv018>.
- [54] Koo WW, Succop PA, Bornschein RL, Krug-Wispé SK, Steinchen JJ, Tsang RC, et al. Serum vitamin D metabolites and bone mineralization in young children with chronic low to moderate lead exposure. *Pediatrics* 1991;87:680–7.
- [55] Bressler JP, Goldstein GW. Mechanisms of lead neurotoxicity. *Biochem Pharmacol* 1991;41:479–84. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(91\)90617-E](https://doi.org/10.1016/0006-2952(91)90617-E).

- [56] Virgolini MB, Aschner M. Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. *Adv Neurotoxicol*, vol. 5, Elsevier Inc.; 2021, p. 159–213. <https://doi.org/10.1016/bs.ant.2020.11.002>.
- [57] Ramírez Ortega D, González Esquivel DF, Blanco Ayala T, Pineda B, Gómez Manzo S, Marcial Quino J, et al. Cognitive Impairment Induced by Lead Exposure during Lifespan: Mechanisms of Lead Neurotoxicity. *Toxics* 2021;9:23. <https://doi.org/10.3390/toxics9020023>.
- [58] Stollery BT, Banks HA, Broadbent DE, Lee WR. Cognitive functioning in lead workers. *Occup Environ Med* 1989;46:698–707. <https://doi.org/10.1136/oem.46.10.698>.
- [59] Hanninen H, Aitio A, Kovala T, Luukkonen R, Matikainen E, Mannelin T, et al. Occupational exposure to lead and neuropsychological dysfunction. *Occup Environ Med* 1998;55:202–9. <https://doi.org/10.1136/oem.55.3.202>.
- [60] Krieg EF, Chrislip DW, Brightwell WS. A meta-analysis of studies investigating the effects of lead exposure on nerve conduction. *Arch Toxicol* 2008;82:531. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0292-z>.
- [61] Shotyk W, le Roux G. Biogeochemistry and Cycling of Lead, 2005, p. 239–75. <https://doi.org/10.1201/9780824751999.ch10>.
- [62] Hans Wedepohl K. The composition of the continental crust. *Geochim Cosmochim Acta* 1995;59:1217–32. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(95\)00038-2](https://doi.org/10.1016/0016-7037(95)00038-2).
- [63] Degryse P, Alexander Bentley R. Archeological Geochemistry, 2018, p. 642–5. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39312-4_77.
- [64] Casals E, Vázquez-Campos S, Bastús NG, Puntès V. Distribution and potential toxicity of engineered inorganic nanoparticles and carbon nanostructures in biological systems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2008;27:672–83. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.06.004>.
- [65] Oravisjärvi K, Timonen KL, Wiikinkoski T, Ruuskanen AR, Heinänen K, Ruuskanen J. Source contributions to PM_{2.5} particles in the urban air of a town situated close to a steel works. *Atmos Environ* 2003;37:1013–22. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(02\)01048-8](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(02)01048-8).
- [66] Sammut ML, Noack Y, Rose J, Hazemann JL, Proux O, Depoux M, et al. Speciation of Cd and Pb in dust emitted from sinter plant. *Chemosphere* 2010;78:445–50. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.039>.
- [67] Schuetz L. Atmospheric Mineral Dust - Properties and Source Markers. *Paleoclimatology and Paleometeorology: Modern and Past Patterns of Global Atmospheric Transport*, Dordrecht: Springer Netherlands; 1989, p. 359–83. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0995-3_15.
- [68] Mukhtar A, Limbeck A. Recent developments in assessment of bio-accessible trace metal fractions in airborne particulate matter: A review. *Anal Chim Acta* 2013;774:11–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.02.008>.
- [69] Manousakas M, Diapouli E, Papaefthymiou H, Migliori A, Karydas AG, Padilla-Alvarez R, et al. Source apportionment by PMF on elemental concentrations obtained by PIXE analysis of PM₁₀ samples collected at the vicinity of lignite power plants and mines in Megalopolis, Greece. *Nucl Instrum Methods Phys Res B* 2015;349:114–24. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2015.02.037>.
- [70] Coufalík P, Mikuška P, Matoušek T, Večeřa Z. Determination of the bioaccessible fraction of metals in urban aerosol using simulated lung fluids. *Atmos Environ* 2016;140:469–75. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2016.06.031>.
- [71] Querol X, Viana M, Alastuey A, Amato F, Moreno T, Castillo S, et al. Source origin of trace elements in PM from regional background, urban and industrial sites of Spain. *Atmos Environ* 2007;41:7219–31. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.05.022>.
- [72] Tan MG, Zhang GL, Li XL, Zhang YX, Yue WS, Chen JM, et al. Comprehensive Study of Lead Pollution in Shanghai by Multiple Techniques. *Anal Chem* 2006;78:8044–50. <https://doi.org/10.1021/ac061365q>.
- [73] Nováková Z. Toxicita nanočástic olova. Diplomová práce. Masaryk University, 2015.

- [74] Cigánková H, Mikuška P, Hegrová J, Pokorná P, Schwarz J, Krajčovič J. Seasonal Variation and Sources of Elements in Urban Submicron and Fine Aerosol in Brno, Czech Republic. *Aerosol Air Qual Res* 2021;21:200556. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2020.09.0556>.
- [75] Mikuška P, Vojtěšek M, Křůmal K, Mikušková-Čampulová M, Michálek J, Večeřa Z. Characterization and Source Identification of Elements and Water-Soluble Ions in Submicrometre Aerosols in Brno and Šlapanice (Czech Republic). *Atmosphere (Basel)* 2020;11:688. <https://doi.org/10.3390/atmos11070688>.
- [76] Sonmez MS, Kumar RV. Leaching of waste battery paste components. Part 2: Leaching and desulphurisation of PbSO₄ by citric acid and sodium citrate solution. *Hydrometallurgy* 2009;95:82–6. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.04.019>.
- [77] Šljukić B, Banks CE, Crossley A, Compton RG. Lead(IV) oxide–graphite composite electrodes: Application to sensing of ammonia, nitrite and phenols. *Anal Chim Acta* 2007;587:240–6. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.01.041>.
- [78] CHEMEUROPE.COM. Lead(II) nitrate. https://www.chemeurope.com/en/encyclopedia/Lead%28II%29_nitrate.html 2020.
- [79] McInnes E. The respiratory system. *A Practical Guide to the Histology of the Mouse*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013, p. 179–94. <https://doi.org/10.1002/9781118789568.ch11>.
- [80] Balko J, Tonar Z, Varga I, Hudák R et al. *Memorix histologie*. 2nd ed. Praha: Triton; 2017.
- [81] Moon C, Jun Yoo S, Soo Han H. Smell. *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, Elsevier; 2014, p. 216–20. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385157-4.00072-5>.
- [82] Harkema JR. *Comparative Anatomy and Epithelial Cell Biology of the Nose. Comparative Biology of the Normal Lung*, Elsevier; 2015, p. 7–19. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404577-4.00002-3>.
- [83] Harkema JR, Carey SA, Wagner JG, Dintzis SM, Liggitt D. *Nose, Sinus, Pharynx, and Larynx. Comparative Anatomy and Histology*, Elsevier; 2012, p. 71–94. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381361-9.00006-8>.
- [84] Navarro M, Ruberte J, Carretero A. *Respiratory apparatus. Morphological Mouse Phenotyping*, Elsevier; 2017, p. 147–78. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812972-2.50006-4>.
- [85] Miwa T, Furukawa M, Tsukatani T, Costanzo RM, DiNardo LJ, Reiter ER. Impact of Olfactory Impairment on Quality of Life and Disability. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;127:497. <https://doi.org/10.1001/archotol.127.5.497>.
- [86] Santos D v., Reiter ER, DiNardo LJ, Costanzo RM. Hazardous Events Associated With Impaired Olfactory Function. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:317. <https://doi.org/10.1001/archotol.130.3.317>.
- [87] Kern DW, Wroblewski KE, Schumm LP, Pinto JM, Chen RC, McClintock MK. Olfactory Function in Wave 2 of the National Social Life, Health, and Aging Project. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci* 2014;69:S134–43. <https://doi.org/10.1093/geronb/gbu093>.
- [88] Pinto JM, Wroblewski KE, Kern DW, Schumm LP, McClintock MK. Olfactory Dysfunction Predicts 5-Year Mortality in Older Adults. *PLoS One* 2014;9:e107541. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107541>.
- [89] Hoffman HJ, Rawal S, Li C-M, Duffy VB. New chemosensory component in the U.S. National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES): first-year results for measured olfactory dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord* 2016;17:221–40. <https://doi.org/10.1007/s11154-016-9364-1>.
- [90] Goncalves S, Goldstein BJ. Pathophysiology of Olfactory Disorders and Potential Treatment Strategies. *Curr Otorhinolaryngol Rep* 2016;4:115–21. <https://doi.org/10.1007/s40136-016-0113-5>.
- [91] Snyder JM, Hagan CE, Bolon B, Keene CD. *Nervous System. Comparative Anatomy and Histology*, Elsevier; 2018, p. 403–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00020-8>.
- [92] The Allen Institute for Brain Science. *Allen Brain Reference Atlases* 2022.

- [93] Striedter GF. Zoomable Human Brain Atlas. Oxford University Press 2015.
- [94] Mazzasette WJ, Jenks C, Nguyen K-L. Brain- Diencephalon, Brainstem, Cerebellum and Limbic System. <https://MedLibretextsOrg/@go/Page/27886> 2021.
- [95] Ruberte J, Navarro M, Carretero A, König HE, Puelles L. Nervous System. Morphological Mouse Phenotyping, Elsevier; 2017, p. 377–474. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812972-2.50013-1>.
- [96] Farooqui AA. Classification and Molecular Aspects of Neurotraumatic Diseases. Ischemic and Traumatic Brain and Spinal Cord Injuries, Elsevier; 2018, p. 1–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813596-9.00001-8>.
- [97] AVILA J, LUCAS JJ, PÉREZ M, HERNÁNDEZ F. Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions. *Physiol Rev* 2004;84:361–84. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2003>.
- [98] Roulois A. Nervous system. In: Scudamore CL, editor. *A Practical Guide to the Histology of the Mouse*, Hoboken, New Jersey, USA: Wiley-Blackwell; 2014, p. 123–48.
- [99] Zamproni LN, Mundim MTV v., Porcionatto MA. Neurorepair and Regeneration of the Brain: A Decade of Bioscaffolds and Engineered Microtissue. *Front Cell Dev Biol* 2021;9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.649891>.
- [100] Agamoli D. Neuropathology Chapter 1 APPLIED NEUROCYTOLOGY AND BASIC REACTIONS. <https://Neuropathology-WebOrg/Chapter1/Chapter1aNeuronsHtml> 2022.
- [101] Little P, Rao D. National Toxicology Atlas: Nonneoplastic Lesion Atlas - Brain. <https://NtpNiehsNihGov/Nnl/Nervous/Brain/Microgliosis/IndexHtm> 2022.
- [102] James Knierim PhD. 5.1 Overview: Functions of the Cerebellum. <https://NbaUthTmcEdu/Neuroscience/m/S3/Chapter05Html> 2020.
- [103] Tang W, Fan W, Lau J, Deng L, Shen Z, Chen X. Emerging blood–brain-barrier-crossing nanotechnology for brain cancer theranostics. *Chem Soc Rev* 2019;48:2967–3014. <https://doi.org/10.1039/C8CS00805A>.
- [104] Chauhan NB, Mehla J. Ameliorative Effects of Nutraceuticals in Neurological Disorders. *Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease*, Elsevier; 2015, p. 245–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411462-3.00027-8>.
- [105] Bozyczko-Coyne D, Williams M. Neurodegeneration. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, Elsevier; 2007, p. 193–228. <https://doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00168-1>.
- [106] Soto C, Pritzkow S. Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* 2018;21:1332–40. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0235-9>.
- [107] Pîrșcoveanu DFV, Pirici I, Tudorică V, Bălșeanu TA, Albu VC, Bondari S, et al. Tau protein in neurodegenerative diseases - a review. *Rom J Morphol Embryol* 2017;58:1141–50.
- [108] Arendt T, Stieler JT, Holzer M. Tau and tauopathies. *Brain Res Bull* 2016;126:238–92. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.018>.
- [109] Chang C-W, Shao E, Mucke L. Tau: Enabler of diverse brain disorders and target of rapidly evolving therapeutic strategies. *Science (1979)* 2021;371. <https://doi.org/10.1126/science.abb8255>.
- [110] MESCHER AL, JUNQUEIRA LCU. *Histology and Its Methods of Study. Junqueira's basic histology: text and atlas. 13th ed., New York City: McGraw Hill Medical; 2013, p. 5–17.*
- [111] Cooper JA, Mintz BR, Palumbo SL, Li W-J. Assays for determining cell differentiation in biomaterials. *Characterization of Biomaterials*, Elsevier; 2013, p. 101–37. <https://doi.org/10.1533/9780857093684.101>.
- [112] Berry R, Church CD, Gericke MT, Jeffery E, Colman L, Rodeheffer MS. *Imaging of Adipose Tissue*, 2014, p. 47–73. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411619-1.00004-5>.
- [113] Angevine JB. Nervous System, Organization of. *Encyclopedia of the Human Brain*, Elsevier; 2002, p. 313–71. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227210-2/00235-1>.

- [114] Flanagan M, Sonnen JA, Keene CD, Hevner RF, Montine TJ. Molecular basis of diseases of the nervous system. *Essential Concepts in Molecular Pathology*, Elsevier; 2020, p. 509–48. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813257-9.00029-2>.
- [115] Dziewulska D, Gogol A, Gogol P, Rafalowska J. Enlargement of the Nissl substance as a manifestation of early damage to spinal cord motoneurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neuropathol* 2013;32:480–5. <https://doi.org/10.5414/NP300623>.
- [116] Greaves P. Nervous System and Special Sense Organs. *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies*, Elsevier; 2012, p. 799–866. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53856-7.00014-2>.
- [117] Liberski PP, Ironside JW. Prion Diseases. *Neurobiology of Brain Disorders*, Elsevier; 2015, p. 356–74. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398270-4.00023-9>.
- [118] Lindberg MR, Lamps LW. Central Nervous System. *Diagnostic Pathology: Normal Histology*, Elsevier; 2018, p. 108–11. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-54803-8.50029-2>.
- [119] GOLDBLUM JR. Demyelinating Diseases. In: ROSAI J, editor. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. 10th ed., Missouri, Mosby: Maryland Heights; 2011, p. 2322–3.
- [120] Lewis TL, Roth KA. Immunohistochemical Detection Methods. *Pathobiology of Human Disease*, Elsevier; 2014, p. 3829–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.07405-0>.
- [121] Büyükköroğlu G, Dora DD, Özdemir F, Hızal C. Techniques for Protein Analysis. *Omics Technologies and Bio-Engineering*, Elsevier; 2018, p. 317–51. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00015-4>.
- [122] Beranova M, Tonar Z. Principy a příklady imunohistochemie: Příručka pro studenty 2002.
- [123] Yuan A, Rao M v., Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments at a glance. *J Cell Sci* 2012;125:3257–63. <https://doi.org/10.1242/jcs.104729>.
- [124] Perrot R, Eyer J. Neuronal intermediate filaments and neurodegenerative disorders. *Brain Res Bull* 2009;80:282–95. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.06.004>.
- [125] Hasegawa S, Miyoshi Y, Egawa C, Ishitobi M, Taguchi T, Tamaki Y, et al. Prediction of response to docetaxel by quantitative analysis of class I and III beta-tubulin isotype mRNA expression in human breast cancers. *Clin Cancer Res* 2003;9:2992–7.
- [126] Jirásek T, Písaríková E, Viklický V, Mandys V. Expression of class III beta-tubulin in malignant epithelial tumours: an immunohistochemical study using TU-20 and TuJ-1 antibodies. *Folia Histochem Cytobiol* 2007;45:41–5.
- [127] Katsetos CD, Herman MM, Mörk SJ. Class III β -tubulin in human development and cancer. *Cell Motil Cytoskeleton* 2003;55:77–96. <https://doi.org/10.1002/cm.10116>.
- [128] Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *The Cytoskeleton*. Mol Biol Cell. 4th Edition, New York: Garland Science; 2002, p. 898–916.
- [129] Franke WW, Schmid E, Osborn M, Weber K. Intermediate-sized filaments of human endothelial cells. *Journal of Cell Biology* 1979;81:570–80. <https://doi.org/10.1083/jcb.81.3.570>.
- [130] Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982;31:11–24. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90400-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90400-7).
- [131] Prelich G, Stillman B. Coordinated leading and lagging strand synthesis during SV40 DNA replication in vitro requires PCNA. *Cell* 1988;53:117–26. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90493-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90493-X).
- [132] Bravo R, Celis JE. A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *Journal of Cell Biology* 1980;84:795–802. <https://doi.org/10.1083/jcb.84.3.795>.
- [133] Celis J, Celis A. Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1985;82:3262–6.
- [134] Joshi S, Yu D. Immunofluorescence. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, Elsevier; 2017, p. 135–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00008-4>.

- [135] Sadeghalvad M, Rezaei N. Introduction on Laboratory Tests for Diagnosis of Infectious Diseases and Immunological Disorders. *Encyclopedia of Infection and Immunity*, Elsevier; 2022, p. 1–18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00087-2>.
- [136] SHAWLOT W, DENG JM, FOHN LE, BEHRINGER RR. Restricted beta-galactosidase expression of a hygromycin-lacZ gene targeted to the beta-actin locus and embryonic lethality of beta-actin mutant mice. *Transgenic Res* 1998;7:95–103. <https://doi.org/10.1023/A:1008816308171>.
- [137] Cytoskeleton. *Medical Cell Biology*, Elsevier; 2008, p. 59–100. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370458-0.50008-6>.
- [138] Maddocks S, Jenkins R. Quantitative PCR. *Understanding PCR*, Elsevier; 2017, p. 45–52. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802683-0.00004-6>.
- [139] Hoy MA. DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction. *Insect Molecular Genetics*, Elsevier; 2013, p. 307–72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415874-0.00008-1>.
- [140] Kramer K. Bioassays for Estrogenic and Androgenic Effects of Water Constituents. *Treatise on Water Science*, Elsevier; 2011, p. 191–219. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53199-5.00057-9>.
- [141] Pacini F, Cantara S. Molecular Diagnosis of Thyroid Cancer. *Genetic Diagnosis of Endocrine Disorders*, Elsevier; 2016, p. 153–62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800892-8.00010-5>.
- [142] von Cheong E, O’Tuathaigh CMP. Modeling Gene–Gene Interactions in Schizophrenia, 2016, p. 327–43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800981-9.00019-5>.
- [143] Etienne-Manneville S. Cdc42 - the centre of polarity. *J Cell Sci* 2004;117:1291–300. <https://doi.org/10.1242/jcs.01115>.
- [144] Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:690–701. <https://doi.org/10.1038/nrm2476>.
- [145] Heasman SJ, Carlin LM, Cox S, Ng T, Ridley AJ. Coordinated RhoA signaling at the leading edge and uropod is required for T cell transendothelial migration. *Journal of Cell Biology* 2010;190:553–63. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002067>.
- [146] Machacek M, Hodgson L, Welch C, Elliott H, Pertz O, Nalbant P, et al. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* 2009;461:99–103. <https://doi.org/10.1038/nature08242>.
- [147] Sikand K, Singh J, Ebron JS, Shukla GC. Housekeeping Gene Selection Advisory: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) and β -Actin Are Targets of miR-644a. *PLoS One* 2012;7:e47510. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047510>.
- [148] Hall MN. mTOR—What Does It Do? *Transplant Proc* 2008;40:S5–8. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.10.009>.
- [149] Switon K, Kotulska K, Janusz-Kaminska A, Zmorzynska J, Jaworski J. Molecular neurobiology of mTOR. *Neuroscience* 2017;341:112–53. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.11.017>.
- [150] Larsen JE, Govindan R, Minna JD. Molecular Basis of Lung Cancer. *The Molecular Basis of Cancer*, Elsevier; 2015, p. 475–490.e1. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4066-6.00032-9>.
- [151] Kaye FJ. Lung Cancer: Molecular and Cellular Abnormalities. *Encyclopedia of Cancer*, Elsevier; 2002, p. 45–50. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227555-1/00126-X>.
- [152] Trotman LC. PTEN. *Handbook of Cell Signaling*, Elsevier; 2010, p. 849–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374145-5.00104-2>.
- [153] Federico C, Bruno F, Sturiale V, D’Amico AG, Maugeri G, D’Agata V, et al. Human nuclear tau and aging. *Factors Affecting Neurological Aging*, Elsevier; 2021, p. 71–81. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817990-1.00007-X>.
- [154] Noble W, Hanger DP, Miller CCJ, Lovestone S. The Importance of Tau Phosphorylation for Neurodegenerative Diseases. *Front Neurol* 2013;4. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00083>.

- [155] Bartolome A, Guillén C. Role of the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Complexes in Pancreatic β -Cell Mass Regulation, 2014, p. 425–69. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800174-5.00017-X>.
- [156] Steagall WK, Glasgow CG, Pacheco-Rodriguez G, Moss J. Lymphangioliomyomatosis (LAM). *Molecules to Medicine with mTOR*, Elsevier; 2016, p. 397–415. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802733-2.00021-9>.
- [157] Al-Tubuly AA. SDS-PAGE and Western Blotting, 2000, p. 391–405. <https://doi.org/10.1385/1-59259-076-4:391>.
- [158] Yang P-C, Mahmood T. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 2012;4:429. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>.
- [159] Yang P-C, Mahmood T. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 2012;4:429. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>.
- [160] Davis AR, Almarzouqi SJ, Morgan ML, Lee AG. Trigeminal Ganglion (Gasserian/Semilunar Ganglion). *Encyclopedia of Ophthalmology*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018, p. 1856–1856. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69000-9_1233.
- [161] Streit A. Sensory Placode Formation in Vertebrates. *Reference Module in Life Sciences*, Elsevier; 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.90752-0>.
- [162] Aziz M ben, Cascella M, Monaco F, Khalife M, di Napoli R. Trigeminal Neuralgia. *Comprehensive Pharmacology*, Elsevier; 2022, p. 139–48. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820472-6.00180-8>.
- [163] Messlinger K, Russo AF. Current understanding of trigeminal ganglion structure and function in headache. *Cephalalgia* 2019;39:1661–74. <https://doi.org/10.1177/0333102418786261>.
- [164] Malin SA, Davis BM, Molliver DC. Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nat Protoc* 2007;2:152–60. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.461>.
- [165] Phalloidin Conjugates for Actin Staining. ThermoFisher Scientific 2022.
- [166] Kim E. Postsynaptic Development: Neuronal Molecular Scaffolds. *Encyclopedia of Neuroscience*, Elsevier; 2009, p. 817–24. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00360-0>.
- [167] Tutukova S, Tarabykin V, Hernandez-Miranda LR. The Role of NeuroD Genes in Brain Development, Function, and Disease. *Front Mol Neurosci* 2021;14. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.662774>.
- [168] Guo Z, Zhang L, Wu Z, Chen Y, Wang F, Chen G. In Vivo Direct Reprogramming of Reactive Glial Cells into Functional Neurons after Brain Injury and in an Alzheimer’s Disease Model. *Cell Stem Cell* 2014;14:188–202. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.12.001>.
- [169] Tata M, Tillo M, Ruhrberg C. Neuropilins in Development and Disease of the Nervous System. *Neural Surface Antigens*, Elsevier; 2015, p. 65–75. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800781-5.00006-2>.
- [170] Garg RK, Malhotra HS, Kumar N. Pathophysiology of Acute Disseminated Encephalomyelitis. *Multiple Sclerosis*, Elsevier; 2016, p. 201–48. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800763-1.00010-5>.
- [171] Hu B, Zhang J, Gong M, Deng Y, Cao Y, Xiang Y, et al. Research Progress of Olfactory Nerve Regeneration Mechanism and Olfactory Training. *Ther Clin Risk Manag* 2022;Volume 18:185–95. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S354695>.
- [172] Holbrook EH, Wu E, Curry WT, Lin DT, Schwob JE. Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue. *Laryngoscope* 2011;121:1687–701. <https://doi.org/10.1002/lary.21856>.
- [173] Carter LA. Olfactory Horizontal Basal Cells Demonstrate a Conserved Multipotent Progenitor Phenotype. *Journal of Neuroscience* 2004;24:5670–83. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0330-04.2004>.

- [174] Kam JWK, Raja R, Cloutier J. Cellular and molecular mechanisms regulating embryonic neurogenesis in the rodent olfactory epithelium. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2014;37:76–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.06.017>.
- [175] Schwob JE, Jang W, Holbrook EH, Lin B, Herrick DB, Peterson JN, et al. Stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: Taking poietic license. *Journal of Comparative Neurology* 2017;525:1034–54. <https://doi.org/10.1002/cne.24105>.
- [176] Borgmann-Winter K, Willard SL, Sinclair D, Mirza N, Turetsky B, Berretta S, et al. Translational potential of olfactory mucosa for the study of neuropsychiatric illness. *Transl Psychiatry* 2015;5:e527–e527. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.141>.
- [177] Cersosimo MG, Benarroch EE, Raina GB. Lewy bodies in the olfactory system and the hypothalamus, 2021, p. 235–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819973-2.00016-2>.
- [178] Dumková J, Smutná T, Vrlíková L, Dočekal B, Kristeková D, Večeřa Z, et al. A Clearance Period after Soluble Lead Nanoparticle Inhalation Did Not Ameliorate the Negative Effects on Target Tissues Due to Decreased Immune Response. *Int J Mol Sci* 2020;21:8738. <https://doi.org/10.3390/ijms21228738>.
- [179] Smutná T, Dumková J, Kristeková D, Laštovičková M, Jedličková A, Vrlíková L, et al. Macrophage-mediated tissue response evoked by subchronic inhalation of lead oxide nanoparticles is associated with the alteration of phospholipases C and cholesterol transporters. *Part Fibre Toxicol* 2022;19:52. <https://doi.org/10.1186/s12989-022-00494-7>.
- [180] Lidsky TI, Schneider JS. Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. *Brain* 2003;126:5–19. <https://doi.org/10.1093/brain/awg014>.
- [181] Prüst M, Meijer J, Westerink RHS. The plastic brain: neurotoxicity of micro- and nanoplastics. *Part Fibre Toxicol* 2020;17:24. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00358-y>.
- [182] Sapolsky RM. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biol Psychiatry* 2000;48:755–65. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)00971-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)00971-9).
- [183] Heimfarth L, Delgado J, Mignori MR, Gelain DP, Moreira JCF, Pessoa-Pureur R. Developmental neurotoxicity of the hippocampus following in utero exposure to methylmercury: impairment in cell signaling. *Arch Toxicol* 2018;92:513–27. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2042-6>.
- [184] Palomero-Gallagher N, Zilles K. *Isocortex. The Rat Nervous System*, Elsevier; 2015, p. 601–25. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374245-2.00022-X>.
- [185] Wilkinson JL. *Cerebellum. Neuroanatomy for Medical Students*, Elsevier; 1992, p. 150–63. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7506-1447-4.50011-6>.
- [186] Hall A. Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans* 2012;40:1378–82. <https://doi.org/10.1042/BST20120103>.
- [187] Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992;70:389–99. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90163-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90163-7).
- [188] Nobes CD, Hall A. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 1995;81:53–62. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90370-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90370-4).
- [189] Tapon N. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:86–92. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80156-1](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80156-1).
- [190] Lash AE, Tolstoshev CM, Wagner L, Schuler GD, Strausberg RL, Riggins GJ, et al. SAGEmap: A Public Gene Expression Resource. *Genome Res* 2000;10:1051–60. <https://doi.org/10.1101/gr.10.7.1051>.
- [191] van Hengel J, D’Hooge P, Hooghe B, Wu X, Libbrecht L, de Vos R, et al. Continuous Cell Injury Promotes Hepatic Tumorigenesis in Cdc42-Deficient Mouse Liver. *Gastroenterology* 2008;134:781–92. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.01.002>.

- [192] Goedert M, Spillantini MG. A Century of Alzheimer's Disease. *Science* (1979) 2006;314:777–81. <https://doi.org/10.1126/science.1132814>.
- [193] Geraldo S, Gordon-Weeks PR. Cytoskeletal dynamics in growth-cone steering. *J Cell Sci* 2009;122:3595–604. <https://doi.org/10.1242/jcs.042309>.
- [194] Hoogenraad CC, Bradke F. Control of neuronal polarity and plasticity – a renaissance for microtubules? *Trends Cell Biol* 2009;19:669–76. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.08.006>.
- [195] Brandt R, Lee G. The Balance Between ? Protein's Microtubule Growth and Nucleation Activities: Implications for the Formation of Axonal Microtubules. *J Neurochem* 1993;61:997–1005. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03613.x>.
- [196] Griffith LM, Pollard TD. The interaction of actin filaments with microtubules and microtubule-associated proteins. *Journal of Biological Chemistry* 1982;257:9143–51. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)34254-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)34254-6).
- [197] Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1975;72:1858–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.5.1858>.
- [198] Rodriguez OC, Schaefer AW, Mandato CA, Forscher P, Bement WM, Waterman-Storer CM. Conserved microtubule–actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol* 2003;5:599–609. <https://doi.org/10.1038/ncb0703-599>.
- [199] Terracciano LM, Piscuoglio S, Ng CKY. Hepatocellular Carcinoma: Pathology and Genetics. Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier; 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65261-3>.
- [200] Guo H, Xie T, Liu H. Notch in Human Cancers—A Complex Tale. *Comprehensive Pharmacology*, Elsevier; 2022, p. 329–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820472-6.00096-7>.
- [201] Boggess JF, Kilgore JE. Uterine Cancer. *Abeloff's Clinical Oncology*, Elsevier; 2014, p. 1575–1591.e4. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2865-7.00088-6>.
- [202] Previs RA, Mills GB, Westin SN. Novel Therapeutic Approaches and Targets for Ovarian Cancer. *The Ovary*, Elsevier; 2019, p. 547–74. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813209-8.00034-0>.
- [203] Gorkhali R, Huang K, Kirberger M, Yang JJ. Defining potential roles of Pb²⁺ in neurotoxicity from a calciomics approach. *Metallomics* 2016;8:563–78. <https://doi.org/10.1039/C6MT00038J>.
- [204] Miura N, Ohtani K, Hasegawa T, Yoshioka H, Hwang G-W. Biphasic adverse effect of titanium nanoparticles on testicular function in mice. *Sci Rep* 2019;9:14373. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50741-9>.
- [205] Lasley SM. Rat Hippocampal Glutamate and GABA Release Exhibit Biphasic Effects as a Function of Chronic Lead Exposure Level. *Toxicological Sciences* 2002;66:139–47. <https://doi.org/10.1093/toxsci/66.1.139>.
- [206] Missaoui WN, Arnold RD, Cummings BS. Toxicological status of nanoparticles: What we know and what we don't know. *Chem Biol Interact* 2018;295:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.07.015>.
- [207] Charlet L, Chapron Y, Faller P, Kirsch R, Stone AT, Baveye PC. Neurodegenerative diseases and exposure to the environmental metals Mn, Pb, and Hg. *Coord Chem Rev* 2012;256:2147–63. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.05.012>.
- [208] van Borm W, Wouters L, van Grieken R, Adams F. Lead particles in an urban atmosphere: An individual particle approach. *Science of The Total Environment* 1990;90:55–66. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(90\)90185-W](https://doi.org/10.1016/0048-9697(90)90185-W).
- [209] Zhang R, Wilson VL, Hou A, Meng G. Source of lead pollution, its influence on publichealth and the countermeasures. *International Journal of Health, Animal Science and Food Safety* 2015;2:18–31.

- [210] Sobanska S, Ricq N, Laboudigue A, Guillermo R, Brémard C, Laureyns J, et al. Microchemical Investigations of Dust Emitted by a Lead Smelter. *Environ Sci Technol* 1999;33:1334–9. <https://doi.org/10.1021/es9805270>.
- [211] Jacobsen NR, Stoeger T, van den Brule S, Saber AT, Beyerle A, Vietti G, et al. Acute and subacute pulmonary toxicity and mortality in mice after intratracheal instillation of ZnO nanoparticles in three laboratories. *Food and Chemical Toxicology* 2015;85:84–95. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.008>.
- [212] Park E-J, Kim H, Kim Y, Park K. Intratracheal instillation of platinum nanoparticles may induce inflammatory responses in mice. *Arch Pharm Res* 2010;33:727–35. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-0512-y>.
- [213] Wang P, Zhang L, Liao Y, Du J, Xu M, Zhao W, et al. Effect of Intratracheal Instillation of ZnO Nanoparticles on Acute Lung Inflammation Induced by Lipopolysaccharides in Mice. *Toxicological Sciences* 2020;173:373–86. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz234>.
- [214] Minigaliyeva IA, Sutunkova MP, Gurvich VB, Bushueva T v., Klinova S v., Solovyeva SN, et al. An overview of experiments with lead-containing nanoparticles performed by the Ekaterinburg nanotoxicological research team. *Nanotoxicology* 2020;14:788–806. <https://doi.org/10.1080/17435390.2020.1762132>.
- [215] McClements DJ, Xiao H. Is nano safe in foods? Establishing the factors impacting the gastrointestinal fate and toxicity of organic and inorganic food-grade nanoparticles. *NPJ Sci Food* 2017;1:6. <https://doi.org/10.1038/s41538-017-0005-1>.
- [216] Lee J, Freeman JL. Zebrafish as a model for investigating developmental lead (Pb) neurotoxicity as a risk factor in adult neurodegenerative disease: A mini-review. *Neurotoxicology* 2014;43:57–64. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.03.008>.
- [217] Ta LE, Espeset L, Podratz J, Windebank AJ. Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum–DNA binding. *Neurotoxicology* 2006;27:992–1002. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2006.04.010>.
- [218] Barbosa DJ, Capela JP, de Lourdes Bastos M, Carvalho F. In vitro models for neurotoxicology research. *Toxicol Res (Camb)* 2015;4:801–42. <https://doi.org/10.1039/C4TX00043A>.
- [219] Atterwill CK. Neurotoxicity in vitro: Model systems and practical applications. *Comparative studies with the cholinergic neurotoxin in primary brain cultures and in rabbit retina in vivo*. *Toxicology in Vitro* 1990;4:346–55. [https://doi.org/10.1016/0887-2333\(90\)90078-8](https://doi.org/10.1016/0887-2333(90)90078-8).
- [220] Reuben A. Childhood Lead Exposure and Adult Neurodegenerative Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 2018;64:17–42. <https://doi.org/10.3233/JAD-180267>.
- [221] Adekomi DA, Adewole OS, Tijani AA, Adeniyi TD. Lead induces inflammation and neurodegenerative changes in the rat medial prefrontal cortex. *Anatomy* 2017;11:79–86. <https://doi.org/10.2399/ana.17.015>.
- [222] Wu J, Ding T, Sun J. Neurotoxic potential of iron oxide nanoparticles in the rat brain striatum and hippocampus. *Neurotoxicology* 2013;34:243–53. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.09.006>.
- [223] Naqvi S, Panghal A, Flora SJS. Nanotechnology: A Promising Approach for Delivery of Neuroprotective Drugs. *Front Neurosci* 2020;14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00494>.
- [224] Rahman MF, Wang J, Patterson TA, Saini UT, Robinson BL, Newport GD, et al. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles☆. *Toxicol Lett* 2009;187:15–21. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.01.020>.
- [225] Long TC, Tajuba J, Sama P, Saleh N, Swartz C, Parker J, et al. Nanosize Titanium Dioxide Stimulates Reactive Oxygen Species in Brain Microglia and Damages Neurons *in Vitro*. *Environ Health Perspect* 2007;115:1631–7. <https://doi.org/10.1289/ehp.10216>.
- [226] Song B, Zhang Y, Liu J, Feng X, Zhou T, Shao L. Unraveling the neurotoxicity of titanium dioxide nanoparticles: focusing on molecular mechanisms. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 2016;7:645–54. <https://doi.org/10.3762/bjnano.7.57>.

- [227] Hou J, Wang L, Wang C, Zhang S, Liu H, Li S, et al. Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. *Journal of Environmental Sciences* 2019;75:40–53. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.06.010>.
- [228] Valdíglesias V, Fernández-Bertólez N, Kiliç G, Costa C, Costa S, Fraga S, et al. Are iron oxide nanoparticles safe? Current knowledge and future perspectives. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2016;38:53–63. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.03.017>.
- [229] Yarjanli Z, Ghaedi K, Esmaeili A, Rahgozar S, Zarrabi A. Iron oxide nanoparticles may damage to the neural tissue through iron accumulation, oxidative stress, and protein aggregation. *BMC Neurosci* 2017;18:51. <https://doi.org/10.1186/s12868-017-0369-9>.
- [230] You R, Ho Y-S, Hung CH-L, Liu Y, Huang C-X, Chan H-N, et al. Silica nanoparticles induce neurodegeneration-like changes in behavior, neuropathology, and affect synapse through MAPK activation. *Part Fibre Toxicol* 2018;15:28. <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0263-3>.
- [231] Zhou M, Xie L, Fang C-J, Yang H, Wang Y-J, Zhen X-Y, et al. Implications for blood-brain-barrier permeability, in vitro oxidative stress and neurotoxicity potential induced by mesoporous silica nanoparticles: effects of surface modification. *RSC Adv* 2016;6:2800–9. <https://doi.org/10.1039/C5RA17517H>.
- [232] Gholamine B, Karimi I, Salimi A, Mazdarani P, Becker LA. Neurobehavioral toxicity of carbon nanotubes in mice. *Toxicol Ind Health* 2017;33:340–50. <https://doi.org/10.1177/0748233716644381>.
- [233] Shi D, Mi G, Webster TJ. The Synthesis, Application, and Related Neurotoxicity of Carbon Nanotubes. *Neurotoxicity of Nanomaterials and Nanomedicine*, Elsevier; 2017, p. 259–84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804598-5.00011-8>.
- [234] Sulhan S, Lyon KA, Shapiro LA, Huang JH. Neuroinflammation and blood-brain barrier disruption following traumatic brain injury: Pathophysiology and potential therapeutic targets. *J Neurosci Res* 2020;98:19–28. <https://doi.org/10.1002/jnr.24331>.
- [235] Riggio S. Traumatic Brain Injury and Its Neurobehavioral Sequelae. *Neurol Clin* 2011;29:35–47. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2010.10.008>.
- [236] Humphreys I, Wood, Phillips C, Macey. The costs of traumatic brain injury: a literature review. *ClinicoEconomics and Outcomes Research* 2013:281. <https://doi.org/10.2147/CEOR.S44625>.
- [237] Yang Y, Jiang G, Zhang P, Fan J. Programmed cell death and its role in inflammation. *Mil Med Res* 2015;2:12. <https://doi.org/10.1186/s40779-015-0039-0>.
- [238] Crews FT, Vetreno RP. Neuroimmune Basis of Alcoholic Brain Damage, 2014, p. 315–57. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801284-0.00010-5>.
- [239] Lisboa SF, Gomes FV, Terzian ALB, Aguiar DC, Moreira FA, Resstel LBM, et al. The Endocannabinoid System and Anxiety, 2017, p. 193–279. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.09.006>.
- [240] Dziewulska D, Gogol A, Gogol P, Rafalowska J. Enlargement of the Nissl substance as a manifestation of early damage to spinal cord motoneurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neuropathol* 2013;32:480–5. <https://doi.org/10.5414/NP300623>.
- [241] Liang H, Chen A, Lai X, Liu J, Wu J, Kang Y, et al. Neuroinflammation is induced by tongue-instilled ZnO nanoparticles via the Ca²⁺-dependent NF- κ B and MAPK pathways. *Part Fibre Toxicol* 2018;15:39. <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0274-0>.
- [242] Sharma A, Feng L, Muresanu DF, Sahib S, Tian ZR, Lafuente JV, et al. Manganese nanoparticles induce blood-brain barrier disruption, cerebral blood flow reduction, edema formation and brain pathology associated with cognitive and motor dysfunctions, 2021, p. 385–406. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2021.06.015>.
- [243] Abdelhameed NG, Ahmed YH, Yasin NAE, Mahmoud MY, El-sakhawy MA. Effects of Aluminum Oxide Nanoparticles in the Cerebrum, Hippocampus, and Cerebellum of Male Wistar Rats and

- Potential Ameliorative Role of Melatonin. *ACS Chem Neurosci* 2023;14:359–69. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.2c00406>.
- [244] Villa-Cedillo SA, Nava-Hernández MP, Soto-Domínguez A, Hernández-Ibarra JA, Perez-Trujillo JJ, Saucedo-Cárdenas O. Neurodegeneration, demyelination, and astrogliosis in rat spinal cord by chronic lead treatment. *Cell Biol Int* 2019;43:706–14. <https://doi.org/10.1002/cbin.11147>.
- [245] Bihagi SW, Zawia NH. Enhanced tauopathy and AD-like pathology in aged primate brains decades after infantile exposure to lead (Pb). *Neurotoxicology* 2013;39:95–101. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.07.010>.
- [246] Eira J, Silva CS, Sousa MM, Liz MA. The cytoskeleton as a novel therapeutic target for old neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol* 2016;141:61–82. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.04.007>.
- [247] Sonawane SK, Ahmad A, Chinnathambi S. Protein-Capped Metal Nanoparticles Inhibit Tau Aggregation in Alzheimer's Disease. *ACS Omega* 2019;4:12833–40. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01411>.
- [248] Gulati P, Gaspers LD, Dann SG, Joaquin M, Nobukuni T, Natt F, et al. Amino Acids Activate mTOR Complex 1 via Ca²⁺/CaM Signaling to hVps34. *Cell Metab* 2008;7:456–65. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.03.002>.
- [249] Conus NM, Hemmings BA, Pearson RB. Differential Regulation by Calcium Reveals Distinct Signaling Requirements for the Activation of Akt and p70S6k. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:4776–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.8.4776>.
- [250] HANNAN KM, THOMAS G, PEARSON RB. Activation of S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1) requires an initial calcium-dependent priming event involving formation of a high-molecular-mass signalling complex. *Biochemical Journal* 2003;370:469–77. <https://doi.org/10.1042/bj20021709>.
- [251] Mercan F, Lee H, Kolli S, Bennett AM. Novel Role for SHP-2 in Nutrient-Responsive Control of S6 Kinase 1 Signaling. *Mol Cell Biol* 2013;33:293–306. <https://doi.org/10.1128/MCB.01285-12>.
- [252] Mercan F, Lee H, Kolli S, Bennett AM. Novel Role for SHP-2 in Nutrient-Responsive Control of S6 Kinase 1 Signaling. *Mol Cell Biol* 2013;33:293–306. <https://doi.org/10.1128/MCB.01285-12>.
- [253] Divolis G, Mavroei P, Mavrofrydi O, Papazafiri P. Differential effects of calcium on PI3K-Akt and HIF-1 α survival pathways. *Cell Biol Toxicol* 2016;32:437–49. <https://doi.org/10.1007/s10565-016-9345-x>.
- [254] Satheesh N, Büsselberg D. The Role of Intracellular Calcium for the Development and Treatment of Neuroblastoma. *Cancers (Basel)* 2015;7:823–48. <https://doi.org/10.3390/cancers7020811>.
- [255] Dong X, Qin J, Ma J, Zeng Q, Zhang H, Zhang R, et al. BAFF inhibits autophagy promoting cell proliferation and survival by activating Ca²⁺-CaMKII-dependent Akt/mTOR signaling pathway in normal and neoplastic B-lymphoid cells. *Cell Signal* 2019;53:68–79. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.09.012>.
- [256] Xu F, Na L, Li Y, Chen L. RETRACTED ARTICLE: Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. *Cell Biosci* 2020;10:54. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00416-0>.
- [257] Castro-Alvarez JF, Uribe-Arias SA, Mejía-Raigosa D, Cardona-Gómez GP. Cyclin-dependent kinase 5, a node protein in diminished tauopathy: a systems biology approach. *Front Aging Neurosci* 2014;6. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00232>.
- [258] Mendoza MC, Vilela M, Juarez JE, Blenis J, Danuser G. ERK reinforces actin polymerization to power persistent edge protrusion during motility. *Sci Signal* 2015;8. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa8859>.
- [259] Zhang M, Liu J, Cheng A, DeYoung SM, Chen X, Dold LH, et al. CAP interacts with cytoskeletal proteins and regulates adhesion-mediated ERK activation and motility. *EMBO J* 2006;25:5284–93. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601406>.

- [260] Choi C, Helfman DM. The Ras-ERK pathway modulates cytoskeleton organization, cell motility and lung metastasis signature genes in MDA-MB-231 LM2. *Oncogene* 2014;33:3668–76. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.341>.
- [261] U.S. Department of Labor. Occupational Safety and Health Standards: Toxic and Hazardous Substances: Lead. US Department of Labor, 200 Constitution Ave NW Washington, DC 20210 2020.
- [262] Rengasamy S, Eimer BC. Nanoparticle Filtration Performance of NIOSH-Certified Particulate Air-Purifying Filtering Facepiece Respirators: Evaluation by Light Scattering Photometric and Particle Number-Based Test Methods. *J Occup Environ Hyg* 2012;9:99–109. <https://doi.org/10.1080/15459624.2011.642703>.
- [263] Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics* 2008;3:281. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-3-3-281>.
- [264] Harris MT, Hussain SS, Inouye CM, Castle AM, Castle JD. Reinterpretation of the localization of the ATP binding cassette transporter ABCG1 in insulin-secreting cells and insights regarding its trafficking and function. *PLoS One* 2018;13:e0198383. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198383>.
- [265] Iram SH, Gruber SJ, Raguimova ON, Thomas DD, Robia SL. ATP-Binding Cassette Transporter Structure Changes Detected by Intramolecular Fluorescence Energy Transfer for High-Throughput Screening. *Mol Pharmacol* 2015;88:84–94. <https://doi.org/10.1124/mol.114.096792>.
- [266] Morris ME, Rodriguez-Cruz V, Felmlee MA. SLC and ABC Transporters: Expression, Localization, and Species Differences at the Blood-Brain and the Blood-Cerebrospinal Fluid Barriers. *AAPS J* 2017;19:1317–31. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0110-8>.
- [267] Godbey WT. Cellular Transport. An Introduction to Biotechnology, Elsevier; 2014, p. 35–64. <https://doi.org/10.1016/B978-1-907568-28-2.00003-4>.
- [268] Choi CC, Ford RC. <scp>ATP</scp> binding cassette importers in eukaryotic organisms. *Biological Reviews* 2021;96:1318–30. <https://doi.org/10.1111/brv.12702>.

Přílohy

P1: DETAILY PRAKTICKÉ ČÁSTI PRÁCE

Charakteristika PbNPs

Charakteristika generovaných nanočástic oxidu olovnatého

Nanočástice oxidu olovnatého (PbONPs) byly generovány ve spolupráci s Ústavem analytické chemie, Akademie věd České republiky, v.v.i. (**tab. S1**).

Tabulka S1. Charakteristika generovaných nanočástic oxidu olovnatého pro *in vivo* experiment.

forma olova	oxid olovnatý (PbO)
koncentrace	$2,23 * 10^6$ NPs/cm ³
hmotnostní koncentrace	78,0 µg/m ³
medián generovaných nanočástic	19,5 nm
odhadovaná uložená dávka po 11 týdnech inhalace generovaných nanočástic	0,88 µg/g (generované NPs/gram hmotnosti těla)
rozpustnost	nerozpustné ve vodě

Charakteristika generovaných nanočástic dusičnanu olovnatého

Nanočástice dusičnanu olovnatého [Pb(NO₃)₂NPs] byly generovány ve spolupráci s Ústavem analytické chemie, Akademie věd České republiky, v.v.i. (**tab. S2**).

Tabulka S2. Charakteristika generovaných nanočástic dusičnanu olovnatého pro *in vivo* experiment.

forma olova	dusičnan olovnatý [Pb(NO ₃) ₂]
koncentrace	$1,94 * 10^5$ NPs/cm ³
hmotnostní koncentrace	68,6 µg/m ³
medián generovaných nanočástic	31,3 nm
odhadovaná uložená dávka po 11 týdnech inhalace generovaných nanočástic	0,774 µg/g (generované NPs/gram hmotnosti těla)
rozpustnost	rozpustné ve vodě

Charakteristika nanočástic oxidu olovnatého pro *in vitro* experiment

Syntetické nanočástice oxidu olovnatého (cPbONPs), které jsou komerčně dostupné (NANOCHEMOZONE Inc), byly ve formě roztoku v kultivačním médiu použity při *in vitro* experimentu (**tab. S3**).

Tabulka S3. Charakteristika komerčně dostupných nanočástic oxidu olovnatého.

forma olova	oxid olovnatý (PbO)
medián syntetických nanočástic	<100 nm
rozpustnost	nerozpustné ve vodě

Charakteristika experimentálních skupin – *in vivo* experiment

Ctr/6w

datum inhalace: 6. 3. 2018 – 16. 4. 2018, průběh experimentu: šest týdnů inhalace vzduchu bez obsahu generovaných nanočástic

PbONPs/6w

datum inhalace: 6. 3. 2018 – 16. 4. 2018, průběh experimentu: šest týdnů inhalace vzduchu s obsahem generovaných nanočástic oxidu olovnatého

Pb(NO₃)₂NPs/6w

datum inhalace: 6. 3. 2018 – 16. 4. 2018, průběh experimentu: šest týdnů inhalace vzduchu s obsahem generovaných nanočástic dusičnanu olovnatého

Ctr/11w

datum inhalace: 6. 3. 2018 – 21. + 23. 5. 2018, průběh experimentu: jedenáct týdnů inhalace vzduchu bez obsahu generovaných nanočástic

PbONPs/11w

datum inhalace: 6. 3. 2018 – 21. + 23. 5. 2018, průběh experimentu: průběh inhalace: jedenáct týdnů inhalace vzduchu s obsahem generovaných nanočástic oxidu olovnatého

Pb(NO₃)₂NPs/11w

datum inhalace: 6. 3. 2018 – 21. + 23. 5. 2018, průběh experimentu: jedenáct týdnů inhalace vzduchu s obsahem generovaných nanočástic dusičnanu olovnatého

PbONPs/CL

datum inhalace: 6. 3. 2018 – 21. + 23. 5. 2018, průběh experimentu: šest týdnů inhalace vzduchu s obsahem generovaných nanočástic oxidu olovnatého a následně pět týdnů inhalace vzduchu bez obsahu generovaných nanočástic

Pb(NO₃)₂NPs/CL

datum inhalace: 6. 3. 2018 – 21. + 23. 5. 2018

průběh experimentu: šest týdnů inhalace vzduchu s obsahem generovaných nanočástic dusičnanu olovnatého a následně pět týdnů inhalace vzduchu bez obsahu generovaných nanočástic

Charakteristika experimentálních skupin – *in vitro* experiment

Experimenty 24 h – různé koncentrace cPbONPs, odběr pro MTT Assay

A: 19. 8. 2022 – 27. 8. 2022

Experimenty 48 h – různé koncentrace cPbONPs, odběr pro MTT Assay

A: 15. 8. 2022 – 24. 8. 2022

Experimenty 72 h – různé koncentrace cPbONPs, odběr pro MTT Assay

A: 15. 8. 2022 – 25. 8. 2022

ctrl/24h + cPbONPs/24h

A: 2. 9. 2022 – 10. 9. 2022 (odběr pro qPCR a WB analýzy)

B: 2. 9. 2022 – 10. 9. 2022 (odběr pro qPCR a WB analýzy)

C: 18. 10. – 25. 10. 2022 (odběr pro ICC analýzy)

D: 30. 11. – 8. 12. 2022 (odběr pro qPCR analýzy)

E: 7. 12. – 15. 12. 2022 (odběr pro ICC analýzy)

F: 7. 12. – 15. 12. 2022 (odběr pro ICC analýzy)

ctrl/48h + cPbONPs/48h

A: 22. 8. 2022 – 31. 8. 2022 (odběr pro qPCR a WB analýzy)

B: 18. 10. 2022 – 26. 10. 2022 (odběr pro qPCR a ICC analýzy)

C: 1. 11. 2022 – 9. 11. 2022 (odběr pro qPCR a ICC analýzy)

D: 7. 12. – 16. 12. 2022 (odběr pro ICC analýzy)

E: 7. 12. – 16. 12. 2022 (odběr pro ICC analýzy)

ctrl/72h + cPbONPs/72h

A: 22. 8. 2022 – 1. 9. 2022 (odběr pro qPCR analýzy)

B: 30. 11. – 10. 12. 2022 (odběr pro qPCR a WB analýzy)

C: 1. 11. 2022 – 10. 11. 2022 (odběr pro qPCR a ICC analýzy)

D: 7. 12. 2022 – 17. 12. 2022 (odběr pro ICC analýzy)

E: 7. 12. 2022 – 17. 12. 2022 (odběr pro ICC analýzy)

Přílohy k hodnocení provedených analýz

Vyhodnocení analýz relativní genové exprese

R (ratio)...udává relativní změnu exprese

ΔCT_K ...kontrolní vzorek

ΔCT_{Pb} ...testovaný vzorek

ΔCT_{TG} ...testovaný gen

ΔCT_{HG} ...housekeeping gen

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

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{Pb} - \Delta CT_K$$

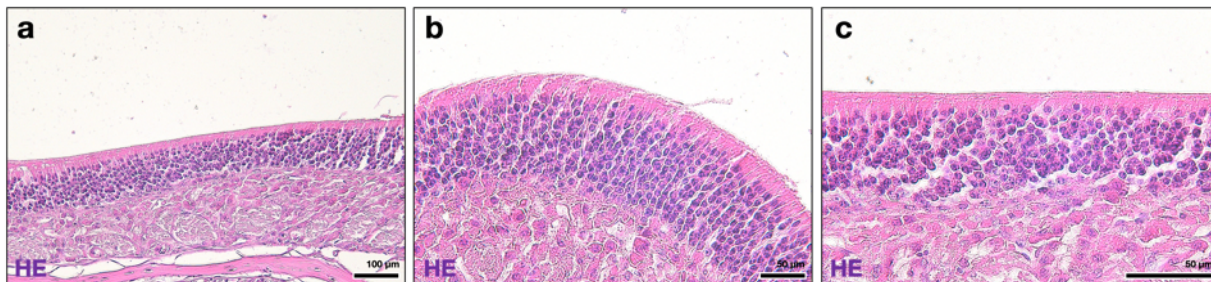
$$\Delta CT_{Pb} = \Delta CT_{TG} - \Delta CT_{HG}$$

$$\Delta CT_K = \Delta CT_{TG} - \Delta CT_{HG}$$

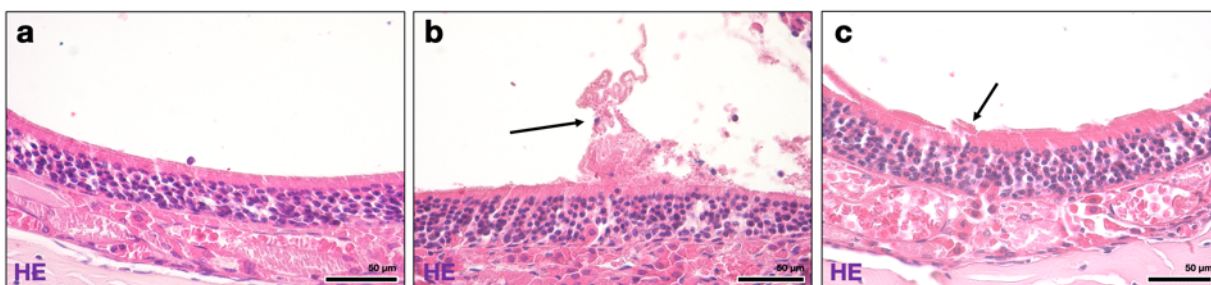
P2: PŘÍLOHY K VÝSLEDKŮM

Čichový epitel

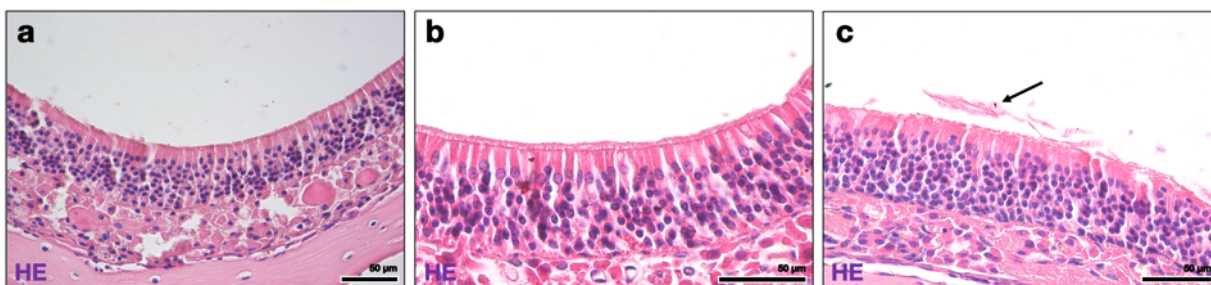
Histopatologická analýza čichového epitelu



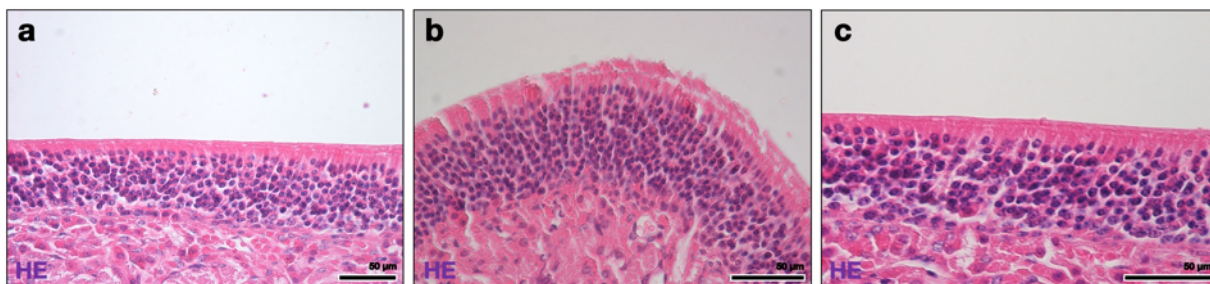
Obrázek S1. Histopatologická analýza čichového epitelu – kontrolní skupina, šestitýdenní experiment. a, b, c – V kontrolní skupině byl čichový epitel volný, bez viditelného poškození či zahlenění. Histologické řezy jsou obarveny Hematoxylinem-Eosinem (HE). Měřítko – 50 a 100 µm.



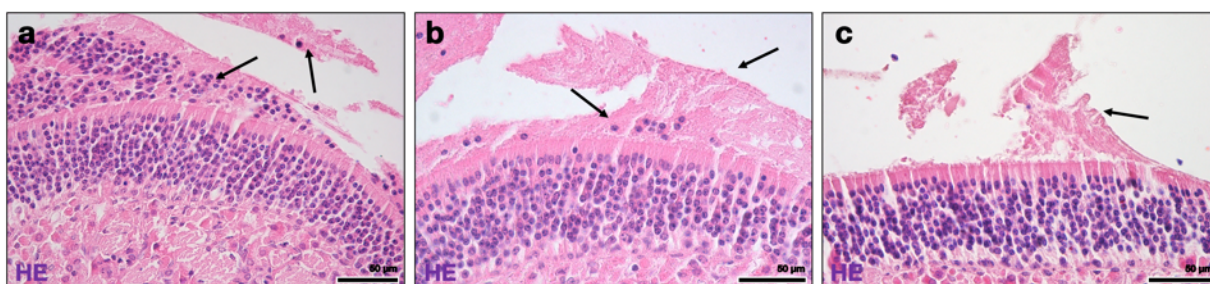
Obrázek S2. Histopatologická analýza čichového epitelu – PbONPs/6w skupina, šestitýdenní experiment. a, b, c – Po šesti týdnech inhalace PbONPs jsme detekovali pouze ojedinělé změny morfologie čichového epitelu. Pozorovali jsme např. zvýšenou vrstvu hlenu s odumřelými buňkami (šipky). Histologické řezy jsou obarveny Hematoxylinem-Eosinem (HE). Měřítko – 50 µm.



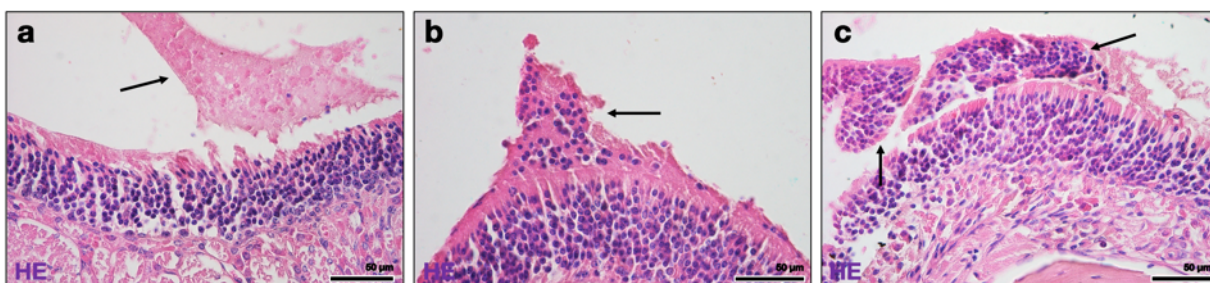
Obrázek S3. Histopatologická analýza čichového epitelu – Pb(NO₃)₂NPs skupina, šestitýdenní experiment. a, b, c – Po skončení šestitýdenní inhalace rozpustných nanočástic olova jsme podobně jako v PbONPs/6w skupině pozorovali pouze ojedinělé patologické nálezy. Jednalo se zj. o zvýšenou vrstvu hlenu (šipka). Histologické řezy jsou obarveny Hematoxylinem-Eosinem (HE). Měřítko – 50 µm.



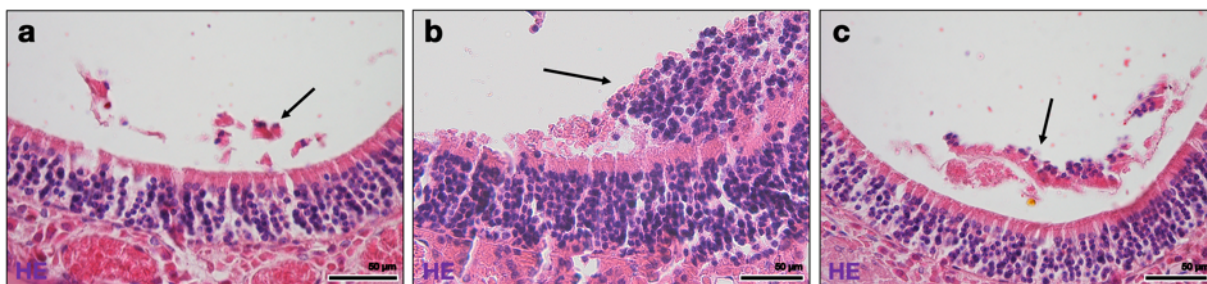
Obrázek S4. Histopatologická analýza čichového epitelu – kontrolní skupina, jedenáctitýdenní experiment. a, b, c – Čichový epitel jedinců z kontrolní skupiny nevykazoval známky poškození, nepozorovali jsme zvýšenou vrstvu hlenu či jiné patologie. Histologické řezy jsou obarveny Hematoxylinem-Eosinem (HE). Měřítko – 50 µm.



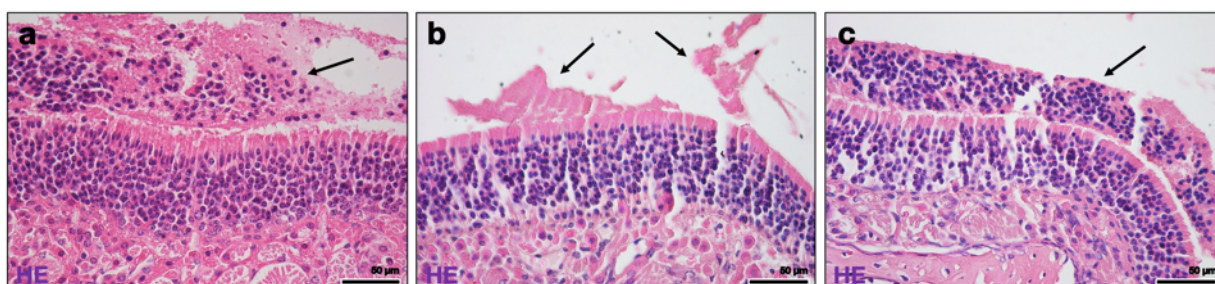
Obrázek S5. Histopatologická analýza čichového epitelu – PbONPs/11w skupina, jedenáctitýdenní experiment. a, b, c – Po jedenácti týdnech inhalace PbONPs jsme na povrchu čichového epitelu detekovali vysoké vrstvy s odumřelými buňkami (šípky). Histologické řezy jsou obarveny Hematoxylinem-Eosinem (HE). Měřítko – 50 µm.



Obrázek S6. Histopatologická analýza čichového epitelu – PbONPs/CL skupina, jedenáctitýdenní experiment. a, b, c – Ve skupině PbONPs/CL jsme našli podobné morfolologické alterace jako ve skupině PbONPs/11w. Pozorovali jsme vysoké vrstvy hlenu s odumřelými buňkami (šípky). Histologické řezy jsou obarveny Hematoxylinem-Eosinem (HE). Měřítko – 50 µm.

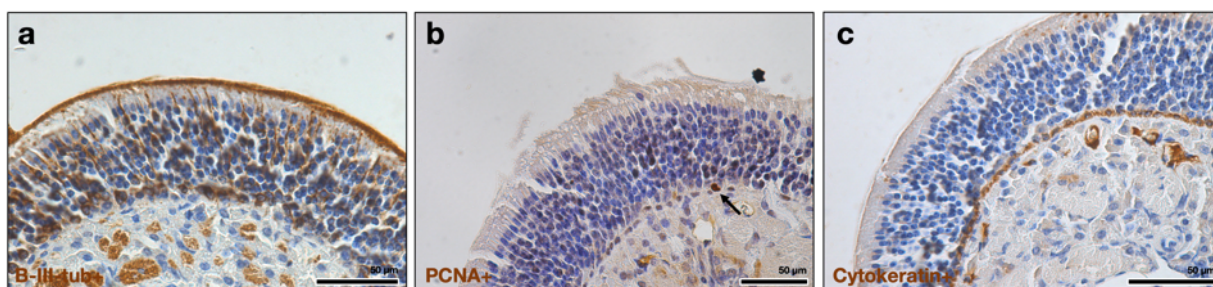


Obrázek S7. Histopatologická analýza čichového epitelu – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/11\text{w}$ skupina, jedenáctitýdenní experiment. a, b, c – Ve skupině $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/11\text{w}$ jsme pozorovali vrstvy hlenu s odumřelými buňkami. Histologické řezy jsou obarveny Hematoxylinem-Eosinem (HE). Měřítka – 50 μm .

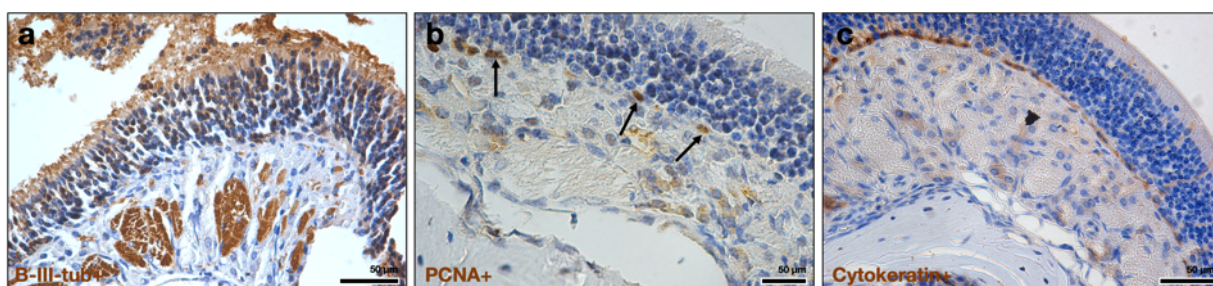


Obrázek S8. Histopatologická analýza čichového epitelu – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$ skupina, jedenáctitýdenní experiment. a, b, c – Po jedenácti týdnech inhalace rozpustných nanočástic olova jsme pozorovali výrazné morfologické změny. Vrstvy hlenu s buněčným debrisi jsme detekovali ve vyšší míře než ve skupině $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/11\text{w}$. Histologické řezy jsou obarveny Hematoxylinem-Eosinem (HE). Měřítka – 50 μm .

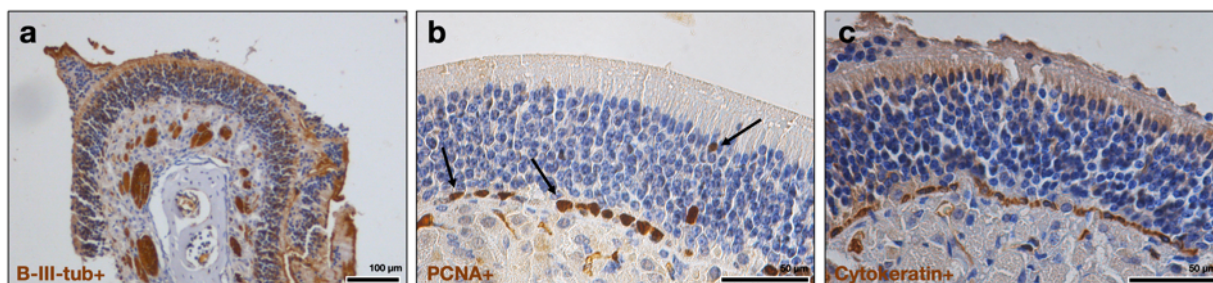
Analýza reparativních procesů v čichovém epitelu



Obrázek S9. Analýza reparativních procesů v čichovém epitelu – kontrolní skupina, jedenáctitýdenní experiment. **a** – V kontrolní skupině jedenáctitýdenního experimentu jsme pozorovali proteinovou expresi Beta-III-tubulinu na apikální straně epitelu, jednotlivá vlákna čichových sensorických neuronů v epitelu a v *lamina propria* Beta-III-tubulin+ nervové svazky. Beta-III-tubulin+ struktury byly detekovány pomocí IHC. Jádra jsou obarvena pomocí Hematoxylinu modře. Měřítko – 50 μ m. **b** – PCNA+ buňky jsme v kontrolní skupině pozorovali pouze ojedinelé, při bazální straně epitelu (šipka). PCNA+ struktury byly detekovány pomocí IHC. Jádra jsou obarvena pomocí Hematoxylinu modře. Měřítko – 50 μ m. **c** – Cytokeratin-pozitivní struktury jsme detekovali při bazální straně epitelu po celé jeho délce, bez porušení. Cytokeratin+ struktury byly detekovány pomocí IHC. Jádra jsou obarvena pomocí Hematoxylinu modře. Měřítko – 50 μ m.

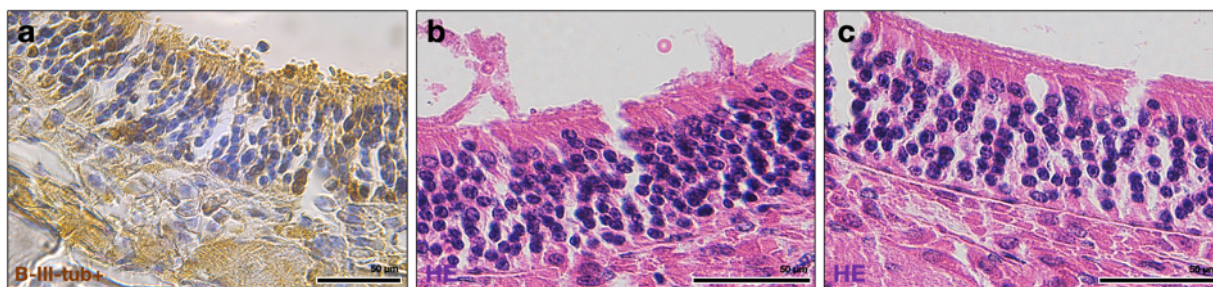


Obrázek S10. Analýza reparativních procesů v čichovém epitelu – PbONPs/11w skupina, jedenáctitýdenní experiment. **a** – Expresí Beta-III-tubulinu ve skupině PbONPs/11w byla odlišná od kontrolní skupiny. Signál na povrchu epitelu nebyl rovnoměrný, vysoké vrstvy hlenu byly Beta-III-tubulin-pozitivní. Nervové svazky v *lamina propria* byly bez poškození. Beta-III-tubulin+ struktury byly detekovány pomocí IHC. Jádra jsou obarvena pomocí Hematoxylinu modře. Měřítko – 50 μ m. **b** – Proliferační aktivitu detekovanou pomocí markeru PCNA jsme pozorovali při bazální straně epitelu, počet PCNA+ buněk (šipky) byl vyšší než v kontrolní skupině. PCNA+ struktury byly detekovány pomocí IHC. Jádra jsou obarvena pomocí Hematoxylinu modře. Měřítko – 50 μ m. **c** – Cytokeratin+ struktury jsme detekovali po celé délce bazálního epitelu, nicméně místy byl signál slabší. Cytokeratin+ struktury byly detekovány pomocí IHC. Jádra jsou obarvena pomocí Hematoxylinu modře. Měřítko – 50 μ m.

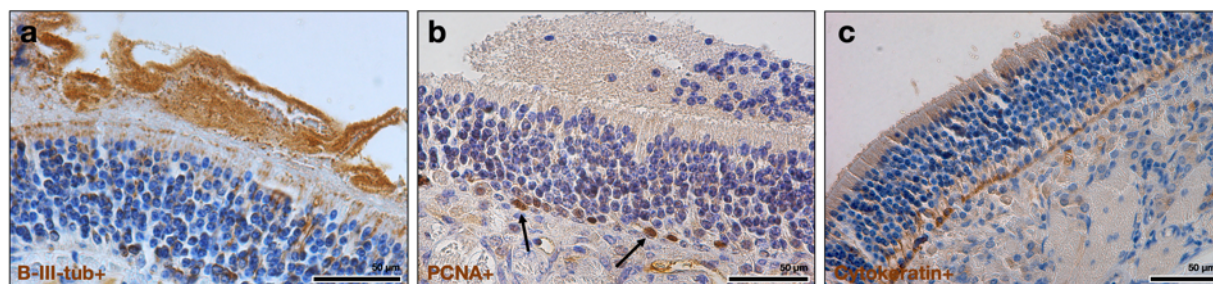


Obrázek S11. Analýza reparativních procesů v čichovém epitelu – PbONPs/CL skupina, jedenáctitýdenní experiment. **a** – Expresí Beta-III-tubulinu jsme detekovali ve vrstvách hlenu na povrchu epitelu. Jednotlivá vlákna nebyla viditelná jako v kontrolní skupině, nervové svazky v *lamina propria* nejevily známky poškození. Beta-III-tubulin+ struktury byly detekovány pomocí IHC. Jádra jsou obarvena pomocí Hematoxylinu modře. Měřítko – 50 μ m. **b** – Počet PCNA+ buněk byl vyšší než v kontrolní i PbONPs/11w skupině, PCNA+ buňky jsme pozorovali v bazální i apikální části epitelu (šipky). PCNA+ struktury byly detekovány pomocí IHC. Jádra jsou

obarvena pomocí Hematoxylinu modře. Měřítka – 50 μm . **c** – Cytokeratin-pozitivní struktury jsme pozorovali po celé délce bazální strany epitelu, signál byl detekován rovnoměrně po celé délce epitelu. Cytokeratin+ struktury byly detekovány pomocí IHC. Jádra jsou obarvena pomocí Hematoxylinu modře. Měřítka – 50 μm .



Obrázek S12. Analýza reparativních procesů v čichovém epitelu – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/11\text{w}$ skupina, jedenáctitýdenní experiment. **a** – Expresi Beta-III-tubulinu jsme detekovali ve vrstvách hleny na povrchu epitelu. Jednotlivá nervová vlákna nebyla viditelná čistě jako v kontrolní skupině. Nervové svazky v *lamina propria* bez patologií. Beta-III-tubulin+ struktury byly detekovány pomocí IHC. Jádra jsou obarvena pomocí Hematoxylinu modře. Měřítka – 50 μm . **b, c** – Vzhledem ke kvalitě vzorků nebylo možné detekovat PCNA+ a Cytokeratin+ struktury. Histologické řezy jsou obarveny Hematoxylinem-Eosinem (HE). Měřítka – 50 μm .



Obrázek S13. Analýza reparativních procesů v čichovém epitelu – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$ skupina, jedenáctitýdenní experiment. **a** – Vrstvy hleny na povrchu čichového epitelu byly Beta-III-tubulin-pozitivní. Nervové svazky v *lamina propria* bez porušení. Beta-III-tubulin+ struktury byly detekovány pomocí IHC. Jádra jsou obarvena pomocí Hematoxylinu modře. Měřítka – 50 μm . **b** – PCNA+ buňky jsme detekovali v bazální části epitelu, počet PCNA+ buněk byl vyšší než v kontrolní skupině. PCNA+ struktury byly detekovány pomocí IHC. Jádra jsou obarvena pomocí Hematoxylinu modře. Měřítka – 50 μm . **c** – Cytokeratin+ struktury jsme našli stejně jako v ostatních skupinách při bazální části čichového epitelu, po celé jeho délce, nebyl rovnoměrný. Cytokeratin+ struktury byly detekovány pomocí IHC. Jádra jsou obarvena pomocí Hematoxylinu modře. Měřítka – 50 μm .

Přehled provedených analýz čichového epitelu

Z každého jedince ze všech experimentálních skupin byl odebrán čichový epitel, nicméně vzhledem k procesu odvápnování v roztoku EDTA došlo k poškození některých vzorků, proto nebyly použity pro analýzy. Pro analýzy bylo použito $n = 2-4$ vzorků z každé skupiny.

Tabulka S4. Přehled provedených histologických analýz na vzorcích čichového epitelu

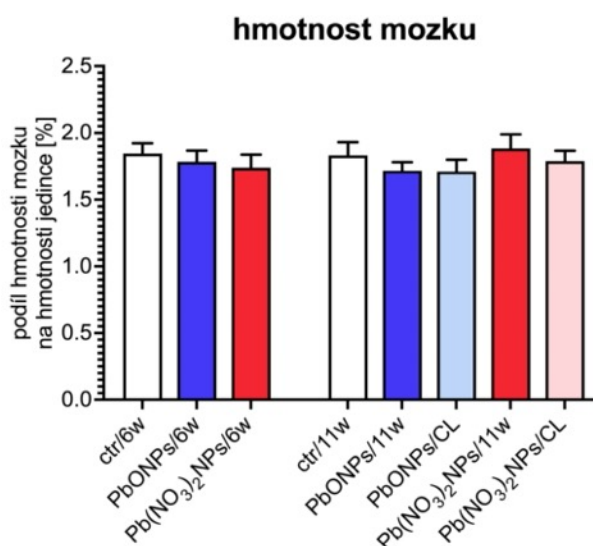
experimentální skupina	číslo jedince	HE	B3T	Cytokeratin	PCNA
ctr/6w	1	ano	ne	ne	ne
	2	ano	ne	ne	ne
	3	ano	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne
PbONPs/6w	1	ano	ne	ne	ne
	2	ano	ne	ne	ne
	3	ano	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/6w	1	ano	ne	ne	ne
	2	ano	ne	ne	ne
	3	ano	ne	ne	ne
	4	ano	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne
ctr/11w	1	ano	ano	ano	ne
	2	ano	ano	ano	ne
	3	ano	ne	ne	ano
	4	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne
PbONPs/11w	1	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne
PbONPs/CL	1	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ne
	3	ano	ano	ano	ano
	4	ano	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/11w	1	ano	ne	ne	ne
	2	ano	ne	ne	ne
	3	ano	ano	ne	ne
	4	ano	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne

experimentální skupina	číslo jedince	HE	B3T	Cytokeratin	PCNA
Pb(NO ₃) ₂ NPs/CL	1	ano	ano	ano	ne
	2	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano
	4	ano	ano	ano	ano
	5	ano	ano	ano	ne

Mozek

Analýza hmotnosti mozku

V rámci šestitýdenního inhalačního experimentu došlo v exponovaných skupinách ke statisticky nevýznamnému poklesu podílu hmotnosti mozku na celkové hmotnosti jedinců (**obr. S14**). Po skončení jedenáctitýdenní inhalace rovněž došlo ve skupinách, které inhalovaly PbONPs k nesignifikantnímu poklesu podílu hmotnosti mozku na celkové hmotnosti, rozdíl mezi skupinou PbONPs/11w a skupinou s eliminačním obdobím (PbONPs/CL) byl velmi malý. Naopak v experimentální skupině Pb(NO₃)₂NPs/11w byl podíl vyšší než v kontrolní skupině. Výsledky nebyly statisticky významné ($p > 0,05$). Podrobnosti analýzy jsou k nahlédnutí v tabulkách (**tab. S5, S6**).



Obrázek S14. Analýza podílu hmotnosti mozku na hmotnosti jedince. Po šestitýdenní inhalaci nanočástic olova došlo k nesignifikantním změnám podílu hmotnosti mozku na celkové hmotnosti jedince ($p > 0,05$). Podíl hmotnosti mozku na celkové hmotnosti jedince v exponovaných skupinách v jedenáctitýdenním experimentu byl ve srovnání s kontrolou mírně odlišný, nicméně tyto změny nebyly statisticky významné ($p > 0,05$).

Tabulka S5. Analýza podílu hmotnosti mozku na hmotnosti jedince - šestitýdenní experiment.

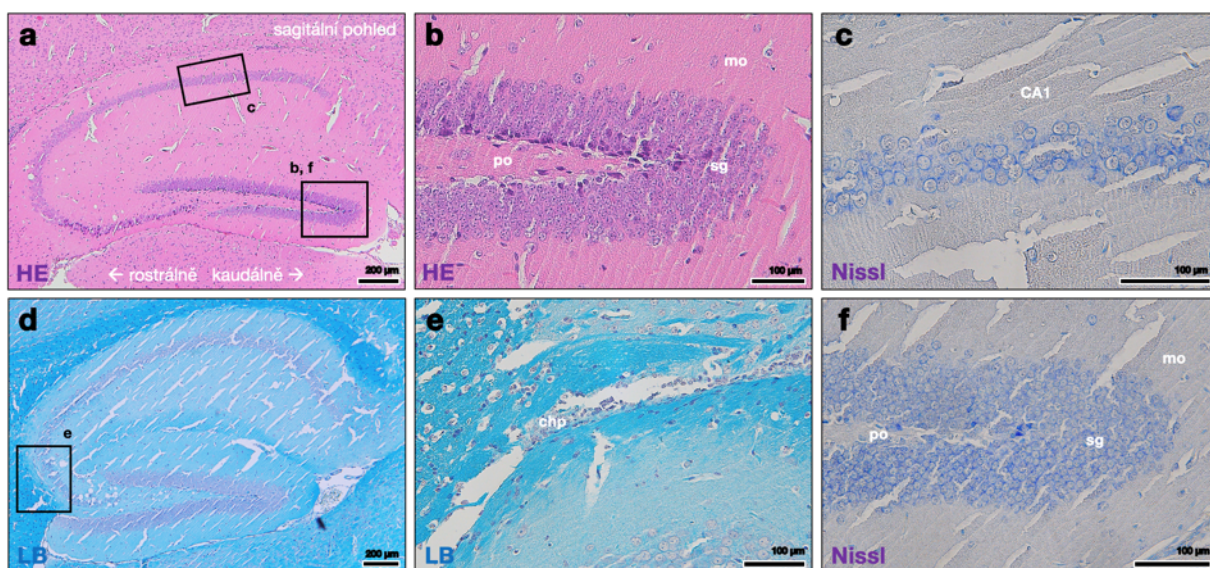
experimentální skupina	číslo jedince	hmotnost jedince [g]	hmotnost mozku [g]	podíl hmotnosti mozku na hmotnosti jedince [%]
ctr/6w	1	23,84	0,4995	2,0952
	2	29,40	0,5179	1,7616
	3	27,80	0,4955	1,7824
	4	27,29	0,4504	1,6504
	5	25,46	0,4928	1,9356
PbONPs/6w	1	32,12	0,5850	1,8213
	2	29,24	0,6099	2,0858
	3	31,52	0,5320	1,6878
	4	32,45	0,5192	1,6000

experimentální skupina	číslo jedince	hmotnost jedince [g]	hmotnost mozku [g]	podíl hmotnosti mozku na hmotnosti jedince [%]
	5	31,27	0,5398	1,7263
Pb(NO ₃) ₂ NPs/ 6w	1	30,89	0,4382	1,4186
	2	26,44	0,4537	1,7160
	3	27,69	0,4926	1,7790
	4	23,82	0,4828	2,0269
	5	28,55	0,5022	1,7590

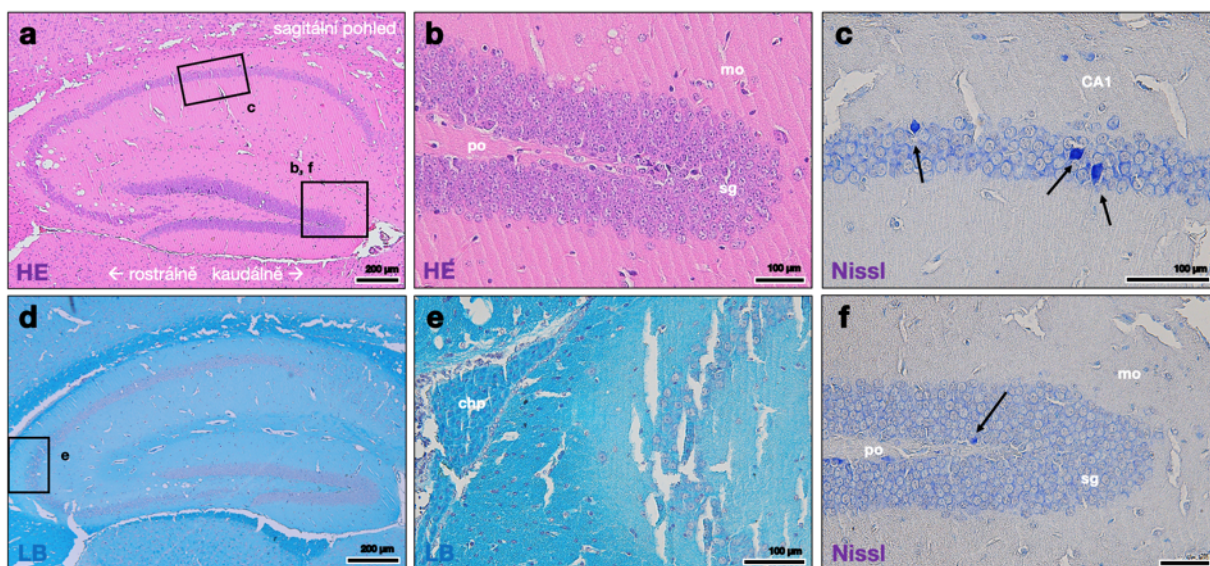
Tabulka S6. Analýza podílu hmotnosti mozku na hmotnosti jedince – jedenáctidenní experiment.

experimentální skupina	číslo jedince	hmotnost jedince [g]	hmotnost mozku [g]	podíl hmotnosti mozku na hmotnosti jedince [%]
ctr/11w	1	27,11	0,5984	2,2073
	2	31,72	0,5720	1,8033
	3	29,43	0,5337	1,8135
	4	30,51	0,5096	1,6703
	5	33,20	0,5521	1,6630
PbONPs/11w	1	29,85	0,4969	1,6647
	2	28,86	0,4674	1,6195
	3	33,30	0,5705	1,7132
	4	31,35	0,5097	1,6258
	5	25,09	0,4919	1,9605
PbONPs/CL	1	29,04	0,5300	1,8251
	2	29,44	0,5067	1,7211
	3	40,21	0,5637	1,4019
	4	31,31	0,5246	1,6755
	5	33,13	0,6390	1,9288
Pb(NO ₃) ₂ NPs/ 11w	1	27,83	0,4969	1,7855
	2	28,90	0,5412	1,8727
	3	26,40	0,4311	1,6330
	4	28,10	0,6382	2,2712
	5	24,40	0,4529	1,8561
Pb(NO ₃) ₂ NPs/ CL	1	32,40	0,5218	1,6105
	2	31,97	0,5606	1,7535
	3	29,30	0,5208	1,7775
	4	27,84	0,5787	2,0787
	5	29,98	0,5162	1,7218

Histopatologická analýza hipokampální oblasti

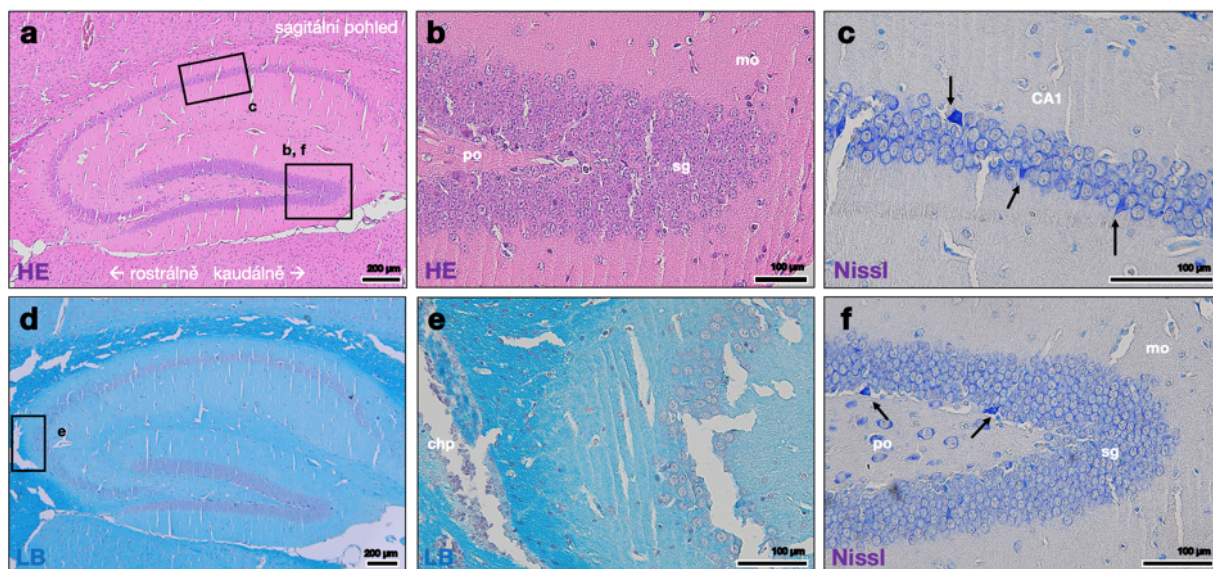


Obrázek S15. Histopatologická analýza hipokampální oblasti – kontrolní skupina, šestitýdenní experiment. **a** – Hipokampální oblast. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí HE. Měřítko – 200 µm. **b** – V oblasti *gyrus dentatus* jsme nedetekovali patologické změny. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí HE. Měřítko – 100 µm. **c** – V pyramidální vrstvě CA jsme místy detekovali nekrotické neurony. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení. Měřítko – 100 µm. **d, e** – Analýza přítomnosti myelinu neukázala rozdíly mezi PbONPs/6w a kontrolní skupinou. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Luxolové modři. Měřítko – 100 a 200 µm. **f** – Nissl+ neurony jsme pozorovali výjimečně i v oblasti granulárních buněk v *gyrus dentatus*. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení. Měřítko – 100 µm. CA1 – Ammonův roh, oblast 1; CA2 – Ammonův roh, oblast 2; CA3 – Ammonův roh, oblast 3; mo – molekulární vrstva; po – polymorfni vrstva; sg – vrstva granulárních buněk.

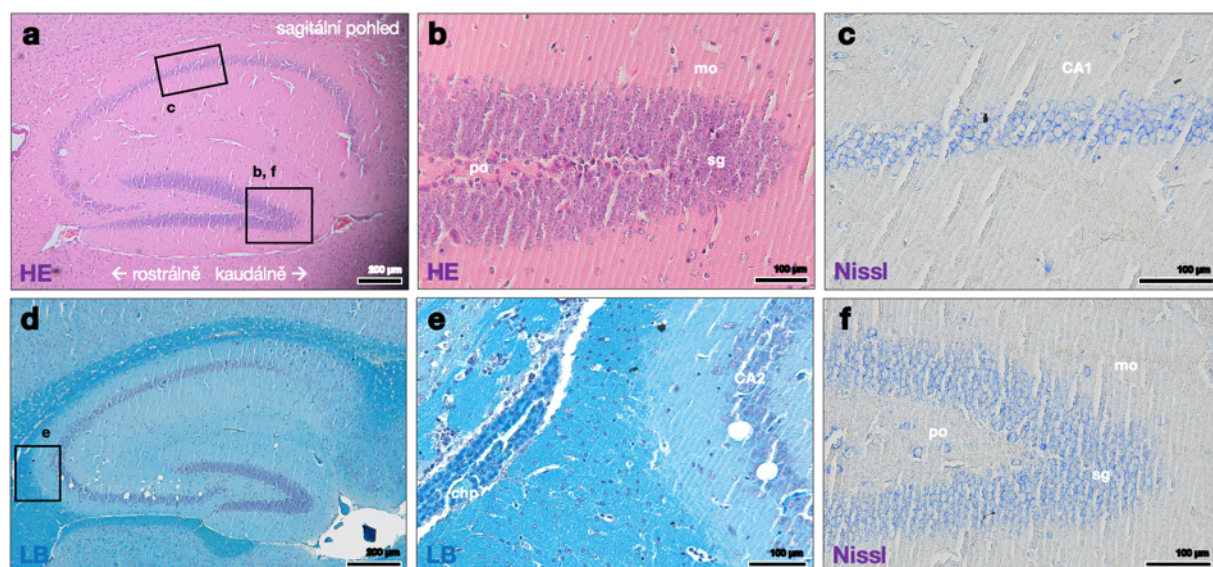


Obrázek S16. Histopatologická analýza hipokampální oblasti – PbONPs/6w skupina, šestitýdenní experiment. **a** – Hipokampální oblast. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí HE. Měřítko – 200 µm. **b** – V oblasti *gyrus dentatus* jsme nedetekovali patologické změny. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí HE. Měřítko – 100 µm. **c** – V pyramidální vrstvě CA jsme občasné detekovali nekrotické neurony. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení. Měřítko – 100 µm. **d, e** – Analýza přítomnosti myelinu neukázala rozdíly mezi PbONPs/6w a kontrolní skupinou. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Luxolové modři. Měřítko – 100 a 200 µm. **f** – Nissl+ neurony jsme pozorovali výjimečně i v oblasti granulozitých buněk v *gyrus dentatus*. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení. Měřítko – 100 µm.

CA1 – Ammonův roh, oblast 1; CA2 – Ammonův roh, oblast 2; CA3 – Ammonův roh, oblast 3; mo – molekulární vrstva; po – polymorfní vrstva; sg – vrstva granulových buněk.

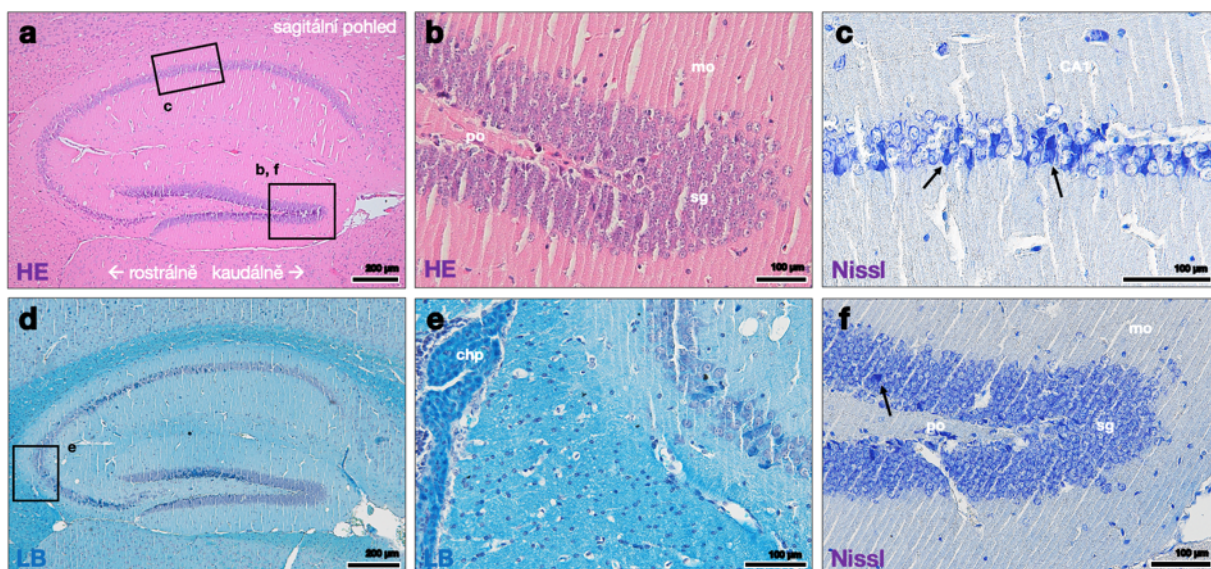


Obrázek S17. Histopatologická analýza hipokampální oblasti – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/6\text{w}$ skupina, šestitýdenní experiment. **a** – Hipokampální oblast. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí HE. Měřítko – 200 µm. **b** – V oblasti *gyrus dentatus* jsme nenalezli žádné morfologické změny. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí HE. Měřítko – 100 µm. **c** – Nekrotické neurony, Nissl+ buňky, jsme občasné detekovali v pyramidální vrstvě Ammonova rohu. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítko – 100 µm. **d, e** – Expres myelinu nebyla oproti kontrolní skupině změněna. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Luxolové modři. Měřítko – 100 a 200 µm. **f** – Nekrotické neurony, detekované pomocí barvení Nissl, jsme ve vrstvě granulárních buněk *gyrus dentatus* pozorovali pouze sporadicky. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítko – 100 µm. CA1 – Ammonův roh, oblast 1; CA2 – Ammonův roh, oblast 2; CA3 – Ammonův roh, oblast 3; mo – molekulární vrstva; po – polymorfní vrstva; sg – vrstva granulárních buněk.

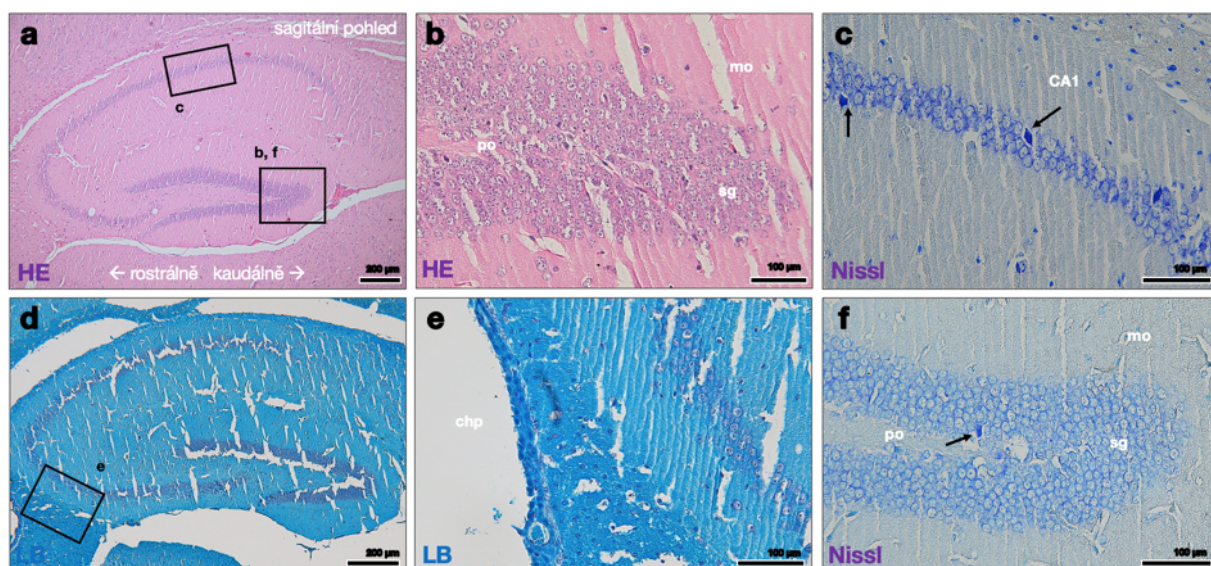


Obrázek S18. Histopatologická analýza hipokampální oblasti – kontrolní skupina, jedenáctitýdenní experiment. **a** – Hipokampální oblast. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí HE. Měřítko – 200 µm. **b** – Oblast *gyrus dentatus*, bez patologií. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí HE. Měřítko – 100 µm. **c** – Nekrotické neurony jsme v pyramidální vrstvě Ammonova rohu detekovali pouze výjimečně. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítko – 100 µm. **d, e** – Detekce myelinu ukázala jeho přítomnost okolo hipokampální formace, zejména u laterální mozkové komory. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Luxolové modři. Měřítko – 100 a 200 µm. **f** – Nissl+ buňky jsme detekovali pouze výjimečně

v oblasti granulových buněk *gyru dentatu*. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítka – 100 μm . CA1 – Ammonův roh, oblast 1; CA2 – Ammonův roh, oblast 2; CA3 – Ammonův roh, oblast 3; chp – choroidální plexus; mo – molekulární vrstva; po – polymorfní vrstva; sg – vrstva granulárních buněk.

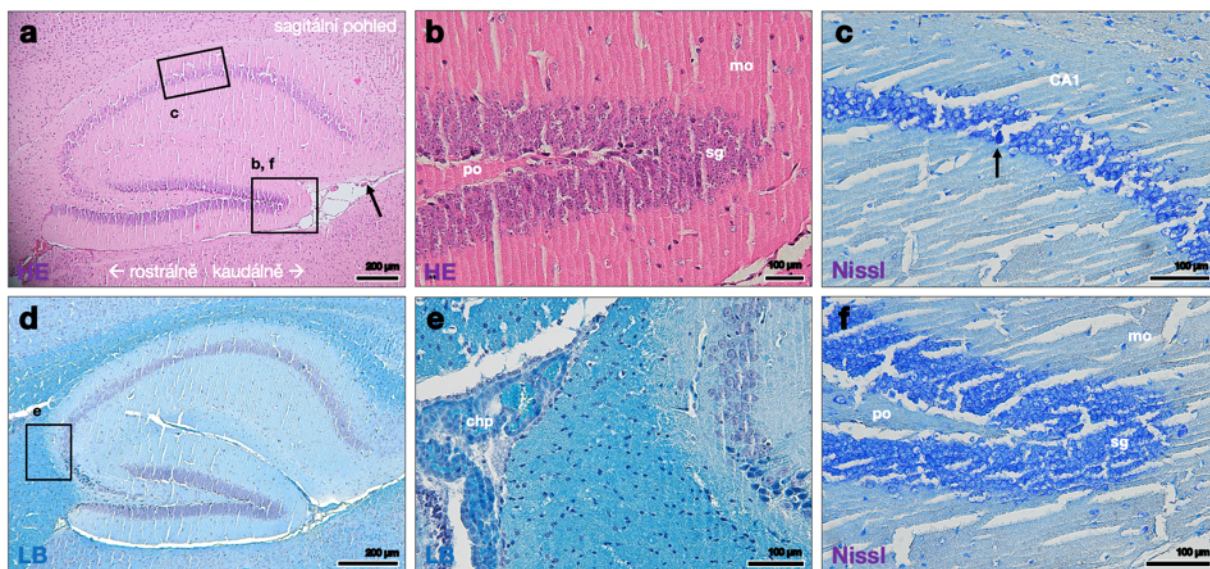


Obrázek S19. Histopatologická analýza hipokampální oblasti – PbONPs/11w skupina, jedenáctitýdenní experiment. **a** – Hipokampální oblast. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí HE. Měřítka – 200 μm . **b** – Oblast *gyrus dentatus*, bez patologických nálezů. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí HE. Měřítka – 100 μm . **c** – Nekrotické neurony jsme hojně pozorovali v pyramidální vrstvě Ammonova rohu (šipky). Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítka – 100 μm . **d, e** – Změny myelinizace axonů v okolí hipokampální oblasti po inhalaci PbONPs nenastaly. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Luxolové modři. Měřítka – 100 a 200 μm . **f** – Nekrotické neurony jsme detekovali také ve vrstvě granulárních buněk v *gyrus dentatus*. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítka – 100 μm . CA1 – Ammonův roh, oblast 1; CA2 – Ammonův roh, oblast 2; CA3 – Ammonův roh, oblast 3; chp – choroidální plexus; mo – molekulární vrstva; po – polymorfní vrstva; sg – vrstva granulárních buněk.

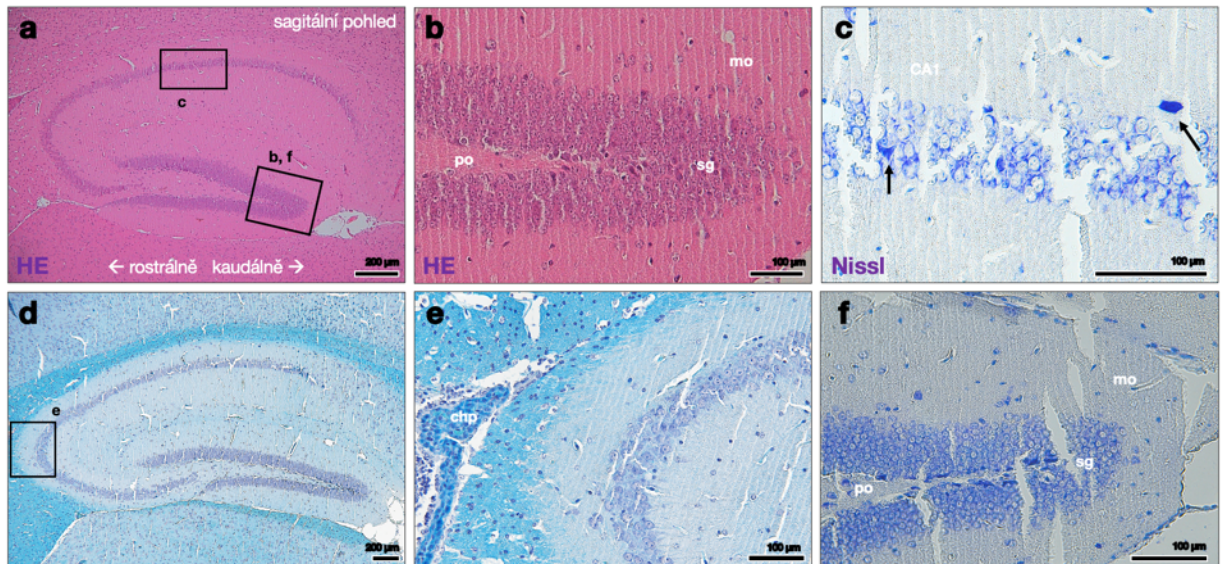


Obrázek S20. Histopatologická analýza hipokampální oblasti – PbONPs/CL skupina, jedenáctitýdenní experiment. **a** – Hipokampální oblast. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí HE. Měřítka – 200 μm . **b** – Oblast *gyrus dentatus*, bez patologických nálezů. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí HE. Měřítka – 100 μm . **c** – Nekrotické neurony (šipky) jsme detekovali v pyramidální vrstvě Ammonova rohu v menším počtu než ve skupině PbONPs/11w. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítka – 100 μm .

Měřítka – 100 μm . **d, e** – Nepozorovali jsme změny myelinizace v okolí hipokampální oblasti. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Luxolové modři. Měřítka – 100 a 200 μm . **f** – Nekrotické neurony jsme detekovali také ve vrstvě granulárních buněk v *gyrus dentatus*. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítka – 100 μm . CA1 – Ammonův roh, oblast 1; CA2 – Ammonův roh, oblast 2; CA3 – Ammonův roh, oblast 3; chp – choroidální plexus; mo – molekulární vrstva; po – polymorfní vrstva; sg – vrstva granulárních buněk.

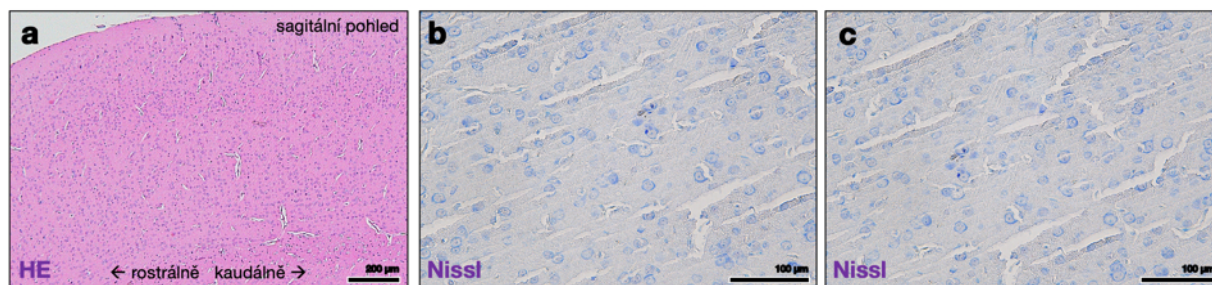


Obrázek S21. Histopatologická analýza hipokampální oblasti – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/11\text{w}$ skupina, jedenáctidenní experiment. **a** – Hipokampální oblast. V okolí hipokampální formace jsme pozorovali spongiformní změny (šipky). Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí HE. Měřítka – 200 μm . **b** – Oblast *gyrus dentatus*, v okolí byly nalezeny spongiformní změny. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí HE. Měřítka – 100 μm . **c** – V pyramidální vrstvě Ammonova rohu jsme pouze vzácně detekovali nekrotické neurony. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítka – 100 μm . **d, e** – Myelinizace axonů byla v okolí hipokampální formace beze změn. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Luxolové modři. Měřítka – 100 a 200 μm . **f** – Vrstva granulárních buněk byla bez přítomnosti nekrotických neuronů. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítka – 100 μm . CA1 – Ammonův roh, oblast 1; CA2 – Ammonův roh, oblast 2; CA3 – Ammonův roh, oblast 3; chp – choroidální plexus; mo – molekulární vrstva; po – polymorfní vrstva; sg – vrstva granulárních buněk.

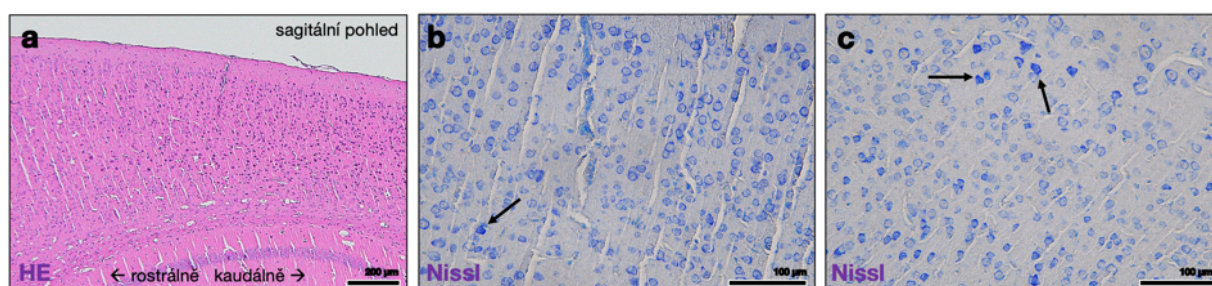


Obrázek S22. Histopatologická analýza hipokampální oblasti – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs/CL}$ skupina, jedenáctitýdenní experiment. **a** – Hipokampální oblast. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí HE. Měřítka – 200 μm . **b** – Oblast *gyru dentatu* bez patologických nálezů. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí HE. Měřítka – 100 μm . **c** – V pyramidální vrstvě Ammonova rohu jsme pozorovali četné nekrotické neurony. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítka – 100 μm . **d, e, f** – Analýza neurofilament neprokázala změny vůči kontrolní skupině. Sagitální pohled. 2H3+ pozitivní struktury byly detekovány pomocí IHC. Jádra jsou obarvena pomocí Hematoxylinu modře. Měřítka – 100 a 200 μm . **g, h** – V případě myelinizace axonů jsme v této experimentální skupině nedetekovali žádné významné změny. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Luxolové modři. Měřítka – 100 a 200 μm . **i** – Také v granulózní vrstvě gyru dentatu jsme detekovali místy nekrotické neurony. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítka – 100 μm . CA1 – Ammonův roh, oblast 1; CA2 – Ammonův roh, oblast 2; CA3 – Ammonův roh, oblast 3; chp – choroidální plexus; mo – molekulární vrstva; po – polymorfnní vrstva; sg – vrstva granulózních buněk.

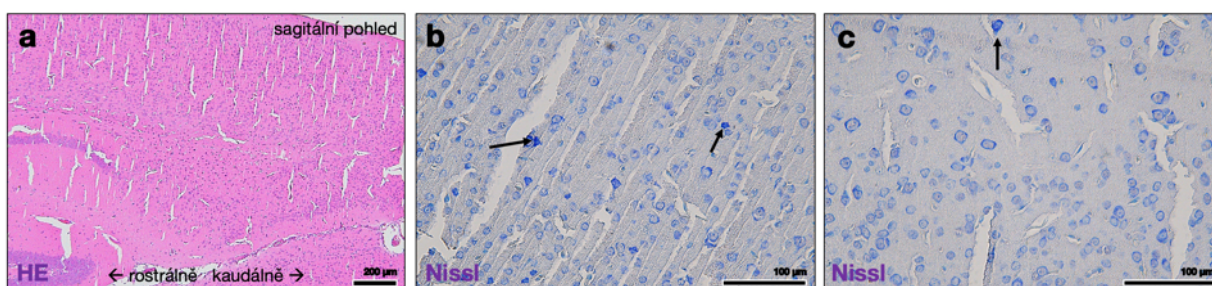
Histopatologická analýza oblasti isocortex



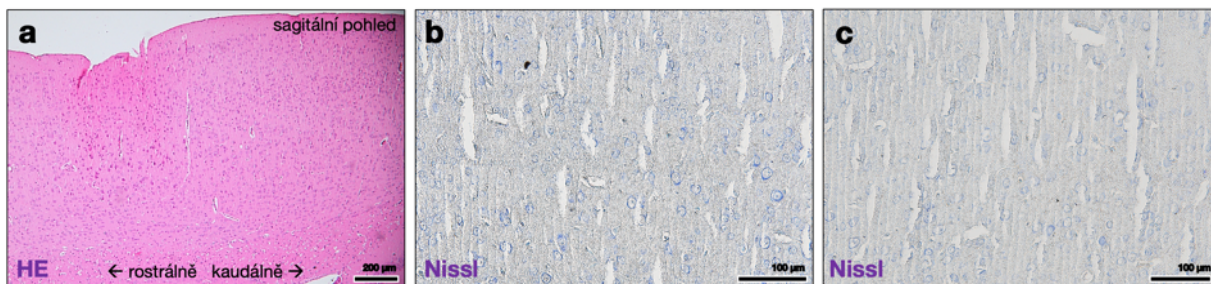
Obrázek S23. Histopatologická analýza oblasti isocortex – kontrolní skupina, šestitýdenní experiment. **a** – Část oblasti isocortex – malé zvětšení. Sagitální řez. Histologický řez byl obarven Hematoxylinem-Eosinem (HE). Měřítko – 200 µm. **b, c** – V kontrolní skupině šestitýdenního experimentu jsme v oblasti isocortexu pouze vzácně pozorovali nekrotické neurony. Nekrotické neurony jsme detekovali pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítko – 100 µm.



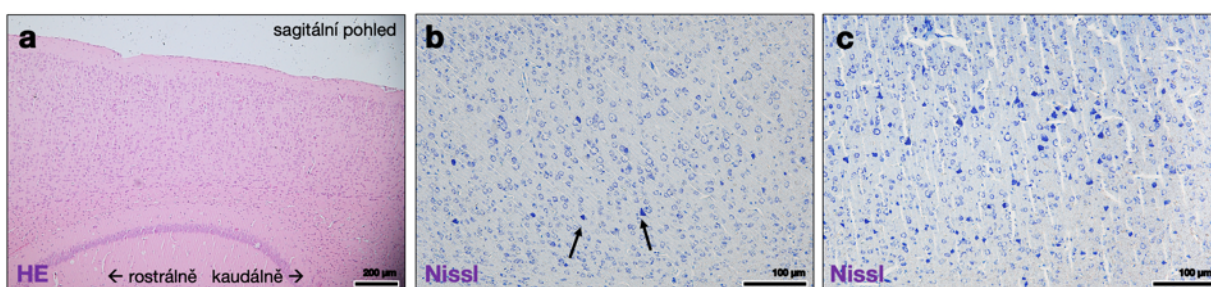
Obrázek S24. Histopatologická analýza oblasti isocortex – PbONPs/6w skupina, šestitýdenní experiment. **a** – Část oblasti isocortex – malé zvětšení. Sagitální řez. Histologický řez byl obarven Hematoxylinem-Eosinem (HE). Měřítko – 200 µm. **b, c** – Nekrotické neurony (šipky) jsme pozorovali zejména v oblasti isocortexu pozorovali hojně. Nekrotické neurony jsme detekovali pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítko – 100 µm.



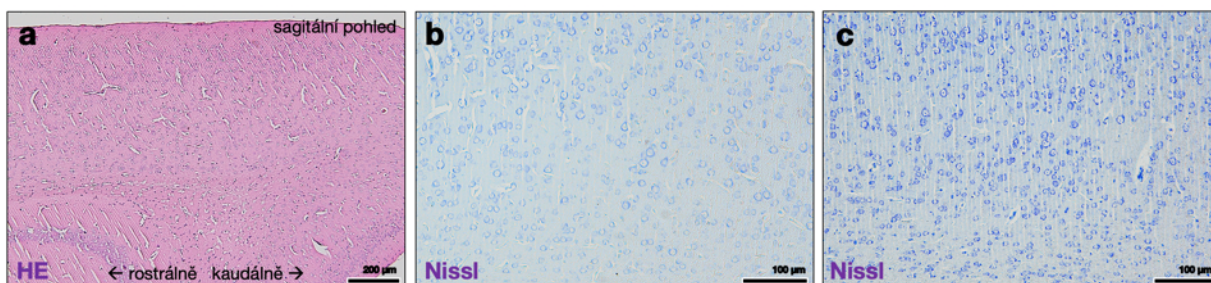
Obrázek S25. Histopatologická analýza oblasti isocortex – Pb(NO₃)₂NPs/6w skupina, šestitýdenní experiment. **a** – Část oblasti isocortex – malé zvětšení. Sagitální řez. Histologický řez byl obarven Hematoxylinem-Eosinem (HE). Měřítko – 200 µm. **b, c** – V oblasti isocortexu jsme po šesti týdnech inhalace rozpustných nanočástic olova četné nekrotické neurony (šipky). Nekrotické neurony jsme detekovali pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítko – 100 µm.



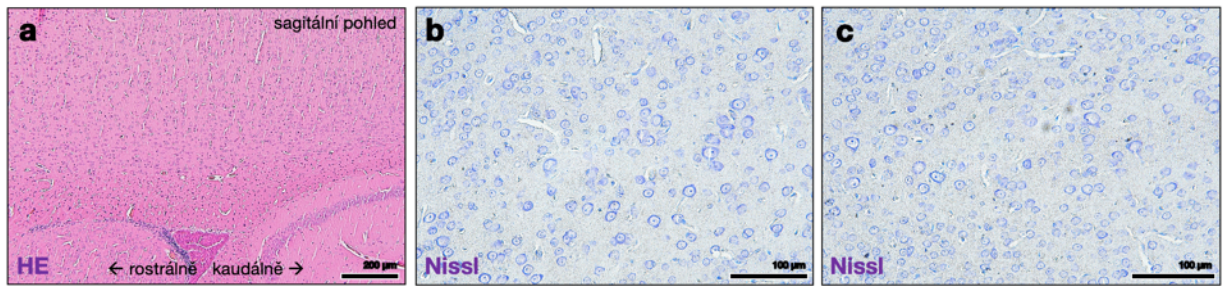
Obrázek S26. Histopatologická analýza oblasti isocortex – kontrolní skupina, jedenáctitýdenní experiment. **a** – Část oblasti isocortex – malé zvětšení. Sagitální řez. Histologický řez byl obarven Hematoxylinem-Eosinem (HE). Měřítko – 200 µm. **b, c** – V kontrolní skupině šestitýdenního experimentu jsme v oblasti isocortexu pouze vzácně pozorovali nekrotické neurony. Nekrotické neurony jsme detekovali pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítko – 100 µm.



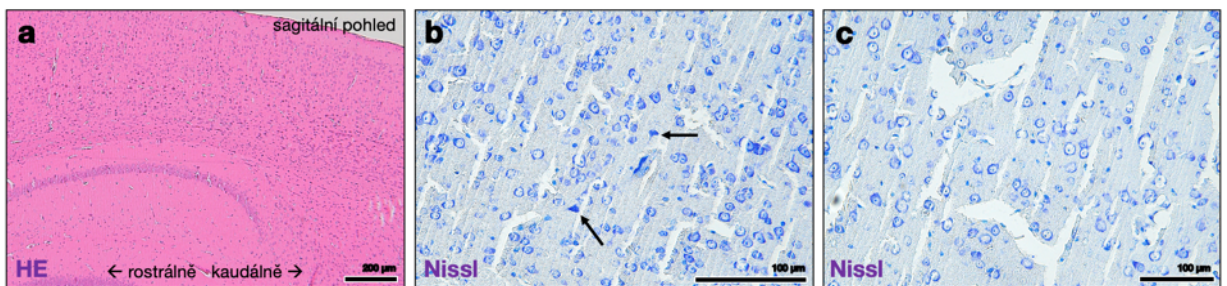
Obrázek S27. Histopatologická analýza oblasti isocortex – PbONPs/11w skupina, jedenáctitýdenní experiment. **a** – Část oblasti isocortex – malé zvětšení. Sagitální řez. Histologický řez byl obarven Hematoxylinem-Eosinem (HE). Měřítko – 200 µm. **b, c** – Ve skupině PbONPs/11w jsme v oblasti isocortexu pozorovali četné nekrotické neurony, které jsme vizualizovali pomocí detekce Nisslovy tigroidní substance (Nissl). Měřítko – 100 µm.



Obrázek S28. Histopatologická analýza oblasti isocortex – PbONPs/CL skupina, šestitýdenní experiment. **a** – Část oblasti isocortex – malé zvětšení. Sagitální řez. Histologický řez byl obarven Hematoxylinem-Eosinem (HE). Měřítko – 200 µm. **b, c** – Ve skupině PbONPs/CL jsme nekrotické neurony našli pouze zřídka. Nekrotické neurony jsme detekovali pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítko – 100 µm.

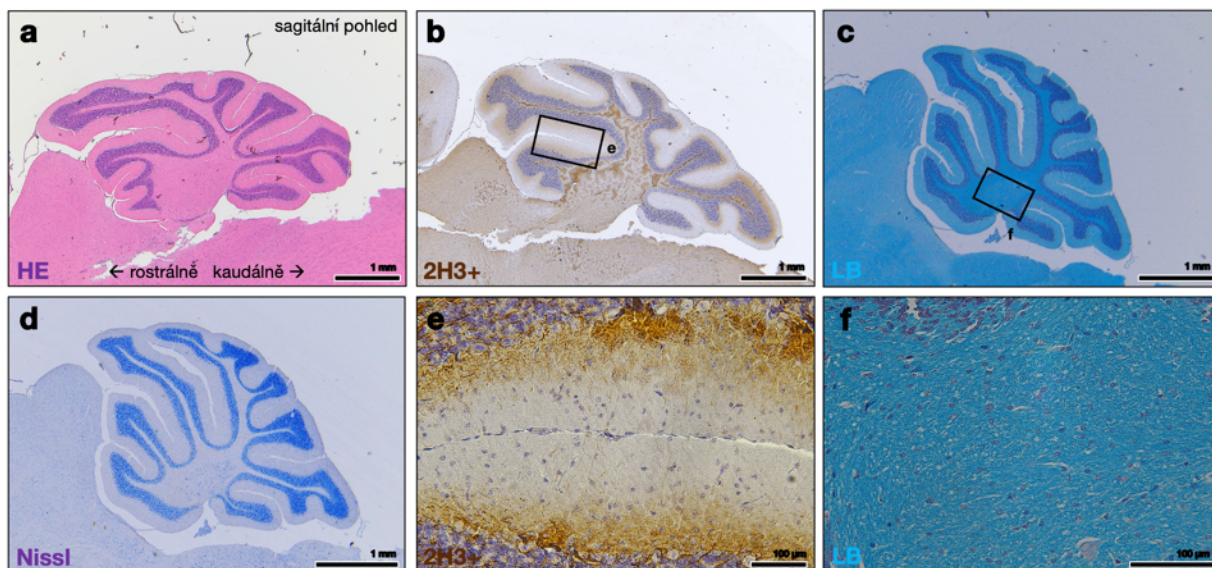


Obrázek S29. Histopatologická analýza oblasti isocortex – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/11\text{w}$ skupina, šestitýdenní experiment. **a** – Část oblasti isocortex – malé zvětšení. Sagitální řez. Histologický řez byl obarven Hematoxylinem-Eosinem (HE). Měřítka – 200 μm . **b, c** – Ve skupině $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/11\text{w}$ jsme nepozorovali nekrotické neurony. Nekrotické neurony jsme detekovali pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítka – 100 μm .

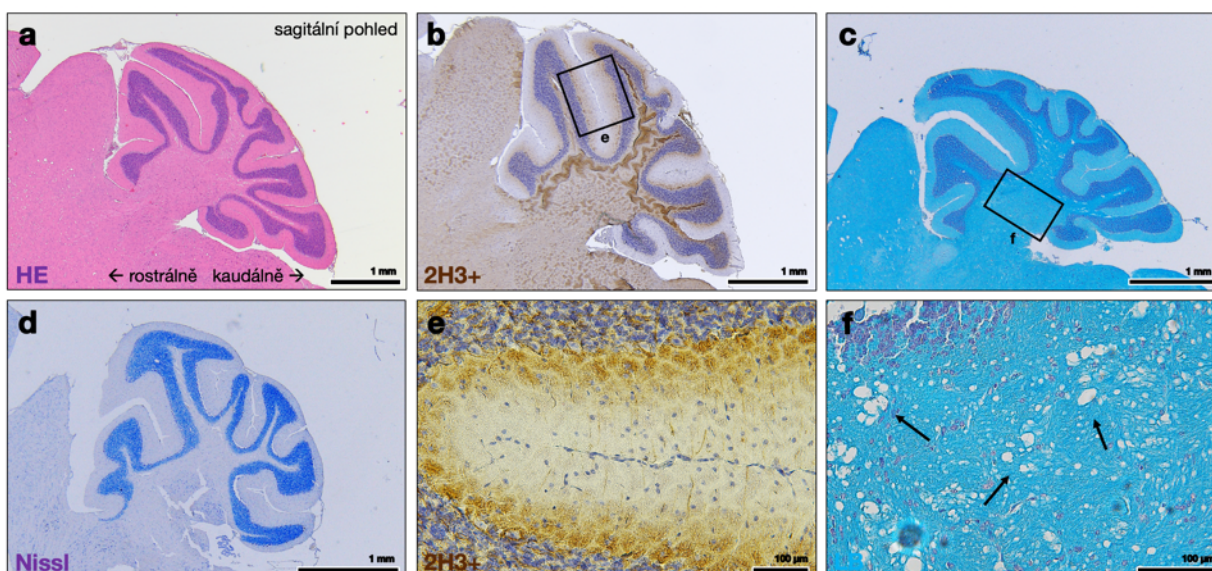


Obrázek S30. Histopatologická analýza oblasti isocortex – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$ skupina, šestitýdenní experiment. **a** – Část oblasti isocortex – malé zvětšení. Sagitální řez. Histologický řez byl obarven Hematoxylinem-Eosinem (HE). Měřítka – 200 μm . **b, c** – U jedinců jsme v isocortexu pozorovali jen příležitostně nekrotické neurony. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítka – 100 μm .

Histopatologická analýza mozečku

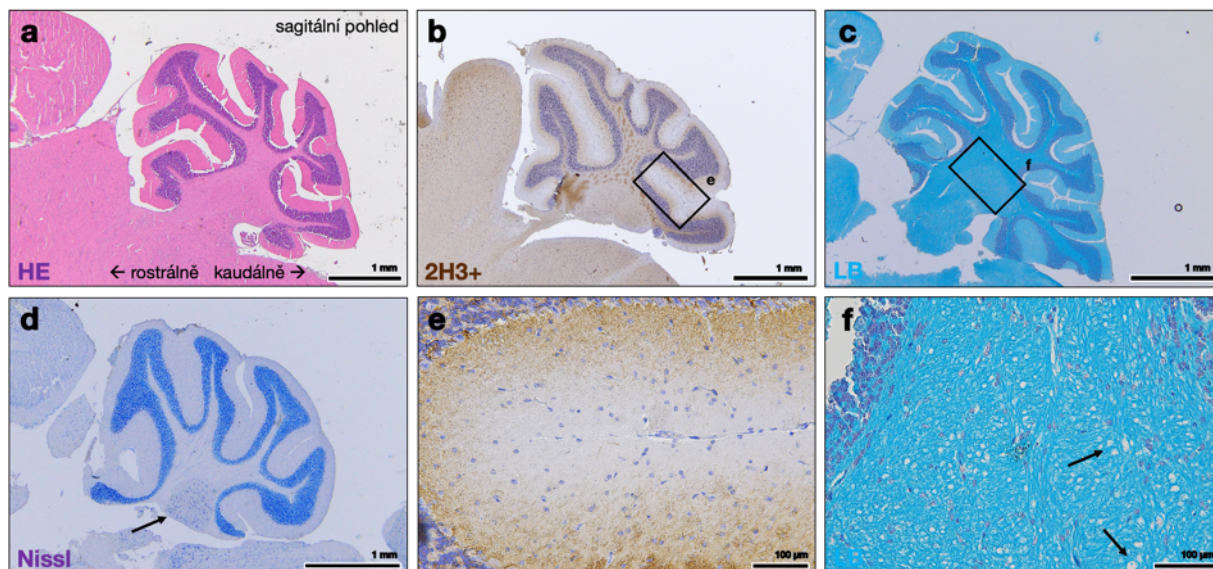


Obrázek S31. Histopatologická analýza oblasti mozečku – kontrolní skupina, šestitýdenní experiment. **a** – Oblast mozečku, sagitální řez. Histologický řez byl obarven pomocí Hematoxylinu-Eosinu (HE). Měřítko – 1 mm. **b, e** – 2H3-pozitivní struktury jsme pozorovali v kůře i dřeni mozečku, blíže jsme se zaměřili na molekulární vrstvu kvůli Purkyňovým buňkám. I v této oblasti byl signál rovnoměrně distribuován. Na histologickém řezu jsme detekovali 2H3 pomocí IHC. Jádra buněk jsou obarvena modře Hematoxylinem. Měřítko – 1 mm, 100 µm. **c, f** – Dále jsme analyzovali bílou hmotu mozečku. V případě kontrolní skupiny byla její struktura pravidelná, bez známek poškození. Histologický řez byl obarven pomocí Luxolové modři (LB). Měřítko – 1 mm, 100 µm. **d** – Pomocí detekce Nisslovy tigroidní substance jsme detekovali případné nekrotické neurony, v bílé hmotě mozečku a jejím okolí jsme žádné nepozorovali. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítko – 100 µm.

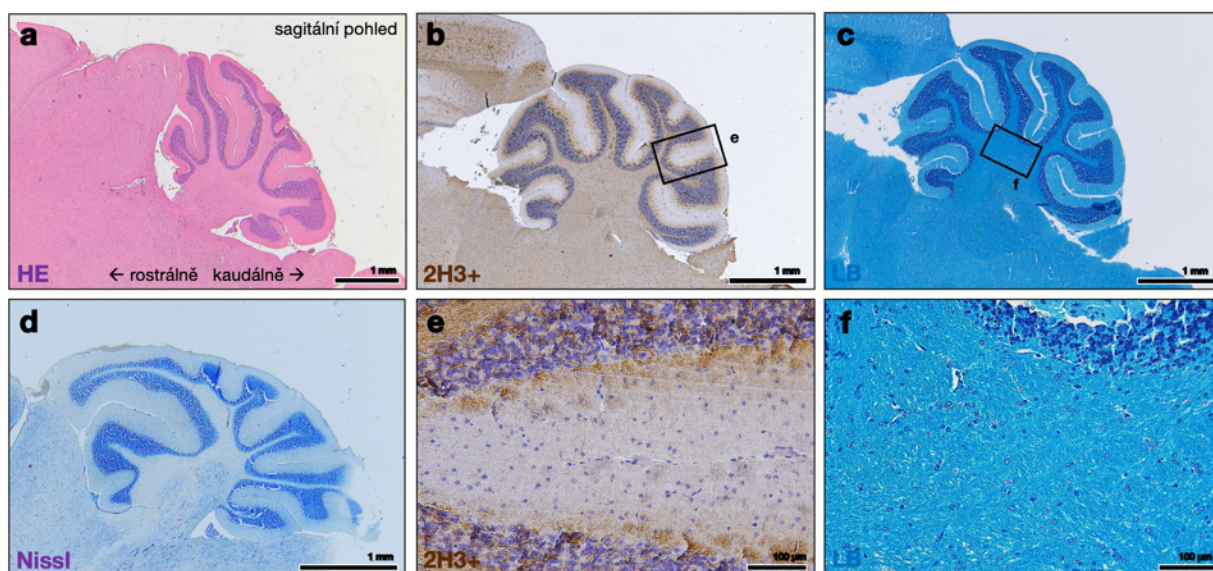


Obrázek S32. Histopatologická analýza oblasti mozečku – PbONPs/6w skupina, šestitýdenní experiment. **a** – Oblast mozečku, sagitální řez. Histologický řez byl obarven pomocí Hematoxylinu-Eosinu (HE). Měřítko – 1 mm. **b, e** – 2H3-pozitivní struktury byly rovnoměrně distribuovány v celém mozečku, oproti kontrolní skupině jsme nepozorovali žádné změny. Na histologickém řezu jsme detekovali 2H3 pomocí IHC. Jádra buněk jsou obarvena modře Hematoxylinem. Měřítko – 1 mm, 100 µm. **c, f** – V bílé hmotě mozečku jsme pozorovali významné strukturální změny. Histologický řez byl obarven pomocí Luxolové modři (LB). Měřítko – 1 mm, 100 µm. **d** –

Nekrotické neurony jsme v oblasti bílé hmoty mozečku nedetekovali. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítko – 100 μm .

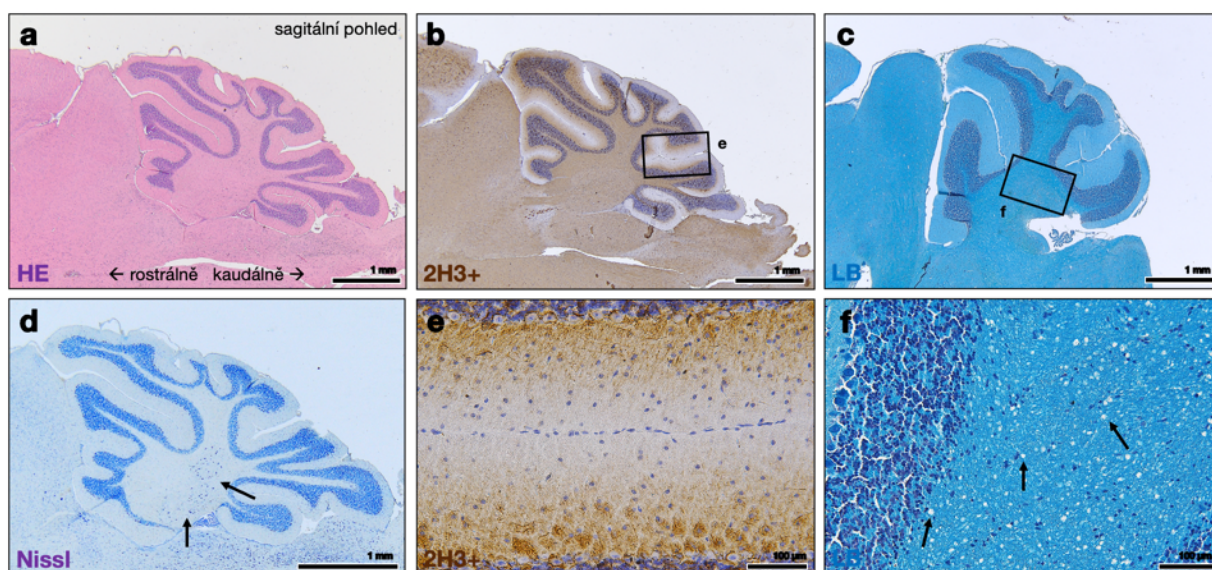


Obrázek S33. Histopatologická analýza oblasti mozečku – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/6\text{w}$ skupina, šestitýdenní experiment. **a** – Oblast mozečku, sagitální řez. Histologický řez byl obarven pomocí Hematoxylinu-Eosinu (HE). Měřítko – 1 mm. **b, e** – Nervová vlákna, detekovaná pomocí 2H3, jsme pozorovali rovnoměrně v celé oblasti mozečku. Nepozorovali jsme jejich úbytek či změny v uspořádání. Na histologickém řezu jsme detekovali 2H3 pomocí IHC. Jádra buněk jsou obarvena modře Hematoxylinem. Měřítko – 1 mm, 100 μm . **c, f** – V bílé hmotě mozečku jsme pozorovali strukturální změny (šipky). Histologický řez byl obarven pomocí Luxolové modři (LB). Měřítko – 1 mm, 100 μm . **d** – V bílé hmotě mozečku jsme také detekovali četné nekrotické neurony (šipka). Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítko – 100 μm .

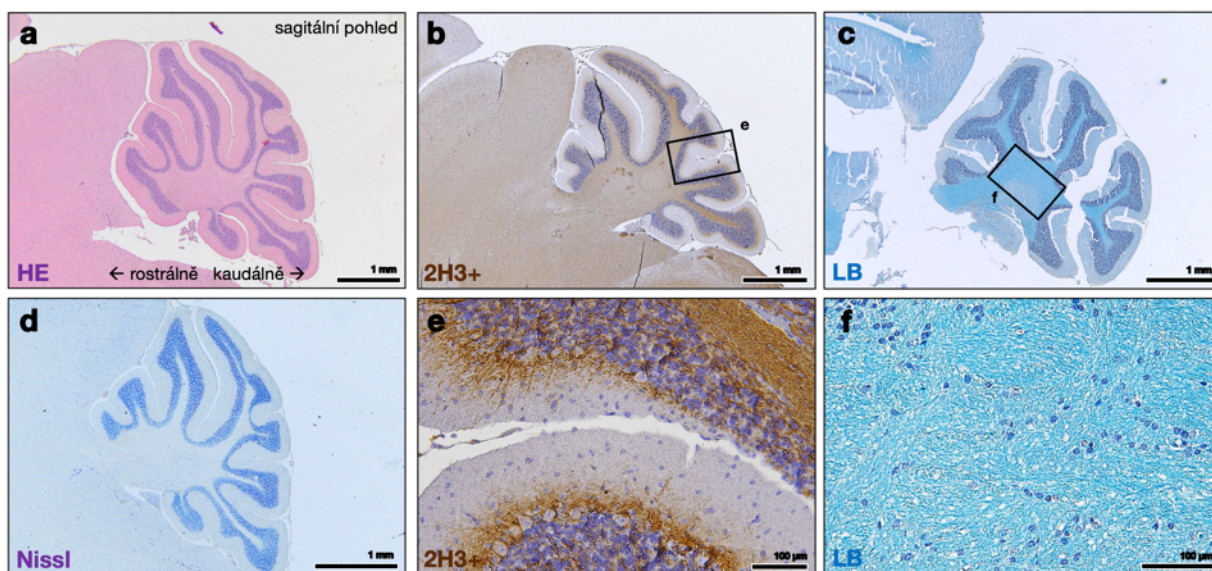


Obrázek S34. Histopatologická analýza oblasti mozečku – kontrolní skupina, jedenáctitýdenní experiment. **a** – Oblast mozečku, sagitální řez. Histologický řez byl obarven pomocí Hematoxylinu-Eosinu (HE). Měřítko – 1 mm. **b, e** – 2H3-pozitivní struktury byly rovnoměrně distribuovány v celém mozečku, oproti kontrolní skupině jsme nepozorovali žádné změny. Na histologickém řezu jsme detekovali 2H3 pomocí IHC. Jádra buněk jsou obarvena modře Hematoxylinem. Měřítko – 1 mm, 100 μm . **c, f** – Bílá hmota mozečku byla v kontrolní skupině pravidelná, bez známek narušení. Histologický řez byl obarven pomocí Luxolové modři (LB). Měřítko – 1 mm, 100 μm .

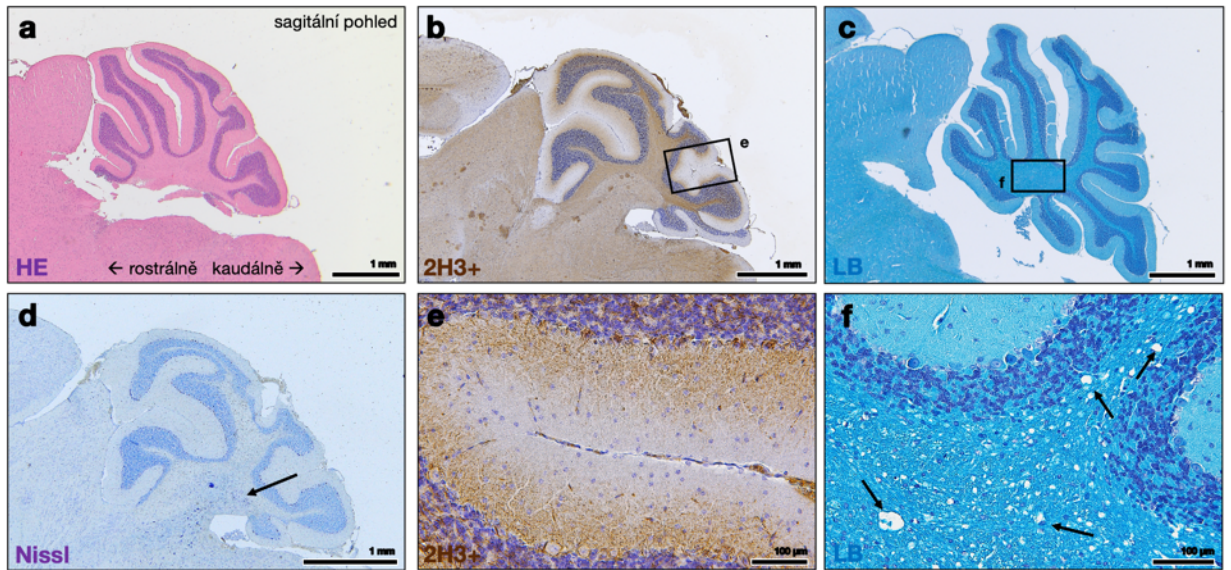
d – V bílé hmotě mozečku jsme nepozorovali nekrotické neurony. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítko – 1 mm.



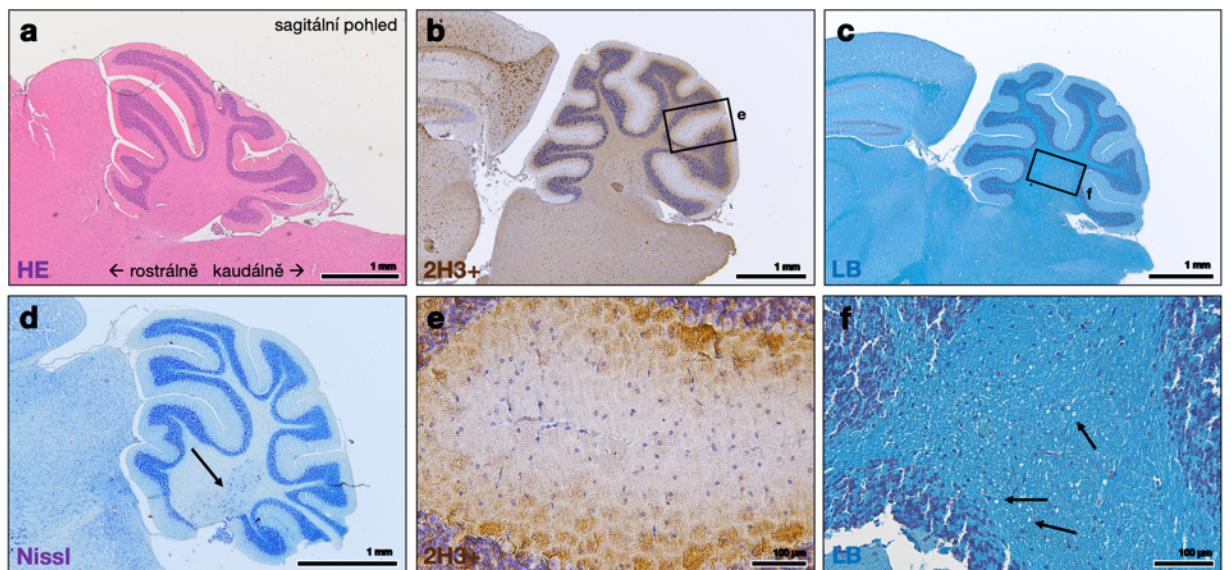
Obrázek S35. Histopatologická analýza oblasti mozečku – PbONPs/11w, jedenáctitýdenní experiment. **a** – Oblast mozečku, sagitální řez. Histologický řez byl obarven pomocí Hematoxylinu-Eosinu (HE). Měřítko – 1 mm. **b, e** – 2H3-positivní struktury byly rovnoměrně distribuovány v celém mozečku, oproti kontrolní skupině jsme nepozorovali žádné změny. Na histologickém řezu jsme detekovali 2H3 pomocí IHC. Jádra buněk jsou obarvena modře Hematoxylinem. Měřítko – 1 mm, 100 μ m. **c, f** – Bílá hmota ve skupině PbONPs/11w byla odlišná od kontrolní skupiny. Pozorovali jsme útvary (šípky) připomínající vakuoly. Histologický řez byl obarven pomocí Luxolové modří (LB). Měřítko – 1 mm, 100 μ m. **d** – V bílé hmotě mozečku jsme detekovali mnoho nekrotických neuronů. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítko – 1 mm.



Obrázek S36. Histopatologická analýza oblasti mozečku – PbONPs/CL, jedenáctitýdenní experiment. **a** – Mozeček, sagitální řez. Histologický řez byl obarven pomocí Hematoxylinu-Eosinu (HE). Měřítko – 1 mm. **b, e** – 2H3+ struktury jsme pozorovali obdobným způsobem jako v kontrolní skupině, nepozorovali jsme žádné změny. Na histologickém řezu jsme detekovali 2H3 pomocí IHC. Jádra buněk jsou obarvena modře Hematoxylinem. Měřítko – 1 mm, 100 μ m. **c, f** – Analýza bílé hmoty mozečku ukázala poškození její struktury, obdobně jako ve skupině PbONPs/11w jsme pozorovali struktury připomínající vakuoly. Histologický řez byl obarven Luxolovou modří (LB). Měřítko – 1 mm, 100 μ m. **d** – Nekrotické neurony jsme v bílé hmotě mozečku nepozorovali. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítko – 1 mm.

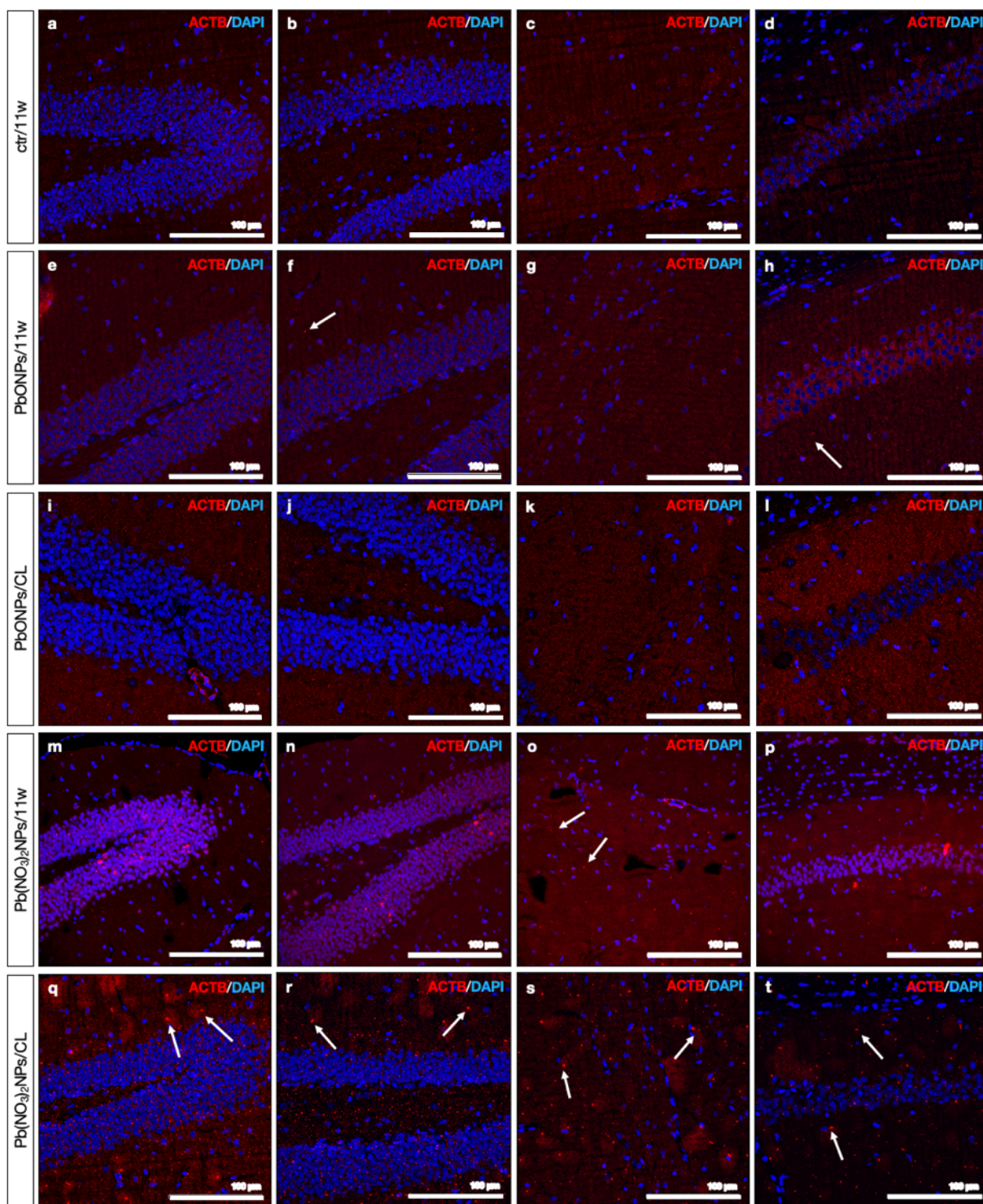


Obrázek S37. Histopatologická analýza oblasti mozečku – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/11\text{w}$ skupina, jedenáctitýdenní experiment. a – Oblast mozečku, sagitální řez. Histologický řez byl obarven pomocí Hematoxylinu-Eosinu (HE). Měřítka – 1 mm. b, e – 2H3-pozitivní struktury byly rovnoměrně distribuovány v celém mozečku, oproti kontrolní skupině jsme nepozorovali žádné změny. Na histologickém řezu jsme detekovali 2H3 pomocí IHC. Jádra buněk jsou obarvena modře Hematoxylinem. Měřítka – 1 mm, 100 μm . c, f – Ve skupině $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/11\text{w}$ jsme pozorovali zdaleka nejrozsáhlejší změny bílé hmoty mozečku (šipky). Histologický řez byl obarven Luxolovou modří (LB). Měřítka – 1 mm, 100 μm . d – V bílé hmotě mozečku jsme detekovali nekrotické neurony. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítka – 1 mm.



Obrázek S38. Histopatologická analýza oblasti mozečku – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$ skupina, jedenáctitýdenní experiment. a – Oblast mozečku, sagitální řez. Histologický řez byl obarven pomocí Hematoxylinu-Eosinu (HE). Měřítka – 1 mm. b, e – 2H3-pozitivní struktury byly rovnoměrně distribuovány v celém mozečku, oproti kontrolní skupině jsme nepozorovali žádné změny. Na histologickém řezu jsme detekovali 2H3 pomocí IHC. Jádra buněk jsou obarvena modře Hematoxylinem. Měřítka – 1 mm, 100 μm . c, f – Bílá hmota mozečku byla značně poškozena, nicméně toto poškození nebylo tak závažné jako ve skupině $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/11\text{w}$, eliminační období se tedy ukázalo jako částečně efektivní. d – V oblasti bílé hmoty mozečku jsme detekovali Nissl-pozitivní neurony. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení (Nissl). Měřítka – 1 mm.

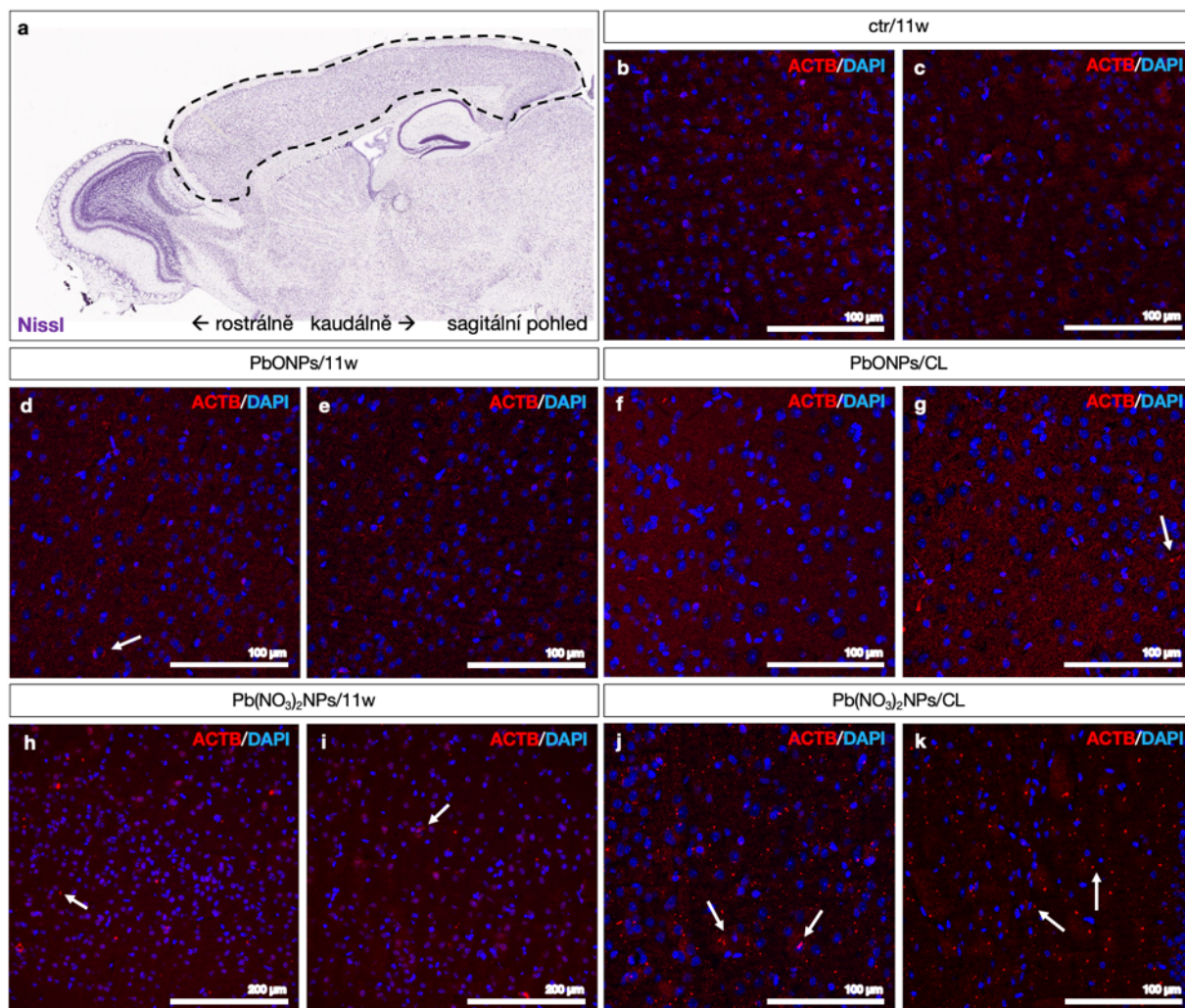
Analýza exprese Beta-Aktinu v hipokampální oblasti



Obrázek S39. Analýza exprese proteinu ACTB v hipokampální oblasti. a, b, c, d – V kontrolní skupině byla exprese ACTB distribuována rovnoměrně, a to ve všech analyzovaných oblastech hipokampu. Sagitální pohled. Histologické řezy byly obarveny pomocí IF metody s markerem ACTB (červeně). Jádra jsou obarvena pomocí DAPI modře. Měřítko – 100 μm . e, f, g, h – U jedinců z PbONPs/11w skupiny byly zřetelné shluky ACTB-pozitivních struktur, zejména v molekulární vrstvě *gyrus dentatus* a *stratum radiatum* Ammonova rohu. Sagitální pohled. Histologické řezy byly obarveny pomocí IF metody s markerem ACTB (červeně). Jádra jsou obarvena pomocí DAPI modře. Měřítko – 100 μm . i, j, k, l – Ve skupině PbONPs/CL byly změny exprese ACTB i přes pětitédenní eliminační období viditelné. Sagitální pohled. Histologické řezy byly obarveny pomocí IF metody s markerem ACTB (červeně). Jádra jsou obarvena pomocí DAPI modře. Měřítko – 100 μm . m, n, o, p – Shluky ACTB signálu jsme pozorovali

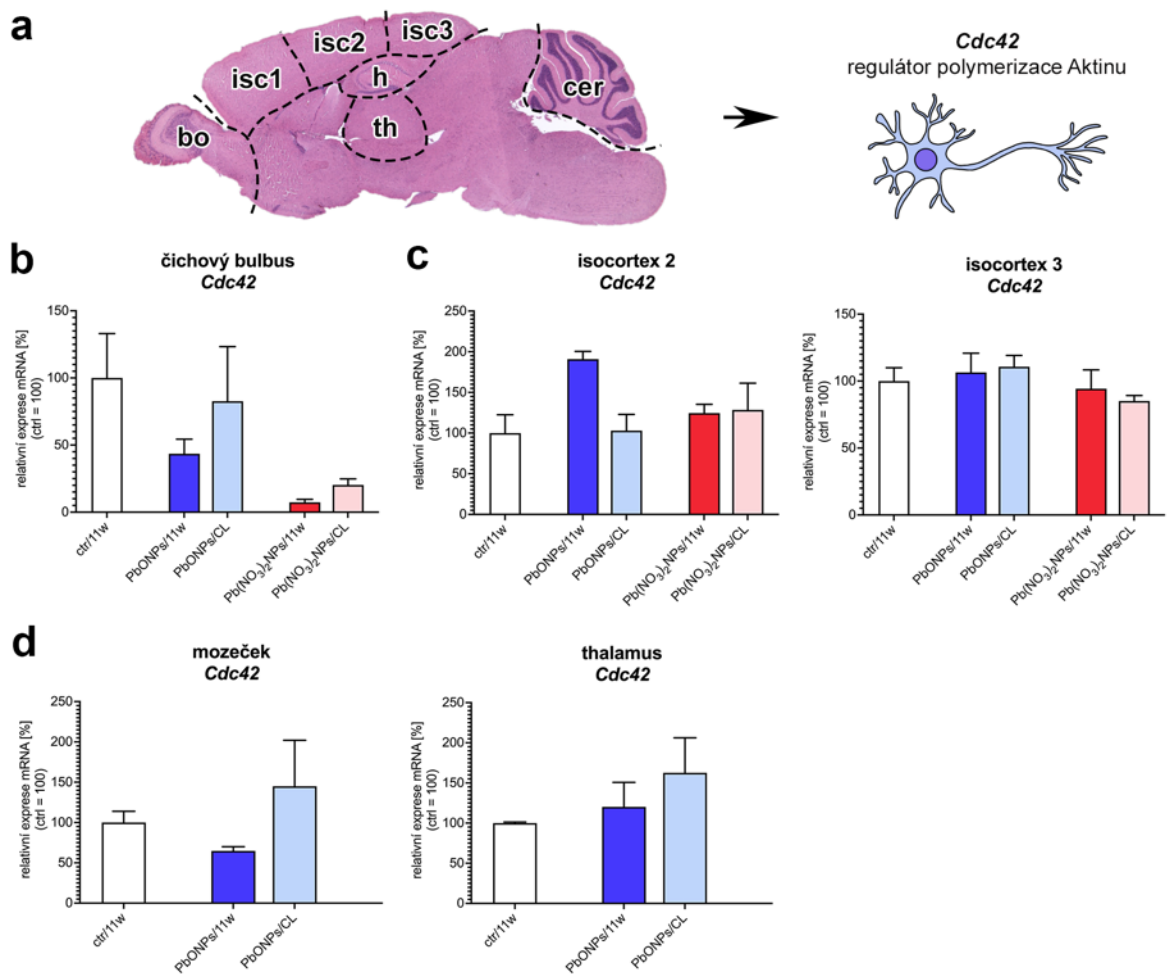
také v hipokampální oblasti jedinců ze skupiny $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/11\text{w}$. Sagitální pohled. Histologické řezy byly obarveny pomocí IF metody s markerem ACTB (červeně). Jádra jsou obarvena pomocí DAPI modře. Měřítko – 100 μm . **q, e, s, t** – Ve skupině $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$ jsme pozorovali nejvýraznější změny v uspořádání ACTB-pozitivních struktur vůči kontrolní skupině. Eliminační období se neukázalo jako efektivní. Sagitální pohled. Histologické řezy byly obarveny pomocí IF metody s markerem ACTB (červeně). Jádra jsou obarvena pomocí DAPI modře. Měřítko – 100 μm .

Analýza exprese ACTB v oblasti isocortexu 1



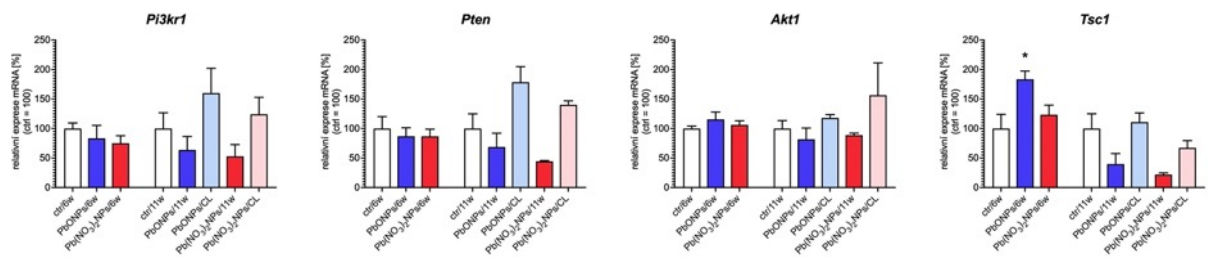
Obrázek S40. Analýza exprese proteinu ACTB v oblasti isocortexu. **a** – Oblast isocortexu – analyzovaná oblast je vyznačena černou přerušovanou čarou. Sagitální pohled. Histologický řez byl obarven pomocí Nisslova barvení. Měřítko není uvedeno. Histologická fotografie je převzata z [92]. **b, c** – V kontrolní skupině jedenáctidenního experimentu jsme pozorovali rovnoměrnou distribuci ACTB-pozitivního signálu. Histologické řezy byly obarveny pomocí IF metody s markerem ACTB (červeně). Jádra jsou obarvena pomocí DAPI modře. Měřítko – 100 µm. **d, e** – Ve skupině PbONPs/11w jsme pozorovali shluky aktinových vláken (šipky) značící změny v aktinovém cytoskeletu. Histologické řezy byly obarveny pomocí IF metody s markerem ACTB (červeně). Jádra jsou obarvena pomocí DAPI modře. Měřítko – 100 µm. **f, g** – Ve skupině PbONPs/CL jsme také detekovali změny v uspořádání aktinového cytoskeletu. Histologické řezy byly obarveny pomocí IF metody s markerem ACTB (červeně). Jádra jsou obarvena pomocí DAPI modře. Měřítko – 100 µm. **h, i** – Ve skupině Pb(NO₃)₂NPs/11w jsme pozorovali výrazné změny v uspořádání aktinového cytoskeletu (šipky). Histologické řezy byly obarveny pomocí IF metody s markerem ACTB (červeně). Jádra jsou obarvena pomocí DAPI modře. Měřítko – 200 µm. **j, k** – Nejvýraznější změny v distribuci ACTB-pozitivního signálu jsme pozorovali ve skupině Pb(NO₃)₂NPs/CL (šipky). Eliminací období se tedy neukázalo jako efektivní. Histologické řezy byly obarveny pomocí IF metody s markerem ACTB (červeně). Jádra jsou obarvena pomocí DAPI modře. Měřítko – 100 µm.

Analýza relativní genové exprese *Cdc42* ve vybraných oblastech mozku

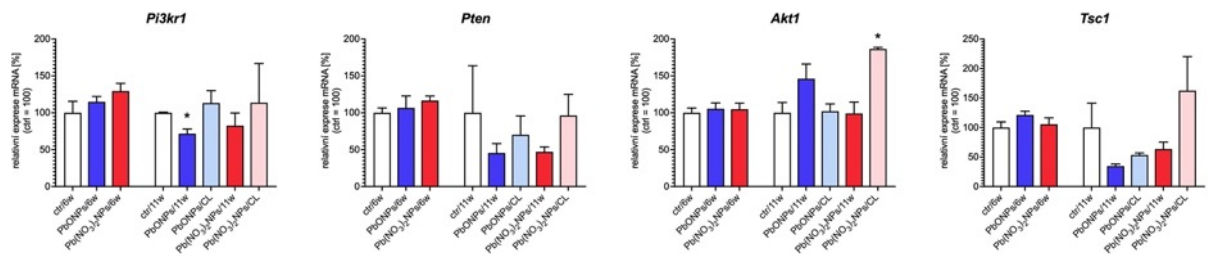


Obrázek S41. Analýza relativní genové exprese *Cdc42* ve vybraných oblastech mozku. Molekula CDC42 je důležitým regulátorem aktinového cytoskeletu. Determinujeme její relativní genovou expresi v různých oblastech mozku.

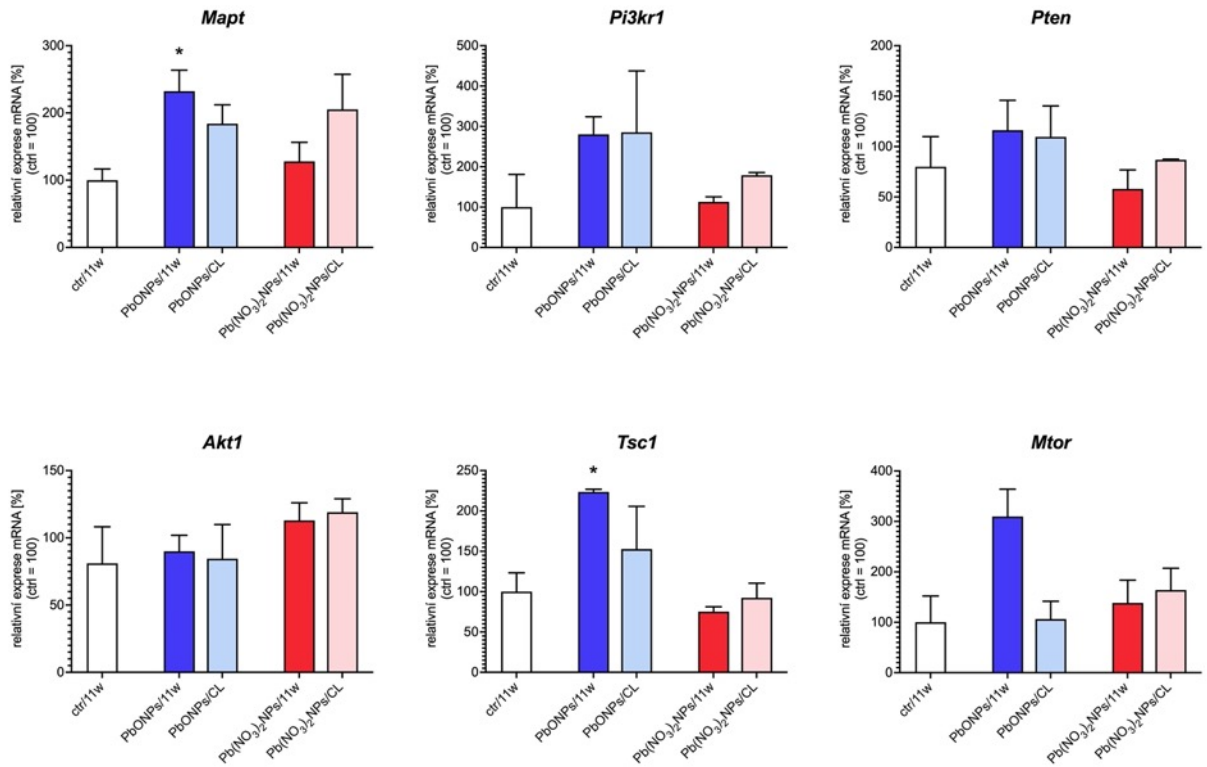
Analyza relativní genové exprese *Mapt* a členů signální dráhy PI3K/Akt/mTOR ve vybraných oblastech mozku



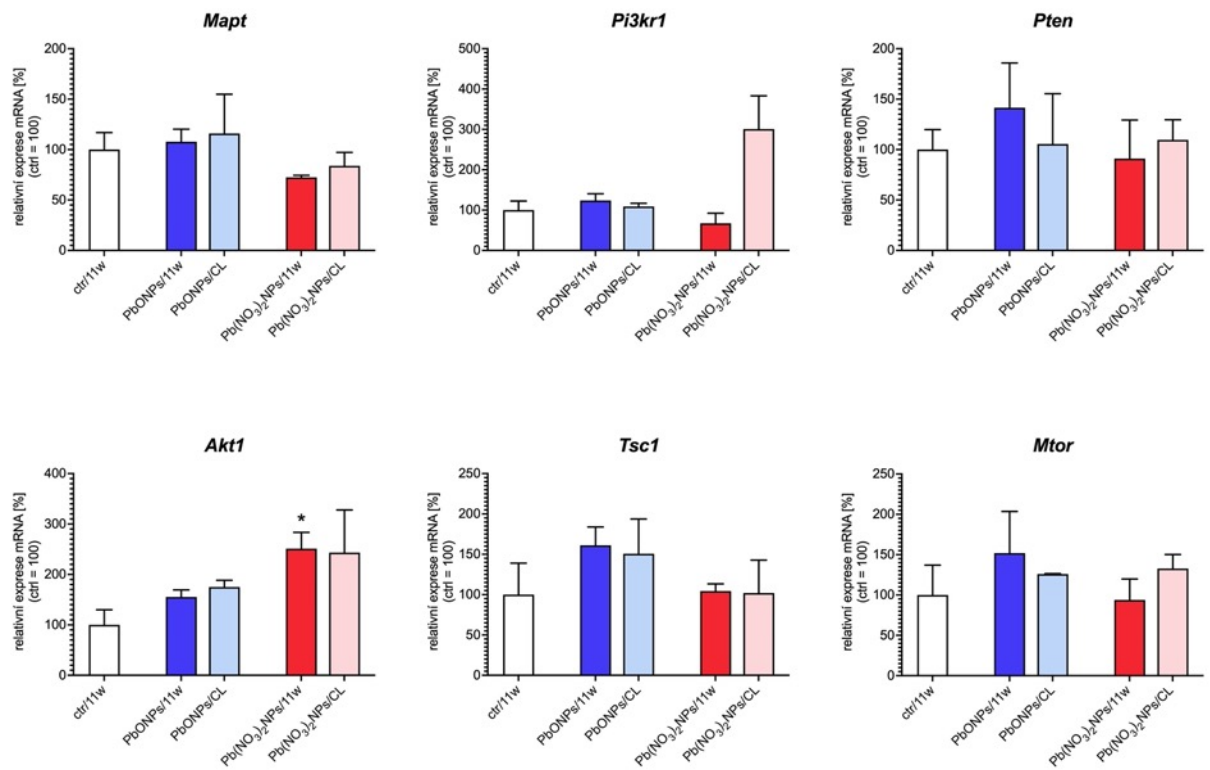
Obrázek S42. Analýza relativní genové exprese vybraných členů PI3K/Akt/mTOR signální dráhy v hipokampální oblasti. Analýza relativní genové exprese *Pi3kr1*, *Pten*, *Akt1* a *Tsc1* ukázala stejný trend. V případě PbONPs/11w a Pb(NO₃)₂NPs/11w došlo ke snížení exprese vybraných členů signální dráhy PI3K/Akt/mTOR ve srovnání s kontrolní skupinou. Ve skupinách s eliminačním obdobím naopak došlo ke zvýšení exprese v porovnání se skupinami, které celých 11 týdnů inhalovaly generované PbNPs. Eliminační období tak přispělo k návratu hodnot na úroveň kontrolní skupiny. Výsledky nejsou statisticky významné ($p > 0,05$).



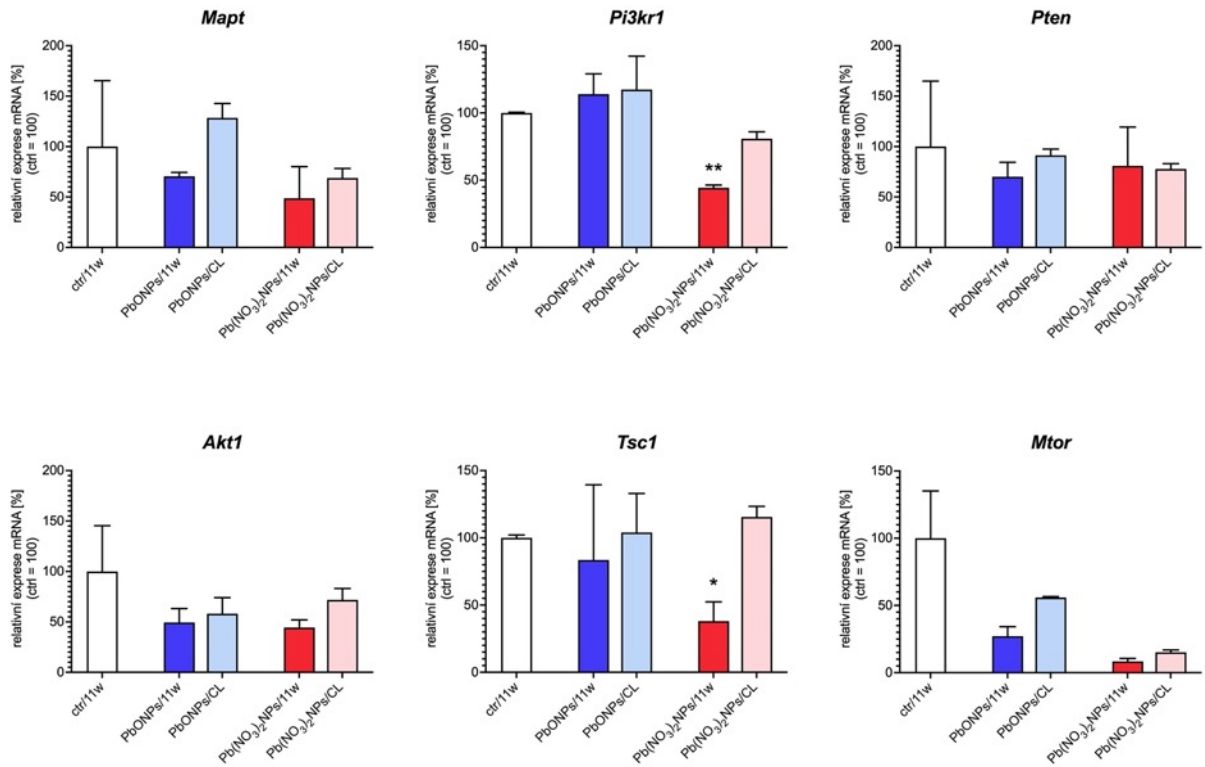
Obrázek S43. Analýza relativní genové exprese vybraných členů PI3K/Akt/mTOR signální dráhy v oblasti isocortexu 1. Exprese genů *Pi3kr1*, *Pten* a *Tsc1* vykazovala stejný trend, jako jsme detekovali v hipokampální oblasti. Ve skupinách PbONPs/11w a Pb(NO₃)₂NPs/11w jsme pozorovali nižší expresi v porovnání s kontrolní skupinou (* $p < 0,05$), ve skupinách s eliminačním obdobím jsme naopak zjistili vyšší expresi vybraných genů vůči skupinám, které celých 11 týdnů inhalovaly generované PbNPs. Eliminační období tak v tomto případě dopomohlo k návratu hodnot genové exprese na úroveň kontrolní skupiny. V případě genu *Akt1* jsme ovšem pozorovali odlišný trend od ostatních analyzovaných genů. V případě PbONPs/11w došlo ke zvýšení exprese *Akt1* vůči kontrolní skupině, podobně jako ve skupině Pb(NO₃)₂NPs/CL (* $p < 0,05$).



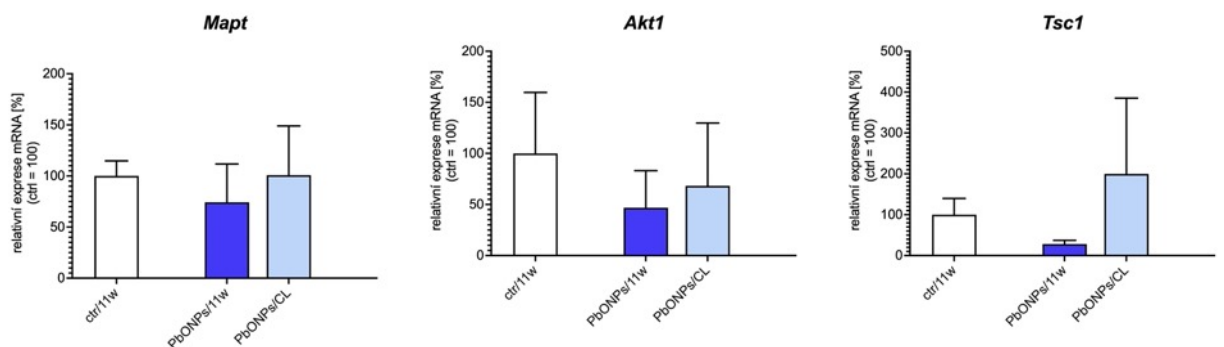
Obrázek S44. Analýza relativní genové exprese *Mapt* a vybraných členů PI3K/Akt/mTOR signální dráhy v oblasti isocortexu 2. V oblasti isocortexu 2 došlo po inhalaci rozpustných i nerozpustných generovaných nanočástic olova ke zvýšení exprese *MAPT*. Největší rozdíl jsme pozorovali mezi kontrolní a PbONPs/11w skupinou (* $p < 0,05$), ostatní výsledky nejsou statisticky signifikantní ($p > 0,05$). Na rozdíl od oblastí hipokampu a isocortexu 1 jsme pozorovali v případě PbONPs/11w skupiny zvýšení exprese vybraných členů PI3K/Akt/mTOR signální dráhy (* $p < 0,05$), v případě ostatních experimentálních skupin jen nevýznamné změny vůči hodnotám kontrolní skupiny.



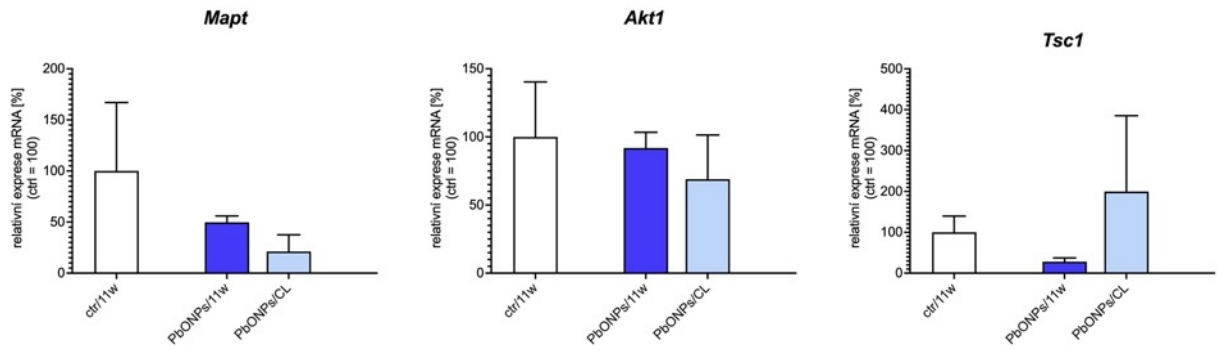
Obrázek S45. Analýza relativní genové exprese *Mapt* a vybraných členů PI3K/Akt/mTOR signální dráhy v oblasti isocortexu 3. Změny v expresi *Mapt* v oblasti isocortexu 3 po inhalaci nanočástic olova byly v porovnání s oblastmi isocortexu 1 a 2 velmi nízké. Výsledky nejsou signifikantní ($p > 0,05$). Relativní genová exprese vybraných členů signální dráhy PI3K/Akt/mTOR v oblasti isocortexu 3 byla podobná jako v oblasti isocortexu 2. Ve skupinách, které inhalovaly PbONPs jsme pozorovali mírné zvýšení exprese kandidátních genů ($p > 0,05$), naopak ve skupinách, které inhalovaly rozpustné PbNPs jsme u některých genů pozorovali výrazněji vyšší expresi v porovnání s kontrolní skupinou (* $p < 0,05$).



Obrázek S46. Analýza relativní genové exprese *Mapt* a vybraných členů PI3K/Akt/mTOR signální dráhy v čichovém bulbu. Po jedenácti týdnech inhalace PbONPs i Pb(NO₃)₂NPs jsme detekovali nižší expresi *Mapt* v porovnání s kontrolní skupinou. Naopak v případě skupin s eliminačním obdobím došlo ke zvýšení exprese *Mapt* vůči skupinám, které 11 týdnů inhalovaly PbNPs. Výsledky nejsou signifikantní. Podobný trend jsme detekovali také v případě hipokampální oblasti. V oblasti čichového bulbu jsme detekovali podobné výsledky analýzy genové exprese vybraných členů signální dráhy PI3K/Akt/mTOR jako v oblasti hipokampu a isocortexu 1. Skupiny, které inhalovaly jedenáct týdnů generované nanočástice olova vykazovaly nižší expresi kandidátních genů vůči kontrolní skupině, u skupin s eliminačním obdobím jsme pozorovali návrat hodnot k úrovni kontrolní skupiny. Výsledky byly statisticky signifikantní (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

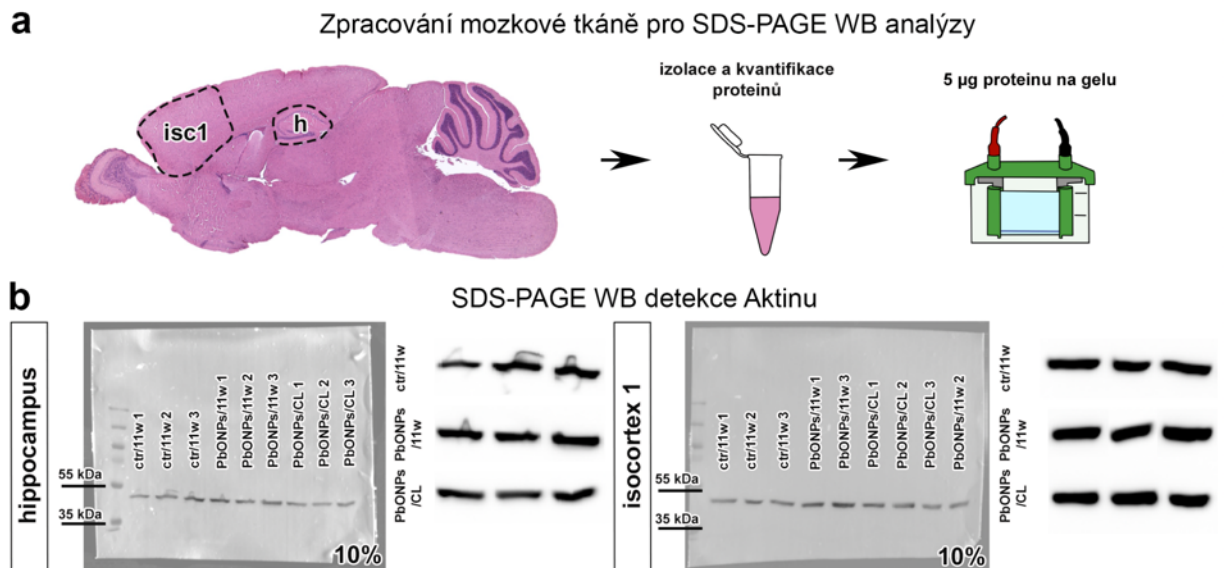


Obrázek S47. Analýza relativní genové exprese *Mapt* a vybraných členů PI3K/Akt/mTOR signální dráhy v mozečku. Oblast mozečku byla analyzována pouze okrajově, pozorovali jsme podobný trend jako v oblastech hipokampu, isocortexu 1 a čichového bulbu, nicméně jsme determinovali velmi vysokou variabilitu mezi jedinci.



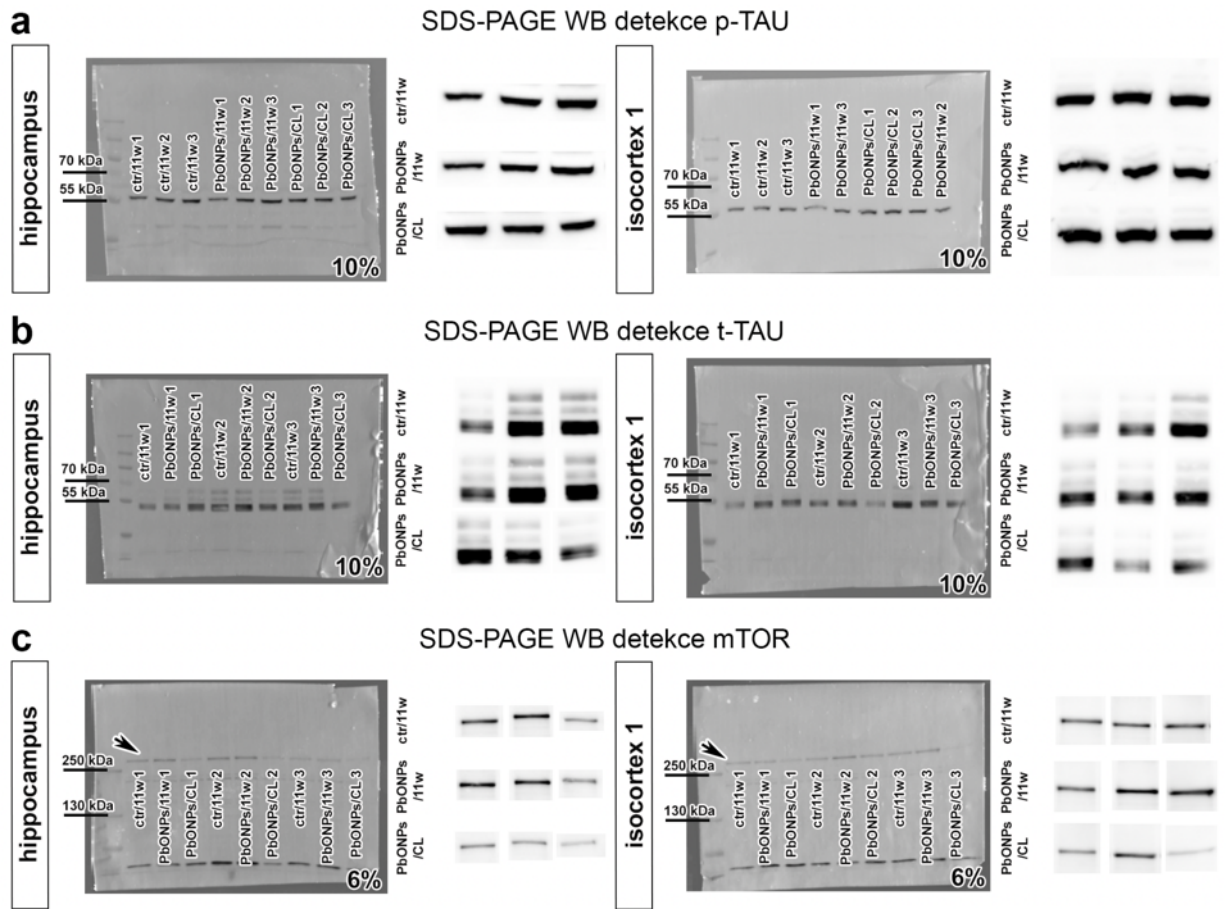
Obrázek S48. Analýza relativní genové exprese *Mapt* a vybraných členů PI3K/Akt/mTOR signální dráhy v oblasti thalamu. Oblast thalamu byla analyzována pouze okrajově, determinovali jsme velmi vysokou variabilitu mezi jedinci.

SDS-PAGE WB analýza exprese Aktin ve vybraných oblastech mozkové tkáně



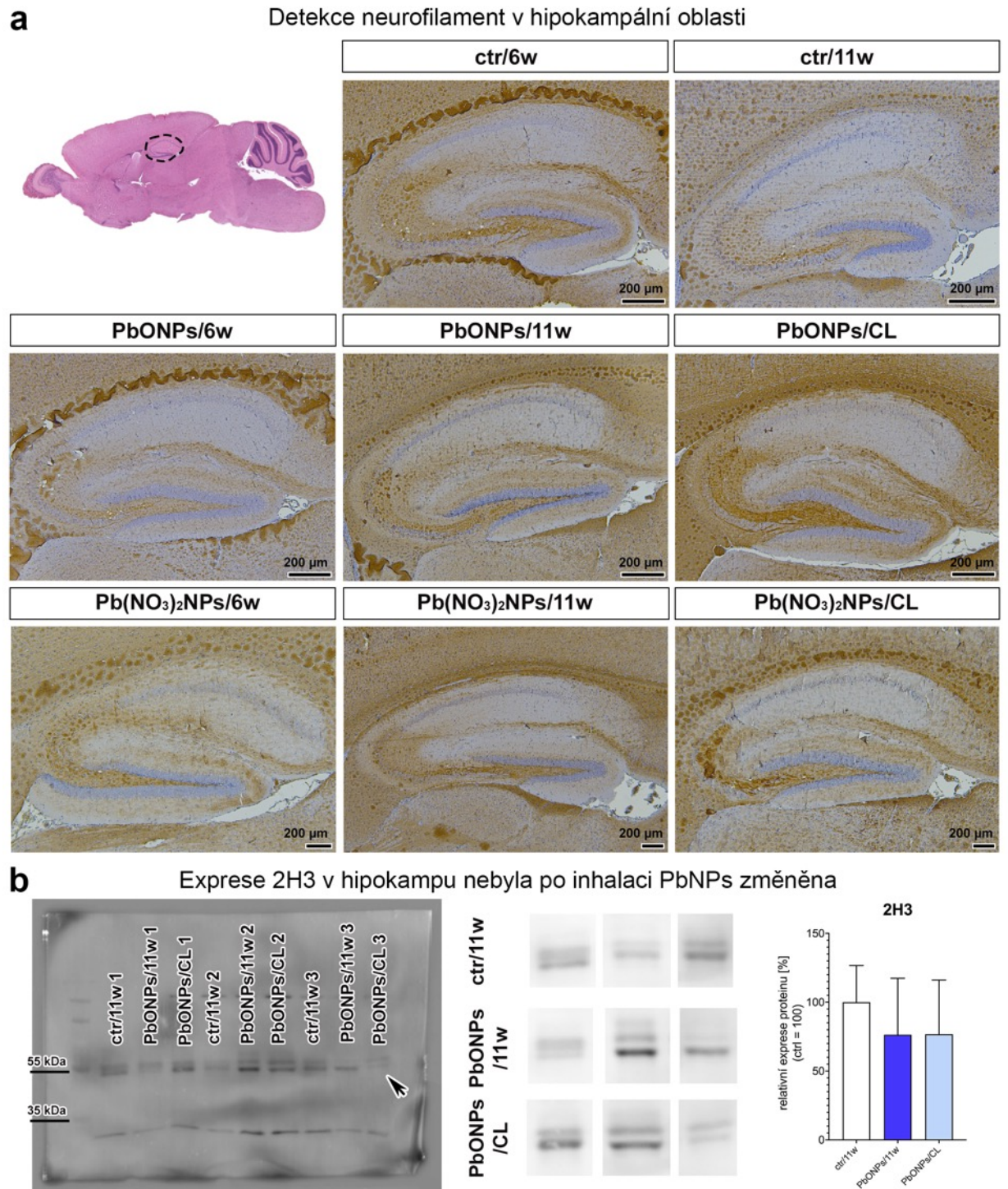
Obrázek S49. Detekce proteinu Aktin pomocí metody SDS-PAGE WB v oblastech hipokampu a isocortexu 1. **a** – Po izolaci proteinů bylo pro analýzu na SDS-PAGE WB použito 5 µg proteinu, absolutní množství proteinu by tedy mělo být pro všechny analýzy stejné. **b** – Distribuce proteinu Aktin byla i přes pozorovanou remodelaci cytoskeletu po inhalaci PbNPs rovnoměrná v kontrolní i exponovaných skupinách. Do analýz nicméně protein Aktin jako housekeeping protein zahrnut nebyl, analyzovali jsme pouze absolutní množství detekovaných proteinů (P2).

SDS-PAGE WB analýza exprese p-TAU, t-TAU a mTOR ve vybraných oblastech mozkové tkáně



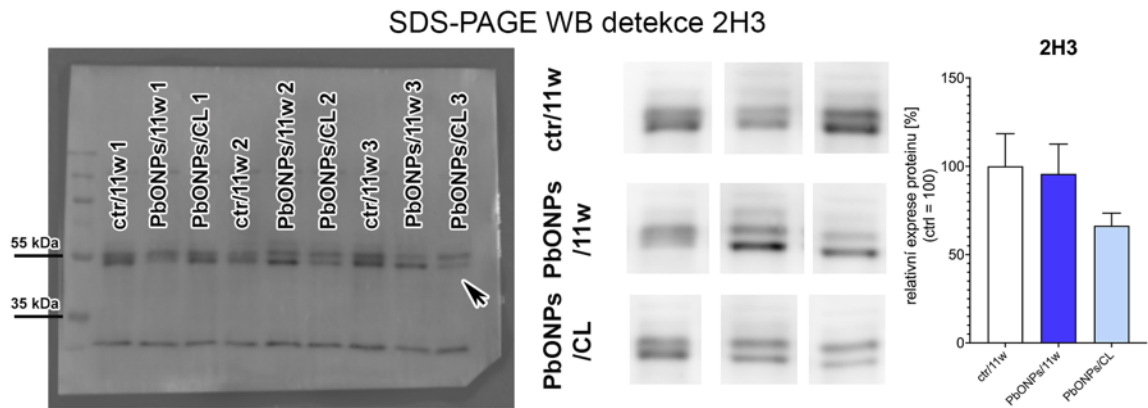
Obrázek S50. Detekce vybraných proteinů v oblastech hipokampu a isocortexu 1 pomocí metody SDS-PAGE WB. a, b, c – Raw data k detekcím p-TAU, t-TAU a mTOR pomocí metody SDS-PAGE WB v oblastech hipokampu a isocortexu 1.

Analýza exprese 2H3 v hipokampální oblasti



Obrázek S51. Analýza exprese 2H3 v hipokampální oblasti. **a** – Detekovali jsme protein 2H3 pomocí IHC metody, nicméně po 11 týdnech inhalace PbNPs jsme nepozorovali žádné změny v množství, distribuci či uspořádání 2H3-positivních struktur. **b** – Protein 2H3 jsme detekovali také pomocí metody SDS-PAGE WB, zde jsme zaznamenali nesignifikantní snížení exprese 2H3 ve skupinách PbONPs/11w a PbONPs/CL, nicméně s velmi vysokou variabilitou mezi jedinci.

SDS-PAGE WB analýza exprese 2H3 v oblasti isocortexu 1



Obrázek S52. Analýza exprese 2H3 v oblasti isocortexu 1. Pomocí metody SDS-PAGE WB jsme detekovali protein 2H3, marker středních neurofilament, nicméně jsme pozorovali pouze minimální změny a poměrně vysokou variabilitu mezi jedinci.

Přehled provedených analýz na vzorcích mozku

Ze každého jedince ze všech experimentálních skupin byla odebrána mozková tkáň, nicméně několik vzorků pro histologické zpracování bylo pro analýzy příliš poškozeno, některé zmražené vzorky byly použity pro jiné analýzy. Pro histologické analýzy bylo použito $n = 3-5$ vzorků z každé skupiny, pro analýzy genové exprese bylo použito $n = 2-5$ vzorků.

Tabulka S7. Přehled provedených histologických analýz na vzorcích mozku.

experimentální skupina	číslo jedince	HE	LB	Nissl	2H3	ACTB
ctr/6w	1	ano	ano	ano	ano	ne
	2	ano	ano	ano	ano	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/6w	1	ano	ano	ano	ano	ne
	2	ano	ano	ano	ano	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne
P Pb(NO ₃) ₂ NPs/6w	1	ano	ano	ano	ano	ne
	2	ano	ano	ano	ano	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne
ctr/11w	1	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ne
	4	ano	ano	ano	ano	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/11w	1	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ne
	4	ano	ano	ano	ano	ano
	5	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/CL	1	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ne
	4	ano	ano	ano	ano	ne
	5	ano	ano	ano	ano	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/11w	1	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ne
	3	ano	ano	ano	ano	ne
	4	ano	ano	ano	ano	ne

experimentální skupina	číslo jedince	HE	LB	Nissl	2H3	ACTB
	5	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs /CL	1	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ne
	4	ano	ano	ano	ano	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne

Tabulka S8. Přehled provedených analýz genové exprese na vzorcích hipokampu.

experimentální skupina	číslo jedince	<i>Cdc42</i>	<i>Mapt</i>	<i>Pi3kr1</i>	<i>Pten</i>	<i>Akt1</i>	<i>Tsc1</i>	<i>Mtor</i>
ctr/6w	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	5	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
PbONPs/6w	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	5	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
Pb(NO ₃) ₂ NPs/6w	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	5	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
ctr/11w	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/11w	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/CL	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne

experimentální skupina	číslo jedince	<i>Cdc42</i>	<i>Mapt</i>	<i>Pi3kr1</i>	<i>Pten</i>	<i>Akt1</i>	<i>Tsc1</i>	<i>Mtor</i>
Pb(NO ₃) ₂ NPs/11w	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/CL	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne

Tabulka S9. Přehled provedených analýz genové exprese v oblasti isocortexu 1.

experimentální skupina	číslo jedince	<i>Cdc42</i>	<i>Mapt</i>	<i>Pi3kr1</i>	<i>Pten</i>	<i>Akt1</i>	<i>Tsc1</i>	<i>Mtor</i>
ctr/6w	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	5	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
PbONPs/6w	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	5	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
Pb(NO ₃) ₂ NPs/6w	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	5	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
ctr/11w	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/11w	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano

experimentální skupina	číslo jedince	<i>Cdc42</i>	<i>Mapt</i>	<i>Pi3kr1</i>	<i>Pten</i>	<i>Akt1</i>	<i>Tsc1</i>	<i>Mtor</i>
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/CL	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/11w	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/CL	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne

Tabulka S10. Přehled provedených analýz genové exprese v oblasti isocortexu 2.

experimentální skupina	číslo jedince	<i>Cdc42</i>	<i>Mapt</i>	<i>Pi3kr1</i>	<i>Pten</i>	<i>Akt1</i>	<i>Tsc1</i>	<i>Mtor</i>
ctr/6w	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/6w	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/6w	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne

experimentální skupina	číslo jedince	<i>Cdc42</i>	<i>Mapt</i>	<i>Pi3kr1</i>	<i>Pten</i>	<i>Akt1</i>	<i>Tsc1</i>	<i>Mtor</i>
ctr/11w	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/11w	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/CL	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/11w	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/CL	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne

Tabulka S11. Přehled provedených analýz genové exprese v oblasti isocortexu 3.

experimentální skupina	číslo jedince	<i>Cdc42</i>	<i>Mapt</i>	<i>Pi3kr1</i>	<i>Pten</i>	<i>Akt1</i>	<i>Tsc1</i>	<i>Mtor</i>
ctr/6w	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/6w	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne

experimentální skupina	číslo jedince	<i>Cdc42</i>	<i>Mapt</i>	<i>Pi3kr1</i>	<i>Pten</i>	<i>Akt1</i>	<i>Tsc1</i>	<i>Mtor</i>
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/6w	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
ctr/11w	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/11w	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/CL	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/11w	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/CL	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne

Tabulka S12. Přehled provedených analýz genové exprese v oblasti čichového bulbu.

experimentální skupina	číslo jedince	<i>Cdc42</i>	<i>Mapt</i>	<i>Pi3kr1</i>	<i>Pten</i>	<i>Akt1</i>	<i>Tsc1</i>	<i>Mtor</i>
ctr/6w	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne

experimentální skupina	číslo jedince	<i>Cdc42</i>	<i>Mapt</i>	<i>Pi3kr1</i>	<i>Pten</i>	<i>Akt1</i>	<i>Tsc1</i>	<i>Mtor</i>
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/6w	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/6w	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
ctr/11w	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/11w	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/CL	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/11w	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/CL	1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne

Tabulka S13. Přehled provedených analýz genové exprese v oblasti thalamu.

experimentální skupina	číslo jedince	<i>Cdc42</i>	<i>Mapt</i>	<i>Pi3kr1</i>	<i>Pten</i>	<i>Akt1</i>	<i>Tsc1</i>	<i>Mtor</i>
ctr/6w	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/6w	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/6w	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
ctr/11w	1	ano	ano	ne	ne	ano	ano	ne
	2	ano	ano	ne	ne	ano	ano	ne
	3	ano	ano	ne	ne	ano	ano	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/11w	1	ano	ano	ne	ne	ano	ano	ne
	2	ano	ano	ne	ne	ano	ano	ne
	3	ano	ano	ne	ne	ano	ano	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/CL	1	ano	ano	ne	ne	ano	ano	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ano	ano	ne	ne	ano	ano	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/11w	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/CL	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne

experimentální skupina	číslo jedince	<i>Cdc42</i>	<i>Mapt</i>	<i>Pi3kr1</i>	<i>Pten</i>	<i>Akt1</i>	<i>Tsc1</i>	<i>Mtor</i>
	2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne

Tabulka S14. Přehled provedených analýz genové exprese v oblasti mozečku.

experimentální skupina	číslo jedince	<i>Cdc42</i>	<i>Mapt</i>	<i>Pi3kr1</i>	<i>Pten</i>	<i>Akt1</i>	<i>Tsc1</i>	<i>Mtor</i>
ctr/6w	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/6w	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/6w	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
ctr/11w	1	ano	ano	ne	ne	ano	ano	ne
	2	ano	ano	ne	ne	ano	ano	ne
	3	ano	ano	ne	ne	ano	ano	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/11w	1	ano	ano	ne	ne	ano	ano	ne
	2	ano	ano	ne	ne	ano	ano	ne
	3	ano	ano	ne	ne	ano	ano	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/CL	1	ano	ano	ne	ne	ano	ano	ne
	2	ano	ano	ne	ne	ano	ano	ne
	3	ano	ano	ne	ne	ano	ano	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/11w	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne

experimentální skupina	číslo jedince	<i>Cdc42</i>	<i>Mapt</i>	<i>Pi3kr1</i>	<i>Pten</i>	<i>Akt1</i>	<i>Tsc1</i>	<i>Mtor</i>
	2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/CL	1	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne

Tabulka S15. Přehled analýz provedených SDS-PAGE WB analýz na vzorcích hipokampu.

experimentální skupina	číslo jedince	Aktin	p-TAU	t-TAU	mTOR	2H3
ctr/11w	1	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/11w	1	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/CL	1	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/11w	1	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/CL	1	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne

Tabulka S16. Přehled analýz provedených SDS-PAGE WB analýz na vzorcích isocortexu 1.

experimentální skupina	číslo jedince	Aktin	p-TAU	t-TAU	mTOR	2H3
ctr/11w	1	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano

experimentální skupina	číslo jedince	Aktin	p-TAU	t-TAU	mTOR	2H3
	3	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/11w	1	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne
PbONPs/CL	1	ano	ano	ano	ano	ano
	2	ano	ano	ano	ano	ano
	3	ano	ano	ano	ano	ano
	4	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/11w	1	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne
Pb(NO ₃) ₂ NPs/CL	1	ne	ne	ne	ne	ne
	2	ne	ne	ne	ne	ne
	3	ne	ne	ne	ne	ne
	4	ne	ne	ne	ne	ne
	5	ne	ne	ne	ne	ne

Buněčné kultury

Přehled provedených analýz

Tabulka S17. Přehled provedených analýz primárních buněčných kultur.

časový bod	opakování	vzor ek	qPCR				ICC				SDS-PAGE WB		
			<i>Cdc42</i>	<i>Mapt</i>	<i>Mtor</i>	<i>Pi3kr1</i>	p-TAU	t-TAU	Aktin	Phalloidin	p-TAU	Aktin	
24 h	A	ctrl 1	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ano	ano	
		ctrl 2	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 3	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 1	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ano	ano	
		Pb 2	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 3	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
	B	ctrl 1	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 2	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 3	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 1	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 2	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 3	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
	C	ctrl 1	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 2	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 3	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 4	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 5	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 1	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 2	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 3	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 4	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 5	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
	48 h	A	ctrl 1	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ano	ano	ano	ano
			ctrl 2	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ano	ano		
ctrl 3			ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
Pb 1			ano	ano	ano	ano	ne	ne	ano	ano	ano	ano	
Pb 2			ano	ano	ano	ano	ne	ne	ano	ano	ne	ne	
Pb 3			ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
B		ctrl 1	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 2	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 3	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 4	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	

časový bod	opakování	vzor ek	qPCR				ICC				SDS-PAGE WB			
			<i>Cdc42</i>	<i>Mapt</i>	<i>Mtor</i>	<i>Pi3kr1</i>	p-TAU	t-TAU	Aktin	Phalloidin	p-TAU	Aktin		
		Pb 1	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 2	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 3	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 4	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
	C	ctrl 1	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 2	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 3	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 4	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 5	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 6	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 1	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 2	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 3	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 4	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
	Pb 5	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne		
	72 h	A	ctrl 1	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
			ctrl 2	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ne	ne
			ctrl 3	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Pb 1			ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	
Pb 2			ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ne	ne	
Pb 3			ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
B		ctrl 1	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 2	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 3	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 4	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 5	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 1	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 2	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 3	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 4	ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
Pb 5		ne	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne		
C		ctrl 1	ne	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 2	ne	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 3	ne	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 4	ne	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 5	ne	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		ctrl 6	ne	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 1	ne	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
		Pb 2	ne	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	

časový bod	opakování	vzor ek	qPCR				ICC				SDS-PAGE WB	
			<i>Cdc42</i>	<i>Mapt</i>	<i>Mtor</i>	<i>Pi3kr1</i>	p-TAU	t-TAU	Aktin	Phalloidin	p-TAU	Aktin
		Pb 3	ne	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne
		Pb 4	ne	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne
		Pb 5	ne	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne
		Pb 6	ne	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne

P3: SEZNAM POUŽITÉHO MATERIÁLU

Seznam použitých roztoků

Roztoky použité při histologických barveních

Hematoxylin-Eosin

Mayerův hematoxylin

destilovaná voda	1000 ml
hematoxylin	1 g
jodičnan sodný	0,2 g
síran hlinitodraselný	50 g
kyselina citrónová	1 g
chloralhydrát	50 g

1 g hematoxylinu, 0,2 g jodičnanu sodného a 50 g kamence draselného rozpustíme v 1 l destilované vody. Po úplném rozpuštění přidáme 1 g kyseliny citronové a 50 g chloralhydrátu.

Eosin žlutý

eosin žlutý (rozpuštěný ve vodě)	5 g
dichroman draselný	5 g
100% ethanol	100 ml
nasycený roztok kyseliny pikrové	100 ml
destilovaná voda	800 ml

Nisslova tigroidní substance

0,1% roztok Toluidinové modři (pH 5.6)

100 ml 0,1% roztoku Toluidinové modři připravíme smícháním 90 ml octanového ústojného roztoku a 10 ml 1% roztoku Toluidinové modři.

50 ml octanového ústojného roztoku připravíme smícháním 41 ml 0,2 M roztoku ledové kyseliny octové a 9 ml 0,2 M roztoku octanu sodného.

0,2 M roztok ledové kyseliny octové

kyselina octová	2,89 ml
destilovaná voda	250 ml

0,2 M roztok octanu sodného

octan sodný	6,8 g
destilovaná voda	250 ml

1% roztok Toluidinové modři

Toluidinová modř	0,5 g
destilovaná voda	50 ml

Luxolová modř**Luxolová modř**

Luxolová modř	0,1 g
96% ethanol	100 ml

Roztok uhličitanu lithného

uhličitan lithný	0,05 g
destilovaná voda	100 ml

Roztoky použité při imunohistochemických, imunofluorescenčních a imunocytochemických metodách

Citrátový pufr

kyselina citronová	42 g
hydroxid sodný	18 g
destilovaná voda	2 l

42 g kyseliny citronové a 18 g hydroxidu sodného rozpustíme v 2 litrech destilované vody. Následně upravíme pH pomocí 36% kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 6. Při použití během imunohistochemických a imunofluorescenčních metod 10x zředíme v destilované vodě.

Fosfátový pufr

chlorid sodný	160 g
chlorid draselný	4 g
dihydrogenfosforečnan draselný	4 g
dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného	46,8 g
hydroxid sodný	2 pecky
destilovaná voda	2 l

Všechny látky umístíme do odměrného válce, který následně dolijeme destilovanou vodou do 2 litrů, mícháme a při použití v rámci imunohistochemických a imunofluorescenčních metod 10x zředíme v destilované vodě.

PBTA

fosfátový pufr (10X)	50 ml
BSA (hovězí sérový albumin)	5 g
tritonX100	1250 ml
destilovaná voda	do 500 ml

Roztoky použité při práci s buněčnými kulturami

Kultivační médium (50 ml)

Neurobasal medium (Thermofisher Scientific)	44 ml
Fetální bovinní sérum (FBS)	5 ml
penicilin-streptomycin (P/S)	0,5 ml
L-Glutamin	0,5 ml

Kultivační médium bez séra (50 ml)

Neurobasal medium (Thermofisher Scientific)	49 ml
penicilin-streptomycin (P/S)	0,5 ml
L-Glutamin	0,5 ml

Roztoky použité při izolaci proteinů

RIPA pufr

5 M NaCl	3 ml
1 M Tris-HCl	5 ml
Nonidet P-40	1 ml
10% kyselina deoxylistová sodná sůl	5 ml
10% dodecylsírán sodný (SDS)	1 ml
destilovaná voda	up to 100 ml

1 M Tris-HCl pH 8.0

Tris	12,11 g
destilovaná voda	100 ml

5 M NaCl

chlorid sodný	29,2 g
destilovaná voda	100 ml

Laemmli Buffer (4X)

Tris	1,514 g
SDS	4 g
glycerol	20 ml
B-mercaptoethanol	10 ml
Bromphenol Blue	200 mg

Rozpustit Tris v 10 ml destilované vody, upravit na pH 6,8. Přidat glycerol a promíchat. Poté přidat SDS a Bromphenol Blue, po rozmíchání přidat B-mercaptoethanol. Skladovat při teplotě -20 °C.

Roztoky použité při metodě SDS-PAGE Western Blot

Příprava polyakrylamidového gelu pro SDS-PAGE

Gely připravujeme den před SDS-PAGE. Nejprve připravíme separační gel, jednotlivé složky přidávám v pořadí seznamu, protože přidáním APS a TEMEDu se spouští polymerační reakce. Směs nalijeme do přichystané formičky asi 3-4 cm od vršku skla, převrstvíme isopropanolem a necháme polymerovat alespoň 30 minut. Analogicky připravujeme zaostřovací gel, jednotlivé složky opět přidáváme v pořadí, které je uvedeno na seznamu. Ze zpolymerovaného rozdělovacího gelu odsajeme isopropanol a přelijeme směsí zaostřovacího gelu až po okraj, přidáme plastový hřebínek, abychom vytvořili jamky pro vzorky s proteiny. Necháme polymerovat opět alespoň 30 minut. Skla s gelem uchováváme v papíře nasáklém vodou při teplotě 4 °C.

Zaostřovací gel

destilovaná voda	6,8 ml
30% mix akrylamidů	1,7 ml
1,5 M Tris pH 6,8	1,25 ml
10% SDS	100 ml
10% APS	100 ml
TEMED	10 ml

0,5 M Tris pH 6,8

destilovaná voda	250 ml
Tris	15,14 g

15,14 g Trisu rozpustíme ve 250 ml vody, následně pomocí koncentrované HCl upravíme pH na 6,8.

Separční gel (10%)

destilovaná voda	5,9 ml
30% mix akrylamidů	5 ml
1,5 M Tris pH 8,8	3,8 ml
10% SDS	150 ml
10% APS	150 ml
TEMED	6 ml

1,5 M Tris pH 8,8

destilovaná voda	250 ml
Tris	45,43 g

45,43 g Trisu rozpustíme ve 250 ml vody, následně pomocí koncentrované HCl upravíme pH na 8,8.

Základní roztok pro přípravu dalších pufrů pro SDS-PAGE WB (10x)

Tris	30 g
glycin	144 g
destilovaná voda	1000 ml

ELFO pufr pH 8,3

základní roztok pro přípravu dalších pufrů	100 ml
10% SDS	10 ml
destilovaná voda	doplnit do 1 l

Blotovací pufr pH 8,3

základní roztok pro přípravu dalších pufrů	100 ml
methanol	150 ml
destilovaná voda	doplnit do 1 l

10x TBS roztok pH 7,6

Tris	24 g
chlorid sodný	88 g
destilovaná voda	doplnit do 1 l

24 g Trisu a 88 g chloridu sodného rozpustíme v 900 ml destilované vody, následně upravíme pH pomocí koncentrované HCl na 7,6 a doplníme destilovanou vodu do výsledného objemu 1 l.

TBST – promývací pufr pH 7,4

Tween	1 ml
10X TBS roztok	100 ml
destilovaná voda	900 ml

5% mléko

TBST – promývací pufr	100 ml
sušené mléko	5 g

Seznam použitých kitů

Kity použité při imunohistochemické metodě

Myší kit – VECTASTAIN® Elite® ABC Kit, Peroxidase (Mouse IgG) (Vector Laboratories, Inc.)

Králičí kit – VECTASTAIN® Elite® ABC Kit, Peroxidase (Rabbit IgG) (Vector Laboratories, Inc.)

Ředidlo Ab – DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components (Dako North America, Inc.)

DAB – DAKO Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Dako North America, Inc.)

Kity použité při imunofluorescenční metodě

Sekundární protilátka – Alexa Fluor™ 555 Donkey anti-rabbit (invitrogen by Thermo Scientific)

Králičí kit – VECTASTAIN® Elite® ABC Kit, Peroxidase (Rabbit IgG) (Vector Laboratories, Inc.)

Ředidlo Ab – DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components (Dako North America, Inc.)

DAPI – Fluoroshield™ with DAPI (Sigma)

DRAQ5 – 65-0880-92 (ThermoFisher Scientific)

Kity použité při analýze genové exprese

Izolace mRNA – RNeasy® Mini Kit (QIAGEN)

Reverzní transkripce – gb Elite Reverse Transcription Kit (GENERI BIOTECH s.r.o.)

Master Mix pro qPCR – gb Ideal PCR Master Mix (GENERI BIOTECH s.r.o.)

Kity použité při SDS-PAGE Western Blot

Standard pro SDS-PAGE – PageRuler Plus (ThermoFisher Scientific)

Sekundární protilátka – Clarity Western Blotting Substrates (BIO-RAD)

Kit použitý při metodě MTT Assay

MTT Cell Proliferation Kit Ab211091 (abcam)

Seznam použitých protilátek

Protilátky použité při imunohistochemických detekcích

2H3	AB_2314897 (DSHB)
B-III-tubulin	ab78078 (abcam)
Pan Cytokeratin	ab961 (abcam)
PCNA	sc-7907 (Santa Cruz)

Protilátky použité při imunofluorescenčních detekcích

Beta-Aktin	PA5-16914 (invitrogen)
------------	------------------------

Protilátky použité při imunocytochemických detekcích

Aktin	sc-1615 (Santa Cruz)
Phalloidin (Alexa 488)	A12379 (Thermo Fisher Scientific)
p-TAU	bs-3489R (Bioss antibodies)
t-TAU	13-6400 (Thermo Scientific)

Protilátky použité při metodě SDS-PAGE Western Blot

2H3	AB_2314897 (DSHB)
Aktin	PA5-16914 (invitrogen)
p-TAU	bs-3489R (Bioss antibodies)
t-TAU	13-6400 (Thermo Scientific)
mTOR	ab109268 (abcam)

Seznam použitých TaqMan

<i>Gapdh</i>	ID Mm99999915_g1
<i>Akt1</i>	ID Mm01331626_m1
<i>Cdc42</i>	ID Mm01194005_g1
<i>Mapt</i>	ID Mm00521988
<i>Pik3r1</i>	ID Mm00803159_g1
<i>Pten</i>	ID Mm00477208_m1
<i>Tsc1</i>	ID Mm00452208_m1
<i>Mtor</i>	ID Mm00444968_m1

Seznam použitých přístrojových pomůcek

Centrifuga	D108 (DLAB) Mini Spin Plus (Eppendorf)
Elektroforetická vana	Mini-PROTEAN® Tetra Cell #1658000 (BIORAD)
Fluorescenční mikroskop	Leica DM2000 & 2000 LED system (Leica Microsystems)
Horká deska	Leica IH1220 (Leica Microsystems)
Kamera	Leica DFC320 Release Notes (Leica Microsystems)
Konfokální mikroskop	SP2 AOBS (Leica Microsystems)
pH metr	edge pH (Hanna Instruments)
Pipety	Micropipette Research 0–2,5 µl (Eppendorf) Micropipette Research 2–20 µl (Eppendorf) Micropipette Research 2–200 µl (Eppendorf) Micropipette Research 100–1000 µl (Eppendorf)
qPCR cycler	LightCycler 480 Instrument II (Roche)
Rotační mikrotom	Leica RM2145 (Leica Microsystems)
Spektrofotometr	NanoDrop One/One Microvolume OD600 (Thermo Scientific)
Světelný mikroskop	Leica DM LB Video Microscope (Leica Microsystems) Leica DM LB2 Video Microscope (Leica Microsystems)
Termocykler	MasterCycler (Eppendorf)
Třepačka	M37610-26 (Barnstead/Thermolyne)
Váha	A200S (Sartorius Analytic)
Vodní lázeň	Leica IH1210 (Leica Microsystems)
Western Blot IS	Azure Microsystems
Zalévací stanice	DP500 (Bio Optica)

Seznam použitých softwarů

Fotografie na mikroskopech

Analýza dat z qPCR cycleru

Úprava fotografií

Analýzy fluorescenčního signálu

Statistické hodnocení, zpracování grafů

Vlastní ikony a schémata

LAS X

Roche LC96 System

Adobe Photoshop 2023

Fiji

GraphPad Prism 5

Procreate

P4: STŘEDOŠKOLSKÉ SOUTĚŽE A KONFERENCE

Cena České učené společnosti, Praha, 15. 5. 2023

Inhalace nanočástic olova způsobuje degenerativní změny mozkové tkáně

Expo-Sciences Luxembourg v Lucemburku, Lucembursko, 6. – 10. 10. 2022

Immune response and reparation of target organs after soluble lead nanoparticles inhalation

Regeneron ISEF v Atlantě, USA, 7. – 13. 5. 2022

Cytoskeletal remodeling in brain tissue exposed to lead nanoparticles

Národní finále soutěže EXPO SCIENCE AMAVET v Praze, 11. – 13. 4. 2022

Přestavba cytoskeletu v mozkové tkáni po expozici nanočásticím olova

Krajské kolo soutěže EXPO SCIENCE AMAVET v Hradci Králové, 25. 3. 2022

Přestavba cytoskeletu v mozkové tkáni po expozici nanočásticím olova

Nominace ze širšího výběru na zahraniční soutěže, Praha, 16. 9. 2021

Immune response and reparation of target organs after soluble lead nanoparticles inhalation

Celostátní přehlídka Středoškolské odborné činnosti, 11. – 13. 6. 2021

Imunitní reakce a reparace cílových orgánů po inhalaci rozpustných nanočástic olova

Krajské kolo Středoškolské odborné činnosti, 11. 5. 2021

Imunitní reakce a reparace cílových orgánů po inhalaci rozpustných nanočástic olova

P5: KONFERENČNÍ ABSTRAKTA

Postery

JEDLIČKOVÁ Adriena, Jana DUMKOVÁ, Daniela KRISTEKOVÁ, Tereza SMUTNÁ, Lucie VRLÍKOVÁ, Aleš HAMPL, Pavel MIKUŠKA, Marcela BUCHTOVÁ. Immune response and reparation of target organs after soluble lead nanoparticles inhalation. Morphology 2021, Praha, 9. – 11. 9. 2021.

JEDLIČKOVÁ Adriena, Daniela KRISTEKOVÁ, Jana DUMKOVÁ, Lucie VRLÍKOVÁ, Denisa LUSKOVÁ, Tereza SMUTNÁ, Pavel MIKUŠKA, Tomáš VACULOVÍČ, Marcela BUCHTOVÁ. Cytoskeletal changes and reparative processes in brain exposed to metal nanoparticles. 2nd V4SDB Conference 2021, Szeged, Hungary, 2. – 5. 9. 2021.

DUMKOVÁ Jana, Zuzana HUSÁKOVÁ, Hana KOTASOVÁ, Vendula PELKOVÁ, **Adriena JEDLIČKOVÁ**, Tomáš VACULOVÍČ, Pavel MIKUŠKA, Pavel COUFALÍK, Aleš HAMPL, Marcela BUCHTOVÁ. Transport nanočástic olova nervovou tkání a jejich vliv na neurony. XXIV. Biologické dny, Brno, 6. – 7. 9. 2021.

Ústní prezentace

JEDLIČKOVÁ Adriena, Jana DUMKOVÁ, Daniela KRISTEKOVÁ, Lucie VRLÍKOVÁ, Denisa LUSKOVÁ, Pavel MIKUŠKA a Marcela BUCHTOVÁ. Lead nanoparticles inhalation induces cytoskeletal remodeling in brain tissue. Morphology 2022, Hradec Králové, 11. – 13. 9. 2022.

KRISTEKOVÁ, Daniela, Adriena JEDLIČKOVÁ, Jana DUMKOVÁ, Lucie VRLÍKOVÁ, Pavel MIKUŠKA a Marcela BUCHTOVÁ. Inhalation of lead oxide nanoparticles leads to degenerative changes in mouse brains. In Nanocon 2021 – 13th International Conference on Nanomaterials. 2021.

P6: PUBLIKACE, MANUSKRIPTY

I

KRISTEKOVÁ, Daniela, Jana DUMKOVÁ, **Adriena JEDLIČKOVÁ**, Bohumil DOČEKAL, Zuzana HUSÁKOVÁ, Lucie VRLÍKOVÁ, Tereza SMUTNÁ, Michaela CAPANDOVÁ, Lukáš ČAPKA, Veronika JAKEŠOVÁ, Kamil KŘŮMAL, Pavel COUFALÍK, Pavel MIKUŠKA, Zbyněk VEČEŘA, Michaela TVRDOŇOVÁ, Tomáš VACULOVÍČ, Viktor KANICKÝ, Aleš HAMPL a Marcela BUCHTOVÁ. Lead oxide nanoparticles inhalation cause degenerative changes in brain. **Manuskript v přípravě, bude odesláno do časopisu Nature.**

II

SMUTNÁ, Tereza, Jana DUMKOVÁ, Daniela KRISTEKOVÁ, Markéta LAŠTOVIČKOVÁ, **Adriena JEDLIČKOVÁ**, Lucie VRLÍKOVÁ, Bohumil DOČEKAL, Lukáš ALEXA, Hana KOTASOVÁ, Vendula PELKOVÁ, Zbyněk VEČEŘA, Kamil KŘŮMAL, Jiří PETRÁŠ, Pavel COUFALÍK, Dalibor VŠIANSKÝ, Samuel ZÁCHEJ, Dominik PINKAS, Jan VONDRÁČEK, Aleš HAMPL, Pavel MIKUŠKA a Marcela BUCHTOVÁ. Macrophage-mediated tissue response evoked by subchronic inhalation of lead oxide nanoparticles is associated with the alteration of phospholipases C and cholesterol transporters. *Particle and Fibre Toxicology*. 2022; 19(52). ISSN 1743-8977. DOI: 10.1186/s12989-022-00494-7. **IF = 9.11 (Q1, D1) (2022).**

III

DUMKOVÁ, Jana, Tereza SMUTNÁ, Lucie VRLÍKOVÁ, Bohumil DOČEKAL, Daniela KRISTEKOVÁ, Zbyněk VEČEŘA, Zuzana HUSÁKOVÁ, Veronika JAKEŠOVÁ, **Adriena JEDLIČKOVÁ**, Pavel MIKUŠKA, Lukáš ALEXA, Pavel COUFALÍK, Michaela TVRDOŇOVÁ, Kamil KŘŮMAL, Tomáš VACULOVÍČ, Viktor KANICKÝ, Aleš HAMPL a Marcela BUCHTOVÁ. A Clearance Period after Soluble Lead Nanoparticle Inhalation Did Not Ameliorate the Negative Effects on Target Tissues Due to Decreased Immune Response. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(22). ISSN 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms21228738. **IF = 5.92 (Q1) (2020).**

IV

KOTASOVÁ, Hana, Daniela KRISTEKOVÁ, Vendula PELKOVÁ, **Adriena JEDLIČKOVÁ**, Lucie VRLÍKOVÁ, Denisa LUSKOVÁ, Jana DUMKOVÁ, Lukáš ALEXA, Zbyněk VEČEŘA, Pavel COUFALÍK, Pavel MIKUŠKA, Jan VONDRÁČEK, Aleš HAMPL a Marcela BUCHTOVÁ. Lead nanoparticles have distinct effects on membrane transporters in macrophages and expandable lung epithelium. **Manuskript v přípravě.**

V

DUMKOVÁ, Jana, Naďa VAŠKOVICOVÁ, Lucie VRLÍKOVÁ, Daniela KRISTEKOVÁ, Zbyněk VEČEŘA, Michaela BAHELKOVÁ, **Adriena JEDLIČKOVÁ**, Pavel MIKUŠKA, Lukáš ALEXA, Pavel COUFALÍK, Kamil KŘŮMAL, Tomáš VACULOVÍČ, Viktor KANICKÝ, Aleš HAMPL, Marcela BUCHTOVÁ. Alterations in the effectivity of clearance period in vital organs after insoluble cadmium nanoparticle inhalation. **Manuskript v přípravě.**