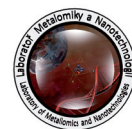
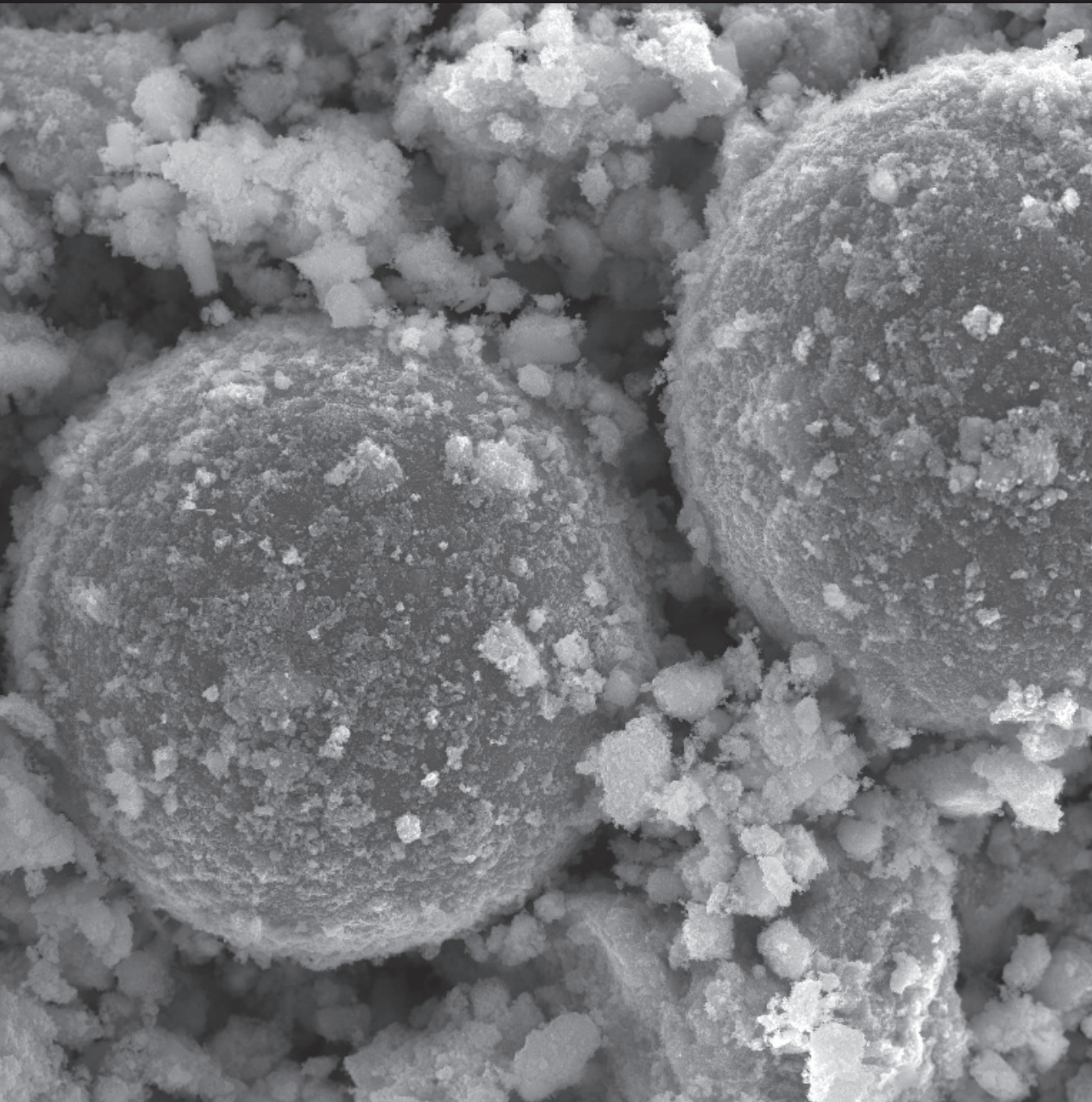


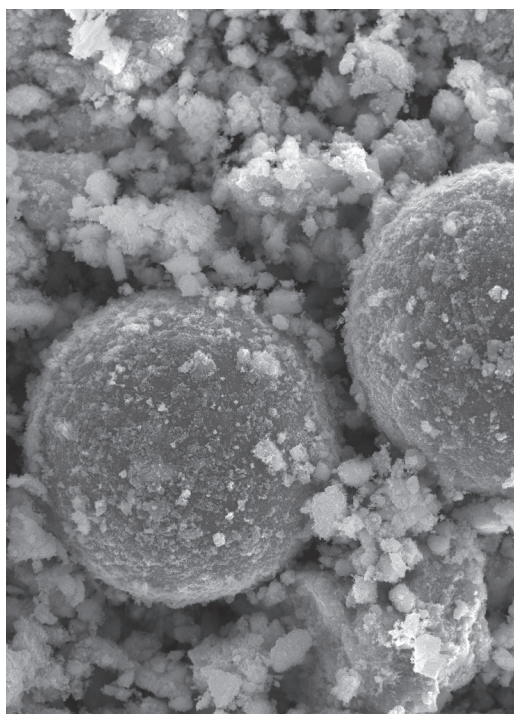
říjen 2014

# Journal of Metallomics and Nanotechnologies

[http://web2.mendelu.cz/af\\_239\\_nanotech/J\\_Met\\_Nano](http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano)

volume 1 issue 3





SEM HV: 25.0 kV	WD: 5.07 mm	
View field: 143 µm	Det: InBeam	20 µm
HiVac	SM: RESOLUTION	Performa

Třetí číslo vychází v průběhu října 2014. Časopis Journal of Metallomics and Nanotechnologies vychází pouze elektronicky, čtvrtletně. Jeho obsahové zaměření je v oblastech nano-biochemie, nanotechnologie, biomedicína a nanomedicína. Časopis vychází bez regionálních mutací v českém, slovenském a anglickém jazyce. Vydavatel: Laboratoř metalomiky a nanotechnologií Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00, Brno, Česká republika.

Časopis Journal of Metallomics and Nanotechnologies je novým výukovým a především vědeckým časopisem, který sdružuje nově vznikající vědecký směr Metalomiku a stále více se rozvíjející Nanotechnologie. Tento časopis je volně přístupný a šiřitelný skrze své webové stránky s minimální podporou reklamy. Cílem je, aby články vycházející v každém ze čtyř ročních čísel obsahovaly tematiku využití jakýchkoliv technologií v měřítku nanometrů pro účely biologického, chemického či biotechnologického výzkumu anebo přímo konkrétních nanobio-technologických aplikací.

## Na obálce

SEM mikrofotografie polymerového nosiče (DOWEX 50WX4-400), modifikovaného superparamagnetickými maghemitovými nanočásticemi. Snímek byl pořízen pomocí skenovacího elektronového mikroskopu FEG-SEM MIRA 3 XMU (Tescan, a. s., Brno Česká republika).



Časopis je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

Journal of Metallomics and Nanotechnologies

**Vydavatel:** Mendelova univerzita v Brně, **Vedoucí editor:** Ondřej Zítka, Vydání: první 2014, **Počet stran:** 74, Vychází elektronicky, ISSN 2336-3940

Ondřej Zítka<sup>1,2</sup>, René Kizek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Ústav chemie a biochemie, Mendelova Univerzita v Brně, Zemědělská 1, CZ-613 00 Brno, Česká republika – Evropská unie

<sup>2</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 3058/10, CZ-616 00 Brno, Česká republika, Evropská unie

Vážení čtenáři,

třetí číslo časopisu „Journal of Metallomics and Nanotechnologies“ je speciálním číslem věnovaným projektu NANOLABSYS. Obsahuje odborné a přehledové články, které byly připraveny pracovníky, kteří během hlavní části řešení projektu tvořili jeho odbornou náplň. Samotnému obsahu a cílům projektu se déle věnuje konkrétní předmluva řešitelů.

Toto číslo je také rovněž posledním, které obsahuje výhradně česky psané články. V následujícím čísle již vzhledem ke snaze o rozšíření dopadu na širší mezinárodní odborné plénum počítáme s plným anglickým zněním odborných publikací. Nicméně stále bude možné zasílat nadále články i v češtině a pouze s anglickým abstraktem. Je potřebné také zmínit, že práce publikované v našem časopise by měly být citovány především v jiných periodikách, tak aby se zvyšovalo povědomí o této nové časopisecké platformě.

Cílem časopisu Journal of Metallomics and Nanotechnologies je dostat se v roce 2015 na pozitivně hodnocený seznam recenzovaných neimpaktovaných periodik Rady pro výzkum, vývoj a inovace vydávaných v České republice. Veškeré kroky, které proto podnikáme a v budoucnu nadále budeme podnikat, souvisí s nutností indexování časopisu v mezinárodních databázích. Proto děkujeme našim příznivcům a přispěvatelům za podporu, bez které by tento posun nebyl možný.

## **Editorial Board of the Journal of Metallomics and Nanotechnologies:**

**Chief Editor:** Ondrej Zitka, Mendel University in Brno, Czech Republic

**Assistant Manager Editor:** Michal Horak, Mendel University in Brno, Czech Republic

**Assistant Manager Editor:** Sylvie Skalickova, Mendel University in Brno, Czech Republic

### **Expert editorial board:**

David Hynek, Central European Institute of Technology, Czech Republic

Elena María Planells del Pozo, University of Granada, Spain

Gabriella Emri, University of Debrecen, Hungary

Jan Labuda, Slovak Technical University in Bratislava, Slovakia

Jaromir Hubalek, University of Technology in Brno, Czech Republic

Jitka Petrlova, Lund University, Sweden

Libuse Trnkova, Masaryk University, Czech Republic

Marie Konecna, Central European Institute of Technology, Czech Republic

Marie Stiborova, Charles University in Prague, Czech Republic

Marketa Vaculovicova, Central European Institute of Technology, Czech Republic

Marta Zalewska, Wroclaw Medical University, Poland

Michal Masarik, Masaryk University, Czech Republic

Milan Antonijevic, University of Belgrade, Serbia

Miroslav Pohanka, University of Defence, Czech Republic

Naser A. Anjum, University of Aveiro, Portugal

Pavel Kopel, Mendel University in Brno, Czech Republic

Rene Kizek, Mendel University in Brno, Czech Republic

Tomas Eckschlager, Charles University in Prague, Czech Republic

Vojtech Adam, Mendel University in Brno, Czech Republic

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Open Access content means the content is free of cost, and no restrictions are applied on its Licensing and Copyrights. Open Access Journals provide free of charge scholarly content. The literature is available for reading, downloading, and editing. The benefit of open access is that the content can be reused for a novel cause/research/experiment.



## Review

---

Mezinárodní spolupráce v oblasti nanotechnologií spojených s in vivo zobrazovacími technikami - Nanolabsys.....	6
Personální a odborné zastoupení na projektu Nanolabsys.....	9
Administrativa a informační systém projektu.....	12
Microwave preparation of carbon quantum dots with different surface modification.....	16
Buněčné linie jako modelové systémy pro optimalizaci aplikace kvantových teček.....	23
Application of quantum dots into chicken embryos.....	26
Působení zinku na živé organismy.....	29
Působení kadmia na živé organismy.....	32
Působení olova na živé organismy.....	35
Působení rtuti na živé organismy.....	38
Monitorování hladiny MT u biologických organismů vystavených působení kovových prvků a sloučenin.....	42
Poměr GSH/GSSG u biologických organismů.....	46
Aminokyseliny a jejich interakce s těžkými kovy.....	49
Antioxidační enzymy - biochemické markery oxidačního stresu.....	53
Studium interakce kvantových teček s nádorovými buňkami pomocí fluorescenční mikroskopie.....	57
Analýza programované buněčné smrti průtokovou cytometrií.....	60
Bakteriofág $\lambda$ jako nanotransportér doxorubicinu.....	64

## Laboratory reports

---

Příprava nanočástic – kvantových teček v terestrických organismech.....	69
Návštěva Bruker AXS GMBH Karlsruhe.....	71

## MEZINÁRODNÍ SPOLUPRÁCE V OBLASTI NANOTECHNOLOGIÍ SPOJENÝCH S *IN VIVO* ZOBRAZOVACÍMI TECHNIKAMI - NANOLABSYS

René Kizek, Zbyněk Heger, Vojtěch Adam

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

Projekt NANOLABSYS byl zahájen k řešení 1. 1. 2012 a termín ukončení je 31. 12. 2014. Finanční dotace je z Evropského sociálního fondu a spoluúčasti státního rozpočtu ČR ve výši 32 358 tis. Kč. Podrobné informace jsou uvedeny v Informačním systému Rady vlády (<http://www.isvav.cz/projectDetail.do?rowId=EE2.3.20.0148>).

Hlavním cílem projektu je vytvoření výzkumné sítě mezi pěti subjekty v rámci EU (ČR, UK, SK, Španělsko a Bulharsko) v oblasti zavedení elektronických laboratorních systémů s ohledem na praktické využití v *in vivo* nanobiotechnologických aplikacích. Výzkumné skupiny spolupracují na vybraných dílčích úkolech v oblasti nanobiotechnologií, nicméně potenciál spolupráce zůstává nevyužit z důvodu administrativních komplikací v oblasti koordinace výzkumných aktivit, nedostatečného zázemí pro sdílení dosažených výsledků a nedostatku zdrojů pro mobilitu výzkumných pracovníků. V navrhovaném projektu se po vědecké stránce využívá znalostí všech odborníků, kteří zaručují na jedné straně transdisciplinaritu projektu a na straně druhé vysoký vědecký potenciál spojený s posílením infrastruktury pracoviště díky projektu (CEITEC). Dílčí cíle projektu jsou: a) propojení jednotlivých výzkumných skupin; b) pilotní vytvoření elektronických laboratorních deníků; c) zvýšení a posílení technologického a organizačního zázemí.

**Přijato k publikování:** 7.8.2014

**Klíčová slova:** heavy metals; internationalisation; NANOLABSYS ;

### Odborné aktivity projektu

Hlavní směry výzkumu se v průběhu řešení projektu významným způsobem posunuly k nanotechnologickým aplikacím v nanomedicíně za využití různých přístupů a postupů zobrazování, prohloubení znalostí a techno-

logických možností kombinace nanočástic a biomolekul (jako jsou thiooly).

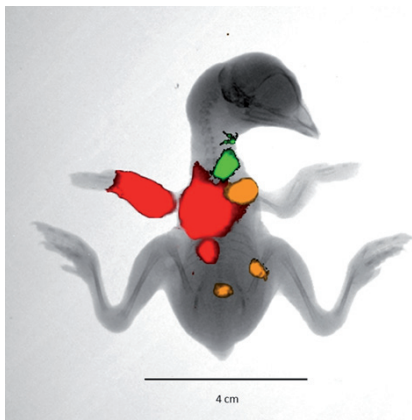
Ve výzkumných úkolech byly především řešeny postupy a technologie vhodné pro přípravu a charakterizaci různých typů fluorescenčně aktivních nanočástic – kvantových teček (**Obr. 1**).

Kvantové tečky (QDs) byly připraveny z různých materiálů (CdTe, CdSe, PbS, ZnS) a následně využity v tkáních modelového organismu - kuřecího embrya. Kuřecí embryonální model je velmi vhodný pro výzkumné cíle, protože představuje velmi snadno a reprodukovatelně připravovaný biologický materiál s rychlým vývojem embrya. Na obrázku 1 jsou zobrazeny kvantové tečky CdTe různé velikosti (tedy i barevnosti). Pomocí těchto nanomateriálů lze získat výsledky s vysokou reprodukovatelností. Ty umožňují také objasnit důležitou otázku, a to je zhášení, změna fyzikálních vlastností či toxicita, vznikající při interakcích s biomole-



**Obr. 1:** CdTe kvantové tečky připravené chemickou syntézou za využití mikrovlnného ohřevu při různých teplotách, a to v rozmezí 60 °C (modré) - 120 °C (červené), po dobu 20 minut při 300 W<sup>1-7</sup>.

kulami (především thiolovými sloučeninami). Kvantové tečky s ideálními vlastnostmi pak představují vhodné biologické značky, využitelné pro identifikaci přímo v živém organismu (**Obr. 2**).



**Obr. 2:** CdTe kvantové tečky aplikované injekčně (0,1 ml) do svaloviny (3 mm) kuřecího embrya (18 dní). Obraz vznikl překrytím rentgenového (doba expozice 6 s, snímané pole 15 × 15 cm, f-Stop: 1,10, X-ray filtr: 0,8 mm, X-ray energie: 45 kVp) a fluorescenčního snímku (kamera 4MP, přístroje Carestream In vivo extreme system, sbírající data v rozmezí 2048 × 2048 pixelů CCD, s následujícími parametry: excitace 410 nm, emise 535, 600 a 700 nm, doba expozice 1 s, snímané pole 15 × 15 cm). Analýza proběhla ihned po aplikaci kvantových teček

Spojení kvantové tečky s magnetickým materiálem přináší další rozvoj aplikací v *in vivo* technologiích. Především je to specifická vazba biomolekul (proteinů, nukleových kyselin, léčiv) na jejich povrch. Magnetická částice zajistí jejich specifickou a selektivní vazbu na povrch, případně usnadní následnou možnost jejich specifického zacílení nebo odstranění. Léčivo v našem primárním zájmu je doxorubicin, vykazující velmi dobré fluorescenční vlastnosti, čímž je umožněno studium zobrazovacími technikami v tkáních. Navíc spojení magnetických částic, kvantových teček a doxorubicinu je unikátním přístupem pro sledování tohoto cytostatika a umožní detailněji a pečlivěji pochopit mechanismy jeho působení případně

nežádoucích efektů - především kardiotoxicity.

Toxické i esenciální ionty těžkých kovů jsou studovány dlouhodobě, avšak pochopení jejich působení a reakce s biomolekulami není jednoznačně popsáno a vyžaduje další podrobný průzkum. V této oblasti se zaměřujeme na sledování těchto kovů v tkáních na modelovém organismu kuřecího embrya. Mapování probíhá na několika úrovních, a to biochemické (detailní studium změn enzymů, proteinů, peptidů a aminokyselin), na úrovni chemické (popsání obsahu v jednotlivých orgánech, tkáních) a na úrovni fyziologické (laserem detekované hladiny iontů v tkáních a jejich distribuční záznam). Metalomické studium obsahu iontů těžkých kovů je spojeno především s thiolovými molekulami, protože -SH skupina je výrazně reaktivní a váže se k iontům těžkého kovu. Specializovanou molekulou, vázající ionty kovů představuje metalothionein, který je elektrochemicky analyzován současně s hladinou těžkého kovu a vzniká tak mapa distribuce kovů v tkáních.

Experimentální výsledky byly uveřejněny v impaktovaném časopise *Chemical Sensors*<sup>7</sup> či v kapitole *Quantum dots: Biological and Biomedical Applications*, obsažené v knize *Quantum Dots: Applications, Synthesis and Characterization*<sup>8</sup>. Dále byly výsledky prezentovány na konferencích jako *VIII. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie*, pořádané 29. - 30. listopadu 2012 v Olomouci, *XII. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků*, 30. - 31. července 2012 v Brně<sup>9</sup>, *XXXVII. Brněnské onkologické dny*, pořádané v Brně 18. - 19. dubna 2013, *XIII. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků*, 29. - 30. května 2013 v Brně<sup>10</sup> či konferenci, pořádané Laboratoří Metalomiky a Nanotechnologií při příležitosti *Světového dne boje proti rakovině*, 8. února 2013 v Brně.

## Poděkování

Rozvoj lidského potenciálu v oblasti výzkumu a inovací, především prostřednictvím postgraduálního studia a odborné přípravy

výzkumných pracovníků a spolupráce v rámci sítí mezi univerzitami, výzkumnými středisky a podniky. Byl pod registračním číslem CZ.1.07/2.3.00/20.148 schválen k financování. (<http://www.msmt.cz/strukturalni-fondy/vysledky-vyzvy-c-20-ipo-oblasti-podpory-2-3-lidske-zdroje-ve>).

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

## Literatura

1. Krejcová L., Hynek D., Guran R., Michalek P., Moulick A., Kopel P., Tmejová K., Hoai N. V., Adam V., Hubalek J., Kynický J., Kizek R.: *International Journal of Electrochemical Science*, 9, 3349 (2014).
2. Sobrova P., Ryvolova M., Pekarík V., Hubalek J., Adam V., Kizek R.: *International Journal of Electrochemical Science*, 8, 12466 (2013).
3. Skalicková S., Zitka O., Nejdil L., Krizková S., Sochor J., Janu L., Ryvolova M., Hynek D., Zidkova J., Zidek V., Adam V., Kizek R.: *Chromatographia*, 76, 345 (2013).
4. Janu L., Stanisavljević M., Krizková S., Sobrova P., Vaculovicova M., Kizek R., Adam V.: *Electrophoresis*, 34, 2725 (2013).
5. Sobrova P., Ryvolova M., Hubalek J., Adam V., Kizek R.: *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 13497 (2013).
6. Stanisavljević M., Janu L., Smerkova K., Krizková S., Pizurova N., Ryvolova M., Adam V., Hubalek J., Kizek R.: *Chromatographia*, 76, 335 (2013).
7. Blazkova I., Vaculovicova M., Eckschlager T., Stiborova M., Trnkova L., Adam V., Kizek R.: *Chem. Sensors*, in press, (2014).
8. Chomoucka J., Drbohlavova J., Vaculovicova M., Sobrova P., Janu L., Adam V., Hubalek J., Kizek R.: *Quantum Dots: Applications, Synthesis and Characterization*, 193 (2012).
9. XII. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků, (2012).
10. XIII. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků, (2013).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však

být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.



## Personální a odborné zastoupení na projektu NANOLABSYS

Olga Kryštofová<sup>a,b</sup>, Vojtěch Adam<sup>a,b</sup>, René Kizek<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká

In the years 2007 - 2013 8 thematic operational programs were published under the Convergence Objective for drawing of the support from the European Union. Our laboratory participated in the competition within the thematic operational program Education for Competitiveness in support of human resources in research and development project „International cooperation in the field of Nanotechnologies “*in vivo*” imaging techniques (NANOLABSYS)“. One of the goals of the project was to create a partner network both in the Czech Republic as well as with other European partners and the development of human potential in research and innovation. This project will meet the set goal. This assertion is confirmed as the involvement of five foreign workers into the ranks of professional workers, as well as the size of the team which has a total of 61 members

**Přijato k publikování:** 7. 8. 2014

**Klíčová slova:** annexované indikátory; NANOLABSYS;

### Úvod

Od roku 2004 se Česká republika zapojila do čerpání Evropských strukturálních fondů (EFS), které jsou hlavním nástrojem realizace evropské politiky hospodářské a sociální soudržnosti. Prostředky vynaložené z těchto fondů mají za cíl snižování ekonomických a sociálních rozdílů mezi členskými státy a jejich regiony.

V letech 2007 – 2013 bylo vyhlášeno v rámci cíle Konvergence osm tematických operačních programů k čerpání podpory z fondů Evropské unie. Naše laboratoř se účastnila soutěže v rámci tematických operačních programů Vzdělávání pro konkurenceschopnost v oblasti podpory lidské zdroje ve výzkumu a vývoji s projektem „Mezinárodní spolupráce v oblasti *in vivo* zobrazovacích technik (NANOLABSYS)“.

### Personální obsazení projektu NANOLABSYS

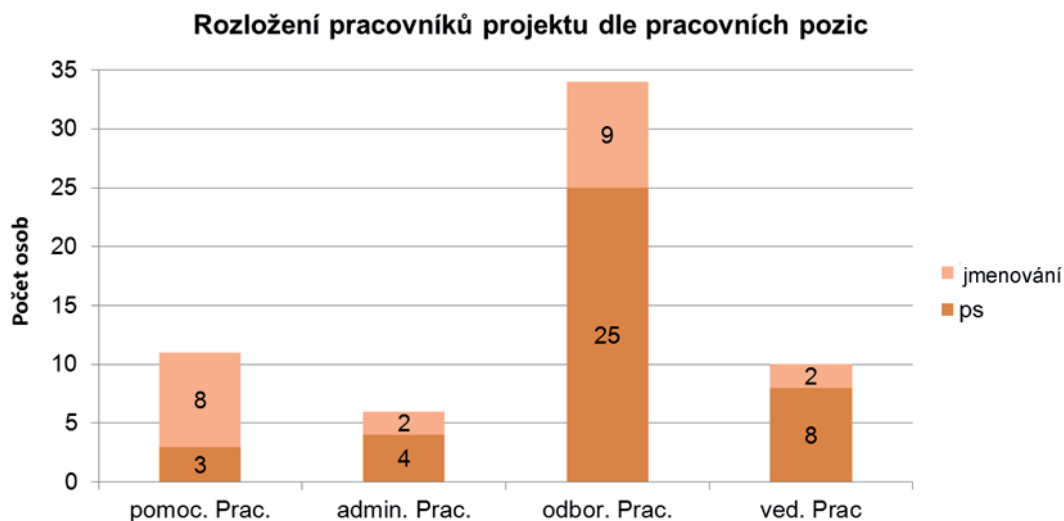
Hlavním cílem předloženého projektu byl rozvoj lidského potenciálu v oblasti výzkumu a inovací, především prostřednictvím postgraduálního studia a odborné přípravy výzkumných pracovníků a spolupráce v rámci sítí mezi univerzitami, výzkumnými středisky a podniky. Po úspěšném absolvování soutěže, započalo

na našem pracovišti (Laboratoř metalomiky a nanotechnologií) 1. 1. 2012 řešení projektu NANOLABSYS s celkovým rozpočtem 32,3 mil. Protože si projekt klade za cíl podporu lidského potenciálu, bylo nezbytné vynaložit nadpoloviční část získaných finančních prostředků (19.8 mil.) na podporu lidských zdrojů. Díky finanční podpoře s EFS jsme mohli vytvořit v rámci projektu realizační tým skládající se ze 1,7 pracovního místa pro řešitele a administrativní pracovníky a 14 pracovních míst pro odborné pracovníky. Dále byla naplánována spolupráce se specialisty a zahraničními pracovníky v rozsahu 4470 pracovních hodin.

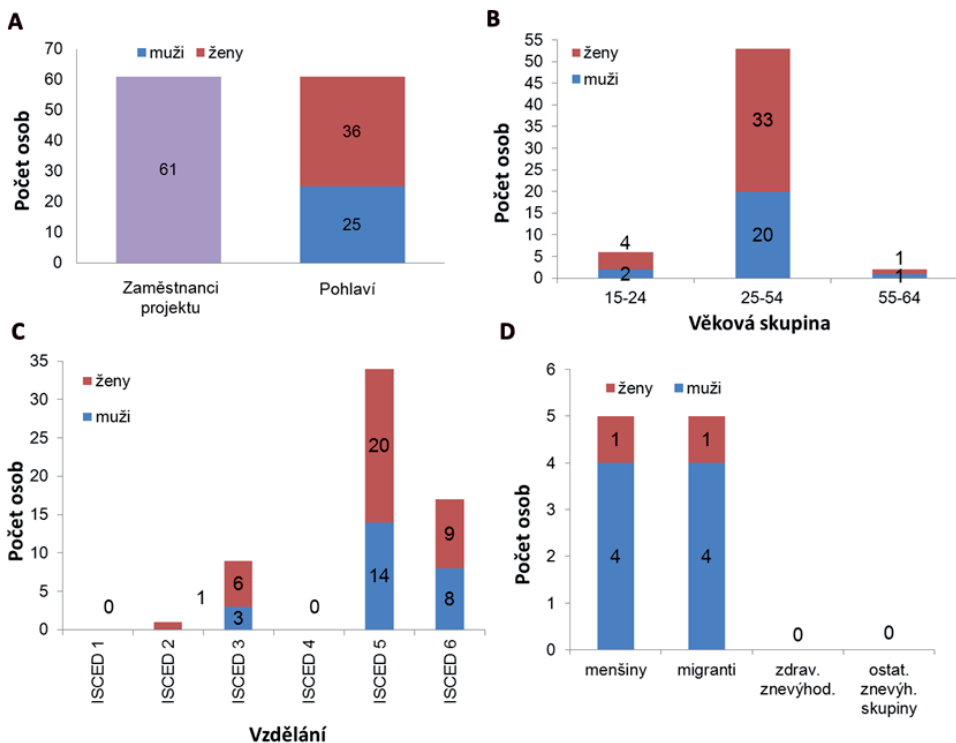
V rámci projektu NANOLABSYS se nám podařilo vytvořit pracovní pozice pro 40 odborných a administrativních pracovníků a s dalšími 21 pracovníky navázat aktivní spolupráci (tzv. jmenovaní pracovníci). V konečném důsledku to znamená, že se na řešení projektu podílí 61 pracovníků (Obr. 1).

### Sledování annexových indikátorů v projektu NANOLABSYS

Čerpání prostředků z evropských strukturálních fondů neznamená pro řešitele jen získání finančních prostředků, ale také povinnost



**Obr. 1:** Rozložení pracovníků projektu dle pracovních pozic



**Obr. 2:** Annexové indikátory pracovníků realizačního týmu; (A) – složení realizačního týmu dle pohlaví, (B) – složení realizačního týmu dle věku, (C) – složení realizačního týmu dle vzdělání, (D) – zastoupení pracovníků realizačního týmu v ostatních sledovaných annexovaných indikátorech

sledovat tzv. annexované indikátory. Způsob jak řešitel tyto indikátory sleduje je popsán v „Metodice monitorovacích indikátorů, 3. verze“, která je platná od 22. 8. 2011. Sledování indikátorů slouží řídicímu orgánu (Ministerstvu školství a mládeže popřípadě hodnotící komisi ESF) k získání zpětné vazby, o tom zda poskytnutá finanční podpora splnila svůj účel a zda byly naplněny kvantifikovatelné cíle projektu. Sledováním annexovaných indikátorů lze získat informace o postavení podpořených osob v rámci projektu, pohlaví, věku, vzdělání a podobně.

Vyhodnocením annexovaných indikátorů u projektu NANOLABSYS pro skupinu „realizačního týmu“ jsme zjistili, že z 61 členů týmu je 59 % žen a 41 % mužů (**Obr. 2A**). Dále bylo zjištěno, že většina realizačního týmu (87 %) spadá do věkové skupiny 25 – 54 let (**Obr. 2B**) a nejvíce členů řešitelského týmu má vzdělání ISCED 5 (celkem 56 %) (**Obr. 2C**). Posledními, námi sledovanými indikátory byly migranti, menšiny, zdravotně znevýhodnění a ostatní znevýhodněné skupiny. Do skupin migrantů a menšin spadá 8 % členů realizačního týmu (**Obr. 2D**) a osoby spadající do skupiny zdravotně znevýhodnění a ostatní znevýhodněné skupiny se v řešitelském týmu projektu NANOLABSYS nevyskytují.

## Závěr

Vyhodnocením annexovaných indikátorů skupiny osob spadající do řešitelského týmu můžeme konstatovat, že projekt NANOLABSYS, který si kladl za jeden z cílů vytvoření partnerské sítě jak v rámci České republiky, tak i s dalšími evropskými partnery, a rozvoj lidského potenciálu v oblasti výzkumu a inovací, tento vytyčený cíl splnil. Toto tvrzení potvrzuje jak zapojení pěti zahraničních pracovníků do řad odborných pracovníků, tak i velikost týmu, který má celkem 61 členů.

*Tato práce byla financována z projektu NANOLABSYS CZ.1.07/2.3.00/20.0148*

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, pro-

ducts, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

## Administrativa a informační systém projektu

Olga Kryštofová<sup>a,b</sup>, Josef Růžička<sup>a,b</sup>, Ondřej Zitka<sup>a,b</sup>, Vojtěch Adam<sup>a,b</sup>, René Kizek<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

### ADMINISTRATION AND INFORMATION SYSTEM OF THE PROJECT

In 2012, in the Laboratory of Metallomics and Nanotechnologies has began to solve the European project CZ.1.07/2.3.00/20.0148 „International cooperation in the field of “*in vivo*” imaging techniques (NANOLABSYS)“. LADYS system was created in addressing to this project. LADYS enabled the effective, uniform and centralized data management, facilitate and accelerate the transfer of new information to members of user networks and in administrative mode to simplify the gathering of information on workers, their daily activities and outputs that the project drew up.

**Přijato k publikování:** 7. 8. 2014

**Klíčová slova:** LADYS, NANOLABSYS;

### Úvod

V roce 2012 započala Laboratoř metalomiky a nanotechnologií řešit evropský projekt CZ.1.07/2.3.00/20.0148 „Mezinárodní spolupráce v oblasti „*in vivo*“ zobrazovacích technik (NANOLABSYS)“, který získala v rámci operačního programu Vzdělávání pro konkurenceschopnost v oblasti podpory Lidské zdroje ve výzkumu. Jedním z hlavních cílů projektu je vytvoření výzkumné sítě mezi subjekty v rámci EU v oblasti zavedení elektronických laboratorních systémů s ohledem na praktické využití v *in vivo* a biotechnologických aplikacích. Ke splnění tohoto cíle byl na našem pracovišti vytvořen systém LADYS (laboratorní databázový systém), který slouží jak k ukládání a předávání experimentálních dat v rámci sítě, tak k usnadnění administrativy související s řešením evropských projektů.

### Historie systému LADYS

Předchůdcem administrativní části systému „LADYS“ byl v naší laboratoři systém „docházka“. Původní systém sloužil zejména k evidenci pracovníků a poskytoval základní údaje o jejich přítomnosti na pracovišti a podílu na řešení různých grantových projektů. V souvislosti se zapojením do operačního programu Vzdělávání pro konkurenceschopnost bylo zapotřebí

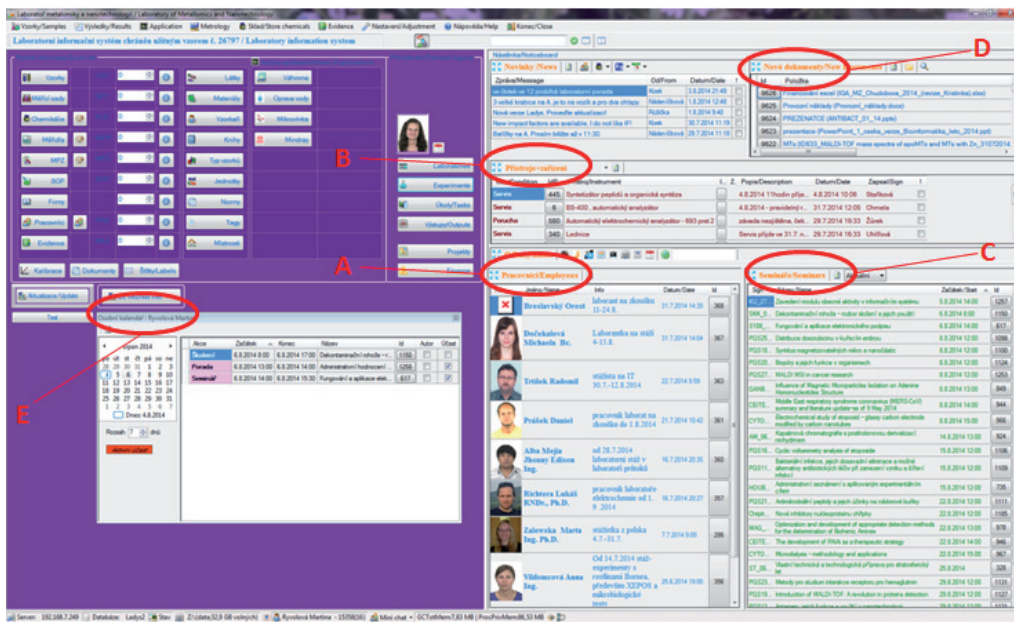
rozšířit spektrum informací o jednotlivých pracovnících a jejich činnostech. Proto byl vyvinut systém LADYS, který umožnil efektivní, jednotnou a centralizovanou správu dat, usnadnil a zrychlil předávání nových informací členům uživatelské sítě a v administrativním módu zjednodušil shromažďování informací o pracovnících, jejich denních činnostech a výstupech, které pro projekt NANOLABSYS vyhotovili.

### Informační část systému LADYS

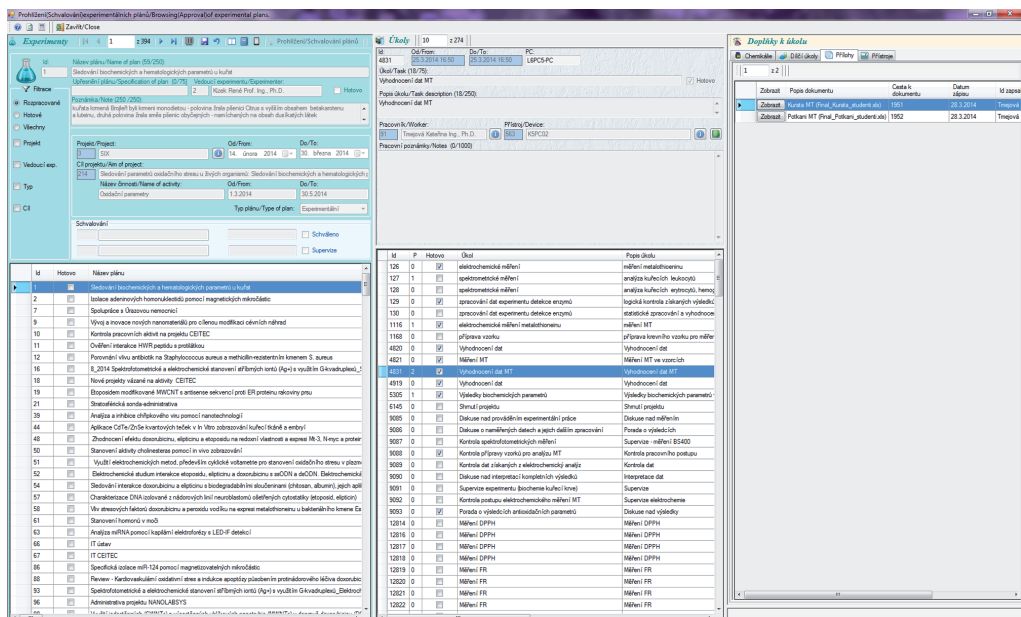
Jak již bylo napsáno v textu výše, jedním z cílů systému LADYS je usnadnění a zrychlení předávání nových informací členům uživatelské sítě. Nejaktuálnější novinky se proto každý uživatel může dočíst hned na hlavním panelu systému (**Obr. 1**). Na tomto panelu jsou promítány informace o nově příchozích pracovnících, o poruchách přístrojů, o vzdělávacích akcích pořádaných pracovištěm, je zde možnost prohlédnout si nejnovější výsledky a výstupy projektů a v neposlední řadě každý uživatel v osobním kalendáři vidí přehled akcí, kterých se zúčastnil nebo se plánuje zúčastnit.

Kromě rychlého poskytování informací systémem uživateli usnadňuje rutinní úkoly související s každodenním laboratorním chodem, od





Obr. 1: Hlavní panel systému LADYS; A - nově přichozí pracovníci, B - poruchy přístrojů, C - vzdělávací akce, D - výsledky a výstupy projektů, E - osobní kalendář



Obr. 2: Pracovní panel sekce Experimenty. V levé části panelu je přehled aktuálně řešených experimentů, ve středové části se nachází přehled úkolů vztahujících se k danému projektu a v pravé části lze získat doplňující informace k danému úkolu, jako jsou získané výsledky, přehled použitých chemikálií či přístrojů

administrativy až po vážení chemikálií.

V sekci experimenty pracovník vidí přehled úkolů, které má splnit, zadává zde plány nových experimentů a také k jednotlivým úkolům nahrává získané experimentální data (Obr. 2). Splněné úkoly jsou následně přenášeny do výkazů práce a také usnadňují vedoucím laboratoří management prací v laboratoři a

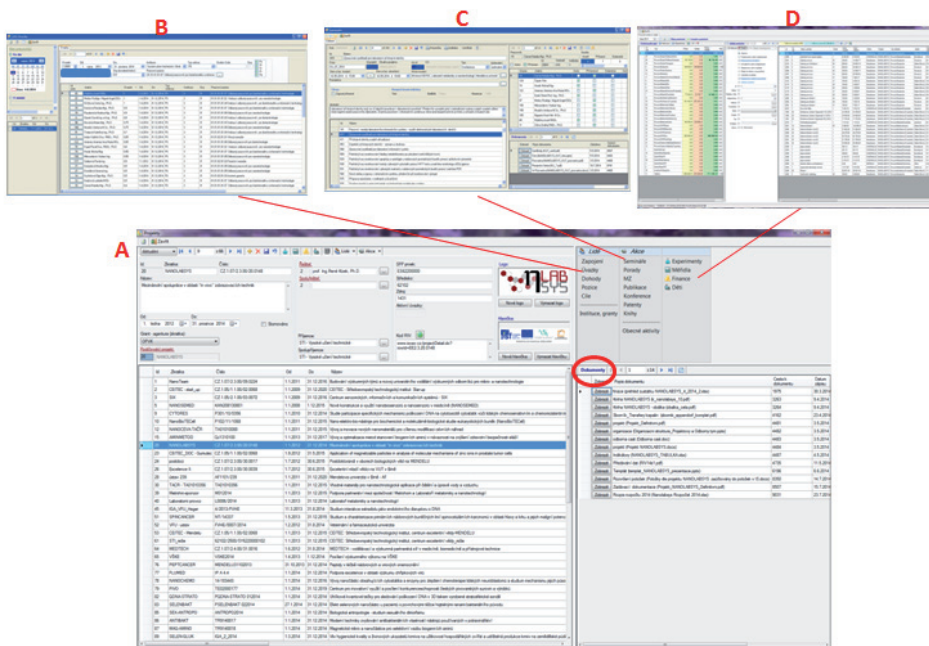
## Administrativní část systému LADYS

Proto, aby mohlo být zajištěno bezproblémové řešení projektu, je zapotřebí mít nejen dobře zvládnutý management prací v laboratoři a využití přístrojového vybavení, ale také je třeba mít přístup k informacím o řešeném projektu. K tomu vedoucím laboratoří a administrativnímu týmu slouží sekce Projekty. Je zde přehled všech aktuálně řešených projektů (Obr. 3A) a v přehledných podsekcích lze nalézt veškeré informace o konkrétním projek-

tu. Kompetentní pracovníci se tak snadno a rychle dozvědí informace např. o personálním obsazení projektu (Obr. 3B). O akcích, které byly pod záštitou projektu pořádány včetně přehledu účastníků a veškeré dokumentace k tomu se vztahující (pozvánky, prezenční listiny, fotodokumentace, apod.) (Obr. 3C). Dále o finančním přehledu projektu, ve kterém jsou v přehledných kategoriích vypsány jednotlivé nakoupené položky (Obr. 3D). Všechny tyto informace nám usnadňují řešení projektu a psaní průběžných zpráv.

## Závěr

V rámci řešení projektu NANOLABSYS se nám podařilo zavést Laboratorní informační systém LADYS, který je velmi sofistikovaným a specifickým softwarem pro laboratorní prostředí. LADYS je navržen tak, aby zjednodušil veškerou práci spojenou s každodenním laboratorním chodem, od administrativy až po vážení chemikálií.



**Obr. 3:** Pracovní panely sekce Projekty; A - přehled všech aktuálně řešených projektů, B - personální obsazení projektu, C – přehled akcí pořádaných pod záštitou projektu, D – informace o finanční stránce projektu

*Tato práce byla financována z projektu NANOLABSYS CZ.1.07/2.3.00/20. 0148*

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

## Microwave preparation of carbon quantum dots with different surface modification

Vedran Milosavljevic<sup>a</sup>, Amitava Moulick<sup>a,b</sup>, Pavel Kopel<sup>a,b</sup>, Vojtěch Adam<sup>a,b</sup>, René Kizek<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

### Microwave preparation of carbon quantum dots with different surface modification

Carbon quantum dots (CQDs) have great potential to be utilized as an optical sensing probe due to its unique photoluminescence and less toxic properties. This work reports a simple and novel synthesis method of carbon dots via direct acid hydrolysis in presence of polyethylene glycol (PEG), polyvinylpyrrolidone (PVP) and bovine serum albumin protein (BSA). In this study, fluorescent CQDs were synthesized by using citric acid and ascorbic acid as the source of carbon precursors, which was covered with polyethylene glycol (PEG), polyvinylpyrrolidone (PVP) and with bovine serum albumin (BSA), by microwave irradiation. Furthermore, the synthesis parameters as power, reaction time and temperature were studied and quality of prepared CQDs were investigated by spectral methods. Short reaction time (20 min) and temperature from 120 °C to 140 °C under microwave irradiation are sufficient to prepare luminescence carbon quantum dots. Absorption spectra and photoluminescence spectra were measured to characterize prepared dots in water solution. The photoluminescence spectra of CQDs doped with different protection compound show the different luminescent and excitation wavelengths starting from 330 nm to 430 nm. Importantly, these CQDs are demonstrated to be excellent bioimaging agents and fluorescent ink due to their stable emission, well dispersibility, low toxicity, long emission life time, and good compatibility with different macromolecules.

**Přijato k publikování:** 7. 8. 2014

**Klíčová slova:** Bovine serum albumin; Fluorescence; Microwave irradiation; Polyethylene glycol; Spectrophotometry;

### 1. Introduction

Carbon quantum dots (CQDs) have received a lot of attention due to their chemical stability, biocompatibility, and low toxicity in comparison with other quantum dots. Unique quantum size effect of quantum dots (QDs) semiconductor nanocrystal stems from dimension smaller than the bulk exaction Bohr radius. This unique effect is connected with QDs properties, such us broad excitation spectrum, excellent photostability, high quantum yield of fluorescence and high photobleaching<sup>1,2</sup>. Carbon nanoparticles were first discovered accidentally by Xu and co-workers<sup>3</sup>, during the electrophoretic purification of carbon nanotubes and since then, there were search activity in this area. CQDs are not only less toxic, but also we can find in different reports that they have less fluorescent blinking

effect. Syntheses of CQDs are much easier compared with other quantum dots, and remarkably cheaper in handling and production costs<sup>4,5</sup>. However, the main advantage of semiconductor nanocrystal is its high fluorescence. Organic fluorophores usually do not have excellent characteristic like QDs that are associated with high photostability and resistant to photobleaching of QDs. These characteristic changes in size of semiconductor nanocrystal which leads to changes in spectra wavelength<sup>6</sup>. Application of these semiconductor based QDs such as CdTe<sup>7</sup>, CdSe<sup>8,9</sup>, CdSe/ZnSe<sup>10</sup>, PbS<sup>11</sup>, and CdS<sup>12</sup>, is limited through the presence of heavy metals. This serious problem demonstrates the limited ability for their conventional application due to the known toxicity<sup>13,14</sup>. Compared with these semiconductor nanomaterial's, CQDs show



many advantages, including chemical stability, biocompatibility and low toxicity<sup>15</sup>.

Carbon quantum dots represent a new type of nanomaterial with nanocrystal structure where the crystal size is not generally less than 10 nm in diameter. The importance of CQD is reflected in its electronic, mechanical, chemical and optical properties. All of these properties allow using of CQDs in different fields of research such as catalysis, sensing, bioimaging, tissue engineering, optoelectronic and electronic devices<sup>16-19</sup>. Carbon nanoparticles have functionalized surface with carboxyl or hydroxyl groups that had a good photo-induced electron transfer properties<sup>20</sup>. Basically, the synthesis of CQDs falls into three main stages; carbonization, passivation, and surface functionalization<sup>21</sup>. Carbonization is the process of converting organic precursor into its basic carbon containing residues via pyrolysis, electrochemical exfoliation, acidic oxidation, hydrothermal treatments, microwave passivation, laser ablation, thermal oxidation and emulsion-assisted methods<sup>22-24</sup>. Passivation is a next step that is usually required, because pure carbon nanoparticles are usually non-fluorescent and the chemical treatment of the surface with different compounds is important step in production of CQDs. This step introduces an insulating shell on the surface that minimizes the impact of surface-defect, trap sites, and direct quenching from the surrounding, which all will enhance the fluorescence emission<sup>25</sup>. The functionalization is the last step necessary for production of effective carbon dots. Specific chemical or biological reactivity on the surface of the CQDs is important to introduce specific sites that can be used for bio-imaging or sensing purposes<sup>26</sup>. Material for preparation of CQDs depends on the methods which are being used. Commonly used is carbon material with different size such as graphite, carbon nanotubes, carbon soot's, activated carbon, graphite oxide or different molecular precursors such as citric acid or glucose<sup>27</sup>. Excellent optical properties of CQDs are arising from carboxyl or hydroxyl groups which are passivized by covering materials. These ensure the production of high fluorescent nanomaterial with high quantum

yield and excitation wavelength<sup>28</sup>.

The current research focuses exploring of synthetic routes, more economical synthesis approaches, utilizing greener chemistry, and diversifying possible starting precursors. Covering materials were selected due to its biocompatibility nature, which later will stand a better chance in applications that require low toxicity tolerance. Therefore, we tried to synthesize functionalized CQDs with high fluorescence by using low temperature. The design in CQD synthesis is based on the following considerations: well surface passivation of CQDs plays a key role in quantum dots. However, reaction temperatures are quite high (usually >300 °C) to ensure complete carbonization of molecular precursors, which may destroy the capping reagents and thus lead to bad surface passivation, and loss (or denaturation) of functional groups. Using of microwave irradiation for synthesis of CQDs for both carbonization and passivation would be beneficial to obtain both well passivized and functionalized CQDs. In the case of our research we choose citric and ascorbic acid as the carbon source due to its well-known low carbonization temperature (<200 °C), and use polyethylene glycol, polyvinylpyrrolidone and bovine serum albumin as the capping and functionalizing reagent since they have functionalized and passivation surface states with carboxyl or hydroxyl groups that had a good photo-induced electron transfer properties.

## 2. Experimental

### 2.1 Chemicals and materials

Citric acid, ascorbic acid, polyethylene glycol (Mw = 8000), polyvinylpyrrolidone (Mw = 40 000) and bovine serum albumin were purchased from Sigma-Aldrich Co., (St. Louis, Missouri, USA).

### 2.2 Synthesis of CQDs

For synthesis of water soluble CQDs we prepared six samples were as follows. Sample **1**, **2** and **3** have the same procedure of preparation; only for each of the sample were used different capping agent for functionalization and passivation of CQDs surface. In the case of 1,1 g of citric acid was diluted with MiliQ

water (15 ml) and after that was added 1 g of PEG under stirring. Afterwards, sample was stirred for 30 min. The same way of preparation was used for 2 except of capping agent PVP and for 3 capping agent was BSA. Samples 4, 5 and 6 also have the same steps of preparation, but in these cases we used ascorbic acid as carbon source. After 30 min of stirring, from each sample 2 ml of solution was pipetted into glass reaction vessel and heated in Multiwave 3000 Microwave Reaction System (Anton Paar, Graz, Austria) using rotor 64MG5. The reaction conditions were as follows: temperature 60–140 °C, power 300 W and time of heating 20 minutes. Prepared CQDs were stored in dark at 4°C. Measurements of CQDs fluorescence were conducted by multifunctional microplate reader Tecan Infinite 200 PRO (Tecan group Ltd. Männedorf, Switzerland). The absorbance scans were recorded in the range from 200 to 800 nm each 5 nm. Emission wavelengths were measured in different excitation wavelength on 330 nm, 340 nm, 360 nm, 380 nm, 400 nm 420 and 430 nm, with 100 µl of sample placed in Costar plate, 96 well, with flat bottom. The samples were visualized by UV transilluminator (VilberLourmat, Marne-la-Valle ´e Cedex, France) at 312 nm.

### 3. Results and discussion

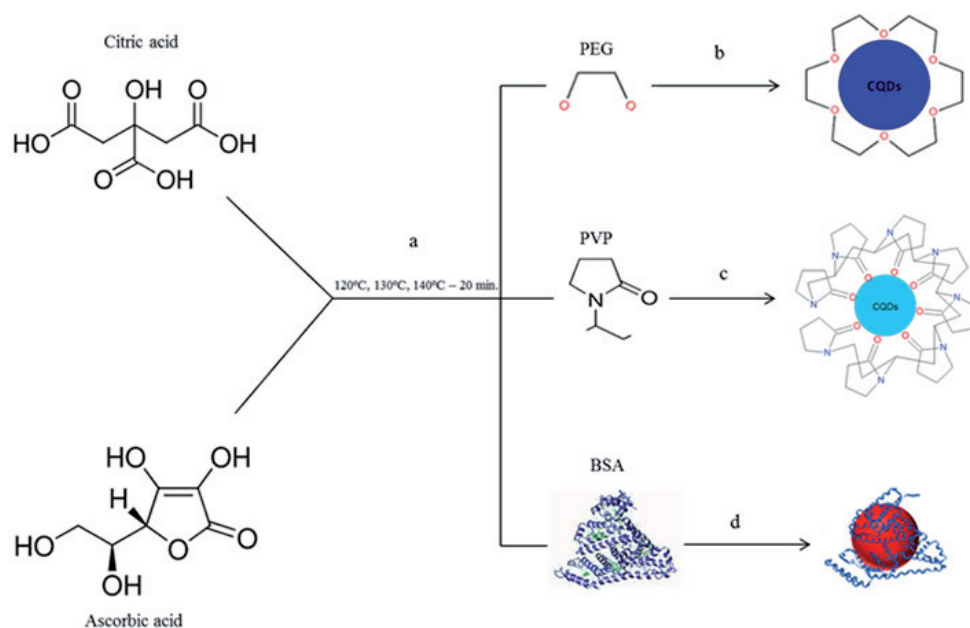
In this work we synthesized CQDs and examined the effect of different capping agent on CQDs fluorescence, using citric acid and ascorbic as the source of carbon precursors, which was covered with PEG, PVP and BSA which is illustrated in (Fig. 1).

General method for the preparation of water soluble CQDs was described in the previous part. Heating of solution was used to carbonize the precursor. To produce CQDs, a high temperature (180 °C) is needed to reach the temperature required for carbonization of precursor. However, higher temperature may cause the destruction of organic capping reagents and this can result in bad surface passivation and functional group deprivation. Using citric acid and ascorbic as the carbon source we prevented the loss of organic matter and we have preserved the good properties of surface passivation.

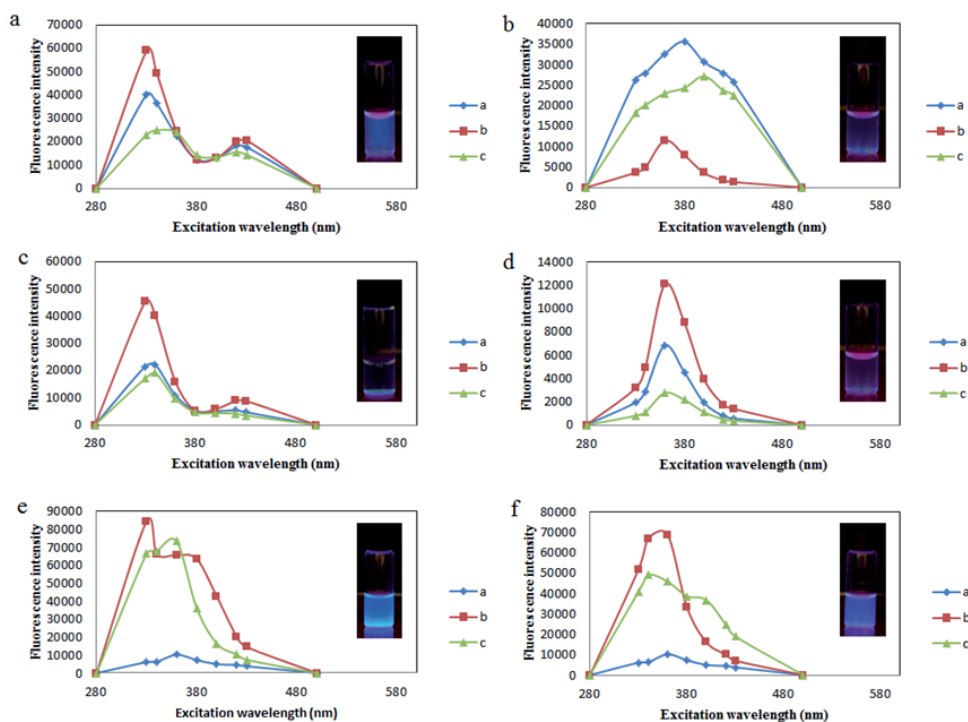
Low carbonization temperature (<140 °C) of citric and ascorbic acids enabled us to synthesize functionalized CQDs by microwave irradiation. For stability of nanomaterial we used surface capping agent PEG, PVP and BSA. The polymer provides surface functionality, which leads to enhanced luminescence and chemical stability that was confirmed by measurement of fluorescent intensities, that show that after two months CQDs have high luminescence and bright blue color.

The influence of various synthesis parameters, including the reaction temperature and time, on stability, quality and photoluminescence (PL) of CQDs were investigated. The spare solutions were colorless and no luminescence was observed. It was also found that after 24 h the solution shows no fluorescence. However, the use of fresh solutions is to prevent formation of any centers for crystallization. Under microwave irradiation, CQDs with blue emission wavelength were produced by varying the reaction temperature and time. It is obvious that higher temperature leads to increasing growth of CQDs. In our experiments we have heated six samples used the same power of microwave oven (300 W) and temperature in the range from 60 °C to 140 °C for 20 min. The samples heated in temperature range from 60 °C to 120 °C didn't show any emission of fluorescence under transilluminator and after fluorescence spectra measuring, from that we can conclude that lower temperature (<120°C) is not sufficient for the synthesis of CQDs independently of length of the sample heating. Higher temperature (120 °C - 140 °C) led to production of small particles which blue emission luminescence. The same was observed in case when temperature above 120 °C was used and time of reaction was 20 min. The photoluminescence (PL) spectra of six samples prepared at 300 W, 20 min of heating and different temperatures (120 °C, 130 °C and 140 °C) and pictures of the samples under transilluminator are given in Fig. 2.

Measuring the fluorescence at excitation wavelengths of 280, 330, 340, 360, 380, 400, 420 and 430 nm were used for CQDs. In the case of the best results were obtained after heating of sample for 20 minutes at 130 °C (red curve).



**Fig. 1:** Diagram for the synthesis of PEG, PVP and BSA-functionalized CQDs. (A) Synthesis of CQDs using citric acid and ascorbic acid as carbon source. (B) Capping of CQDs with PEG. (C) Capping of CQDs with PVP. (D) Capping of CQDs with BSA



**Fig. 2:** Measuring the CQDs fluorescence with excitation wavelength at 280, 330, 340, 360, 380, 400, 420 and 430 nm. Blue curve-120 °C, red curve-130 °C and green curve 140 °C. Maxima of fluorescence intensity, (A) Citric acid capped with PVP, (B) Ascorbic acid capped with PVP, (C) Citric acid capped with PEG, (D) Ascorbic acid capped with PEG, (E) Citric acid capped with BSA, (F) Ascorbic acid capped with BSA

When we look at the excitation wavelength the highest narrow peak at 340 nm of emission wavelength was found. The fluorescence intensity at 340 nm increases according to temperature of heating; it can be seen from the obtained fluorescence intensity (**Fig. 2a**). However, second peak was also obtained for fluorescence measurement at 340 nm. This can be explained as aggregation of smaller particles into larger structure according to Goncalves et al.<sup>29</sup>. Samples heated on 120 °C (blue curve) and 140 °C (green curve) show that they have the same narrow peak at 340 nm, but fluorescence intensity were decreased with changing temperature of heating. From observed results we can see that the fluorescence intensity of CQDs was the best when the sample was heated on 130 °C. The variation in fluorescence intensity at 340 nm can be explained by bonding of PVP by oxygens on the surface of carbon precursor and stabilization of CQDs under different temperature of heating the sample. Also, independently from fluorescence intensity, picture that was taken under UV light does not show bright blue color. Sample 3 shows the same results as can be seen from (**Fig. 2c**), the fluorescence intensity are lower if we compare with 1 and picture of sample taken under UV light do not show any luminescence. For sample 5 (see **Fig. 2e**) two peaks were also observed. When the sample was heated at 130 °C (red curve) the highest narrow peak was obtained at 340 nm and second peak was obtained at 400 nm. According to Pyng Yu et al.<sup>29</sup>, the peak at 340 nm is described to  $\pi-\pi^*$  transition of aromatic C-C bonds, while a shoulder at 400 nm attributes to  $n-\pi^*$  transition of C-O bonds. Carboxyl group may originate from the surface of CQDs, while C-C from the core. Sample heated on 140 °C (green curve) and sample heated on 120 °C (blue curve) show highest peak at 360 nm and second peak at 340 nm and this can be explained as an effect of samples heating on different temperature. However, if we compare this figure with another we can see that these CQDs who were heated at 130 °C have the higher fluorescence according to the results and picture taken under UV light.

In the case of samples 2, 4 and 6 carbon

precursor was ascorbic acid. Measuring the fluorescence of sample 2 (**Fig. 2b**) the best results were obtained after heating of sample for 20 minutes at 120 °C (blue curve) were the highest narrow peak was found at 380 nm of emission wavelength with highest fluorescence. At 140 °C the narrow peak was found at 400 nm but fluorescence decreased, and on 130 °C the narrow peak was found at 360 nm with very low fluorescence. However, sample 4 shows that sample heated on 130 °C have highest fluorescence with highest narrow peak found at 360 nm (red curve). Samples heated on 120 °C (blue curve) and 140 °C show that they have the same narrow peak at 360 nm, but fluorescence intensity decreased with temperature changing. In the case of sample 6 heated on 130 °C has highest fluorescence with highest narrow peak found at 360 nm (red curve). Sample that was heated on 140 °C (green curve) shows lower fluorescence and narrow peak was found at 340 nm and sample heated on 120 °C (blue curve) shows the lowest fluorescence with narrow peak at 360 nm. However, if we compare results in **Fig. 2 b, d and f** we can see that for synthesis of CQDs the main role plays the temperature were with changing the temperature narrow peak was found on another excitation wavelength and the capping agent according from the results and picture taken under UV light. Also the highest luminescence with bright blue color shows the sample 6 capped with BSA. The observed fluorescence of samples 5 and 6 seems to be promising for imaging in biological samples. It is also very important to mention that citric and ascorbic acid don't show any fluorescence after heating at same temperature without capping agent.

#### 4. Conclusion

This work has demonstrated the success in converting citric and ascorbic acid as carbon precursor and PEG, PVP, BSA as capping agent into CQDs via a simple and effective carbonization method. The CQDs were found to be highly fluorescent with good stability. The highest fluorescence was obtained using BSA as capping agent. However, another samples



also show high fluorescence but without high luminescence under UV light. Using a citric acid as carbon source show that higher fluorescence were obtained after heating sample at 130 °C. The resulting fluorescence of the samples was found to decrease at different temperature above 130 °C. But in the case of citric acid used as carbon precursors we can see that main role in increasing of fluorescence has capping agent. Depending on capping agent the temperature necessary for synthesis of highly fluorescent CQDs were constantly changing. This study serves as a novel demonstration of an easy and economical method to produce CQDs that can lead to their potential for optical sensing applications. This is especially with further modifications such as surface capping of the CQDs or doping the CQDs with various dopants are performed that might improve the sensitivity of the detection.

*Financial support from NANOLABSYS CZ.1.07/2.3.00/20.0148 is highly acknowledged.*

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

## References

1. Yang, T.; Lu, M.; Mao, X.; Liu, W.; Wan, L.; Miao, S.; Xu, J. Synthesis of CdS quantum dots (QDs) via a hot-bubbling route and co-sensitized solar cells assembly. *Chemical Engineering Journal*. 2013, 225, 776-783.
2. Xiao, Q.; Huang, S.; Su, W.; Li, P.; Ma, J.; Luo, F.; Chen, J.; Liu, Y. Systematically investigations of conformation and thermodynamics of HSA adsorbed to different sizes of CdTe quantum dots. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013, 102, 76-82.
3. Ma, Z.; Ming, H.; Huang, H.; Liu, Y.; Kang, Z. One-step ultrasonic synthesis of fluorescent N-doped carbon dots from glucose and their visible-light sensitive photocatalytic ability. *New Journal of Chemistry*. 2012, 36, 861-864.
4. Baker, S.N.; Baker, G.A. Luminescent Carbon Nanodots: Emergent Nanolights. *Angewandte Chemie-International Edition*. 2010, 49, 6726-6744.
5. Yang, Z.; Li, Z.; Xu, M.; Ma, Y.; Zhang, J.; Su, Y.; Gao, F.; Wei, H.; Zhang, L. Controllable Synthesis of Fluorescent Carbon Dots and Their Detection Application as Nanoprobes. *Nano-Micro Letters*. 2013, 5, 247-259.
6. Fu, A.; Gu, W.; Larabell, C.; Alivisatos, A.P. Semiconductor nanocrystals for biological imaging. *Current Opinion in Neurobiology*. 2005, 15, 568-575.
7. Halpert, J.E.; Porter, V.J.; Zimmer, J.P.; Bawendi, M.G. Synthesis of CdSe/CdTe nanobarbells. *Journal of the American Chemical Society*. 2006, 128, 12590-12591.
8. Reiss, P.; Carayon, S.; Bleuse, J.; Pron, A. Low polydispersity core/shell nanocrystals of CdSe/ZnSe and CdSe/ZnSe/ZnS type: preparation and optical studies. *Synthetic Metals*. 2003, 139, 649-652.
9. Chen, J.; Song, J.L.; Sun, X.W.; Deng, W.Q.; Jiang, C.Y.; Lei, W.; Huang, J.H.; Liu, R.S. An oleic acid-capped CdSe quantum-dot sensitized solar cell. *Applied Physics Letters*. 2009, 94.
10. Reiss, P.; Bleuse, J.; Pron, A. Highly luminescent CdSe/ZnSe core/shell nanocrystals of low size dispersion. *Nano Letters*. 2002, 2, 781-784.
11. Jin-nouchi, Y.; Hattori, T.; Sumida, Y.; Fujishima, M.; Tada, H. PbS Quantum Dot-Sensitized Photoelectrochemical Cell for Hydrogen Production from Water under Illumination of Simulated Sunlight. *Chemphyschem*. 2010, 11, 3592-3595.
12. Tachibana, Y.; Akiyama, H.Y.; Ohtsuka, Y.; Torimoto, T.; Kuwabata, S. CdS quantum dots sensitized TiO<sub>2</sub> sandwich type photoelectrochemical solar cells. *Chemistry Letters*. 2007, 36, 88-89.
13. Song, Y.; Feng, D.; Shi, W.; Li, X.; Ma, H. Parallel comparative studies on the toxic effects of unmodified CdTe quantum dots, gold nanoparticles, and carbon nanodots on live cells as well as green gram sprouts. *Talanta*. 2013, 116, 237-244.
14. Liu, Y.; Liu, C.Y.; Zhang, Z.Y. Synthesis and surface photochemistry of graphitized carbon quantum dots. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2011, 356, 416-421.
15. Dong, Y.; Zhou, N.; Lin, X.; Lin, J.; Chi, Y.; Chen, G. Extraction of Electrochemiluminescent Oxidized Carbon Quantum Dots from Activated Carbon. *Chemistry of Materials*. 2010, 22, 5895-5899.
16. Liu, Y.; Yu, Y.X.; Zhang, W.D. Carbon quantum dots-doped CdS microspheres with enhanced photocatalytic performance. *Journal of Alloys and Compounds*. 2013, 569, 102-110.
17. Dong, Y.Q.; Chen, C.Q.; Lin, J.P.; Zhou, N.N.; Chi, Y.W.; Chen, G.N. Electrochemiluminescence emission from carbon quantum dot-sulfite coreactant system. *Carbon*. 2013, 56, 12-17.
18. Zhang, X.; Ming, H.; Liu, R.H.; Han, X.; Kang, Z.H.; Liu, Y.; Zhang, Y.L. Highly sensitive humidity sensing properties of carbon quantum dots films. *Materials Research Bulletin*. 2013, 48, 790-794.

19. Bai, W.; Zheng, H.; Long, Y.; Mao, X.; Gao, M.; Zhang, L. A carbon dots-based fluorescence turn-on method for DNA determination. *Anal Sci.* 2011, 27, 243-246.
20. Li, Y.; Zhang, B.P.; Zhao, J.X.; Ge, Z.H.; Zhao, X.K.; Zou, L. ZnO/carbon quantum dots heterostructure with enhanced photocatalytic properties. *Applied Surface Science.* 2013, 279, 367-373.
21. Esteves da Silva, J.C.G.; Goncalves, H.M.R. Analytical and bioanalytical applications of carbon dots. *Trac-Trends in Analytical Chemistry.* 2011, 30, 1327-1336.
22. Liang, Q.H.; Ma, W.J.; Shi, Y.; Li, Z.; Yang, X.M. Easy synthesis of highly fluorescent carbon quantum dots from gelatin and their luminescent properties and applications. *Carbon.* 2013, 60, 421-428.
23. Kwon, W.; Do, S.; Won, D.C.; Rhee, S.W. Carbon Quantum Dot-Based Field-Effect Transistors and Their Ligand Length-Dependent Carrier Mobility. *ACS Applied Materials & Interfaces.* 2013, 5, 822-827.
24. Liu, Y.; Liu, C.-y.; Zhang, Z.-y. Synthesis and surface photochemistry of graphitized carbon quantum dots. *Journal of Colloid and Interface Science.* 2011, 356, 416-421.
25. Wu, L.; Luderer, M.; Yang, X.; Swain, C.; Zhang, H.; Nelson, K.; Stacy, A.J.; Shen, B.; Lanza, G.M.; Pan, D. Surface Passivation of Carbon Nanoparticles with Branched Macromolecules Influences Near Infrared Bioimaging. *Theranostics.* 2013, 3, 677-686.
26. Chandra, S.; Pathan, S.H.; Mitra, S.; Modha, B.H.; Goswami, A.; Pramanik, P. Tuning of photoluminescence on different surface functionalized carbon quantum dots. *Rsc Advances.* 2012, 2, 3602-3606.
27. Dong, Y.Q.; Wang, R.X.; Li, H.; Shao, J.W.; Chi, Y.W.; Lin, X.M.; Chen, G.N. Polyamine-functionalized carbon quantum dots for chemical sensing. *Carbon.* 2012, 50, 2810-2815.
28. Kim, J.; Park, J.; Kim, H.; Singha, K.; Kim, W.J. Transfection and intracellular trafficking properties of carbon dot-gold nanoparticle molecular assembly conjugated with PEI-pDNA. *Biomaterials.* 2013, 34, 7168-7180.
29. Goncalves, H.; Esteves da Silva, J.C.G. Fluorescent Carbon Dots Capped with PEG(200) and Mercaptosuccinic Acid. *Journal of Fluorescence.* 2010, 20, 1023-1028.



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons

(BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

# Buněčné linie jako modelové systémy pro optimalizaci aplikace kvantových teček

Jan Balvan<sup>a,b</sup>, Michaela Fojtů<sup>a</sup>, Hana Polanská<sup>a</sup>, Michal Masařík<sup>a,b</sup>, René Kizek<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> Ústav patologické fyziologie, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

<sup>c</sup> Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

## Cell lines as a model system for quantum dots applications

Semiconductor quantum dots (QDs) are nanoparticles in which charge carriers are three dimensionally or quantum confined. The quantum confinement provides size-tunable absorption bands and emission color to QDs. Also, the photoluminescence (PL) of QDs is exceptionally bright and stable, making them potential candidates for biomedical imaging and therapeutic interventions. Although fluorescence imaging and photodynamic therapy (PDT) of cancer have many advantages over imaging using ionizing radiations and chemo and radiation therapies, advancement of PDT is limited due to the poor availability of photostable and NIR fluorophores and photosensitizing (PS) drugs.

**Přijato k publikování:** 8. 8. 2014

**Klíčová slova:** Aptamer; buněčné linie; kvantové tečky; membránový receptor; protilátka; specifický ligand

## Úvod

Kvantové tečky (QDs) jsou fluoreskující polovodičové nanokrystaly. Jsou složeny z několika stovek až tisíc atomů a představují tak přechod mezi atomem a pevnou látkou<sup>1</sup>. Optické a další fyzikální vlastnosti nanokrystalů závisí na jejich velikosti a tvaru. Změnou velikosti nanokrystalu lze upravovat vlnovou délku (barvu) světla vyzářovaného nanokrystalem. Fotoluminiscence (PL) QDs je výjimečně jasná a stabilní, což předurčuje jejich potenciální využití v biomedicínských zobrazovacích metodách a v terapeutických intervencích. Přestože fluorescenční zobrazovací metody a fotodynamická terapie (PDT) nádorových onemocnění mají v porovnání s ionizujícím zářením nebo chemo- a radioterapií mnoho výhod, vývoj PDT je limitován nízkou dostupností fotostabilních fluoroforů, fotosenzitivizujících (PS) látek<sup>2</sup>. Pro tyto účely se jako ideální modelové systémy jeví buněčné linie, které představují levný a snadno reprodukovatelný zdroj informací. Vzhledem k široké nabídce buněčných linií není problém s výběrem buněčné linie odpovídající určitému

typu onemocnění. V této rešerši se budeme soustředit na nádorová onemocnění a možnosti jejich zobrazování pomocí kvantových teček.

## Vizualizace nádorových buněk s využitím kvantových teček *in vitro*

Cílené doručení kvantových teček nebo jejich konjugátů s fotosenzitivizujícími látkami do nádorových buněk je nezbytným požadavkem pro selektivní zobrazování a fotodynamickou terapii nádorového onemocnění<sup>2</sup>. Zvýšená exprese specifických receptorů je typickým znakem mnoha typů nádorových onemocnění. Tyto receptory tak představují ideální cíle pro směřování QDs do nádorových buněk<sup>3</sup>. Metody pro doručení QDs do buněk zahrnují různé fyzikální a biochemické techniky. Fyzikální techniky, jako je elektroporace a mikroinjikace mají limitované praktické využití v *in vivo* systémech v porovnání s biochemickými metodami<sup>4</sup>. Konjugace QDs s peptidy, protilátkami a sekundárními protilátkami představuje slibný nástroj pro selektivní značení nádorových buněk kvantovými tečkami<sup>1</sup>.

Zobrazování nádorových buněk *in vitro* patří mezi jednu z nejpokročilejších aplikací kvantových teček. Od zavedení biokompatibilních kvantových teček pro zobrazování buněk v roce 1998<sup>3</sup> nastal prudký rozvoj v této oblasti. Mnoho výzkumných skupin následně aplikovalo QDs pro vizualizaci nádorových buněk. QDs konjugované s ligandy/protilátkami/peptidy specifickými pro nádorové buňky se ukázaly být efektivním nástrojem pro detekci a zobrazování lidských nádorových buněčných linií odvozených od karcinomu prostaty<sup>5</sup>, prsu<sup>6</sup>, nádorů pankreatu<sup>7</sup>, kostní dřevě<sup>8</sup> a jazyka<sup>9</sup>. V závislosti na funkční skupině či biomolekule konjugované k povrchu QD rozlišujeme techniky cílení a zobrazování nádorových buněk na metody využívající protilátky a metody využívající ligand<sup>1</sup>.

### **Cílené zobrazování nádorových buněk kvantovými tečkami konjugovanými s protilátkou**

Nadměrně exprimované specifické receptory u mnoha typů nádorového onemocnění představují ideální cíl pro zobrazování buněk a distribuci chemoterapeutik. QDs konjugované s primární či sekundární protilátkou pro nadměrně exprimované receptory jsou široce užívány pro cílení a zobrazování nádorových buněk. Klasickým příkladem detekce nádorových buněk pomocí kvantových teček je značení lidských nádorových prostatických buněk linie C4-2 pomocí konjugátu QDs s protilátkou proti specifickému prostatickému membránovému antigenu (PSMA). PSMA pozitivní C4-2 buňky byly tímto konjugátem spolehlivě označeny. Buňky linie PC-3 (PSMA negativní) však nebyly rozeznány ani konjugátem s protilátkou, ani samotnými QDs<sup>10</sup>.

U mnoha typů karcinomu prsu je typickým enormně exprimovaný receptor Her2. QDs konjugované s Trastuzumabem (Herceptinem), protilátkou proti tomuto receptoru, byly použity pro selektivní značení a zobrazování nádorových buněk karcinomu prsu. Buňky karcinomu prsu byly značeny také pomocí QDs konjugovaných s protilátkami pro epidermální růstový faktor (EGFR), estrogenový receptor (ER), progesteronový receptor (PR) a savčí cíl

rapamycinu (m-TOR)<sup>11</sup>.

Efektivita značení nádorových buněk QDs může být dále zvýšena použitím víceúrovňového přístupu využívajícího imunolipozomy jako transportéry účinných látek v kombinaci a QDs, které zobrazí buňky zasažené lipozomem. Pomocí fluorescenčního zobrazení tak může být ověřena správná lokace uvolnění obsahu lipozomálních transportérů<sup>12</sup>.

### **Cílené zobrazování nádorových buněk kvantovými tečkami konjugovanými s ligandy**

Protilátky využívané k cílení enormně exprimovaných receptorů nádorových buněk jsou specifické, ale značně finančně nákladné. Jako alternativa tak byl vytvořen postup, využívající jako konjugáty QDs specifické ligandy pro enormně exprimované receptory nádorových buněk. Příkladem látek, které byly pro tento účel testovány, jsou biomolekuly, jako je RGD peptid (arginin-glycin-asparagová kyselina), listová kyselina, epidermální růstový faktor (EGF), transferin a několik aptamerů (krátké nukleové kyseliny či peptidy)<sup>1</sup>. Buňky karcinomu prsu (MDA-MB-435) a buňky glioblastomu (U87MG) byly například označeny kvantovými tečkami, které byly k nádorovým buňkám cíleny konjugovaným RGD peptidem<sup>13</sup>. Výhoda konjugátu QD-RGD peptidu v tomto případě spočívala v selektivní vazbě k vysoce exprimovanému  $\alpha\beta3$  integrinu ve výše zmíněných buněčných liniích. Stejný výzkumný tým také zjistil, že QD-RGD peptid konjugát dokáže efektivně rozlišit lidské nádorové buňky MCF-7, ve kterých není  $\alpha\beta3$  integrin zvýšeně regulován<sup>11</sup>. Nádorové buňky prostaty byly selektivně značeny kvantovými tečkami konjugovanými s aptamery. PSMA pozitivní nádorové buňky prostaty LNCaP byly značeny QDs konjugovanými s A10 RNA aptamerem, zatímco PSMA negativní buňky PC-3 takto označeny nebyly<sup>14</sup>. Konjugáty QD-aptamer tak prokázaly stejnou účinnost ve značení nádorových buněk prostaty jako konjugáty QD-protilátka. Využití aptamerů k cílení QDs na nádorové buňky je finančně méně náročné než využití protilátek<sup>14</sup>.



## Závěr

Využití kvantových teček (QDs), fluoreskujících polovodičových nanokrystalů schopných měnit s velikostí vlnovou délku vyzařovaného světla, v zobrazování nádorových buněk představuje cenný nástroj využitelný v mnoha odvětvích současného výzkumu. Různé biomedicínské zobrazovací metody a terapeutické intervence (například fotodynamická terapie, PDT) využívající QDs mají v porovnání s klasickými chemo- a radioterapiemi mnoho výhod<sup>2</sup>. Jejich využití je však limitováno malou dostupností fotostabilních fluoroforů či fotosenzitivizujících látek. Výzkum nutný k získání takovýchto látek vyžaduje modelové systémy, které jsou při zachování reprodukovatelnosti levné, opakovatelné a snadno manipulovatelné. Buněčné linie proto představují ideální variantu pro *in vitro* výzkum spojený s kvantovými tečkami a jejich aplikací.

*Tato práce byla financována z projektu NANOLABSYS CZ.1/072.3.00/20.0148.*

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

## Literatura

- Biju, V.; Mundayoor, S.; Omkumar, R.V.; Anas, A.; Ishikawa, M. Bioconjugated quantum dots for cancer research: Present status, prospects and remaining issues. *Biotechnology Advances*. 2010, 28, 199-213.
- Moore, C.M.; Emberton, M.; Bown, S.G. Photodynamic Therapy for Prostate Cancer-An Emerging Approach for Organ-Confined Disease. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2011, 43, 768-775.
- Chan, W.C.W.; Nie, S.M. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*. 1998, 281, 2016-2018.
- Tan, A.; Yildirim, L.; Rajadas, J.; De La Pena, H.; Pastorin, G.; Seifalian, A. Quantum dots and carbon nanotubes in oncology: a review on emerging theranostic applications in nanomedicine. *Nanomedicine*. 2011, 6, 1101-1114.
- Jiang, W.; Papa, E.; Fischer, H.; Mardiyani, S.; Chan, W.C.W. Semiconductor quantum dots as contrast agents for whole animal imaging. *Trends in Biotechnology*. 2004, 22, 607-609.
- Kwon, S.; Kim, M.S.; Lee, E.S.; Sohn, J.S.; Park, J.-K. A quantum dot-based microfluidic multi-window platform for quantifying the biomarkers of breast cancer cells. *Integrative Biology*. 2014, 6, 430-437.
- Zaman, M.B.; Baral, T.N.; Jakubek, Z.J.; Zhang, J.; Wu, X.; Lai, E.; Whitfield, D.; Yu, K. Single-Domain Antibody Bioconjugated Near-IR Quantum Dots for Targeted Cellular Imaging of Pancreatic Cancer. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2011, 11, 3757-3763.
- Stroh, M.; Zimmer, J.P.; Duda, D.G.; Levchenko, T.S.; Cohen, K.S.; Brown, E.B.; Scadden, D.T.; Torchilin, V.P.; Bawendi, M.G.; Fukumura, D.; Jain, R.K. Quantum dots spectrally distinguish multiple species within the tumor milieu in vivo. *Nature Medicine*. 2005, 11, 678-682.
- Iyer, G.; Pinaud, F.; Tsay, J.; Li, J.J.; Bentolila, L.A.; Michalet, X.; Weiss, S. Peptide coated quantum dots for biological applications. *Ieee Transactions on Nanobioscience*. 2006, 5, 231-238.
- Li, X.; Li, W.; Yang, Q.; Gong, X.; Guo, W.; Dong, C.; Liu, J.; Xuan, L.; Chang, J. Rapid and Quantitative Detection of Prostate Specific Antigen with a Quantum Dot Nanobeads-Based Immunochromatography Test Strip. *Acs Applied Materials & Interfaces*. 2014, 6, 6406-6414.
- Han, S.-J.; Rathinaraj, P.; Park, S.-Y.; Kim, Y.K.; Lee, J.H.; Kang, I.-K.; Moon, J.-S.; Winiarz, J.G. Specific Intracellular Uptake of Herceptin-Conjugated CdSe/ZnS Quantum Dots into Breast Cancer Cells. *Biomed Research International*. 2014.
- Mi, Y.; Li, K.; Liu, Y.; Pu, K.-Y.; Liu, B.; Feng, S.-S. Herceptin functionalized polyhedral oligomeric silsesquioxane - conjugated oligomers - silica/iron oxide nanoparticles for tumor cell sorting and detection. *Biomaterials*. 2011, 32, 8226-8233.
- Cai, W.B.; Shin, D.W.; Chen, K.; Gheysens, O.; Cao, Q.Z.; Wang, S.X.; Gambhir, S.S.; Chen, X.Y. Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects. *Nano Letters*. 2006, 6, 669-676.
- Bagalkot, V.; Zhang, L.; Levy-Nissenbaum, E.; Jon, S.; Kantoff, P.W.; Langer, R.; Farokhzad, O.C. Quantum dot - Aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on Bi-fluorescence resonance energy transfer. *Nano Letters*. 2007, 7,



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však

být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.



## Application of quantum dots into chicken embryos

Iva Blažková<sup>a</sup>, Marie Konečná<sup>a,b</sup>, Renáta Kenšová<sup>a,b</sup>, Vojtěch Adam<sup>a,b</sup>, René Kizek<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemedelska 1, CZ-613 00 Brno, Czech Republic

<sup>b</sup> Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technicka 3058/10, CZ-616 00 Brno, Czech Republic

### Application of quantum dots into chicken embryos

Quantum dots (QDs) are small semiconductor nanoparticles with great optical properties. Their behaviour enables the usage of QDs in *in vitro* and *in vivo* experiments and they are promising tools in disease treatment and targeted therapy. The limitation of their usage is the toxicity. Quantum dots consist of different metals, which have various effects on the health. To decrease their toxicity, different surface coatings are used. The effect of QDs on the organism can be tested on chicken embryos. Chicken embryos represent great model for QDs toxicity studies, because there is no need of any permission for the work with embryos and the experiments are low cost and fast.

**Přijato k publikování:** 8. 8. 2014

**Klíčová slova:** Chicken embryo; metals; nanoparticles; quantum dots;

### Chicken embryos as biological research model

Embryology is the study of the sequential development of various tissues, organs and systems from conception to birth. The observation and description of different embryo species development helps us to understand the products of genetic and environmental interaction. Genetic manipulation, induction of drugs, exposure to disease, radioactive tagging or dyeing of developing tissues and x-ray treatments are some of the commonly performed experiments that provide information that can be applied to human development and birth defects<sup>1</sup>.

The studies on chicken embryos represent the transition between the *in vitro* studies on cell cultures and *in vivo* experiments on mammalian organisms. The experiments on mammalian animal models are costly and generate ethical issue. Using of non-mammalian vertebrate embryos is possible without any licence and is reproducible with high throughput. The experiments on embryos are possible till they are able of independent feeding, it means the hole developmental period (21 days) of chicken embryos<sup>2</sup>. Chicken embryos are often studied because of the easy access through the shell and

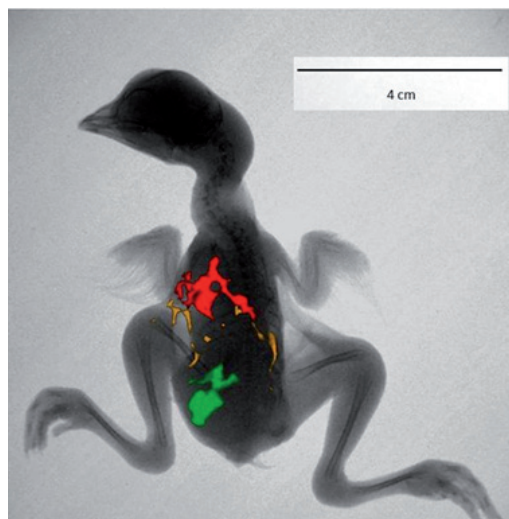
their rapid development<sup>3</sup>. The advantageous procedure for chicken embryo observation is x-ray method in combination with fluorescence measurement of the labeled tissues<sup>4</sup>. One of the most frequently used optical labeling agents are quantum dots (QDs)<sup>5</sup>.

### Quantum dots as labeling agents

QDs are inorganic semiconductor nanoparticles (1 – 20 nm) with great fluorescence properties. QDs are usually synthesised from atoms of group II-IV or III-V, the most studied are CdTe, CdSe, CdS, ZnSe and ZnS QDs<sup>6-8</sup>. QDs have due to their size dissimilar properties than crystals in macro scale and could be used in medicine and pharmacology<sup>9</sup>. QDs were used for labelling and detection of different biomolecules<sup>10-13</sup>. Diverse quantum dots in chicken embryo detected by imaging software are shown in **Fig. 1**.

### Toxicity of metal nanoparticles

Recently, much attention is paid to the toxicity of metal nanoparticles. Presence of different forms of various metals influence embryonic development of every animal species in positive (essential) or negative way<sup>14</sup>. Whereas some of



**Fig.1:** Different CdTe QDs applied into the chicken embryo (18th developmental day) detected by In vivo Xtreme by Carestream (Rochester, NY, USA). The fluorescence of three different QDs detected with excitation filter: 480 nm and emission filter: 535 nm (CdTe green), 600 nm (CdTe yellow) and 700 nm (CdTe red). The fluorescence images were overlaid with x-ray image

the metals are essential others may have toxic or fatal effects. There are a lot of toxicology handbooks or articles for physicians, toxicologists and engineers in the field of environmental and occupational health<sup>8</sup>. But the toxicity of metal nanoparticles to the organism has to be investigated.

Because of the content of heavy metals, the toxicity of QDs is discussed<sup>15</sup>. The metals in chicken embryos were studied and described in the past<sup>16</sup> and they are often investigated in the present. The teratogenicity of cadmium ions ( $\text{CdCl}_2$ ) was observed in chicken embryos<sup>17</sup>. The effect of teratogenic cadmium on tissue and cell distribution of cadherins and their intracellular associates was investigated<sup>18</sup>. Cadmium can affect the reproduction and development by different ways in all developmental stages of the organism. Cadmium has a wide range of effects on health in model organisms and also in humans. The most targeting to the kidneys, liver and vascular system was detected<sup>19</sup>. The in

ovo injection of cadmium into the chicken heart caused the inflammatory processes in heart tissue and lower heart rate and heart weight lost was observed<sup>20</sup>. Cadmium is notable inducer of oxidative stress and it is teratogenic. The oxidative stress may influence the teratogenicity, but the direct effect was not confirmed. The antioxidants are not able to decrease embryo lethality or malformations<sup>21</sup>.

The maltodextrin modification of CdS QDs did not delete the toxicity of QDs. The CdS with maltodextrin were observed to be cytotoxic and embryotoxic. Low concentration of QDs increased a growth of the cells, but in higher concentrations the sufficient toxicity was observed. After the application of CdS QDs to the chicken embryos the anomalies in a dependence of applied dose were observed. The most changes were observed on the heart, central nervous system, neural tube and somites<sup>22</sup>.

The chorio-allantoic membrane of chicken embryos is highly vascularised and can be used in studies of angiogenesis and tumour grow<sup>23,24</sup>. The vessels of chorio-allantoic membrane can be visualized by QDs. It was observed, that QDs can circulate 4 days in vessels without the change and their stability depends especially on the surface coating. For these experiments the QDs with emission higher than 655 nm are recommended, because of the elimination of the autofluorescence<sup>25</sup>.

The toxicity of other different nano-materials was also observed on non-mammalian vertebrate embryos as models in nanomedicine<sup>2</sup>.

*Financial support from the project NANOLABSYS CZ.1.07/2.3.00/20.0148.*

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

## References

- Gormus, U. THE RELATIONSHIP OF EMBRYOGENESIS AND CARCINOGENESIS. *Nobel Medicus*. 2011, 7, 5-9.
- Giannaccini, M.; Cuschieri, A.; Dente, L.; Raffa, V. Non-mammalian vertebrate embryos as models in nanomedicine. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*. 2014, 10, 703-719.
- Ivarie, R. Avian transgenesis: progress towards the promise. *Trends in Biotechnology*. 2003, 21, 14-19.
- Blazkova, I.; Nguyen, V.H.; Kominkova, M.; Konecna, R.; Chudobova, D.; Krejcova, L.; Kopel, P.; Hynek, D.; Zitka, O.; Beklova, M.; Adam, V.; Kizek, R. Fullerene as a transporter for doxorubicin investigated by analytical methods and in vivo imaging. *Electrophoresis*. 2014, 35, 1040-1049.
- Wang, Y.C.; Hu, R.; Lin, G.M.; Roy, I.; Yong, K.T. Functionalized Quantum Dots for Biosensing and Bioimaging and Concerns on Toxicity. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2013, 5, 2786-2799.
- Cooper, J.K.; Franco, A.M.; Gul, S.; Corrado, C.; Zhang, J.Z. Characterization of Primary Amine Capped CdSe, ZnSe, and ZnS Quantum Dots by FT-IR: Determination of Surface Bonding Interaction and Identification of Selective Desorption. *Langmuir*. 2011, 27, 8486-8493.
- Gomes, S.A.O.; Vieira, C.S.; Almeida, D.B.; Santos-Mallet, J.R.; Menna-Barreto, R.F.S.; Cesar, C.L.; Feder, D. CdTe and CdSe Quantum Dots Cytotoxicity: A Comparative Study on Microorganisms. *Sensors*. 2011, 11, 11664-11678.
- Sobhana, S.S.L.; Devi, M.V.; Sastry, T.P.; Mandal, A.B. CdS quantum dots for measurement of the size-dependent optical properties of thiol capping. *Journal of Nanoparticle Research*. 2011, 13, 1747-1757.
- Geszke-Moritz, M.; Moritz, M. Quantum dots as versatile probes in medical sciences: Synthesis, modification and properties. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*. 2013, 33, 1008-1021.
- Sobrova, P.; Blazkova, I.; Chomoucka, J.; Drbohlavova, J.; Vaculovicova, M.; Kopel, P.; Hubalek, J.; Kizek, R.; Adam, V. Quantum dots and prion proteins: Is this a new challenge for neurodegenerative diseases imaging? *Prion*. 2013, 7, 349-358.
- Tmejova, K.; Hynek, D.; Kopel, P.; Krizkova, S.; Blazkova, I.; Trnkova, L.; Adam, V.; Kizek, R. Study of metallothionein-quantum dots interactions. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* 2014, in press.
- Ryvolova, M.; Chomoucka, J.; Janu, L.; Drbohlavova, J.; Adam, V.; Hubalek, J.; Kizek, R. Biotin-modified glutathione as a functionalized coating for bioconjugation of CdTe based quantum dots. *Electrophoresis*. 2011, 32, 1619-1622.
- Krejčová, L.; Hynek, D.; Kopel, P.; Merlos, M.A.R.; Tmejova, K.; Trnkova, L.; Adam, V.; Hubalek, J.; Kizek, R. Quantum dots for electrochemical labelling of neuraminidase genes of H5N1, H1N1 and H3N2 influenza. *Int. J. Electrochem. Sci*. 2013, 8, 4457-4471.
- Bertini, I.; Cavallaro, G. Metals in the „omics“ world: copper homeostasis and cytochrome c oxidase assembly in a new light. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2008, 13, 3-14.
- Lin, G.M.; Ding, Z.C.; Hu, R.; Wang, X.M.; Chen, Q.; Zhu, X.M.; Liu, K.; Liang, J.H.; Lu, F.Q.; Lei, D.L.; Xu, G.X.; Yong, K.T. Cytotoxicity and immune response of CdSe/ZnS Quantum dots towards a murine macrophage cell line. *Rsc Advances*. 2014, 4, 5792-5797.
- Mas, A.; Arola, L. CADMIUM AND LEAD TOXICITY EFFECTS ON ZINC, COPPER, NICKEL AND IRON DISTRIBUTION IN THE DEVELOPING CHICK-EMBRYO. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology*. 1985, 80, 185-188.
- Yamamoto, F.Y.; Neto, F.F.; Freitas, P.F.; Ribeiro, C.A.O.; Ortolani-Machado, C.F. Cadmium effects on early development of chick embryos. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2012, 34, 548-555.
- Thompson, J.; Wong, L.; Lau, P.S.; Bannigan, J. Adherens junction breakdown in the periderm following cadmium administration in the chick embryo: distribution of cadherins and associated molecules. *Reproductive Toxicology*. 2008, 25, 39-46.
- Thompson, J.; Bannigan, J. Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reproductive Toxicology*. 2008, 25, 304-315.
- Pavlak, K.; Dzugan, M.; Wojtyasiak, D.; Lis, M.; Niedziolka, J. Effect of in ovo injection of cadmium on chicken embryo heart. *African Journal of Agricultural Research*. 2013, 1534-1539.
- Thompson, J.; Doi, T.; Power, E.; Balasubramanian, I.; Puri, P.; Bannigan, J. Evidence against a direct role for oxidative stress in cadmium-induced axial malformation in the chick embryo. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010, 243, 390-398.
- Leon-Buitimea, A.; Rodriguez-Fragoso, P.; Reyes-Esparza, J.A.; Rodriguez-Fragoso, L. Synthesis, characterization and toxicological evaluation of maltodextrin capped cadmium sulfide nanoparticles in human cell lines and chicken embryos. *Faseb Journal*. 2013, 27.
- Ribatti, D. Chicken Chorioallantoic Membrane Angiogenesis Model, in: X. Peng and M. Antonyak (Eds.), *Cardiovascular Development: Methods and Protocols*, Humana Press Inc, Totowa, 2012, pp. 47-57.
- Jedelska, J.; Strehlow, B.; Bakowsky, U.; Aigner, A.; Hobel, S.; Bette, M.; Roessler, M.; Franke, N.; Teymoortash, A.; Werner, J.A.; Eivazi, B.; Mandic, R. The Chorioallantoic Membrane Assay Is a Promising Ex Vivo Model System for the Study of Vascular Anomalies. *In Vivo*. 2013, 27, 701-705.
- Smith, J.D.; Fisher, G.W.; Waggoner, A.S.; Campbell, P.G. The use of quantum dots for analysis of chick CAM vasculature. *Microvascular Research*. 2007, 73, 75-83.



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

## Působení zinku na živé organismy

Renáta Kenšová<sup>a,b</sup>, David Hynek<sup>a,b</sup>, Vojtěch Adam<sup>a,b</sup>, René Kizek<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

### The influence of zinc to living organisms

This paper describes the role of zinc in the natural environment. The attention is focused on natural and anthropogenic sources in the environment. The effect of zinc on the human organism, in particular its biochemical and physiological functions are described. The lack or excess of zinc and its impact on human health is also discussed. Part of this work summarizes the most commonly used methods for the detection of zinc.

**Přijato k publikování:** 8. 8. 2014

**Klíčová slova:** biodostupnost; detekce; metabolismus; onemocnění; organismus; toxicita; zinek; životní prostředí

### Úvod

Zinek hraje důležitou roli jako esenciální stopový prvek pro vývoj, růst a diferenciaci všech živých organismů<sup>1</sup>. Je důležité upozornit, že vysoké koncentrace esenciálních těžkých kovů mají za určitých podmínek toxické účinky stejně jako jejich nedostatek. Zinek se vyskytuje pouze ve formě dvoumocného iontu, kdy jsou jeho d-orbitály kompletně zaplněny elektrony a nemůže tak podléhat redoxním změnám. Zinek je součástí mnoha důležitých enzymů a DNA vazebných proteinů jako jsou zinkové prsty. Kromě katalytické funkce přispívá k stabilizaci membrán a makromolekul. Při vyšších koncentracích však inhibuje transport elektronů v dýchacím řetězci<sup>1,2</sup>.

### Fyzikálně-chemické vlastnosti zinku

Zinek je středně tvrdý křehký modrobílý kov, na lomu krystalický a lesklý. Na vzduchu je stálý, protože se pokrývá vrstvičkou oxidu zinečnatého (ZnO). Zinek má bod tání 419,5 °C a bod varu 908 °C; při zahřátí na 100 - 150 °C se stává kujným, při 210 °C se stává křehkým, drobí se a práškuje. Při teplotách pod 0,875 K je supravodivý. Patří mezi přechodné prvky, které mají valenční elektrony v d-sféře. Je to relativně měkký kov, který snadno reaguje s

anorganickými kyselinami i s organickými látkami. Ve sloučeninách se vyskytuje pouze v mocenství Zn(II).

### Zinek v přírodním prostředí

V přírodě se zinek vyskytuje pouze ve sloučeninách. Je zastoupen v různém množství ve většině hornin a minerálů. Nejznámější a hlavní rudou je minerál sfalerit (ZnS - sulfid zinečnatý). Zinek proniká do vzduchu, vody a půdy v důsledku přírodních procesů i lidské činnosti. Do životního prostředí se většinou dostává jako výsledek důlní činnosti, čištění (rafinace) zinku a olova či kadmia, dále v důsledku výroby oceli, spalování uhlí a odpadů. Tyto úniky mohou zvyšovat koncentrace zinku v ovzduší. Do vodních toků se zinek může dostávat vypouštěním zinku a dalších kovů z továren, s odpadními vodami z domácností, při dešti je splachován z půdy, pokud ta tento prvek obsahuje. Uvádí se, že zinek je čtvrtým průmyslově nejvíce vyráběným kovem<sup>3,4</sup>.

### Toxicita zinku

Zinek je esenciální pro většinu organismů a zároveň je druhým nejčastěji se vyskytujícím přechodným kovem v jejich tělech. Je známo, že lidské tělo obsahuje průměrně 2 g tohoto kovu. Největší množství zinku je obsaženo v krvi,



dále pak v játrech, kostech, mozku, ledvinách a ve velkém množství je obsažen ve spermatu. Jeho přítomnost je důležitá pro růst a vývoj organismu a řadu enzymatických pochodů, je součástí insulínu a také je to významný antioxidant. Zinek hraje zásadní roli ve více než 300 enzymech nebo metaloproteinů v lidském těle a ve více než 2000 transkripčních faktorech účastnících se genové exprese<sup>5,6</sup>. Tyto zinek-obsahující proteiny a enzymy hrají mnoho důležitých, biologicky významných rolí v mitotickém buněčném dělení a diferenciaci, ale také na apoptóze, syntéze proteinů a nukleových kyselin<sup>1,5-8</sup>. Díky všem svým funkcím je zinek naprosto nezbytný pro správný vývoj a růst organismu. Pro člověka se považuje koncentrace zinku ve vodě 30 mg/l za prahovou hranici toxicity. Naproti tomu je zinek značně toxickou látkou pro vodní organismy. Jde o koncentrace pohybující se řádově již v desetinách mg/l<sup>3,9,10</sup>. Dnes je všeobecně známo, že nedostatek zinku způsobuje poškození imunitního systému, nepříznivě ovlivňuje růst těla a sexuální vývoj, a že vede k poruchám čichových a chuťových vjemů. Při nedostatečném vstřebávání zinku z potravin dochází ke špatnému hojení ran, zhoršování paměti, očním chorobám, neplodnosti a v krajních případech až smrti jedince<sup>11,12</sup>. Naopak nadměrné množství zinku poškozuje gastrointestinální trakt (dochází k bolestem žaludku, křečím, průjmům). Chronický nadbytek zinku způsobuje chudokrevnost, poruchy trávení a metabolismu cukrů. Kumulace v těle nehrozí, neboť se zinek snadno pomocí gastrointestinálního traktu vylučuje.

## Metody stanovení zinku

Ke stanovení zinku je v současné době často využívanou a nejrozšířenější metodou atomová absorpční spektrometrie (AAS), atomová emisní spektrometrie (AES), hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) a optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES)<sup>13-16</sup>. Na předním místě je také stále využívána elektrochemická metoda diferenční pulzní voltametrie (DPV), a to především díky tomu, že je tato metoda méně ekonomicky nákladná, rychlá, přesná a citlivá<sup>17,18</sup>.

*Financial support from the project  
NANOLABSYS CZ.1.07/2.3.00/20.0148.*

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

## Literatura

- Franklin, R.B.; Costello, L.C. The Important Role of the Apoptotic Effects of Zinc in the Development of Cancers. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2009, 106, 750-757.
- Greenwood, N.N.; Earnshaw, A. *Chemistry of the elements*, Pergamon Press, 1984.
- Bencko, V.; Cikrt, M.; Lener, J. *Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka*, Grada, 1995.
- Barta, M. *Chemické prvky kolem nás*. 2012, 112 s.
- Krizkova, S.; Ryvolova, M.; Hrabeta, J.; Adam, V.; Stiborova, M.; Eckschlager, T.; Kizek, R. Metallothioneins and zinc in cancer diagnosis and therapy. *Drug Metabolism Reviews*. 2012, 44, 287-301.
- John, E.; Laskow, T.C.; Buchser, W.J.; Pitt, B.R.; Basse, P.H.; Butterfield, L.H.; Kalinski, P.; Lotze, M.T. Zinc in innate and adaptive tumor immunity. *Journal of Translational Medicine*. 2010, 8.
- Sztalmachova, M.; Hlavna, M.; Gumulec, J.; Holubova, M.; Babula, P.; Balvan, J.; Sochor, J.; Tanhauserova, V.; Raudenska, M.; Krizkova, S.; Adam, V.; Eckschlager, T.; Kizek, R.; Masarik, M. Effect of zinc(II) ions on the expression of pro- and anti-apoptotic factors in high-grade prostate carcinoma cells. *Oncology Reports*. 2012, 28, 806-814.
- Kambe, T.; Yamaguchi-Iwai, Y.; Sasaki, R.; Nagao, M. Overview of mammalian zinc transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2004, 61, 49-68.
- Strnadova, N.; Matejkova, D. Adsorption of Copper and Zinc from Aqueous Solution on Mg(OH)<sub>2</sub>. *Chemické listy*. 2006, 100, 803 - 808.
- Pitter, P. *Hydrochemie*, Vydavatelství VŠCHT, 1999.
- Bhutta, Z.A.; Bird, S.M.; Black, R.E.; Brown, K.H.; Gardner, J.M.; Hidayat, A.; Khatun, F.; Martorell, R.; Ninh, N.X.; Penny, M.E.; Rosado, J.L.; Roy, S.K.; Ruel, M.; Sazawal, S.; Shankar, A.; Zinc Investigators, C. Therapeutic effects of oral zinc in acute and persistent diarrhea in children in developing countries: pooled analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2000, 72, 1516-1522.
- Zemel, B.S.; Kawchak, D.A.; Fung, E.B.; Ohene-Frempong, K.; Stallings, V.A. Effect of zinc supplementation on growth and body composition in children with sickle cell disease. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2002, 75, 300-307.



13. Belanovic, S.; Bjedov, I.; Cakmak, D.; Obratov-Petkovic, D.; Kadovic, R.; Beloica, J. INFLUENCE OF Zn ON THE AVAILABILITY OF Cd AND Cu TO VACCINIUM SPECIES IN UNPOLLUTED AREAS - A CASE STUDY OF STARA PLANINA MT. (SERBIA). *Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences*. 2013, 8, 5-14.
14. Spiric, Z.; Vuckovic, I.; Stafilov, T.; Kusan, V.; Frontasyeva, M. Air Pollution Study in Croatia Using Moss Biomonitoring and ICP-AES and AAS Analytical Techniques. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2013, 65, 33-46.
15. Conceicao, F.T.; Navarro, G.R.B.; Silva, A.M. Anthropogenic Influences on Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn Concentrations in Soils and Sediments in a Watershed with Sugar Cane Crops at Sao Paulo State, Brazil. *International Journal of Environmental Research*. 2013, 7, 551-560.
16. Konz, I.; Fernandez, B.; Fernandez, M.L.; Pereiro, R.; Gonzalez-Iglesias, H.; Coca-Prados, M.; Sanz-Medel, A. Quantitative bioimaging of trace elements in the human lens by LA-ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014, 406, 2343-2348.
17. Pop, S.F.; Stefan-van Staden, R.I.; van Staden, J.F.; Aboul-Enein, H.Y.; Ion, R.M.; Aydogmus, Z. Electroanalysis of Oseltamivir Phosphate Using New Microelectrodes Based on Zinc Complexes with Porphyrins and Phthalocyanines. *Journal of the Electrochemical Society*. 2012, 159, B789-B793.
18. Adam, V.; Petrlova, J.; Potesil, D.; Zehnalek, J.; Sures, B.; Trnkova, L.; Jelen, F.; Kizek, R. Study of metallothionein modified electrode surface behavior in the presence of heavy metal ions-biosensor. *Electroanalysis*. 2005, 17, 1649-1657.



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

## Působení kadmia na živé organismy

Renáta Kenšová<sup>a,b</sup>, David Hynek<sup>a,b</sup>, Vojtěch Adam<sup>a,b</sup>, René Kizek<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

### The influence of cadmium to living organisms

The aim of this study was to summarize findings about the role of cadmium in the environment. The study includes information about the properties and effects of cadmium on the environment, transport between the different components of the environment and describes natural and anthropogenic sources of cadmium. Furthermore, this work describes the effect of cadmium on the human body and shows its toxicity. The methods of cadmium determination are also summarized in the scope of this work.

**Přijato k publikování:** 8. 8. 2014

**Klíčová slova:** bioakumulace; kadmium; metody detekce; onemocnění; organismus; otrava; toxicita; životní prostředí

### Úvod

Z toxických kovů v relativně velkých množstvích uvolňovaných do životního prostředí se nejčastěji soustřeďuje pozornost na kadmium, jeden z nejtoxičtějších kovů, který se projevuje největším zásahem do potravního a potravinového řetězce. Kadmium je neesenciální prvek mající významné toxikologické vlastnosti. Jedná se kumulativní jed, což znamená, že se jeho obsah v organismu v průběhu ontogeneze zvyšuje<sup>1</sup>. Zdrojem kadmia v prostředí jsou minerální hnojiva superfosfáty, průmysl, těžba a zpracování rud a výfukové emise benzínových dopravních prostředků<sup>2</sup>.

### Fyzikálně-chemické vlastnosti kadmia

Kadmium je typický kovový prvek bílé stříbrné barvy. Za teplot pod 0,517 K je supravodičem I. typu. Patří mezi přechodné prvky, které mají valenční elektrony v d-sféře. Ve sloučeninách se vyskytuje téměř pouze v mocenství  $Cd^{2+}$ . Sloučeniny  $Cd^+$  jsou silně nestálé. V silných minerálních kyselinách je kadmium dobře rozpustné za vývoje plynného vodíku. Na vzduchu je kovové kadmium stálé, ale v atmosféře kyslíku je možné jej zapálit za vzniku oxidu kadmatného ( $CdO$ ). Kadmium přechází do ovzduší ve formě těkavých sloučenin již při teplotě 480 °C<sup>3</sup>.

### Kadmium v přírodním prostředí

Kadmium se vyskytuje v zemské kůře, v mořské vodě i ve vesmíru. Ve všech těchto prostředích se vyskytuje v minimálním množství. V přírodě se kadmium vyskytuje jako příměs rud zinku a někdy i olova, z nichž se také společně získává<sup>2</sup>.

Do životního prostředí se kadmium dostává několika cestami. Do ovzduší se dostává v důsledku spalování uhlí, odpadů, z dolů a rafinérií. Do vody se uvolňuje z odpadních vod, jak z domácností, tak z průmyslu. Hnojiva obvykle obsahují určité množství kadmia a stávají se tak zdrojem znečištění půd tímto těžkým kovem. Stejně tak jsou zdroji znečištění vod a půd kadmium jeho úniky z provozů k nakládání s nebezpečnými odpady. V životním prostředí člověka je podstatným zdrojem kadmia cigaretový kouř<sup>4</sup>. Sloučeniny kadmia se používají při galvanickém pokovování kovů, jako pigmenty nebo stabilizátory plastů, v alkalických bateriích a ve sloučeninách s jinými kovy, např. mědí<sup>2,5</sup>.

### Toxicita kadmia

Kadmium patří mezi prvky, jejichž vliv na zdravotní stav lidského organismu je negativní. Může to být způsobeno tím, že kadmium má podobnou elektronegativitu a podobné chemické

vlastnosti jako esenciální těžký kov zinek a toxicita kadmia se projevuje výhradně tehdy, když nahrazuje zinek v životně důležitých proteinech (zinkové prsty). K tomu přispívá i stejný mechanismus příjmu a transportu těchto dvou kovů v organismu. Iontový poloměr Zn (0,074 nm) je však nižší než iontový poloměr Cd (0,097 nm), a to při společném vstupu kovů ulehčuje Zn, aby přednostně obsadil cílová místa v proteinech, a tím celkově snižoval toxicitu kadmia<sup>6-8</sup>. Příkladem je zablokování inzulínového cyklu, které může působit vážné zdravotní komplikace<sup>9</sup>. Dalším rizikovým faktorem u kadmia je skutečnost, že se jedná o mimořádně kumulativní jed. Přijaté kadmium se z organismu vylučuje jen velmi pozvolna a obtížně, jeho většina se přitom koncentruje především v ledvinách a v menší míře i v játrech, kde může přetrvávat až desítky let<sup>10</sup>. Mezi hlavní zdravotní projevy chronické expozice kadmia patří nejen poškození ledvin a jater ale také osteoporóza, anémie, zvýšené riziko srdečních a cévních onemocnění a zvýšené riziko rakoviny<sup>6,11</sup>. Díky těmto negativním vlastnostem kadmia, je důležité sledovat jeho množství v organismu. Stanovení stopových prvků v krvi a tělních tekutinách je v medicíně stále považováno za užitečné a důležité, protože hladina některých prvků, může být u člověka spojena s různými patologickými změnami<sup>12</sup>. Z toho důvodu je přesné a reprodukovatelné stanovení stopových prvků v biologických vzorcích velmi důležité<sup>9,13-15</sup>. Při jednorázové vysoké dávce kadmia se dostávají bolesti břicha, průjem a zvracení<sup>10</sup>.

## Metody stanovení kadmia

Nejčastější metodou pro stanovení kadmia je atomová absorpční spektrometrie (AAS) s elektrotermickou i plamenovou atomizací, která se využívá pro široké spektrum biologických a environmentálních vzorků. Mezi další často používané metody využívající pro stanovení kadmia indukčně vázaného plasmatu patří hmotnostní spektrometrie (ICP-MS) a optická emisní spektrometrie (ICP-OES)<sup>16,17</sup>. Kromě spektrálních metod se také prosazují ekonomicky méně nákladné, rychlé a citlivé metody elektrochemické<sup>18-20</sup>.

*Tato práce byla financována z projektu NANOLABSYS CZ.1.07/2.3.00/20.0148.*

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

## Literatura

1. Singh, B.R.; McLaughlin, J. Cadmium in Soils and Plants, Springer Netherlands, 1999.
2. Cibulka, J. Pohyb olova, kadmia a rtuti v biosféře; Překl. Jiří Cibulka, Academia, 1991.
3. Greenwood, N.N.; Earnshaw, A. Chemistry of the elements, Pergamon Press, 1984.
4. Friberg, L. CADMIUM. Annual Review of Public Health. 1983, 4, 367-373.
5. Barta, M. Chemické prvky kolem nás. 2012, 112 s.
6. Hayes, A.W. Principles and Methods of Toxicology, Lippincott Williams & Wilkins, 1989.
7. Kambe, T.; Yamaguchi-Iwai, Y.; Sasaki, R.; Nagao, M. Overview of mammalian zinc transporters. Cellular and Molecular Life Sciences. 2004, 61, 49-68.
8. Krizkova, S.; Ryvolova, M.; Hrabeta, J.; Adam, V.; Stiborova, M.; Eckschlagler, T.; Kizek, R. Metallothioneins and zinc in cancer diagnosis and therapy. Drug Metabolism Reviews. 2012, 44, 287-301.
9. Blazewicz, A.; Orlicz-Szczesna, G.; Prystupa, A.; Szczesny, P. Use of ion chromatography for the determination of selected metals in blood serum of patients with type 2 diabetes. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2010, 24, 14-26.
10. Bencko, V.; Cikrt, M.; Lener, J. Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka, Grada, 1995.
11. Waalkes, M.P. Cadmium carcinogenesis in review. Journal of Inorganic Biochemistry. 2000, 79, 241-244.
12. ATSDR. (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) Toxicological profile for lead (update). U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. 1999.
13. Afridi, H.I.; Kazi, T.G.; Arain, M.B.; Jamali, M.K.; Kazi, G.H.; Jalbani, N. Determination of cadmium and lead in biological samples by three ultrasonic-based samples treatment procedures followed by electrothermal atomic absorption spectrometry. Journal of Aoac International. 2007, 90, 470-478.
14. Afridi, H.I.; Kazi, T.G.; Kazi, A.G.; Shah, F.; Wadhwa, S.K.; Kolachi, N.F.; Shah, A.Q.; Baig, J.A.; Kazi, N. Levels of Arsenic, Cadmium, Lead, Manganese and Zinc in Biological Samples of Paralysed Steel Mill Workers with Related to Controls. Biological Trace Element Research. 2011, 144, 164-182.

15. Parsons, P.J. MONITORING HUMAN EXPOSURE TO LEAD - AN ASSESSMENT OF CURRENT LABORATORY PERFORMANCE FOR THE DETERMINATION OF BLOOD LEAD. *Environmental Research*. 1992, 57, 149-162.
16. Almeida, T.S.; de Andrade, R.M.; de Gois, J.S.; Borges, D.L.G. Development of a simple and fast ultrasound-assisted extraction method for trace element determination in tobacco samples using ICP-MS. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2014, 94, 756-764.
17. Capelli, C.; Foppiano, D.; Venturelli, G.; Carlini, E.; Magi, E.; Ianni, C. Determination of Arsenic, Cadmium, Cobalt, Chromium, Nickel, and Lead in Cosmetic Face-Powders: Optimization of Extraction and Validation. *Analytical Letters*. 2014, 47, 1201-1209.
18. Fialova, D.; Kremplova, M.; Hynek, D.; Konecna, M.; Kaiser, J.; Malina, R.; Kynicky, J.; Krystofova, O.; Kizek, R.; Adam, V. Sosedka Pegmatite Metal Ions Composition Determined by Voltammetry. *International Journal of Electrochemical Science*. 2013, 8, 7853-7867.
19. Hynek, D.; Krejcova, L.; Sochor, J.; Cernei, N.; Kynicky, J.; Adam, V.; Trnkova, L.; Hubalek, J.; Vrba, R.; Kizek, R. Study of Interactions between Cysteine and Cadmium(II) Ions using Automatic Pipetting System off-line Coupled with Electrochemical Analyser Dedicated United Nation Environment Program: Lead and Cadmium Initiatives. *International Journal of Electrochemical Science*. 2012, 7, 1802-1819.
20. Krystofova, O.; Trnkova, L.; Adam, V.; Zehnalek, J.; Hubalek, J.; Babula, P.; Kizek, R. Electrochemical Microsensors for the Detection of Cadmium(II) and Lead(II) Ions in Plants. *Sensors*. 2010, 10, 5308-5328.



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

## Působení olova na živé organismy

Renáta Kenšová<sup>a,b</sup>, David Hynek<sup>a,b</sup>, Vojtěch Adam<sup>a,b</sup>, René Kizek<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

### The influence of lead to living organisms

This study deals with the role of lead in the environment. It summarizes information about properties of lead and deals with lead intakes into the environment, anthropogenic or natural, and it follows transport of lead between individual components of the environment. Part of this thesis is given to the accumulation of lead into organisms. It points out the toxicity of lead and its effect to human organism. The last chapter summarizes the analytic methods that are commonly used for lead determination.

**Přijato k publikování:** 8. 8. 2014

**Klíčová slova:** bioakumulace; detekce; olovo; onemocnění; organismus; otrava; toxicita

### Úvod

Olovo je těžký kov, který je toxický při velmi nízkých dávkách a má akutní a chronické účinky na lidské zdraví. Vykazuje multi-systémovou tkáňovou toxicitu, která může vyvolat negativní neurologické, kardiovaskulární, renální, gastrointestinální, hematologické a reprodukční účinky. Dále byly také popsány genotoxické a karcinogenní účinky olova <sup>1</sup>.

### Fyzikálně-chemické vlastnosti olova

Olovo je toxický těžký kov, který je člověku známý již od starověku. Je to namodralý nebo stříbrně šedý měkký kov s teplotou tání 327,5 °C a s teplotou varu při atmosférickém tlaku 1740 °C, je velmi těžký, měkký a nízkotavitelný. Je velice dobře kujný a odolný vůči korozi. Za teplot pod 7,196 K je supravodičem I. typu. Olovo se vyskytuje ve formě čtyř izotopů uvedených v pořadí podle hojnosti výskytu: 208, 206, 207 a 204. Poměr zastoupení izotopů se v různých minerálech liší <sup>2</sup>. Tato vlastnost byla využita k výzkumu environmentálních a metabolických drah olova pomocí neradioaktivních izotopů. V anorganických sloučeninách je obvyklý oxidační stav olova +2. Kromě dusičnanu, chlorečnanu a v mnohem menší míře chloridu, je většina anorganických solí olova ve vodě málo rozpustná.

Organické sloučeniny olova, zejména tetraethylolovo či tetramethylolovo, jsou velmi důležité, protože se ve velkém množství používají jako přísady benzinů. Tetraethylolovo a tetramethylolovo jsou bezbarvé kapaliny; teplota varu tetraethylolova je 110 °C a teplota varu tetramethylolova je 200 °C. Protože jejich těkavost je nižší než těkavost většiny ostatních složek benzinů, vypařování benzinů vede ke koncentraci tetraethylolova a tetramethylolova.

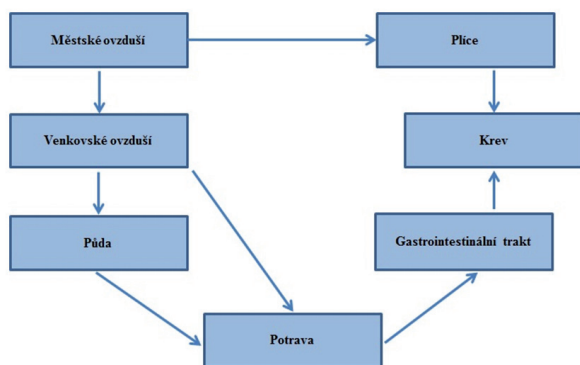
### Olovo v přírodním prostředí

Nejběžnějším minerálem a zároveň olovenou rudou je sulfid olovnatý neboli galenit (PbS). Olovo je jedním z mála prvků, kterého na Zemi přirozeně přibývá. Je totiž na konci rozpadových řad radioaktivních prvků <sup>3</sup>.

Hlavním zdrojem emisí olova do ovzduší je antropogenní činnost, zejména spalování alkylovnatých přísad benzinů (80 – 90 %), těžba a zpracování olovnatých rud, úprava a výroba sloučenin olova a výrobků obsahujících olovo a spalování odpadů <sup>4</sup>. Vodovodní instalace z olovených trubek ve starých domech mohou být rovněž důležitým zdrojem expozice lidí olovu, zejména v oblastech s měkkou vodou. V některých oblastech mohou být dalším zdrojem expozice starší nátěrové hmoty obsahující



olovo, které se vyskytují ve starých domech. Na obrázku 1 je znázorněna expoziční cesta olova do lidského organismu.



Obr. 1: Expoziční dráhy olova z ovzduší podílející se na hladinách olova v krvi člověka

## Toxicita olova

Toxicita olova může být do jisté míry vysvětlena jeho interferencí s různými enzymovými systémy. Olovo tyto enzymy deaktivuje tím, že se váže na SH-skupiny jejich proteinů, nebo tím, že substituuje jiné esenciální kovové ionty. Z tohoto důvodu lze považovat téměř všechny tělesné orgány nebo systémy za cílový orgán potenciálně zasažený olovem. Doloženo bylo široké spektrum biologických účinků olova včetně účinků na biosyntézu hemu, na nervový systém (neurotoxické účinky), na ledviny, reprodukční, imunitní a kardiovaskulární systém a na játra, endokrinní žlázy i gastrointestinální trakt. Je-li obyvatelstvo dlouhodobě exponováno nízkým koncentracím olova, nejkritičtější jsou účinky na biosyntézu hemu, erythropoézu, nervový systém a krevní tlak<sup>1</sup>. Toxicita olova je zvláště významná u dětí. Trvalé vystavení dětského organismu i nízkým dávkám olova je příčinou zpomalení duševního vývoje a nepříznivých změn v chování<sup>5,6</sup>. Nevyloučené absorbované olovo je v organismu distribuováno mezi tři hlavní cílové složky: krev, měkké tkáně a mineralizující tkáně (kosti a zuby). U dospělých je okolo 95 % zátěže organismu olovem deponováno v kostech, zatímco u dětí je podíl deponovaný v kostech jen okolo 70 %<sup>7</sup>. Biologický poločas olova v krvi může

být krátký, okolo 20 až 40 dnů (údaj založený na izotopové stopovací analýze)<sup>8</sup>.

Typickými příznaky otravy olovem jsou bleďost obličeje a rtů, zácpa a nechut k jídlu, kolika (bolestivý stav v krajině břicha), anémie, bolesti hlavy, křeče, chronická nefritida, poškození mozku a poruchy centrálního nervového systému. Léčení spočívá v tvorbě komplexu a maskování olova silným chelatačním činidlem. I stopy olova v okolním prostředí a potravě mohou vést při trvalém přísunu do organismu k následným těžkým onemocněním, protože olovo se v těle kumuluje a vylučuje se jen obtížně.

Díky uvedeným negativním vlastnostem olova, je nutné sledovat jeho množství v organismu. Stanovení stopových prvků v krvi a tělních tekutinách je v medicíně stále považováno za užitečné a důležité sledovat, protože úroveň některých prvků (olovo), může být u člověka spojeno s různými patologickými změnami<sup>1</sup>. Proto je přesné a reprodukovatelné stanovení stopových prvků v biologických vzorcích velmi důležité<sup>9-13</sup>.

## Metody stanovení olova

Pro stanovení olova se často využívá metoda atomové absorpční spektrometrie (AAS), hmotnostní spektrometrie (MS) a na předním místě je také stále využívána diferenční pulzní voltametrie (DPV), a to především díky tomu, že tato metoda je méně ekonomicky nákladná, přesná a citlivá<sup>14,15</sup>.

*Tato práce byla financována z projektu NANOLABSYS CZ.1.07/2.3.00/20.0148.*

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

## Literatura

1. ATSDR. (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) Toxicological profile for lead (update). U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. 1999.
2. Greenwood, N.N.; Earnshaw, A. Chemistry of the elements, Pergamon Press, 1984.
3. Barta, M. Chemické prvky kolem nás, Edika, 2012, pp. 112 s.
4. Šimek, M. Základy nauky o půdě: Biologické procesy a cykly prvků, Jihočeská univerzita, Biologická fakulta, 2003.
5. Ziegler, E.E.; Edwards, B.B.; Jensen, R.L.; Mahaffey, K.R.; Fomon, S.J. ABSORPTION AND RETENTION OF LEAD BY INFANTS. *Pediatric Research*. 1978, 12, 29-34.
6. Rutter, M. THE LONG-TERM EFFECTS OF EARLY EXPERIENCE. *Developmental Medicine and Child Neurology*. 1980, 22, 800-815.
7. Barry, P.S.I. CONCENTRATIONS OF LEAD IN THE TISSUES OF CHILDREN. *British Journal of Industrial Medicine*. 1981, 38, 61-71.
8. Kang, H.K.; Infante, P.F.; Carra, J.S. DETERMINATION OF BLOOD-LEAD ELIMINATION PATTERNS OF PRIMARY LEAD SMELTER WORKERS. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1983, 11, 199-210.
9. Afridi, H.I.; Kazi, T.G.; Arain, M.B.; Jamali, M.K.; Kazi, G.H.; Jalbani, N. Determination of cadmium and lead in biological samples by three ultrasonic-based samples treatment procedures followed by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of Aoac International*. 2007, 90, 470-478.
10. Afridi, H.I.; Kazi, T.G.; Kazi, A.G.; Shah, F.; Wadhwa, S.K.; Kolachi, N.F.; Shah, A.Q.; Baig, J.A.; Kazi, N. Levels of Arsenic, Cadmium, Lead, Manganese and Zinc in Biological Samples of Paralyzed Steel Mill Workers with Related to Controls. *Biological Trace Element Research*. 2011, 144, 164-182.
11. Blazewicz, A.; Orlicz-Szczesna, G.; Prystupa, A.; Szczesny, P. Use of ion chromatography for the determination of selected metals in blood serum of patients with type 2 diabetes. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2010, 24, 14-26.
12. Najafi, N.M.; Massumi, A.; M., S. In Situ Digestion of Serum Samples in Graphite Furnace Prior to determination by ETAAS. *Scientia Iranica* 2005, 12, 324–328
13. Parsons, P.J. MONITORING HUMAN EXPOSURE TO LEAD - AN ASSESSMENT OF CURRENT LABORATORY PERFORMANCE FOR THE DETERMINATION OF BLOOD LEAD. *Environmental Research*. 1992, 57, 149-162.
14. Hynek, D.; Prasek, J.; Pikula, J.; Adam, V.; Hajkova, P.; Krejcová, L.; Trnkova, L.; Sochor, J.; Pohanka, M.; Hubalek, J.; Beklova, M.; Vrba, R.; Kizek, R. Electrochemical Analysis of Lead Toxicosis in Vultures. *International Journal of Electrochemical Science*. 2011, 6, 5980-6010.
15. Krizkova, S.; Zitka, O.; Adam, V.; Beklova, M.; Horna, A.; Svobodova, Z.; Sures, B.; Trnkova, L.; Zeman, L.; Kizek, R. Possibilities of electrochemical techniques in metallothionein and lead detection in fish tissues. *Czech Journal of Animal Science*. 2007, 52, 143-148.



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

## Působení rtuti na živé organismy

Renáta Kenšová<sup>a,b</sup>, David Hynek<sup>a,b</sup>, Vojtěch Adam<sup>a,b</sup>, René Kizek<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

### The influence of mercury to living organisms

This study deals with the role of mercury in the environment. It summarizes information about properties of mercury and its species, deals with individual mercury intakes into the environment, anthropogenic or natural, and it follows transport of mercury between individual components of the environment. Part of this thesis is given to the accumulation of mercury and mercury species into organisms. It points out the toxicity of mercury and mercury species, their effect to human organism. In the last chapter there is a resume of the instrumental methods which are commonly used for mercury determination.

**Přijato k publikování:** 8. 8. 2014

**Klíčová slova:** bioakumulace; detekce; onemocnění; organismus; otrava; rtuť; toxicita

### Úvod

Sloučeniny rtuti patří mezi nejvíce toxické látky vyskytující se v životním prostředí. Jsou používány v různých průmyslových odvětvích, zemědělství, laboratorní technice i lékařství. Nalezneme ji v půdách, horninách, atmosféře, ve vodách, ale také v organismech. Toxicita rtuti závisí na formě, ve které se nachází. V souvislosti se sledováním rizikových prvků v životním prostředí se rtuť dostala do popředí zájmů nejenom ekologů, ale i hygieniků. Následkem antropogenního znečištění se rtuť nachází ve větší či menší míře ve všech ekosystémech. Vzhledem ke schopnosti bioakumulace rtuti v potravním řetězci je výzkumu šíření rtuti v životním prostředí v posledních letech věnována značná pozornost.

### Fyzikálně-chemické vlastnosti rtuti

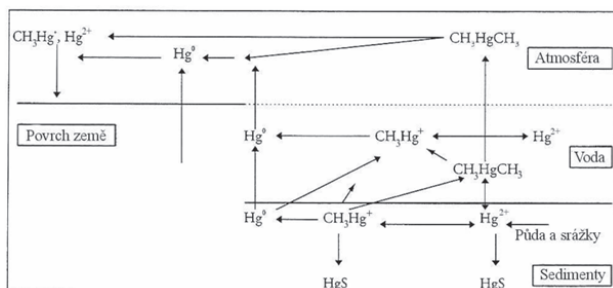
Rtuť (Hg), je kapalný kovový prvek stříbrné bílé barvy. Je nápadně těžká a dobře vede elektrický proud. Je supravodičem I. typu. Patří mezi přechodné prvky, které mají valenční elektrony v d-sféře<sup>1</sup>. Rtuť se vyskytuje pouze v omezeném počtu oxidačních stavů (0, +I, +II). Přesto vytváří širokou škálu sloučenin, které se liší jak svými fyzikálními a chemickými vlastnostmi, tak i

svou toxicitou. Mezi nejdůležitější chemické formy rtuti náleží elementární (kovová) rtuť, rtuťné ( $\text{Hg}_2^{2+}$ ) a rtuťnaté ( $\text{Hg}^{2+}$ ) anorganické formy rtuti a organokovové sloučeniny<sup>2</sup>.

### Rtuť v přírodním prostředí

Rtuť je obsažena ve více než dvaceti minerálech, zejména sulfidech spolu se zinkem, železem, mědí a jinými kovy. Jedinou rudou, z níž se rtuť efektivně průmyslově získává, je rumělka ( $\text{HgS}$ ), jenž je podobně jako jiné sulfidy nerostem primárních hornin. Rumělka obsahuje přes 86% rtuti. Mnohem méně rtuti se vyskytuje jako elementární rtuť (Hg), avšak pokud jde o uvolňování rtuti do prostředí, má elementární rtuť velký význam. Oproti nerozpustné rumělce je elementární rtuť těkavá a uvolňuje se (vypařuje) z hornin do atmosféry. Rtuť se dostává do ovzduší také vulkanickou činností, z vegetace a z oceánů<sup>3</sup>. Z ovzduší je rtuť odstraňována srážkovými vodami, které průměrně obsahují  $0,2 \mu\text{g.l}^{-1}$  rtuti<sup>4</sup>.

Stejně jako u většiny prvků jsou hlavními vstupy rtuti do životního prostředí atmosférické emise, které mohou být antropogenního či přirozeného původu. Rtuť a její sloučeniny lze nalézt v celém ekosystému, ve všech složkách životního prostředí. Způsob transportu rtuti do životního prostředí popisuje bio-geochemický



**Obr. 1:** Některé z možných cest transportu rtuti v životním prostředí (převzato a modifikováno) <sup>6</sup>

cyklus (Obr. 1). Tento cyklus je neustále opakován a je charakterizován jako součet všech vstupů a výstupů sloučenin rtuti v daném ekosystému. Pouze malá část rtuti je navázána do nerozpustných sloučenin nebo akumulována ve vodních potravních řetězcích a z toho důvodu nemůže být znovu uvolněna do atmosféry <sup>2,5</sup>.

## Toxicita rtuti

Toxicita rtuti závisí na chemických a fyzikálních vlastnostech jednotlivých forem rtuti, tj. na rozpustnosti, intoxikační cestě, době expozice, na jejím množství a především na mobilitě forem. Platí, že čím mobilnější je forma rtuti, tím je toxicitější <sup>6,7</sup>. Elementární rtuť a její sloučeniny (anorganické i organické) jsou vysoce jedovaté látky působící akutní i chronické otravy. Toxicita je dána zejména reakcí rtuťnatého kationtu se sulfhydrylovými skupinami (-SH) biomolekul s následnou změnou propustnosti buněčných membrán a poškozením nitrobuňčných enzymů (kationty rtuti i ve velmi malých koncentracích inhibují některé enzymové reakce vazbou na aktivní centra enzymů). Anorganické formy rtuti jsou považovány za méně toxické než organické <sup>8</sup>.

Expoziční cesta rtuti je u lidí nejčastěji inhační, orální a dermální. Expozice sloučeninami rtuti se u lidí projevuje imunologickými, neurologickými, reprodukčními, vývojovými, genotoxickými a karcinogenními účinky a mohou končit i smrtí <sup>2</sup>.

Při otravě člověka rtuť záleží na formě rtuti, druhu otravy (akutní, chronická) a vstupní cestě rtuti do organismu. Při akutní expozici vysokým koncentracím par elementární rtuti jsou kritickým orgánem plic. Vzniká erozivní

bronchitida, doprovázená zvracením a průjmy. Při chronické expozici je nejvíce postižen mozek. Počáteční příznaky jsou nespecifické (únava, bolesti hlavy, nechutenství atd.), později se objevuje typický třes, který postupně postihuje celé tělo. U lidí profesionálně exponovaným parám kovové rtuti bylo zjištěno zvýšené procento výskytu chromozómových aberací lymfocytů <sup>8</sup>.

Při akutní otravě anorganickými sloučeninami rtuti (chlorid, dusičnan, kyanid rtuťnatý) jsou kritickým orgánem ledviny a trávicí ústrojí. Při perorálním příjmu již po několika minutách po požití toxické dávky (0,2 – 1,0 g) dochází ke zvracení krvavého obsahu, následují kolikové bolesti břicha a průjmy. Během 24 hodin se vyvine obraz selhání ledvin s nekrózou epitelových buněk proximálního tubulu <sup>9</sup>. Při chronické otravě anorganickými sloučeninami, i elementární rtuť, byl popsán nefrotický syndrom, zvýšená sekrece slin a záněty dásní. U malých dětí do čtyř let vzniká syndrom akrodynie (růžová nemoc), který je charakterizován ekzémem po celém těle, otoky, loupáním kůže a zimnicí. Po přerušení expozice rtuti příznaky postupně mizí <sup>9</sup>.

Mezi akutní a chronickou otravou organickými sloučeninami nejsou velké rozdíly. Alkylsloučeniny významným způsobem poškozují zejména centrální nervový systém, dochází k atrofii mozku se ztenčením vrstvy mozkové kůry <sup>10</sup>. Tyto změny jsou provázeny histologickými změnami v mozkové hmotě. Výraznými klinickými příznaky jsou poruchy chování, řeči, polykání a sluchu. Typický je svalový třes a zúžení zorného pole <sup>11</sup>.

Některými autory je uváděn mutagenní účinek organických forem rtuti, především methylrtuti <sup>8</sup>. Methylrtuť může pravděpodobně sloužit jako donor methylové skupiny při alkylačních reakcích na DNA.

V posledních letech se stále častěji poukazuje na možné teratogenní a neurotoxické účinky organických forem <sup>8</sup>. Prokázalo se, že rtuť je schopna proniknout přes placentární bariéry a způsobit otravu plodu. Intenzita průniku je dána chemickou vazbou rtuti. Nejmenší schop-



nost průniku má anorganická rtuť, vyšší je u arylrtuťnatých sloučenin, nejvyšší pak alkylrtuťnatých sloučenin. Placenta může do určité míry ochránit plod před akutní otravou methylrtuť. V případech chronických zátěží mateřského organismu rtuť bylo naopak zjištěno, že plod doslova vychytává rtuť přestupující placentou a kumuluje ji především v mozku a červených krvinkách. Rtuť rovněž negativně ovlivňuje životnost spermií i přežívání embryí<sup>12</sup>.

Již před několika desítkami let se zjistilo, že toxicita rtuti může být snížena přítomností selenu. Účinek selenu se projevuje při akutních a chronických otravách jak anorganicky, tak i organicky vázanou rtuť<sup>13</sup>.

## Metody stanovení rtuti

Pro stanovení celkového obsahu rtuti ve vzorku je třeba převést veškeré chemické formy rtuti na formu jednu a to anorganickou. Vzniklou anorganickou rtuť je možné detekovat jako atomární rtuť. Oxidace chemických forem rtuti se provádí silnými kyselinami (kyselina chlorovodíková, kyselina sírová, kyselina dusičná) a oxidačními činidly (peroxid vodíku, dichroman draselný, manganistan draselný) v kyselém prostředí, UV zářením a mikrovlnným zářením. Účinná je i fotooxidace, tj. kombinace chemické oxidace s působením UV záření<sup>2,5</sup>. Kvlastnímu stanovení celkového obsahu rtuti se používá atomová absorpční spektrometrie (AAS), atomová fluorescenční spektrometrie (AFS), atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-AES), hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP – MS) a atomová emisní spektrometrie s mikrovlnně indukovaným plazmatem (MIP – AES). Uvedené techniky se liší citlivostí. Výhodou spojení GC – AES a GC – ICP – MS je možnost multielementární analýzy. Některé tyto techniky využívají metodu generování studených par<sup>14</sup>. Pro stanovení celkového obsahu rtuti byly vyvinuty speciální analyzátory, např. TMA 254 (Tesla, ČR) a AMA 254 (Altec, ČR)<sup>2,5,15</sup>. Tyto analyzátory umožňují přímé stanovení rtuti v pevných, plynných a kapalných vzorcích bez potřeby předchozí chemické úpravy vzorku<sup>14</sup>.

*Tato práce byla financována z projektu NANOLABSYS CZ.1.07/2.3.00/20.0148.*

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

## Literatura

1. Greenwood, N.N.; Earnshaw, A. Chemistry of the elements, Pergamon Press, 1984.
2. Houserova, P.; Janak, K.; Kuban, P.; Pavlickova, J.; Kuban, V. Chemical forms of mercury in aquatic ecosystems - Properties, levels, cycle and determination. *Chemicke Listy*. 2006, 100, 862-876.
3. Šimek, M. Základy nauky o půdě: Biologické procesy a cykly prvků, Jihočeská univerzita, Biologická fakulta, 2003.
4. Svobodova, Z.; Hejtmanek, M. Rtuť ve vodním prostředí. *Živa*. 1982, 93-95.
5. Zavadská, M.; Zemberyova, M. Determination and speciation of organomercurials in environmental samples by AAS. *Chemicke Listy*. 1999, 93, 91-98.
6. Fara, M. Specifika emisí rtuti ze zdrojů znečišťování ovzduší vzhledem k potřebám modelů rozptylu znečištění v ovzduší a posuzování potenciálních rizik životním prostředím. Praha, 2004.
7. Tichý, M. Toxikologie pro chemiky: toxikologie obecná, speciální, analytická a legislativa, Karolinum, 1998.
8. Bencko, V.; Cikrt, M.; Lener, J. Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka, Grada, 1995.
9. Berlin, M. Toxicology of metals II. Environmental health effects series. U. S. Environmental Protection Agency. 1977, 206 - 221.
10. Merian, E.; Clarkson, T.W. Metals and their compounds in the environment: occurrence, analysis, and biological relevance, VCH, 1991.
11. Clarkson, T.W. The toxicology of mercury. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 1997, 34, 369-403.
12. Klaverkamp, J.F.; Macdonald, W.A.; Lillie, W.R.; Lutz, A. JOINT TOXICITY OF MERCURY AND SELENIUM IN SALMONID EGGS. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1983, 12, 415-419.
13. Birge, W.J.; Black, J.A.; Westerman, A.G.; Hudson, J.E. The effect of mercury on reproduction of fish and amphibians., New York, 1979.
14. Popl, M.; Fährnich, J.; fakulta, V.š.c.-t.v.P.C.-i. Analytická chemie životního prostředí, VŠCHT, 1999.



15. Krystek, P.; Ritsema, R. Mercury speciation in thawed out and refrozen fish samples by gas chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and atomic fluorescence spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2005, 381, 354-359.



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

## Monitorování hladiny metallothioneinu u biologických organismů vystavených působení kovových prvků a sloučenin

Kateřina Tmejová<sup>a,b</sup>, David Hynek<sup>a,b</sup>, Kristýna Číhalová<sup>a</sup>, Renata Kenšová<sup>a,b</sup>, René Kizek<sup>a,b</sup>, Vojtěch Adam<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

### Monitoring of metallothionein levels in biological organism exposed to the metal elements and compounds

In this study, the basic facts about the relationship between metallothionein and metals are summarized, determining the affinity of the interaction of metallothionein with different metals and the importance of this interaction for the functioning of organisms. In two described experiments there was presented significance of metallothionein determination in organism exposure to heavy metals.

**Přijato k publikování:** 9. 8. 2014

**Klíčová slova:** kovy; metallothionein; MT; nádorový marker; těžké kovy

### Úvod

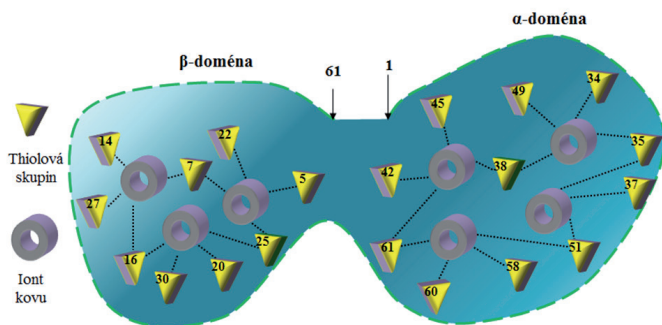
Metallothionein (MT) je součástí skupiny nízkomolekulárních na cysteiny velmi bohatých proteinů o molekulové hmotnosti 6 – 10 kDa<sup>1</sup>. Ve své základní struktuře neobsahuje aromatické aminokyseliny. Molekula se skládá z 60 až 68 aminokyselinových zbytků včetně 20 cysteinů, které se v primární sekvenci vyskytují obvykle v těchto repetičích: Cys-X-Cys, Cys-Cys-X-Cys-Cys, Cys-X-Cys-Cys (X představuje jinou aminokyselinu než cystein)<sup>2</sup>. Všechny cysteiny jsou v redukované formě a koordinované s ionty kovu, přičemž vytvářejí metalthiolátové klastry. Jedna molekula savčího MT je schopna vázat 11 jednovazných nebo 7 dvou vazných kovových iontů<sup>3</sup>. Kovy jsou vázány do společných tetrahedrálních jednotek. Největší afinitou disponuje MT vůči Cu<sup>+</sup> (konstanta stability 10<sup>19</sup> - 10<sup>17</sup>), dále pak Cd<sup>2+</sup> (10<sup>17</sup> - 10<sup>15</sup>) a Zn<sup>2+</sup> (10<sup>14</sup> - 10<sup>11</sup>) a není schopen vázat Cu<sup>2+</sup>. Celkově je známo 18 iontů kovů, které MT dokáže vázat, ale pouze Cu<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup> a Bi<sup>2+</sup> jsou schopny vytěsnit navázaný Zn<sup>2+</sup> ze struktury MT. Jak již bylo zmíněno, terciární struktura MT je rozdělena na dvě domény,  $\alpha$  a  $\beta$ ,  $\alpha$ -doména (C-terminální) je stabilnější a obsahuje 4 vazebná místa pro divalentní těžké kovy,  $\beta$ -doména (N-terminální)

dokáže pojmout 3 divalentní kovové ionty<sup>4</sup>.

V této práci jsou prezentovány podstatné výsledky studie zkoumající vliv působení iontů kovů (měď, olovo, zinek, stříbro a kadmium) na hladinu metallothioneinu v bakteriální kultuře *Staphylococcus aureus*. Dále je prezentován výstup z experimentu zabývající se změnou v hladině metallothioneinu v důsledku přítomnosti kadmia a olova v bakteriální kultuře *Escherichia coli* a *Escherichia coli* klonované genem exprimujícím gen MT-3.

### Isoformy metallothioneinu

Metallothionein byl pozorován v celé živočišné říši a vyskytuje se také u eukaryotických mikroorganismů, řady prokaryot a u vyšších rostlin<sup>3</sup>. U savců jsou známy 4 isoformy (MT-1 – MT-4), u člověka bylo zjištěno dalších 13 metallothioneinů podobných proteinů<sup>5</sup>. Pro isoformu MT-1 existuje 11 genů (MT-1A, B, E, F, G, H, I, J, K, L a X), pro další isoformu po jednom genu<sup>6</sup>. Odlišnosti jednotlivých isoform MT vycházejí zejména z post-translačních úprav, malých změn v primární struktuře a afinitě k jednotlivým těžkým kovům. Přestože jsou strukturně tyto isoformy podobné, plní jiné biologické funkce<sup>7</sup>. Tato skutečnost je zajištěna jejich odlišnou lokalizací v buněčných kompartmen-



**Obr. 1:** Struktura metalothioneinu

tech a jednotlivých tkáních. MT-1 a MT-2 jsou rozšířené téměř ve všech tkáních<sup>8</sup>, MT-3 je exprimován v mozkové tkáni, v srdeční svalovině, ledvinách a v tkáních reprodukčních orgánů<sup>9</sup>. Nejméně známá je isoforma MT-4, která byla objevena v epiteliálních buňkách<sup>2</sup>. Forma MT bez navázaného iontu kovu (apo-MT) je přítomna v buňkách, které jsou vystaveny nedostatku  $Zn^{2+}$ . Bylo pozorováno, že apo-MT může díky vysoké afinitě odebrat  $Zn^{2+}$  z transkripčních faktorů (TFIIIA) a ze zinkových prstů (Sp-1)<sup>10</sup>. Popsaný mechanismus je pravděpodobně jedním z mnoha protiapoptotických a proliferáčnických nádorových mechanismů<sup>11</sup>.

## Funkce metalothioneinu v organismu

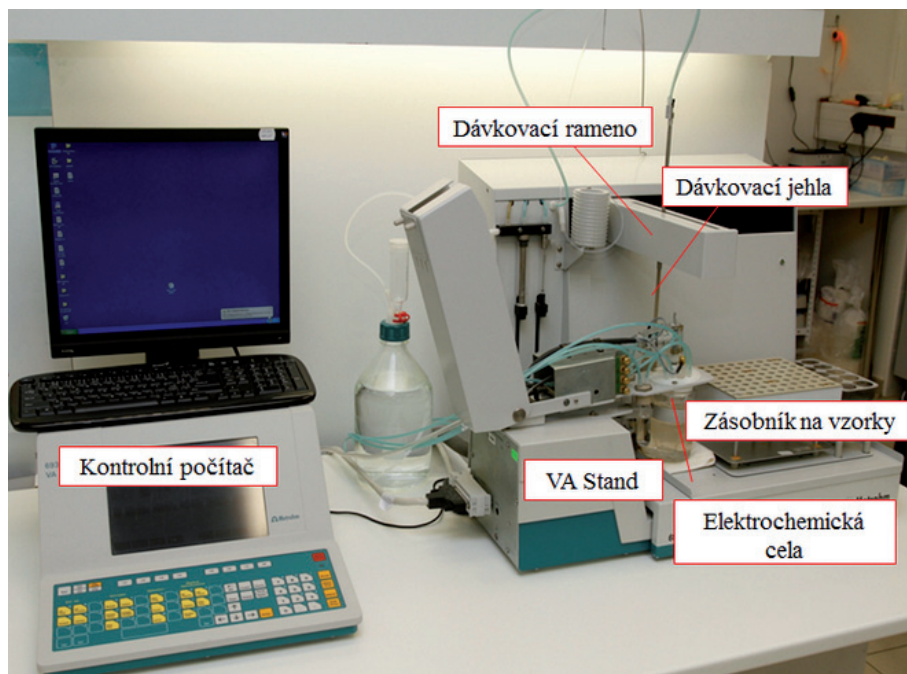
O funkci MT není ještě úplně vše známo, ale pravděpodobně tento protein souvisí s transportem zinku v intracelulárním prostoru buňky<sup>12</sup>. Dále studium exprese MT na úrovni mRNA ukazuje na roli tohoto proteinu při ochraně buňky vůči vysoké koncentraci  $Zn^{2+}$  a při odchytu těchto iontů pro potřebu jednotlivých buněčných procesů<sup>13</sup>. MT může korigovat aktivitu zinkových prstů díky kompetici o vazbu zinku<sup>14</sup>, slouží také jako rezervoár zinku pro zinek-dependentní proteiny a jako zdroj zinku pro nově syntetizované apo-MT, či regulátory vlastní exprese<sup>13</sup>. Navíc je známo, že MT vstupuje do oxidačně-redukční rovnováhy uvnitř buněk<sup>15</sup>. MT je dále zkoumán jako nádorový marker na základě skutečnosti, že exprese MT je závislá na stupni diferenciaci nádoru, stádiu onemocnění a dalších charakteristikách nádorových buněk<sup>16</sup>.

## Elektrochemická detekce metalothioneinu

Stanovení metalothioneinu probíhalo pomocí přístroje 747 VA Stand ve spojení s 693 VA procesorem a 695 autosamplerem (Metrohm, Švýcarsko). Detailní vyobrazení analytického přístroje je na Obr. 2. Při měření bylo

použito standardní tříelektrodové zapojení spolu s chlazením vzorků na  $4^{\circ}C$  (Julabo F25, JulaboDE). Jako pracovní elektroda byla zvolena rtuťová kapková elektroda s povrchem kapky  $0,4\text{ mm}^2$  (HMDE), argentchloridová ( $Ag/AgCl/KCl\ 3\ M$ ) elektroda sloužila jako referentní a platínová elektroda byla elektrodou pomocnou. Parametry stanovení jsou následující: počáteční potenciál  $-0,700\text{ V}$ , koncový potenciál  $-1,750\text{ V}$ , čas modulace  $0,057\text{ s}$ , časový interval  $0,200\text{ s}$ , krokový potenciál  $0,020\text{ V}$ , amplituda  $-0,250\text{ V}$ , deoxygenace 99,9% argonem  $120\text{ s}$ , celkový objem elektrolytu se vzorkem je  $2\text{ ml}$ . Vzorek se standardně dávákuje v objemu  $5\ \mu\text{l}$ .

Brdičkuv roztok používaný pro stanovení metalothioneinu jako elektrolyt je složen z  $1\text{ M}$  amonného pufru a  $1\text{ mM}$  chloridu hexaaminkobaltitého. V roztoku probíhá katalytická reakce, u níž dochází k interakci  $[Co(NH_3)_6]Cl_3$  s  $-SH$  skupinou proteinu, kdy se nejprve vytvoří hexaaminkobaltnatý iont. Stabilita tohoto komplexu je ale velmi nízká, proto podléhá hydrolyze za vzniku amoniaku.  $NH_3$  zvyšuje pH elektrolytu a vytváří tak podmínky pro vznik katalytické reakce. Následuje redukce hexaaminkobaltného komplexu na čistý kobalt. Jako výsledek celé reakce vzniknou v amonném pufru dvě potenciálové vlny, a to při potenciálu přibližně  $-0,30\text{ V}$  ( $Co^{3+} \rightarrow Co^{2+}$ ) a  $-1,20\text{ V}$  ( $Co^{2+} \rightarrow Co^0$ ). Po přidání proteinu s thiolovou skupinou jsou na voltamogramu zaznamenány dvě další vlny při potenciálech  $-1,35$  a  $-1,48\text{ V}$ , přičemž výška posledního signálu je závislá na koncentraci metalothioneinu v reálném vzorku<sup>17,18</sup>.



Obr. 2: Detailní popis elektrochemické aparatury použité pro detekci metalothioneinu

### Efekt iontů těžkých kovů na *Staphylococcus aureus*

Vliv iontů těžkých kovů ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$ ) při působení na gram-pozitivní bakteriální kmen *S. aureus* byl elektrochemicky studován z pohledu změny v hladině termostabilního proteinu metalothioneinu v rezistentním, a vůči kovu nerezistentním kmeni. Rezistentní kmen byl připraven kultivací *S. aureus* s postupným přidáváním stejné koncentrace těžkých kovů ( $50 \mu\text{M}$ ) k bakteriální kultuře až do koncentrace, kdy je *S. aureus* ještě schopný regenerace. V takto kultivovaných bakteriálních kmelech opatřených nezbytnou přípravou vzorku pro elektrochemickou detekci byl stanoven metalothionein. Bylo zjištěno, že hladina metalothioneinu je vyšší v kmeni rezistentním na kovy, a to zejména v rezistentním kmeni s mědí a olovem<sup>19</sup>. Zvýšení koncentrace MT může být důležitá pro homeostázi a detoxifikaci kovů pro získání rezistence na těžké kovy kmene *S. aureus*.

### Efekt kademnatých a olovnatých iontů na *Escherichia coli* s genem pro MT-3

*Escherichia coli* a *Escherichia coli* s genem pro lidský MT-3 byly vystaveny působení kademnatých a olovnatých iontů ( $25$ ,  $50$ ,  $75$  and  $150 \mu\text{M}$ ) a v těchto kondicích byla elektrochemicky stanovena hladina MT jako markeru určujícího působení těžkých kovů na organismus. Ze získaných dat (hodnota MT klesá v obou bakteriálních kulturách se vzrůstající koncentrací kovů a nejvyšší hodnota MT byla detekována v kondicích bez přítomnosti kovu) lze říci, že byl detekován volný MT (volné thiolové skupiny přítomné ve struktuře metalothioneinu) v samotné *E. coli*. Získané výsledky ukazují na fakt, že kovové ionty jsou vyloučeny z buňky. Mechanismus vylučování kovových iontů z buňky začíná navázáním kovových iontů do struktury metalothioneinu v cytoplazmě a dále se tento komplex vyloučí pomocí efluxu do média. Toto médium bylo v průběhu přípravy vzorku odejmuto, buněčná stěna rozrušena a bylo možno detekovat pouze malé množství

MT původně navázaného v buňce. Mezi další skutečnosti patří také fakt, že hodnota MT byla vyšší v případě *E. coli* s MT-3 ve srovnání s *E. coli*. Také z experimentálních dat vyplývá rozdílná afinita MT-3 ke kadmii a olovu; přičemž olovo má větší afinitu k MT-3.

## Závěr

V této studii byla shrnuta základní fakta o vztahu metalothioneinu a kovů, afinitě určující interakci metalothioneinu s jednotlivými kovy a významu této interakce pro fungování organismů. Na dvou uvedených experimentech byl prezentován význam MT pro studium intoxikace organismu ionty kovů.

*Tato práce byla financována z projektu NANOLABSYS CZ.1.07/2.3.00/20.0148.*

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

## Literatura

- Kagi, J.H.R.; Schaffer, A. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*. 1988, 27, 8509-8515.
- Bamber, B.A.; Masters, B.A.; Hoyle, G.W.; Brinster, R.L.; Palmiter, R.D. Leukemia inhibitory factor induces neurotransmitter switching in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994, 91, 7839-7843.
- Cobbett, C.; Goldsbrough, P. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis, 2002.
- Nath, R.; Kambadur, R.; Gulati, S.; Paliwal, V.K.; Sharma, M. Molecular aspects, physiological-function, and clinical-significance of metallothioneins *Crc Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1988, 27, 41-85.
- Simpkins, C.O. Metallothionein in human disease. *Cellular and Molecular Biology*. 2000, 46, 465-488.
- Ghoshal, K.; Jacob, S.T. Regulation of metallothionein gene expression. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol 66. 2001, 66, 357-384.
- Hamer, D.H. Metallothionein - an overview. *Marine Environmental Research*. 1988, 24, 171-171.
- Masters, B.A.; Quaife, C.J.; Erickson, J.C.; Kelly, E.J.; Froelick, G.J.; Zambrowicz, B.P.; Brinster, R.L.; Palmiter, R.D. Metallothionein-III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *Journal of Neuroscience*. 1994, 14, 5844-5857.
- Moffatt, P.; Seguin, C. Expression of the gene encoding metallothionein-3 in organs of the reproductive system. *DNA and Cell Biology*. 1998, 17, 501-510.
- Zeng, J.; Heuchel, R.; Schaffner, W.; Kagi, J.H.R. Metallothionein (apometallothionein) can modulate DNA-binding and transcription activation by zinc finger containing factor-SP1. *Febs Letters*. 1991, 279, 310-312.
- Barnas, C.; MartelPlanche, G.; Furukawa, Y.; Hollstein, M.; Montesano, R.; Hainaut, P. Inactivation of the p53 protein in cell lines derived from human esophageal cancers. *International Journal of Cancer*. 1997, 71, 79-87.
- Studer, R.; Vogt, C.P.; Cavigelli, M.; Hunziker, P.E.; Kagi, J.H.R. Metallothionein accretion in human hepatic cells is linked to cellular proliferation. *Biochemical Journal*. 1997, 328, 63-67.
- Davis, S.R.; Cousins, R.J. Metallothionein expression in animals: A physiological perspective on function (Reprinted from vol 130, pg 1085, 2000). *Journal of Nutrition*. 2002, 132, 1085-1088.
- Roesijadi, G.; Bogumil, R.; Vasak, M.; Kagi, J.H.R. Modulation of DNA binding of a tramtrack zinc finger peptide by the metallothionein-thionein conjugate pair. *Journal of Biological Chemistry*. 1998, 273, 17425-17432.
- Sato, M.; Bremner, I. Oxygen free-radicals and metallothionein *Free Radical Biology and Medicine*. 1993, 14, 325-337.
- Theocharis, S.E.; Margeli, A.P.; Kljanienko, J.T.; Kouraklis, G.P. Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology*. 2004, 45, 103-118.
- Petrova, J.; Potesil, D.; Mikelova, R.; Blastik, O.; Adam, V.; Trnkova, L.; Jelen, F.; Prusa, R.; Kukacka, J.; Kizek, R. Attomole voltammetric determination of metallothionein. *Electrochimica Acta*. 2006, 51, 5112-5119.
- Raspor, B.; Paic, M.; Erk, M. Analysis of metallothioneins by the modified Brdicka procedure. *Talanta*. 2001, 55, 109-115.
- Waalkes, M.P.; Harvey, M.J.; Klaassen, C.D. Relative invitro affinity of hepatic metallothionein for metals. *Toxicology Letters*. 1984, 20, 33-39.



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.



## Poměr GSH/GSSG u biologických organismů

Markéta Komínková<sup>a</sup>, Ondřej Zítka<sup>a,b</sup>, René Kizek<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

### The ratio of GSH/GSSG in biological organisms

Tripeptide glutathion is one of the most important thiol compound. It is involved in a wide variety of cellular processes. In the organism it occurs in two forms: as a reduced glutathion (GSH) and as an oxidized glutathion (GSSG). Protective and regulatory functions of GSH are based on changes in its redox state. GSH and GSSG forms together one of the most significant redox couples in the cell. Their ratio under the physiological conditions is usually constant, regardless of the total concentration of glutathion in a cell. The ratio of both forms of glutathion is considered as an indicator of oxidative stress effect.

**Přijato k publikování:** 9. 8. 2014

**Klíčová slova:** glutathion, poměr GSH/GSSG, redoxní pár

### Úvod

De Re-Pailhade v roce 1888 <sup>1</sup> objevil v kvasinkách drcených s elementární sírou látku, která je odpovědná za vytváření sirovodíku. Tuto látku následně identifikoval i ve svalovině, játrech, mozku, krvi, vaječném bílku, ale také v chřestu. Látka byla pojmenována philothion. De Rey-Pailhade věřil, že se jedná o látku s důležitou rolí v organismu, neboť se zdála být v živých buňkách všudypřítomná. Předpokládal, že philothion obsahuje labilní vodík. V dalších pracích bylo předpokládáno, že tato látka obsahuje thiolovou skupinu. Později bylo chybně určeno, že se jedná o dipeptid kyseliny glutamové a cysteinu. Následovalo přejmenování z philothionu na glutathion. V roce 1927 byla publikována práce, která již správně identifikovala izolovaný glutathion jako tripeptid složený z cysteinu, kyseliny glutamové a glycinu <sup>2</sup>.

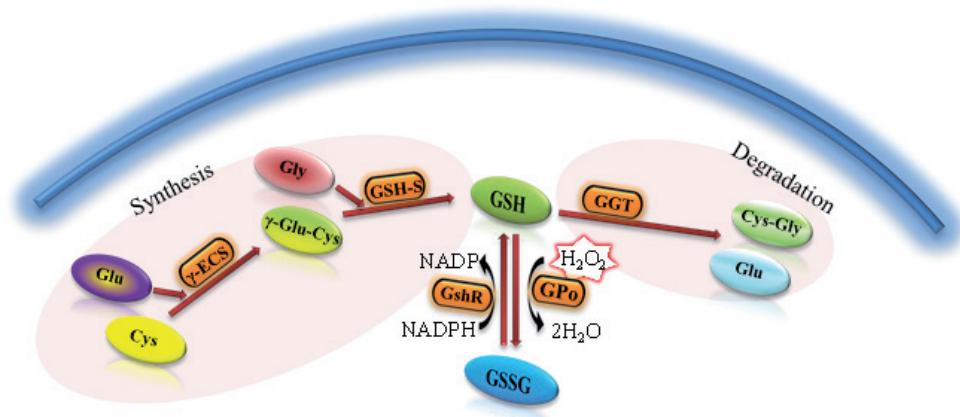
### Glutathion

Glutathion ( $\gamma$ -glutamylcysteinylglycin), který je přítomen v buňkách prakticky všech eukaryotních organismů od prvoků přes rostliny až po savce, je jednou z nejvýznamnějších thiolových sloučenin. Podílí se na celé řadě buněčných procesů, včetně ochrany proti reaktivním formám kyslíku (ROS) a těžkým

kovům, udržuje redoxní rovnováhu buněk, hraje důležitou roli v metabolismu a transportu aminokyselin, umožňuje detoxifikaci xenobiotik a je prekurzorem vzniku fytochelatinů <sup>3-5</sup>. V organismu se vyskytuje ve dvou formách, a to jako redukovaný glutathion (GSH) a jako oxidovaný glutathion (GSSG). Z obou forem je převládající GSH <sup>6</sup>. Bioaktivita GSH se může v organismech značně lišit jak v závislosti na buněčných komponentách (cytosol 1 – 11 mM, jádro 3 – 15 mM a mitochondrie 5 – 11 mM), tak i v závislosti na jednotlivých buňkách (v lidských tkáních obvykle 0,1 – 10 mM, nejvíce v játrech, slezině, ledvinách, čočkách, erytrocytech a leukocytech) <sup>7,8</sup>.

### Poměr GSH/GSSG

Poměr obou forem glutathionu je považován za indikátor působení oxidačního stresu <sup>9,10</sup>. Ochranné a regulační funkce GSH jsou založeny na změnách v jeho redoxním stavu. GSH a GSSG tvoří jeden z nejdůležitějších redoxních párů v buňce <sup>11</sup>. Poměr je ve fyziologických podmínkách obvykle konstantní, nezávisle na celkové koncentraci glutathionu v buňce. Působením stresových faktorů dochází k oxidaci GSH na GSSG. Do jaké míry oxidace probíhá, závisí nejen na formě, době trvání a intenzitě



**Obr. 1:** Na obrázku je zobrazen obecný postup syntézy a metabolismu glutathionu. Z kyseliny glutamové (Glu) a cysteinu (Cys) vzniká díky enzymu  $\gamma$ -glutamylcystein syntáza ( $\gamma$ -ECS)  $\gamma$ -glutamylcystein ( $\gamma$ -Glu-Cys). Účinkem enzymu glutathion syntázy (GSH-S) se z  $\gamma$ -Glu-Cys a glycinu (Gly) syntetizuje glutathion v redukované formě (GSH). Jako antioxidant se GSH oxiduje na oxidovanou formu glutathionu (GSSG) za účasti enzymu glutathion peroxidázy (Gpo). Díky působení glutathion reduktázy (GshR) se glutathion vyskytuje především ve formě GSH. K degradaci glutathionu v buňkách dochází díky  $\gamma$ -glutamyl transpeptidáze (GGT) na kyselinu glutamovou (Glu) a dipeptid cysteinylglycin (Cys-Gly)

stresoru, ale zejména na tolerančních schopnostech buňky. V důsledku dochází k poklesu poměru GSH/GSSG. Po ukončení působení stresového faktoru se GSSG opět redukuje na GSH optovně se zvyšuje poměr GSH/GSSG (Obr. 1) <sup>12</sup>.

Poměr GSH/GSSG v krvi může být dobrým biomarkerem nádorových onemocnění, Parkinsonovy nemoci, kardiovaskulárních chorob, ischemie, revmatoidní artritidy, Alzheimerovy choroby, cukrovky <sup>13</sup>.

## Závěr

Glutathion je nejvýznamnější thiolovou sloučeninou, která se v organismu podílí na celé řadě buněčných procesů, včetně ochrany proti ROS a těžkým kovům. Poměr redukováného a oxidovaného glutathionu (GSH/GSSG) závisí na trvání, intenzitě a formě stresoru a také na tolerančních schopnostech buňky. Tento poměr je vhodným indikátorem oxidačního stresu.

*Tato práce byla financována z projektu NANOLABSYS CZ.1.07/2.3.00/20.0148.*

The authors declare they have no potential

conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

## Literatura

1. De Rey-Pailhade, J. Sur un corps d'origine organique hydrogénéant le soufre 1 à froid. Comptes Rendus Hebdomadaire Séances de l'Académie de Sciences. 1888, 1683–1684.
2. Meister, A. On the Biochemistry of Glutathione, Glutathione Centennial, 1989, pp. 3-21.
3. Pophaly, S.D.; Singh, R.; Kaushik, J.K.; Tomar, S.K. Current status and emerging role of glutathione in food grade lactic acid bacteria. Microbial Cell Factories. 2012, 11.
4. Seth, C.S.; Remans, T.; Keunen, E.; Jozefczak, M.; Gielen, H.; Opendakker, K.; Weyens, N.; Vangronsveld, J.; Cuypers, A. Phytoextraction of toxic metals: a central role for glutathione. Plant Cell and Environment. 2012, 35, 334-346.
5. Paradiso, A.; Berardino, R.; de Pinto, M.C.; di Toppi, L.S.; Storelli, M.M.; Tommasi, F.; De Gara, L. Increase in ascorbate-glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants. Plant and Cell Physiology. 2008, 49, 362-374.
6. Forman, H.J.; Zhang, H.Q.; Rinna, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement,

- and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*. 2009, 30, 1-12.
7. Pastore, A.; Federici, G.; Bertini, E.; Piemonte, F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*. 2003, 333, 19-39.
  8. Biswas, S.K.; Rahman, I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: The role of glutathione. *Molecular Aspects of Medicine*. 2009, 30, 60-76.
  9. Anderson, M.E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions*. 1998, 112, 1-14.
  10. Ogawa, K. Glutathione-associated regulation of plant growth and stress responses. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2005, 7, 973-981.
  11. Szalai, G.; Kellos, T.; Galiba, G.; Kocsy, G. Glutathione as an Antioxidant and Regulatory Molecule in Plants Under Abiotic Stress Conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2009, 28, 66-80.
  12. Noctor, G.; Veljovic-Jovanovic, S.; Driscoll, S.; Novitskaya, L.; Foyer, C.H. Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration? *Ann Bot*. 2002, 89 Spec No, 841-850.
  13. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007, 39, 44-84.



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

## AMINOKYSELINY A JEJICH INTERAKCE S TĚŽKÝMI KOVY

Natalia Cernej<sup>a,b</sup>, Zbyněk Heger<sup>a,b</sup>, Ondřej Zítka<sup>a,b</sup>, Vojtěch Adam<sup>a,b</sup>, René Kizek<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

### Amino Acids and their interactions with heavy metals

In this study we attempted to characterize amino acids properties and their possible interactions with the metal ions. In the first part of this study we described the structure of amino acids, its biochemical properties and its role in organism. In the next and the most important part we summarized accessible information about the metals and heavy metals which can form a bond with amino acids. Especially the heavy metals could have really important role in the process of metabolisms of amino acids, but this role is still unknown.

**Přijato k publikování:** 10. 8. 2014

**Klíčová slova:** Aminokyseliny; cystein; detoxifikace; těžké kovy

### Úvod

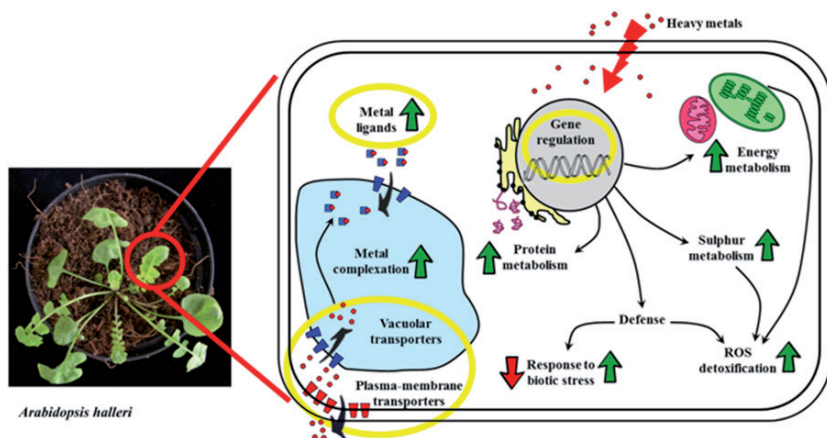
Nedostatek některých kovů v metabolismu živočichů může vést k vážnému narušení homeostázy, stejně tak jako jejich přítomnost ve vyšších koncentracích. U kovů je známo více druhů toxického působení. Arsen, chrom a platina působí kancerotoxicky. Zlato, kobalt, chrom, nikl a platina působí imunotoxicky. Rtuť má teratogenní a embryotoxický účinek. Kadmium, olovo a thalium jsou spermiotoxické. Uran působí nefrotoxicky a měď, železo, selen a zinek neurotoxicky. Pokud by se kovy v organismu pohybovaly volně bez kontroly, nastal by stav, při kterém dochází vlivem jejich působení k tvorbě reaktivních kyslíkatých sloučenin, jako je peroxid vodíku, superoxid nebo hydroxylový radikál. Tyto anorganické sloučeniny pak mohou oxidovat biochemické molekuly a narušovat tak homeostázu organismu. V první obranné linii proti těmto sloučeninám zpravidla vždy stojí sloučenina, která je schopna tyto účinky zmírnit, nebo úplně vyrušit, a to bez poškození organismu nebo narušení homeostázy. Děje se tak chemickou cestou formou redukce vodíkem. Aminokyseliny hrají hlavní roli jako složky proteinů a meziprodukty metabolismu. Kovové ionty jsou nezbytné jako stopové prvky, ale při vyšších koncentracích se stávají toxické. Těžké kovy jsou obtížné odstranit z životního prostředí a na rozdíl od

mnoha jiných znečišťujících látek nemohou být chemicky nebo biologicky degradovány a nakonec jsou nezníčitelné<sup>1</sup>. Dnes, mnoho těžkých kovů představuje globální nebezpečí pro životní prostředí. Například, znečištění životního prostředí Cd, vyplývající zejména z těžby a tavení, šíření čistírenských kalů a používání fosfátových hnojiv, se zvyšuje. To znamená, že použití mikroorganismů a rostlin pro dekontaminaci těžkých kovů přitahuje stále větší pozornost, protože z několika problémů, spojených s odstraněním znečišťujících látek za použití běžných metod<sup>2</sup>. Mechanismy podílející se na bakteriální resistenci vůči těžkým kovům jsou buď aktivní vylučování toxických kovů z buňky, nebo enzymatická detoxikace (toxické ionty přechází na méně toxické či méně dostupné kovové ionty). Detoxifikace kovů tvorbou komplexů je využívána u většiny eukaryot<sup>3</sup> (**Obr. 1**). Nejlepší předpoklad pro takovéto účinky má zejména thiolová skupina aminokyseliny cysteinu a dále pak nukleofilní vlastnosti postranních řetězců aminokyselin jako methionin, histidin nebo tryptofan.

### Cystein

Cystein je v organismu syntetizován z methioninu a serinu, kde je methionin přeměněn na homocystein přes S-adenosylmethionin a S-adenosylcystein<sup>4</sup>. Cystein je jednou ze dvou

neesenciálních sirných aminokyselin, obsahující atom síry ve formě thiolové skupiny, která je umístěna na posledním  $\gamma$ -uhlíku řetězce. Díky tomu má cystein nukleofilní vlastnosti a proto je nevhodnější aminokyselinou pro vazby kovových iontů. Díky redoxním vlastnostem a schopnosti být donorem elektronů je thiolová skupina v cysteinu velmi důležitá při tvorbě strukturních interakcí, přes redoxní katalýzu, hydrolyzu až po možnost vazby kovů, kde se uplatňuje v podobě -S-S- můstků, redoxní katalýzu anebo hydrolyzu (Obr. 2) <sup>5</sup>.



Obr. 1: Schéma detoxikace těžkého kovu v rostlinné buňce

## Methionin

Methionin je druhou ze dvou neesenciálních sirných aminokyselin a oproti cysteinu, jehož je prekurzorem, má méně výrazné kov-vázající vlastnosti, jelikož atom síry se zde nenachází jako snadně přístupná thiolová skupina, ale jako disulfid. Methionin při interakcích s kovy většinou se projevuje jako donor elektronových párů <sup>6</sup>, je to způsobeno odlišným umístěním atomu síry v molekule cysteinu. Síra v methioninu nemůže poskytovat valenční elektron pro potenciální vazbu s kovem, protože oba vazebné valenční elektrony jsou využity pro vazbu s atomem uhlíku v rámci struktury methioninu. Z tohoto důvodu se methionin při interakcích s kovy většinou projevuje v rámci struktury proteinu pouze koordinačními vazbami a to v roli donoru elektronových párů <sup>7</sup>. Methionin

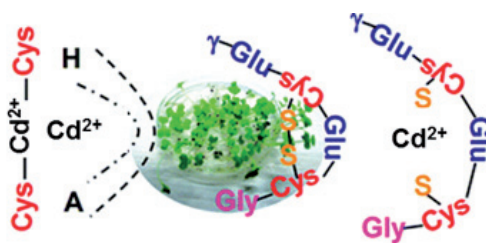
má významný derivát, kterým je homocystein. Molekula homocysteinu neobsahuje methylovou skupinu na atomu síry a proto má dobré možnosti pro vazbu kovu, je analogem cysteinu, obsahující jeden uhlík v řetězci navíc <sup>7</sup>.

## Histidin

Při interakci s kovy využívá koordinačních vlastností aminokyselina histidin, a to díky přítomnosti imidazolového dusíku, který má nukleofilní vlastnosti <sup>8</sup>. Možnost tvorby interakcí kadmia s histidinem byla studována také u

vodních mikroorganismů <sup>9</sup>. Byl také proveden experiment na testování interakce proteinu Cap43 s ionty  $\text{Ni}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{2+}$ , kde každý z kovů byl koordinován histidinem <sup>10</sup>. Histidin může s kovy interagovat více způsoby a to jednak kova-

lentní interakcí vzdálenějšího dusíku nebo elektrostatickou interakcí s volným elektronovým párem dusíku, který přímo sousedí uhlíkem, který spojuje imidazol s alifatickým řetězcem.



Obr. 2: Schéma vazby  $\text{Cd}^{2+}$  + PC2 pomocí -S-S- můstků

## Tryptofan a Fenylalanin

Významnou roli v interakcích hraje tryptofan a fenylalanin. Mezi aminokyseliny, které z chemického hlediska mohou přispívat k interakcím kovů s bílkovinami přes karboxylovou skupi-



nu (-COOH) jsou aminokyseliny asparagová a glutamová<sup>8</sup>, které tak mohou kovy pomocí karboxylové skupiny stabilizovat v dané bílkovině. V případě glycinu byla možnost interakce teoreticky studována intramolekulárně dokonce i v rámci jeho struktury, kdy interagoval jak karboxyl, tak aminoskupina<sup>11</sup>.

## Glutathion

Peptidy jsou krátké aminokyselinové úseky, kde primární struktura je dána sekvencí aminokyselin. A tak lze předpokládat, že interakce s kovem, které jsou ovlivněny složením peptidu, lze také *in vitro* studovat záměnou sousedících aminokyselin s kov-vaznou aminokyselinou. V organismu se vyskytuje více peptidů, které mohou interagovat s kovy. Glutathion (GSH) je jeden z nejdůležitějších peptidů v organismu (rostlinném i živočišném)<sup>12</sup>. Jedna se o tripeptid, který je složen z kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu. Vzhledem k přítomnosti cysteinu v GSH byla možnost vazby s kovem prokázána v literatuře<sup>13</sup>. Glutathion je součástí biochemických procesů, které pomáhají udržovat redoxní rovnováhu organismu pomocí glutathion-askorbátového cyklu<sup>12</sup>. Vazba kovu na cystein v molekule GSH je nejvíce ovlivněna redoxními vlastnostmi daného kovu. Významným enzymem v rámci biochemie GSH je Glutathion S-transferáza (GST), která katalyzuje konjugaci GSH s xenobiotiky (karcinogeny a produkty oxidativního stresu) a tak je umožněna jejich detoxifikace. Zvýšená exprese GST byla zpozorována u pacientů s rakovinou prostaty (CaP) po aplikaci chemoterapie<sup>14</sup>.

## Závěr

Studium interakce aminokyselin s těžkými kovy je stále atraktivní téma a v poslední době se jim věnuje zvýšená pozornost. Metalomika, je vědní obor, který se zabývá systematickým studiem metalomů, interakcí a funkčních spojení kovů a jejich vztahy s geny, proteiny, metabolity a ostatními biomolekulami v živých organizmech a ekosystémech. Metalomika je zaměřena na studium rolí, příjmu, transportu a skladování stopových kovů iontů toxických a esenciálních pro organismus a také pochopení mechanismů životních procesů spojených s

kovy. V současné době transport některých kovů a možnosti vazeb kovů na některé volné aminokyseliny, anebo menší biomolekuly doposud nedostatečně prozkoumané. Výsledky interakce kovů s biomolekulami, jako jsou aminokyseliny, peptidy a bílkoviny jsou důležité pro pochopení obranných mechanismů organismů.

*Tato práce byla financována z projektu NANOLABSYS CZ.1/072.3.00/20.0148*

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

## Literatura

1. Mahadevan, R.; Bond, D.R.; Butler, J.E.; Esteve-Nunez, A.; Coppi, M.V.; Palsson, B.O.; Schilling, C.H.; Lovley, D.R. Characterization of metabolism in the Fe(III)-reducing organism *Geobacter sulfurreducens* by constraint-based modeling. *Appl Environ Microbiol.* 2006, 72, 1558-1568.
2. Silver, S.; Phung, L.T. Bacterial heavy metal resistance: New surprises. *Annual Review of Microbiology.* 1996, 50, 753-789.
3. Hall, J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot.* 2002, 53, 1-11.
4. Toohey, J.I. Sulfur Amino Acids in Diet-induced Fatty Liver: A New Perspective Based on Recent Findings. *Molecules.* 2014, 19, 8334-8349.
5. Giles, N.M.; Giles, G.I.; Jacob, C. Multiple roles of cysteine in biocatalysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 300, 1-4.
6. Zenk, M.H.; Juenger, M. Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry.* 2007, 68, 2757-2772.
7. Bridges, C.C.; Zalups, R.K. Homocysteine, system b<sub>0</sub>,+ and the renal epithelial transport and toxicity of inorganic mercury. *Am J Pathol.* 2004, 165, 1385-1394.
8. Appleton, T.G.; Hall, J.R.; Prenzler, P.D.; Ross, F.B. Complexes of Peptides and related molecules with diammine Platinum-II models for platinum protein interactions. *Anti-Cancer Drug Design.* 1991, 6, 262-263.
9. Pokrovsky, O.S.; Martinez, R.E.; Golubev, S.V.; Kompantseva, E.I.; Shirokova, L.S. Adsorption of metals and protons on *Gloeocapsa* sp cyanobacteria: A surface speciation approach. *Applied Geochemistry.* 2008, 23, 2574-2588.
10. Zoroddu, M.A.; Medici, S.; Peana, M.; Kowalik-

Jankowska, T.; Kozłowski, H. Interaction of Cap43 Protein Fragments with Ni(II) and Cu(II), Medimond S R L, 40128 Bologna, 2008.

11. Hoyau, S.; Ohanessian, G. Interaction of alkali metal cations (Li<sup>+</sup>-Cs<sup>+</sup>) with glycine in the gas phase: A theoretical study. *Chemistry-a European Journal*. 1998, 4, 1561-1569.
12. Noctor, G.; Queval, G.; Mhamdi, A.; Chaouch, S.; Foyer, C.H. Glutathione. *Arabidopsis Book*. 2011, 9, 18.
13. Cobbett, C.S. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol*. 2000, 123, 825-832.
14. Chen, R.; Ren, S.; Meng, T.; Aguilar, J.; Sun, Y. Impact of glutathione-S-transferases (GST) polymorphisms and hypermethylation of relevant genes on risk of prostate cancer biochemical recurrence: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013, 8.



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons

(BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

## Antioxidační enzymy - biochemické markery oxidačního stresu

Martina Matoušková<sup>a</sup>, Branislav Ruttkay-Nedecký<sup>a,b</sup>, René Kizek<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

### Antioxidant enzymes – biochemical markers of oxidative stress

Oxidative stress is the imbalance between the oxygen radicals and antioxidant defence system of the organism and leads to cell damage. Antioxidant enzymes are an important part of the defense against oxidative stress and the crucial ones are superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase. Superoxide dismutase catalyses the conversion of superoxide to hydrogen peroxide, which can be further degraded by catalase to oxygen and water. Peroxidases are enzymes catalysing the reduction of the number of peroxides to alcohols. Glutathione peroxidases are selenium dependent enzymes using reduced glutathione (GSH) as a cofactor. They catalyze the conversion of hydrogen peroxide to water while the reduced glutathione is oxidized. The GSH is then being renewed by the activity of glutathione reductase, another antioxidative enzyme that reduces oxidized glutathione (GSSG) to GSH.

**Přijato k publikování:** 10. 8. 2014

**Klíčová slova:** antioxidační enzymy; glutathion peroxidáza; glutathion reductáza; kataláza; oxidační stres; superoxid dismutáza

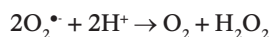
### Úvod

Oxidační stres představuje nerovnováhu mezi kyslíkovými radikály a antioxidační obranou organismu a vede k poškození buněk. Antioxidační enzymy jsou důležitou součástí obrany vůči oxidačnímu stresu a mezi nedůležitější z nich patří superoxid dismutáza, kataláza, glutathion peroxidáza a glutathion reductáza.

### Superoxid dismutáza (SOD)

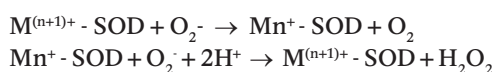
#### Formy SOD a mechanismus účinku

Jedním z hlavních antioxidačních enzymů je superoxid dismutáza – SOD, katalyzující přeměnu superoxidu na peroxid vodíku, který může být dále rozkládán katalázou. Superoxidový aniont má oxidační i redukční vlastnosti. Podléhá dismutaci, při které jedna jeho molekula poskytuje elektron druhé, takže superoxid se zároveň oxiduje i redukuje. Produkty reakce jsou kyslík a peroxid vodíku:



Přestože ve vodném prostředí tahle reakce probíhá, v biologických systémech je ještě

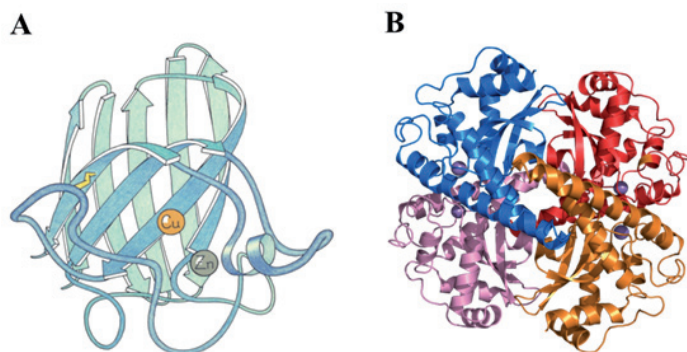
urychlována enzymem SOD<sup>1</sup>, který katalyzuje proces přeměny superoxidu ( $\text{O}_2^{\bullet}$ ) na peroxid vodíku (který je méně agresivní sloučenina) a kyslík podle následujících reakcí:



Kde  $\text{M} = \text{Cu}$  ( $n = 1$ ) anebo  $\text{Mn}$  ( $n = 2$ ). U lidí (a jiných savců) existují tři formy SOD. SOD1 se nachází v cytoplazmě, SOD2 v mitochondriích a SOD3 v extracelulárním prostoru. SOD1 a SOD3 obsahují měď a zinek (**Obr. 1A**), zatímco SOD2 (**Obr. 1B**) obsahuje mangan. Superoxid dismutáza přispívá ke snížení oxidačního stresu a tím zabraňuje poškození DNA, RNA, proteinů a lipidů<sup>2</sup>.

### Metody stanovení SOD

Ke stanovení aktivity SOD se používají metody nepřímé, které jsou spojeny se schopností SOD inhibovat reakce řízené superoxidy. Měření inhibice produkce superoxidů způsobené SOD slouží ke stanovení její aktivity<sup>5</sup>.



**Obr.1:** A) struktura podjednotky Cu-Zn SOD1 izolované z hovězích erytrocytů<sup>3</sup> B) struktura lidské mitochondriální Mn SOD2<sup>4</sup>

### Metody se skládají ze tří kroků:

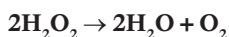
1. Produkce superoxidů: K produkci superoxidů se nejčastěji používá reakce xantinu s xantin oxygenázou, NADH (NADPH) s phenazin methosulfátem či jiné systémy.
2. Detekce superoxidů: Jako detektory superoxidů se nejčastěji používají nitrobluete-trazolium (NBT), cytochrom c, pyrogallol, 6-hydroxydopamin a další chromogenní substráty, které po reakci se superoxidy vytvářejí barevné produkty, jež jsou spektrofotometricky měřeny<sup>6,7</sup>.
3. Inhibice reakcí řízených superoxidy: SOD mají schopnost reagovat se superoxidy, čímž dochází k inhibici přeměny chromogenních substrátů na jejich barevné produkty.

## Kataláza

### Mechanismus účinku

Enzym kataláza (EC 1.11.1.6., KAT) katalyzuje heterolytické štěpení dvou molekul peroxidu vodíku za vzniku kyslíku a vody<sup>8</sup>. Pro všechny dosud známé katalázy je společná základní reakce dismutace peroxidu vodíku podle reakčního schématu:

#### KAT



Kataláza je enzym schopný kromě redukce, i oxidace peroxidu vodíku, čímž se podstatně liší od peroxidáz (E.C. 1.11.1.5.), které dovedou

$\text{H}_2\text{O}_2$  pouze redukovat za současné oxidace sekundárního substrátu, kterým mohou být (pro buňky toxické) objemnější molekuly fenolických sloučenin<sup>9</sup>.

Kataláza se vyskytuje u téměř všech organismů s aerobním metabolismem. Její hlavní fyziologická role tkví v ochranné funkci buněk před mimořádně reaktivními molekulami s peroxidickou vazbou, které vznikají jako vedlejší produkty katabolismu. V buňkách eukaryotů je kataláza typic-

kým markerem subcelulárních organel, známých jako peroxisomy<sup>10,11</sup>. Peroxisomy obsahují charakteristické anabolické systémy, jako například  $\beta$ -oxidační systém mastných kyselin. Účinkem peroxisomálních oxidáz vzniká značné množství peroxidu vodíku, který je odstraňován působením peroxisomální katalázy<sup>12</sup>.

Katalázy a peroxidázy představují esenciální výbavu buněk při překonávání škodlivých účinků oxidačního stresu<sup>13</sup>. Podle novějších výzkumů katalázy účinkují u většiny pro- a eukaryotů v přímé součinnosti se superoxid dismutázami, které chrání před inaktivací vyššími koncentracemi peroxidu vodíku<sup>14</sup>.

### Metoda stanovení katalázy

Metody stanovení katalázy jsou založeny na sledování rozkladu peroxidu vodíku působením kataláz. Tento rozklad je měřen jako pokles absorbance  $\text{H}_2\text{O}_2$  při 240 nm. Většina sledovaných metod vychází z metody vyvinuté dle Aebi et al<sup>15</sup>. Metoda byla optimalizována pro jaterní tkáň modelových ptáků – křepelek japonských (*Coturnix japonica*) a savců – potkanů (*Rattus norvegicus var. alba*). Metoda je založena na schopnosti kataláz rozkládat peroxid vodíku na vodu a kyslík. Tento rozklad je sledován měřením poklesu absorbance směsi vzorku s  $\text{H}_2\text{O}_2$  v mikrokyvetách při 240 nm<sup>15</sup>.

## Glutathion peroxidáza (GPx)

### Formy GPx a mechanismus účinku

Intracelulární peroxidy vodíku (hydroperoxydy) jsou odstraňovány glutathionperoxidázou (GPx). Glutathion (GSH), je jedním z nejvýznamnějších činitelů antioxidantního obranného systému buňky, jelikož ve spojení s enzymy, glutathion peroxidázou (GPx) a glutathion-S-transferázou pí (GSTpi), hraje ústřední roli v detoxikaci a biotransformaci chemoterapeutických léčiv<sup>16</sup>.

Peroxidázy jsou enzymy katalyzující redukcí mnoha peroxidů na alkoholy. Glutathion peroxidázy jsou selen-dependentní cytosolové enzymy, používající GSH jako kofaktor. Katalyzují přeměnu peroxidu vodíku na vodu a zároveň oxidaci redukovaného glutathionu (GSH) na jeho oxidovanou formu (GSSG). GPx hrají důležitou roli v ochraně membrán před jejich lipidovou peroxidací<sup>17</sup> Produkty této reakce jsou příslušné alkoholy a voda:

#### GPx



V současné době jsou známy 4 různé glutathion peroxidázy: cytosolová (GPx-1), gastrointestinální (GPx-2), plasmatická (GPx-3) a fosfolipid hydroperoxidová (GPx-4)<sup>18</sup>. Všechny odstraňují peroxidy pomocí redukovaného glutathionu (GSH), a proto mají antioxidantní funkci. Liší se svou lokalizací a substrátovou specifitou. Všechny GPx s výjimkou GPx-4 se skládají ze čtyř řetězců a v každém je jeden selenocystein<sup>19</sup>.

### Metoda stanovení GPx

Aktivita glutathion peroxidázy (GPx) je stanovena na základě měření míry úbytku NADPH v čase reakcí využívající redukovaného glutathionu GSH jako substrátu. Ten je za účasti GPx přeměněn na GSSG. GSSG je okamžitě a nepřetržitě redukováno přebytkem aktivity glutathion reductázy (GR), která tak zajišťuje konstantní hladinu GSH. GSSG za účasti GR reaguje s NADPH, čímž dochází k jeho úbytku a ten je měřen<sup>6</sup>. Metoda je modifikovaná na mikrodestičkové provedení a využívá spektrofotometrické koncovky při 340 nm.

Reakce je znázorněna v následujících rovnicích:

#### GPx



#### GR



## Glutathion reductáza (GR)

### Mechanismus účinku

Glutathion peroxidáza (GPx) existuje ve dvou formách: selen-dependentní a selen-independenční. Se-dependentní GPx katalyzuje oxidaci glutathionu (GSH) na jeho oxidovanou formu (GSSG) v přítomnosti  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Zpětnou redukcí GSSG na GSH zabezpečuje glutathion reductáza (GR), která tak udržuje v buňkách fyziologický poměr GSH/GSSG (10:1).

### Metoda stanovení GR

Glutathion reductáza katalyzuje přeměnu oxidovaného glutathionu (GSSG) na redukovaný glutathion (GSH) za spotřeby NADPH. Aktivita glutathion reductázy je stanovována na základě úbytku množství NADPH v reakci. Metoda je modifikovaná na mikrodestičkové provedení a využívá spektrofotometrické koncovky při 340 nm<sup>20</sup>.

#### GR



## Závěr

V přehledovém článku byly popsány nejdůležitější antioxidantní enzymy, jejich různé formy, místa a mechanismy jejich účinku a principy metod jejich stanovení.

*Tato práce byla financována z projektu NANOLABSYS CZ.1/072.3.00/20.0148.*

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.



## Literatura

- Paoletti, F.; Aldinucci, D.; Mocali, A.; Caparrini, A. A SENSITIVE SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF SUPEROXIDE-DISMUTASE ACTIVITY IN TISSUE-EXTRACTS. *Analytical Biochemistry*. 1986, 154, 536-541.
- Skalicka, Z.F.; Zolzer, F.; Beranek, L.; Racek, J. Indicators of oxidative stress after ionizing and/or non-ionizing radiation: Superoxid dismutase and malondialdehyde. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*. 2012, 117, 111-114.
- Tainer, J.A.; Getzoff, E.D.; Beem, K.M.; Richardson, J.S.; Richardson, D.C. DETERMINATION AND ANALYSIS OF THE 2A STRUCTURE OF COPPER, ZINC SUPEROXIDE-DISMUTASE. *Journal of Molecular Biology*. 1982, 160, 181-217.
- Borgstahl, G.E.O.; Parge, H.E.; Hickey, M.J.; Johnson, M.J.; Boissinot, M.; Hallewell, R.A.; Lepock, J.R.; Cabelli, D.E.; Tainer, J.A. Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface. *Biochemistry*. 1996, 35, 4287-4297.
- Paoletti, F.; Mocali, A. DETERMINATION OF SUPEROXIDE-DISMUTASE ACTIVITY BY PURELY CHEMICAL-SYSTEM BASED ON NAD(P)H OXIDATION. *Methods in Enzymology*. 1990, 186, 209-220.
- Tarhan, L.; Tuzmen, M.N. Some properties of Cu, Zn-superoxide dismutase from sheep erythrocyte. *Turkish Journal of Chemistry*. 2000, 24, 109-116.
- Flohe, L.; Gunzler, W.A. ASSAYS OF GLUTATHIONE-PEROXIDASE. *Methods in Enzymology*. 1984, 105, 114-121.
- Chance, B. THE EFFECT OF PH UPON THE EQUILIBRIA OF CATALASE COMPOUNDS. *Journal of Biological Chemistry*. 1952, 194, 483-496.
- Barr, D.P.; Aust, S.D. ON THE MECHANISM OF PEROXIDASE-CATALYZED OXYGEN PRODUCTION. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993, 303, 377-382.
- Masters, C.; Crane, D. The peroxisome: A vital organelle, Cambridge University Press, The Pitt Building, Trumpington Street, Cambridge CB2 1RP, England; Cambridge University Press, 40 W. 20th Street, New York, New York 10011-4211, USA, 1995.
- McCammon, M.T.; Veenhuis, M.; Trapp, S.B.; Goodman, J.M. ASSOCIATION OF GLYOXYLATE AND BETA-OXIDATION ENZYMES WITH PEROXISOMES OF SACCHAROMYCES-CEREVISIAE. *Journal of Bacteriology*. 1990, 172, 5816-5827.
- Binder, M.; Schanz, M.; Hartig, A. VECTOR-MEDIATED OVEREXPRESSION OF CATALASE-A IN THE YEAST SACCHAROMYCES CEREVISIAE INDUCES INCLUSION BODY FORMATION. *European Journal of Cell Biology*. 1991, 54, 305-312.
- Schellhorn, H.E. REGULATION OF HYDROPEROXIDASE (CATALASE) EXPRESSION IN ESCHERICHIA-COLI. *Fems Microbiology Letters*. 1995, 131, 113-119.
- Fridovich, I. SUPEROXIDE RADICAL AND SUPEROXIDE DISMUTASES. *Annual Review of Biochemistry*. 1995, 64, 97-112.
- Aebi, H. CATALASE INVITRO. *Methods in Enzymology*. 1984, 105, 121-126.
- Leonel, C.; Gelaleti, G.B.; Jardim, B.V.; Moschetta, M.G.; Regiani, V.R.; Oliveira, J.G.; Zuccari, D. Expression of glutathione, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase pi in canine mammary tumors. *Bmc Veterinary Research*. 2014, 10.
- van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2003, 13, 57-149.
- Arthur, J.R.; Bermano, G.; Mitchell, J.H.; Hesketh, J.E. Regulation of selenoprotein gene expression and thyroid hormone metabolism. *Biochemical Society Transactions*. 1996, 24, 384-388.
- Burk, R.F.; Hill, K.E.; Motley, A.K. Selenoprotein metabolism and function: Evidence for more than one function for selenoprotein P. *Journal of Nutrition*. 2003, 133, 1517S-1520S.
- Carlberg, I.; Mannervik, B. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF FLAVOENZYME GLUTATHIONE REDUCTASE FROM RAT-LIVER. *Journal of Biological Chemistry*. 1975, 250, 5475-5480.



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

## Studium interakce kvantových teček s nádorovými buňkami pomocí fluorescenční mikroskopie

Iva Blažková<sup>a</sup>, Pavel Kopel<sup>a,b</sup>, Markéta Vaculovičová<sup>a,b</sup>, Vojtěch Adam<sup>a,b</sup>, René Kizek<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

### Study of the interaction of quantum dots with tumor cells by fluorescence microscopy

This review is aimed on the interaction of quantum dots with tumor cells by fluorescence microscopy, we analyze the possibilities of the usage of QDs in tumor cell detection and visualization by fluorescence microscopy. QDs are fluorescent nanoparticles with good fluorescence properties. Specifically modified QDs can be targeted to the tumor tissue. QDs can be modified by antibodies, proteins, carbohydrates etc. For the use of QDs in biological applications, their solubility in water, stability and biocompatibility is important. Fluorescence microscopy is a good tool to observe interaction of QDs with cells and enable direct differentiation of normal and tumor cells.

**Přijato k publikování:** 11. 8. 2014

**Klíčová slova:** buňky; fluorescence; kvantové tečky; mikroskopie

### Úvod

Ačkoli jsou velké pokroky v diagnostice a léčbě nádorových onemocnění, časná detekce nádorového bujení je stále problematická. Kvantové tečky (QDs) jsou nanočástice, jež mají výborné fotoluminiscenční vlastnosti a skrývají velký potenciál pro využití v detekci nádorových onemocnění a další biomedicínské aplikace. Jejich široké absorpční spektrum a úzké emisní spektrum je činí výbornými fluorescenčními značkami<sup>1</sup>. Fluorescenční vlastnosti QDs mohou být úspěšně využity k zobrazování nádorových buněk i k *in situ* vyšetřování nádorové tkáně<sup>2</sup>. Výhodou zobrazovacích metod je především neinvazivní vyšetření tkáně<sup>3</sup>.

Ke studiu interakce různě modifikovaných QDs s buňkami je nejčastěji užívána fluorescenční mikroskopie<sup>4</sup>. Intravitální mikroskopie se v posledních několika desetiletích stává stále populárnější, protože poskytuje informace o komplexních biologických procesech v reálném čase a vysokém rozlišení. Technologické pokroky, které umožňují proniknutí hluboko do živých tkání, představuje například vývoj konfokální a dvoufotonové mikroskopie.

K tomu se přidává studium nových fluoroforů, které umožní jasné značení buněk a tkání a tím umožní efektivní zobrazování<sup>5</sup>. Fluorescenční mikroskopie může být využita ke studiu vnitřních struktur buněk, transkripční aktivity, lokalizace interakcí a stability proteinů a celé řady dějů v buňkách<sup>6</sup>.

QDs mohou být svázány s různými nanočásticemi, které zajistí jejich zacílení do nádorových buněk<sup>7</sup>. K tomu, aby mohly být QDs užívány jako fluorescenční značky v medicíně je důležitá jejich rozpustnost ve vodě, vysoká biokompatibilita a dobré fluorescenční vlastnosti, které umožní jejich detekci i hluboko v tkáni. QDs emitující v oblasti infračerveného záření lépe pronikají tkání a jsou tedy pro biologické aplikace vhodnější. Kvantové tečky vykazují oproti organickým fluoroforům lepší fotostabilitu. CdTe QDs modifikované merkaptopropionovou kyselinou (MPA) s emisním maximem 640 nm vykazovaly v porovnání s rhodaminem 6G, po 200 minutách působení laserového paprsku (526 nm) jen o 5 % nižší intenzitu fluorescence, zatímco v případě rhodaminu byl pokles 50 %<sup>8</sup>. Toxicita QDs může být snížena jejich

povrchovou modifikací, například pokrytím L-cysteinem nebo manózou<sup>8</sup>. K tomu, aby mohly být QDs použity k léčbě nádorových onemocnění je nutná jejich funkcionalizace (protilátky, protein G, kyselina listová), aby došlo k zacílení léčiva do nádorové tkáně<sup>8</sup>. Také bylo zjištěno, že CdSe QDs vykazují inhibiční efekt vůči ROCK (Rho asociované kináze) v nádorových buňkách karcinomu děložního hrdla a tím tlumí progresi nádoru<sup>9</sup>.

QDs mohou být povrchově modifikovány polyethylenglykolem (PEG), který snižuje jejich cytotoxicitu a genotoxicitu a zajistí vyšší biokompatibilitu<sup>10</sup>. QDs se 40% pokryvem vykazovaly nejlepší vlastnosti, byla u nich pozorována dobrá disperze ve vodě, nízká tvorba agregátů a výborná fluorescence<sup>11</sup>. VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) je exprimován některými nádorovými buňkami za účelem angiogeneze a výživy nádoru<sup>12</sup>. Těto schopnosti nádorových buněk využili Sun et al. k zacílení QDs na jaterní nádorové buňky HepG2, které exprimují VEGF. Po navázání anti-VEGF na QDs, byla pozorována pomocí fluorescenční mikroskopie podstatně vyšší akumulace těchto QDs v nádorových jaterních buňkách, nežli v buňkách VEGF neexprimujících<sup>11</sup>. CdTe QDs funkcionalizované  $\beta$ -Cyclodextrinem ( $\beta$ -CD) pro detekci amantadinu (AD) se po inkubaci s HepG2 buňkami koncentrují v cytoplazmě buněk a mohou sloužit jako biomarker AD v nádorových buňkách. AD je antivirotikum používané především proti chřipkovému viru A a dále také pro léčbu Parkinsonovy nemoci<sup>13</sup>. Detekce je založena na fluorescenčním rezonančním přenosu energie (FRET) mezi QDs a rhodaminem. Rhodamin může vstupovat do dutiny cyklodextrinu a tím může docházet k FRET, pokud toto místo obsadí AD, FRET nenastává<sup>14</sup>.

## Funkcionalizace QDs

K zobrazování, cílení a třídění buněk lze použít QDs vázané s magnetickými částicemi<sup>15</sup>. Tyto částice mohou být dále za účelem vyšší biokompatibility pokryty PEG s karboxylovými, nebo aminovými skupinami (amino PEG). Bylo pozorováno, že patnáct dní po aplikaci QDs s amino PEG byla pozorována značná

akumulace v játrech, slezině a ledvinách a nebyla detekována významná toxicita. Po vazbě s kyselinou listovou bylo pozorováno specifické zacílení do HeLa buněk<sup>16</sup>. Toxicita QDs může být snížena konjugací se sacharidy pomocí thioglykolové kyseliny. Použití sacharidů může také umožnit zacílení do nádorových buněk<sup>17</sup>. Po pokrytí CdSe QDs D-manózou (QDs-Man), byla pozorována výrazná endocytóza QDs-Man HepG2 buňkami přes jejich manózové receptory. Takto modifikované QDs by mohly sloužit k detekci jaterních nádorových buněk<sup>18</sup>.

K cílení do nádorové tkáně může být použit peptid RGD, který vykazuje vysokou afinitu k  $\alpha\beta 3$  integrinu, jenž bývá exprimován v nádorových buňkách<sup>19</sup>. Sonda tvořená CdTe QDs konjugovanými s RGD (arginin-glycin-asparagová kyselina) a <sup>188</sup>Re může být použita k detekci nádoru pomocí fluorescenčního zobrazování a k zacílení radioaktivního <sup>188</sup>Re do nádorové tkáně (radioterapie). Tím umožňuje jak zobrazování, tak léčbu postižené tkáně. Tato sonda se dobře váže na lidské gliové buňky U87MG, které vykazují vysokou afinitu k RGD. Byl detekován nárůst koncentrace sondy v gliových buňkách s prodlužující se inkubační dobou. Po 6 hodinové inkubaci bylo detekováno, z aplikovaného množství 87,3 % v nádorových buňkách<sup>20</sup>. CdTe QDs mohou být použity také jako fotosenzitivní látka ve fotodynamické terapii, což potvrdila in vitro fotodynamická terapie leukemických nádorových buněk (HL 60)<sup>21</sup>.

QDs díky svým dobrým fluorescenčním vlastnostem mají velký potenciál v detekci nádorových buněk a dalších biologických aplikacích. Po jejich zacílení specifickými protilátkami, proteiny, sacharidy, atd. mohou být úspěšně dopraveny do nádorových buněk a tím úspěšně odlišeny od zdravé tkáně. Fluorescenční mikroskopie umožňuje detekci QDs v buňkách a proto je výborným nástrojem pro studium zacílení QDs do buněk.

*Tato práce byla financována z projektu NANOLABSYS CZ.1.07/2.3.00/20.0148.*

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, pro-

ducts, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

## Literatura

- Hong, L.; Wang, Z.; Yuan, L.; Tan, J.H.; Wang, L.X.; Qu, G.B.; Zhang, D.Q.; Lin, R.H.; Liu, S.J. Subcellular Distribution of CdSe Quantum Dots (QDs) in Breast Cancer Cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2012, 12, 365-367.
- Hu, W.Q.; Fang, M.; Zhao, H.L.; Yan, S.G.; Yuan, J.P.; Peng, C.W.; Yang, G.F.; Li, Y.; Li, J.D. Tumor invasion unit in gastric cancer revealed by QDs-based in situ molecular imaging and multispectral analysis. *Biomaterials*. 2014, 35, 4125-4132.
- Qu, L.Z.; Deng, D.W.; Wang, J.; Gu, Y.Q. DOX-CONJUGATED HIGH-QUALITY AgZnInS QDs FOR REVERSAL OF MULTIDRUG RESISTANCE. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. 2014, 7.
- Shibu, E.S.; Ono, K.; Sugino, S.; Nishioka, A.; Yasuda, A.; Shigeri, Y.; Wakida, S.; Sawada, M.; Biju, V. Photouncaging Nanoparticles for MRI and Fluorescence Imaging in Vitro and in Vivo. *Acs Nano*. 2013, 7, 9851-9859.
- Progatzky, F.; Dallman, M.J.; Lo Celso, C. From seeing to believing: labelling strategies for in vivo cell-tracking experiments. *Interface Focus*. 2013, 3.
- Shapiro, L.; McAdams, H.H.; Losick, R. Why and How Bacteria Localize Proteins. *Science*. 2009, 326, 1225-1228.
- Ou, J.; Wang, F.; Huang, Y.J.; Li, D.S.; Jiang, Y.M.; Qin, Q.H.; Stachurski, Z.H.; Tricoli, A.; Zhang, T.N. Fabrication and cyto-compatibility of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/graphene-CdTe QDs/CS nanocomposites for drug delivery. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2014, 117, 466-472.
- Gallo, J.; Garcia, I.; Genicio, N.; Penades, S. CdTe-Based QDs: Preparation, Cytotoxicity, and Tumor Cell Death by Targeting Transferrin Receptor. *Particle & Particle Systems Characterization*. 2014, 31, 126-133.
- Chen, L.Q.; Qu, G.B.; Zhang, C.W.; Zhang, S.P.; He, J.Y.; Sang, N.; Liu, S.J. Quantum dots (QDs) restrain human cervical carcinoma HeLa cell proliferation through inhibition of the ROCK-c-Myc signaling. *Integrative Biology*. 2013, 5, 590-596.
- Ju, L.; Zhang, G.L.; Zhang, C.; Sun, L.; Jiang, Y.; Yan, C.L.; Duerksen-Hughes, P.J.; Zhang, X.; Zhu, X.Q.; Chen, F.F.; Yang, J. Quantum dot-related genotoxicity perturbation can be attenuated by PEG encapsulation. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2013, 753, 54-64.
- Sun, T.; Li, K.; Li, Y.P.; Li, C.J.; Zhao, W.O.; Chen, L.; Chang, Y.L. Optimizing conditions for encapsulation of QDs by varying PEG chain density of amphiphilic centipede-like copolymer coating and exploration of QDs probes for tumor cell targeting and tracking. *New Journal of Chemistry*. 2012, 36, 2383-2391.
- Wang, Y.; Cho, S.G.; Wu, X.; Siwko, S.; Liu, M. G-Protein Coupled Receptor 124 (GPR124) in Endothelial Cells Regulates Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Induced Tumor Angiogenesis. *Current Molecular Medicine*. 2014, 14, 543-554.
- Arakelyan, R.K.; Nerobkova, L.N.; Katunina, E.A.; Valdman, E.A.; Kapitsa, I.G.; Voronina, T.A.; Avakyan, G.N.; Gusev, E.I. Functional brain activity in patients with Parkinson's disease during amantadin-sulfate therapy. *Zhurnal Nevrologii I Psikiatrii Imeni S S Korsakova*. 2005, 105, 17-21.
- Ai, X.Z.; Niu, L.; Li, Y.Y.; Yang, F.P.; Su, X.G. A novel beta-Cyclodextrin-QDs optical biosensor for the determination of amantadine and its application in cell imaging. *Talanta*. 2012, 99, 409-414.
- Ahmed, S.R.; Dong, J.H.; Yui, M.; Kato, T.; Lee, J.; Park, E.Y. Quantum dots incorporated magnetic nanoparticles for imaging colon carcinoma cells. *Journal of Nanobiotechnology*. 2013, 11.
- Singh, N.; Charan, S.; Sanjiv, K.; Huang, S.H.; Hsiao, Y.C.; Kuo, C.W.; Chien, F.C.; Lee, T.C.; Chen, P.L. Synthesis of Tunable and Multifunctional Ni-Doped Near-Infrared QDs for Cancer Cell Targeting and Cellular Sorting. *Bioconjugate Chemistry*. 2012, 23, 421-430.
- Kikkeri, R.; Lepenies, B.; Adibekian, A.; Laurino, P.; Seeberger, P.H. In Vitro Imaging and in Vivo Liver Targeting with Carbohydrate Capped Quantum Dots. *Journal of the American Chemical Society*. 2009, 131, 2110-+.
- Jiang, M.X.; Chen, Y.; Kai, G.Q.; Wang, R.J.; Cui, H.L.; Hu, M.L. Preparation of CdSe QDs-carbohydrate Conjugation and its Application for HepG2 Cells Labeling. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2012, 33, 571-574.
- Temming, K.; Schiffelers, R.M.; Molema, G.; Kok, R.J. RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature. *Drug Resistance Updates*. 2005, 8, 381-402.
- Li, Z.; Zhang, G.X.; Shen, H.; Zhang, L.; Wang, Y.X. Synthesis and cell uptake of a novel dualmodality Re-188-HGRGD (D) F-CdTe QDs probe. *Talanta*. 2011, 85, 936-942.
- Wang, J.; Chen, L.; Jiang, F.; Xiong, J.W. Experimental Resarch of Destruction of Leukemia Tumor Cells HL60 by QDs-CdTe-based PDT Combined with Antibiotics in Vitro, in: B. Tan (Ed.), *Future Materials Engineering and Industry Application*, Trans Tech Publications Ltd, Stafa-Zurich, 2012, pp. 205-208.



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.



## Analýza programované buněčné smrti průtokovou cytometrií

Jan Balvan<sup>a,b</sup>, Martina Raudenská<sup>a</sup>, Michal Masařík<sup>a,b</sup>, René Kizek<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> Ústav patologické fyziologie, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

<sup>c</sup> Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

### Flow-cytometric analysis of programmed cell death

Programmed cell death (PCD) is a crucial process required for the normal development and physiology of metazoans. The three major mechanisms that induce PCD are called type I (apoptosis), type II (autophagic cell death), and type III (necrotic cell death). Dysfunctional PCD leads to diseases such as cancer and neurodegeneration. Although apoptosis is the most common form of PCD, recent studies have provided evidence that there are other forms of cell death. The high majority of classical apoptotic hallmarks can be rapidly examined by flow cytometry. Cytometry thus became a technology of choice in diverse studies of cellular demise. A large variety of cytometric methods designed to identify apoptotic cells and probe mechanisms associated with this mode of cell demise have been developed during the past two decades.

**Přijato k publikování:** 11. 8. 2014

**Klíčová slova:** Apoptóza; autofágie; nekróza; průtoková cytometrie; viabilita

### Úvod

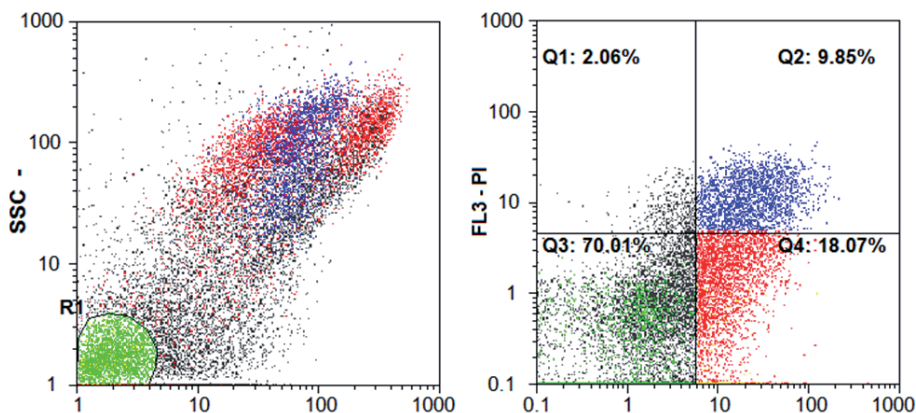
Programovaná buněčná smrt hraje významnou roli ve vývoji organismu, v udržování homeostázy a v odpovědi organismu na chemoterapii. Při analýze cytotoxicity různých testovaných látek je velmi důležité rozlišit mezi jednotlivými typy programované buněčné smrti. Programovaná buněčná smrt je v současné době dělena do tří hlavních kategorií. Typ I (apoptóza), typ II (autofágie) a typ III (nekroza) <sup>1,2</sup>. Poruchy v procesech programované buněčné smrti vedou k rozvoji nádorových onemocnění, onemocnění kardiovaskulárního systému a neurodegenerativních změn<sup>3</sup>. V současné době existuje mnoho metod stanovení jednotlivých typů buněčné smrti, klasickými biochemickými a molekulárně biologickými metodami počínaje (western blot, qRT-PCR) a moderními mikroskopickými metodami konče (transmisní elektronová, fázová a fluorescenční mikroskopie). Pro kvantifikaci jednotlivých druhů buněčné smrti ve sledované populaci buněk je však metodou číslo jedna průtoková cytometrie <sup>3</sup>.

### Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je cytologická metoda založená na měření a následné analýze fyzikálních charakteristik vyšetřovaných částic unášených nosnou kapalinou a interagujících se světelným zářením <sup>4</sup>. Základními analyzovanými veličinami jsou velikost částic, denzita jejich vnitřního obsahu (granularita) a intenzita fluorescence. Analyzovaný vzorek je vnášen do kapiláry s laminárně proudící kapalinou, kde je pomocí hydrodynamické isofokusace zajišťována stabilní pozice a rychlost zkoumaných částic. Ke stanovení dochází v měřicí komoře při interakci buněk s laserovým paprskem. Detekované částice prochází kapilárou a kříží laserový paprsek. Přitom dochází k rozptýlení paprsku. V úhlu do 20° proti ose paprsku je snímán tzv. Forward scatter (FSC), který přibližně odpovídá velikosti částic. V úhlu 90° proti ose světelného paprsku je snímán tzv. Sideward scatter (SSC), který odráží spíše vnitřní strukturovanost a granularitu částice. Po průchodu komorou jsou buňkám přiřazeny naměřené hodnoty a tato data jsou uložena k dalšímu zpracování. Analyzovaný materiál musí být připraven ve formě suspenze částic, které jsou



menší než průměr trysky v měřicí komoře průtokového cytometru. Možnosti analýzy mohou být dále rozšířeny několika kanály pro snímání fluorescence (viz Obr. 1, FL1 a FL3) <sup>5</sup>.



**Obr. 1:** Histogram zachycující procentuální zastoupení jednotlivých typů buněčné smrti v buněčné populaci (barvení annexinem V a PI) Q1: Buněčné fragmenty a enukleovaná jádra pozitivní na PI, negativní na annexin; Q2: Nekrotické buňky pozitivní jak na PI tak i na annexin; Q3 viabilní buňky negativní na obě barviva; Q4 apoptotické buňky negativní na PI, pozitivní na alexin

### Průtokový cytometr se skládá ze tří až čtyř celků.

1. Optický systém je složený ze zdroje záření (různé typy laserů, UV lampa) sloužícího k měření v rovině procházejícího světla (FSC) a odraženého světla (SSC), aktivaci fluorochromu a optické cesty zrcadel a filtrů směřujících signál na příslušné detektory.
2. Systém fluidiky slouží k transportu analyzované částice do měřicí komory.
3. Výpočetní systém umožňuje nastavení různých parametrů cytometru a převádí světelný signál na signál elektrický. Skládá se z analog-digitálního převodníku a modulu zobrazení. Používá se k analýze a archivaci naměřených hodnot.
4. Sortovací modul bývá součástí pouze specializovaných cytometrů. Sortování umožňuje oddělení určité zájmové populace z analyzovaného vzorku.

### Apoptóza a nekróza

Apoptóza je geneticky přísně regulovaný druh buněčné smrti spojený s četnými typickými biochemickými a morfologickými změnami

buněčné architektury <sup>6</sup>. Důsledkem tohoto procesu není jen smrt buňky, ale také účinné odstranění mrtvých buněk a jejich částí (apoptotických tělísek) fagocytujícími buňkami<sup>1</sup>. Mezi typické charakteristiky apoptotických buněk patří smrštění buněčné membrány, „blebbing“ membrány, ztráta kontaktu s extracelulární matrix, kondenzace chromatinu, fragmentace DNA, externalizace fosfatidylserinů (PS) z vnitřní na vnější vrstvu buněčné membrány a aktivace kaspáz <sup>3</sup>. Mnoho proteinů zabezpečujících mezibuněčné spoje patří mezi substráty kaspáz, stejně jako proteiny poutající buňku k extracelulární matrix. Během apoptózy proto dochází k přestavbě cytoskeletu <sup>2</sup>. Důsledkem není jen zakulacení buněk, ale také dramatické vlnění membrány vedoucí k uvolňování apoptotických tělísek. Mezi substráty kaspáz patří také mikrotubuly a mikrofilamenta.

### Analýza fragmentované DNA značené propidiumjodidem

Fragmentace nukleozomální DNA je jedním z hlavních znaků apoptózy. Analýza replikačního stavu buněčné populace (profil buněčného cyklu) může být snadno provedena pomocí fluorescenčního barviva propidiumjodidu (PI), které se stechiometricky váže k nukleovým kyselinám <sup>7</sup>. Díky fixaci buněk v etanolu proniká PI do buněk. Intenzita emise fluorescenční-

ho signálu odpovídá obsahu DNA v buňkách. Buňky v klidové fázi a buňky ve fázi G1 obsahují 2 kopie chromozomu, tedy poloviční množství DNA než buňky podstupující mitózu (G2/M fáze)<sup>8</sup>. Signál fluorescence mitotických buněk bude tedy dvojnásobný v porovnání s G1 buněčnou populací. Signál buněk v S fázi, ve kterých probíhá intenzivní syntéza DNA, bude ležet mezi signálem G1 a G2/M buněčné populace. Vzhledem k tomu, že během apoptózy dochází důsledkem činnosti nukleáz ke vzniku fragmentů DNA o nízké molekulové hmotnosti, mohou být apoptotické buňky snadno identifikovány jako hypodiploidní populace, tzv. „sub-G1“<sup>8,9</sup>.

### Detekce buněčné smrti pomocí FITC-konjugovaného annexinu V

Annexin V patří do rodiny annexinů vázajících fosfolipidy. S nejvyšší účinností se váže k negativně nabitému fosfolipidu fosfatidylserinu (PS), zatímco s fosfatidylcholinem interaguje slabě. PS se za normálních podmínek (zdravé buňky) nachází na vnitřní plazmatické membráně. Proapoptotické signály však způsobují jeho rychlou externalizaci<sup>6</sup>. Ačkoli není přesný mechanismus redistribuce PS během apoptózy zcela objasněn, ví se, že je tento proces závislý na činnosti kaspáz, a že může být inhibován inhibitory kaspáz (např. z-VAD-fmk)<sup>3,10</sup>.

Při detekci apoptózy annexinem V je nezbytné současné značení buněk propidiumjodidem (PI). Nekrotické buňky totiž váží annexin V díky prasklé buněčné membráně stejně jako buňky apoptotické. Na výsledném histogramu se budou apoptotické buňky jevit pozitivní na barvení annexinem V a negativní na barvení PI, zatímco nekrotické buňky budou pozitivní na obě barviva, jelikož se PI díky permeabilizované buněčné membráně dostane do nitra buněk<sup>7</sup>.

### Detekce buněčné smrti měřením aktivity kaspáz pomocí FLICA

Hlavním biochemickým dějem během apoptózy je aktivace „apoptotických“ kaspáz patřících do podskupiny kaspázy-3, které štěpí více než 600 buněčných substrátů. Některé z těchto substrátů jsou zodpovědné za morfologické změny během apoptózy (např. ICAD, ROCK1). Selhání

aktivace kaspáz dramaticky mění fenotyp buněčné smrti z apoptotického na nekrotický, což má dalekosáhlé následky pro odpověď imunitního systému na takovéto buňky. Kaspázy jsou syntetizovány v prekurzorové formě enzymu vyskytující se v cytoplazmě viabilních buněk. V přítomnosti apoptotických signálů dochází k proteolytickému zpracování, které spustí aktivací kaskádu kaspáz<sup>11</sup>.

Inhibitor kaspáz značený fluorochromem (FLICA) tak představuje jednoduchou metodu pro stanovení aktivity kaspáz. Tyto sondy jsou netoxické a prostupují bez problémů do buněk. Současné kity různých výrobců využívají FAM-VAD-fmk, která se nevratně váže na všechny aktivní apoptotické kaspázy. Cílová tripeptidová sekvence (VAD) je spojena s FAM (fluorescenčně značený karboxyfluorescein) a s fluorometylketonem (fmk). Aktivní heterotetramery kaspáz váží FAM-FLICA sondu pomocí FMK interakce s cysteiny uvnitř aktivního místa molekuly kaspázy. Viabilní buňky FAM-FLICA neváží, jelikož je sonda odmyta při promývacích krocích protokolu<sup>3</sup>.

### Závěr

Procesy buněčné smrti mají velký význam ve vývoji organismu, udržování homeostázy a funkce imunitního systému. Deregulace těchto procesů se projevuje různými nádorovými, kardiovaskulárními či neurodegenerativními onemocněními. Spolehlivá detekce a kvantifikace apoptotických a nekrotických buněk poskytuje cenný nástroj při hodnocení odpovědi buněčné populace na léčebnou strategii či podmínky kultivace. Průtoková cytometrie představuje moderní cytologickou metodu hodnotící fyzikální parametry analyzovaných částic (buněk), jako je velikost a granularita, stejně jako specifické znaky značené fluorescenční sondou (receptory, organely).

*Tato práce byla financována z projektu NANO-LABSYS CZ.1/072.3.00/20.0148.*

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

## Literatura

1. Schultz, D.R.; Harrington, W.J. Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2003, 32, 345-369.
2. Ouyang, L.; Shi, Z.; Zhao, S.; Wang, F.T.; Zhou, T.T.; Liu, B.; Bao, J.K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*. 2012, 45, 487-498.
3. Henry, C.M.; Hollville, E.; Martin, S.J. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods*. 2013, 61, 90-97.
4. Bertho, A.L.; Santiago, M.A.; Coutinho, S.G. Flow cytometry in the study of cell death. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000, 95, 429-+.
5. Wu, D.Y.; Patti-Diaz, L.; Hill, C.G. Development and validation of flow cytometry methods for pharmacodynamic clinical biomarkers. *Bioanalysis*. 2010, 2, 1617-1626.
6. Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. 2007, 35, 495-516.
7. Rieger, A.M.; Hall, B.E.; Le Thuong, L.; Schang, L.M.; Barreda, D.R. Conventional apoptosis assays using propidium iodide generate a significant number of false positives that prevent accurate assessment of cell death. *Journal of Immunological Methods*. 2010, 358, 81-92.
8. Ormerod, M.G. Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 2002, 265, 73-80.
9. Qin, L.F.; Ng, I.O.L. Induction of apoptosis by cisplatin and its effect on cell cycle-related proteins and cell cycle changes in hepatoma cells. *Cancer Letters*. 2002, 175, 27-38.
10. Telford, W.G. Detecting apoptosis by flow cytometry: a practical guide. *Cytometry Part B-Clinical Cytometry*. 2012, 82B, O8-O8.
11. Slee, E.A.; Harte, M.T.; Kluck, R.M.; Wolf, B.B.; Casiano, C.A.; Newmeyer, D.D.; Wang, H.G.; Reed, J.C.; Nicholson, D.W.; Alnemri, E.S.; Green, D.R.; Martin, S.J. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *Journal of Cell Biology*. 1999, 144, 281-292.



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

## BAKTERIOFÁG $\lambda$ JAKO NANOTRANSPORTÉR DOXORUBICINU

Simona Dostálová<sup>a,b</sup>, Markéta Vaculovičová<sup>b</sup>, René Kizek<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

### Bacteriophage $\lambda$ as a doxorubicin nanocarrier

In this study, we discussed the use of bacteriophage  $\lambda$  as a nanocarrier of anthracycline drug doxorubicin. This drug is used in treatment of cancer, which is the cause of death of every fourth patient in developed countries. Doxorubicin has many severe side effects for patients' healthy cells, which lowers their well-being. These can be eliminated by encapsulation of doxorubicin into suitable nanocarrier, such as bacteriophage  $\lambda$  capsid. In this work, infusion method was used for this encapsulation and proven by absorbance and fluorescence measurement of whole bacteriophage. It was concluded, that bacteriophage both intercalates into DNA and binds to capsid proteins of bacteriophage  $\lambda$ .

**Přijato k publikování:** 11. 8. 2014

**Klíčová slova:** bakteriofág  $\lambda$ ; doxorubicin; enkapsulace léčiv; nanotransportéry; viry

### Úvod

Ve vyspělých zemích jsou v současnosti velkým problémem nádorová onemocnění, na jejichž následky umírá každý čtvrtý člověk. Běžné způsoby léčby rakoviny jsou často založeny na velmi malých rozdílech mezi zdravými a nádorovými buňkami a jsou velmi toxické pro zdravé buňky<sup>1</sup>. Používají se látky, schopné poškodit, zpomalit nebo zastavit růst buněk, označující se jako cytostatika. Nejvíce působí na rychle se dělící buňky, jako jsou právě nádorové, ale také buňky sliznice trávicí soustavy, vlasového epitelu nebo kostní dřeně. To způsobuje řadu vedlejších účinků cytostatik<sup>2</sup>.

Doxorubicin je antracyklinové léčivo interkalující do nukleových kyselin a inhibující jejich syntézu<sup>3-5</sup>. Používá se pro léčbu řady maligních tumorů, jako jsou neuroblastomy<sup>6</sup>, leukémie<sup>7</sup>, Hodgkinův i non-Hodgkinův lymfom<sup>8</sup>, nádory močového měchýře<sup>9</sup> nebo kůže<sup>10</sup>. Doxorubicin má ale bohužel také řadu negativních účinků, z nichž nejzávažnější je jeho kardiotoxicita<sup>11,12</sup>.

Negativní účinky doxorubicinu i dalších cytostatických léčiv by bylo možné snížit jeho enkapsulací do vhodného nanotransportéru<sup>13</sup>. To jsou přenašeče o velikosti 20-100 nm, které díky svojí velikosti nejsou z těla odstraňovány

přes renální clearance<sup>14</sup>, ale zároveň mohou prostupovat póry v defektních nádorových cévách a zdržovat se v okolí nádoru. Tento jev se označuje jako efekt zvýšené permeability a retence (EPR efekt)<sup>15,16</sup>. Léčivo je z nanotransportérů možné uvolňovat postupně a aktivně jej cílit na nádorové buňky<sup>17</sup>.

Nanotransportéry mohou být sestaveny z různých materiálů. Často jsou studovány proteinové nanotransportéry, jejichž speciálním případem jsou virové kapsidy<sup>18</sup>. Jako takový nanotransportér by mohl být použit bakteriofág  $\lambda$ , jehož kapsida má ikozahedrální tvar o průměru 50-60 nm. Jeho genom obsahuje přibližně 50 genů v lineární dvouřetězcové DNA o délce 48 502 bp<sup>19</sup>.

V této práci je studován bakteriofág  $\lambda$  jako možný nanotransportér doxorubicinu. Je navržena infuzní metoda enkapsulace, která je ověřena fluorescenčním měřením bakteriofága. V práci je zkoumáno, na jaké části bakteriofága (DNA, proteiny) se doxorubicin při enkapsulaci váže.



## Materiály a metody

### Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly v ACS čistotě pořízeny od firmy Sigma-Aldrich Chemical Co. (MO, USA), pokud není uvedeno jinak. Bakteriofág  $\lambda$  byl pořízen z České sbírky mikroorganismů (ČR).

### Enkapsulace doxorubicinu do bakteriofága $\lambda$

K 80  $\mu$ l bakteriofága  $\lambda$  o koncentraci hlavního proteinu kapsidy E 20  $\mu$ g/ml bylo přidáno 80  $\mu$ l doxorubicinu o různých koncentracích (200; 100; 50; 25; 12,5 a 0  $\mu$ g/ml). Inkubace probíhala 2 hod v temnu při 25 °C bez třepání. Přebytečný doxorubicin byl následně dialyzován v kolonkách Amicon 3K (MERCK-Millipore, MA, USA) po dobu 15 min při 7000 rpm a 20 °C. Vzorek byl 2 $\times$  promyt vodou. Objem byl poté doplněn na původní (160  $\mu$ l). Absorpční spektrum bakteriofága s enkapsulovaným doxorubicinem bylo změřeno při vlnových délkách 230-650 nm. Emisní spektrum doxorubicinu bylo změřeno s excitační vlnovou délkou 480 nm v rozsahu emisních vlnových délek 515-815 nm.

### Vizualizace doxorubicinu v DNA bakteriofága

Byla izolována DNA bakteriofága  $\lambda$  na automatickém izolátoru nukleových kyselin MagNA Pure Compact, kitem Nucleic Acid Isolation I, protokolem Plasma\_NA, výchozí množství vzorku bylo 100  $\mu$ l, eluce proběhla do 50  $\mu$ l. U izolované DNA bylo změřeno absorpční spektrum vlnových délek v rozsahu 200-800 nm, a emisní spektrum s excitační vlnovou délkou 480 nm a emisními vlnovými délkami v rozsahu 515-815 nm.

Pro vizualizaci doxorubicinu v DNA byla provedena derivatizace fluoreskaminem. K 50  $\mu$ l izolované DNA bylo přidáno 30  $\mu$ l derivatizačního činidla fluoreskaminu o koncentraci  $1 \times 10^{-3}$  M, které se váže na primární aminokupiny. Inkubace probíhala 5 minut a bylo změřeno emisní spektrum s excitační vlnovou délkou 390 nm a emisními délkami v rozsahu 420-850 nm.

## Výsledky a diskuze

### Enkapsulace doxorubicinu do bakteriofága $\lambda$

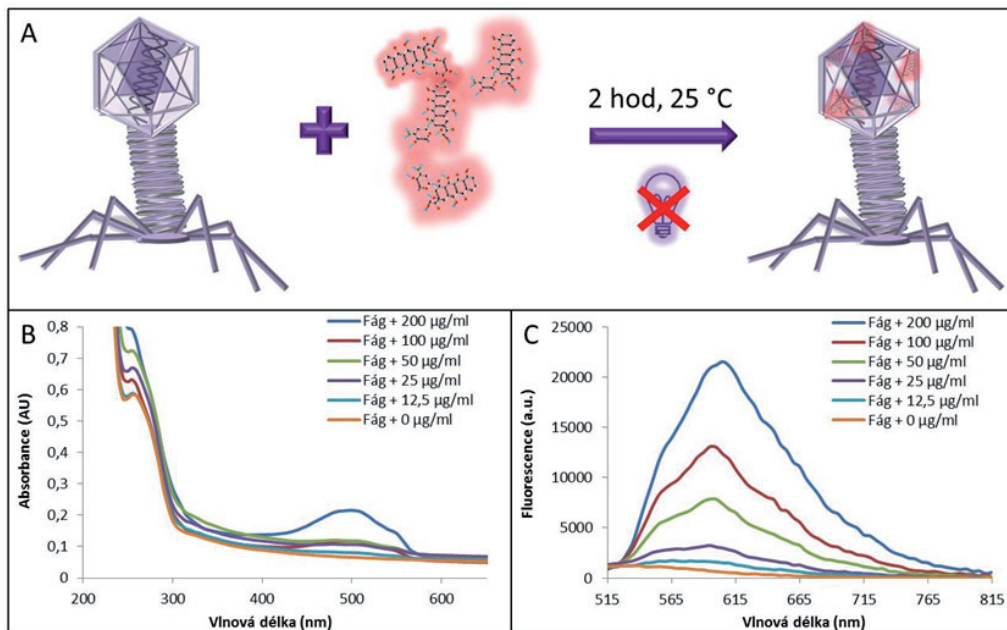
Pro enkapsulaci doxorubicinu do bakteriofága  $\lambda$  byla použita infuzní metoda, jejíž princip spočívá v tom, že léčivo je schopno vstoupit do kapsidy póry v její struktuře a navázat se na nukleovou kyselinu viru. Pro tuto enkapsulaci je nutné použít kladně nabitá léčiva, která se vážou na záporně nabitě nukleové kyseliny elektrostatickou interakcí<sup>20</sup>, nebo látky interkalující do DNA, mezi které patří i doxorubicin<sup>21</sup>. Léčivo je u některých virů schopné se navázat i na proteiny kapsidy 109. Schéma této enkapsulace viz **Obr. 1A**.

Bakteriofág  $\lambda$  byl smíchán s doxorubicinem o různých koncentracích a přebytečný neenkapsulovaný doxorubicin byl odstraněn dialýzou a promytím. U bakteriofága s enkapsulovaným doxorubicinem byly charakterizovány jeho optické vlastnosti. Doxorubicin má fluorescenční vlastnosti, díky kterým je umožněna jeho vizualizace<sup>22</sup>.

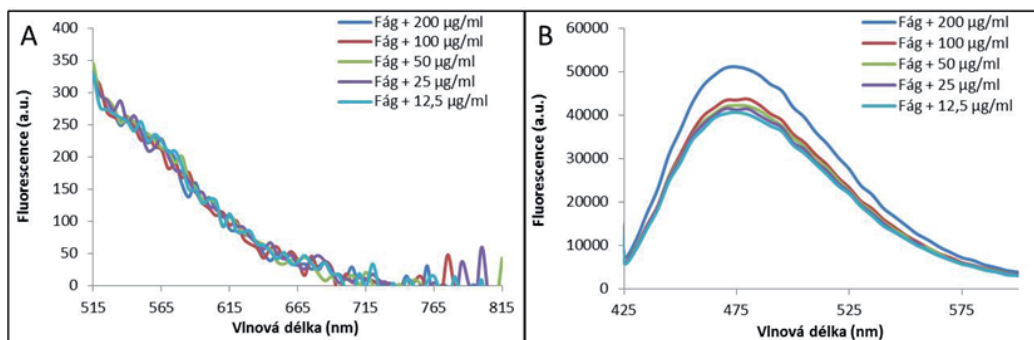
**Obr. 1B** ukazuje absorpční spektrum bakteriofága  $\lambda$  se vzrůstajícími koncentracemi aplikovaného doxorubicinu. Absorpční spektrum bylo měřeno v rozsahu vlnových délek 230-650 nm. U kontrolního vzorku samotného bakteriofága bez přídatku doxorubicinu jsou vidět pouze absorpční maxima při 260 a 280 nm, odpovídající DNA bakteriofága a proteinům jeho kapsidy. Po přidání doxorubicinu se objevuje nové absorpční maximum při 480 nm, což odpovídá právě absorpčnímu maximu doxorubicinu. Absorbance při vlnové délce 480 nm roste lineárně se vzrůstající aplikovanou koncentrací doxorubicinu.

**Obr. 1C** ukazuje fluorescenční spektrum různých koncentrací doxorubicinu enkapsulovaného v bakteriofágu  $\lambda$ . Samotný bakteriofág bez přídatku doxorubicinu nevykazuje fluorescenci. Po přídatku doxorubicinu se projevuje jeho fluorescence s emisním maximem při 605 nm, která roste lineárně se vzrůstající koncentrací aplikovaného doxorubicinu. To potvrzuje, že bakteriofág  $\lambda$  je schopen enkapsulovat infuzní metodou i vysoké koncentrace doxorubicinu.





**Obr. 1:** Enkapsulace různých koncentrací doxorubicinu do bakteriofága  $\lambda$ . A) Schéma enkapsulace. B) Absorpční spektrum bakteriofága s enkapsulovaným doxorubicinem, vlnové délky 230-650 nm. C) Fluorescenční spektrum bakteriofága s enkapsulovaným doxorubicinem, excitační vlnová délka 480 nm, emisní vlnové délky 515-815 nm



**Obr. 2:** Vizualizace doxorubicinu v DNA bakteriofága  $\lambda$ . A) Fluorescenční spektrum izolované DNA bakteriofága  $\lambda$  s enkapsulovaným doxorubicinem, excitační vlnová délka 480 nm, emisní vlnové délky 515-815 nm. B) Fluorescenční spektrum derivatizačního činidla fluoreskamínu navázaného na primární aminokupiny doxorubicinu po 5 minutové inkubaci, excitační vlnová délka 390 nm, emisní vlnové délky 425-600 nm

## Vizualizace doxorubicinu v DNA bakteriofága

Pro zjištění, zda je doxorubicin interkalován do DNA bakteriofága nebo navázán na proteiny jeho kapsidy, byla izolována DNA bakteriofága  $\lambda$  s enkapsulovaným doxorubicinem a byla změněna fluorescence doxorubicinu v ní. Excitační vlnová délka byla 480 nm a emisní vlnové délky byly v rozsahu 515-815 nm. DNA však žádnou fluorescenci doxorubicinu nevykazovala (**Obr. 2A**), což bylo způsobeno tím, že eluční roztok, který se používá při izolaci DNA, zhasí fluorescenci doxorubicinu téměř 10 $\times$ .

Proto bylo pro vizualizaci doxorubicinu interkalovaného do DNA bakteriofága při enkapsulaci použito derivatizační činidlo fluoreskamin. To se váže na primární aminoskupiny, které obsahuje i doxorubicin, má velmi rychlou reakční kinetiku a degraduje ve vodném prostředí, takže bez navázání na aminoskupiny nevykazuje fluorescenci.

**Obr. 2B** ukazuje fluorescenční spektrum fluoreskaminu, s excitační vlnovou délkou 390 nm a emisními vlnovými délkami v rozsahu 425-600 nm. Je vidět, že se vzrůstající aplikovanou koncentrací doxorubicinu lineárně roste fluorescence fluoreskaminu. To potvrzuje, že doxorubicin je interkalovaný v DNA bakteriofága, ale jeho koncentrace je nízká. Vzhledem k velkým rozdílům fluorescence doxorubicinu v DNA a v celém bakteriofágu je možné říct, že doxorubicin se váže i na proteiny kapsidy.

## Závěr

Nádorová onemocnění jsou velkým problémem v rozvinutých zemích světa, kde v jejich důsledku umírá každý čtvrtý člověk. Současné způsoby léčby mají mnoho negativních vedlejších účinků pro zdravé buňky pacienta a snižují tak kvalitu jeho života. Proto se stále více uvažuje o uzavření cytostatických léčiv do vhodných nanotransportérů. Těmi mohou být i virové kapsidy, například bakteriofága  $\lambda$ . V práci byla uvedena metoda enkapsulace antracyklinového antibiotika doxorubicinu do bakteriofága  $\lambda$ . Tato enkapsulace byla potvrzena změnami optických vlastností bakteriofága  $\lambda$ . Bylo potvrzeno, že doxorubicin se váže na proteiny i DNA bakteriofága.

*Tato práce byla financována ze zdrojů NANOLABSYS CZ.1.07/2.3.00/20.0148.*

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

## Literatura

1. Sumer, B.; Gao, J.M. Theranostic nanomedicine for cancer. *Nanomedicine*. 2008, 3, 137-140.
2. Negreira, N.; Mastroianni, N.; de Alda, M.L.; Barcelo, D. Multianalyte determination of 24 cytostatics and metabolites by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry and study of their stability and optimum storage conditions in aqueous solution. *Talanta*. 2013, 116, 290-299.
3. Kizek, R.; Adam, V.; Hrabeta, J.; Eckschlager, T.; Smutny, S.; Burda, J.V.; Frei, E.; Stiborova, M. Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: Recent advances. *Pharmacology & Therapeutics*. 2012, 133, 26-39.
4. Minotti, G.; Menna, P.; Salvatorelli, E.; Cairo, G.; Gianni, L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*. 2004, 56, 185-229.
5. Stiborova, M.; Eckschlager, T.; Poljakova, J.; Hrabeta, J.; Adam, V.; Kizek, R.; Frei, E. The Synergistic Effects of DNA-Targeted Chemotherapeutics and Histone Deacetylase Inhibitors As Therapeutic Strategies for Cancer Treatment. *Current Medicinal Chemistry*. 2012, 19, 4218-4238.
6. Bean, J.F.; Qiu, Y.-Y.; Yu, S.; Clark, S.; Chu, F.; Madonna, M.B. Glycolysis inhibition and its effect in doxorubicin resistance in neuroblastoma. *Journal of pediatric surgery*. 2014, 49, 981-984.
7. Szwed, M.; Matusiak, A.; Laroche-Clary, A.; Robert, J.; Marszalek, I.; Jozwiak, Z. Transferrin as a drug carrier: Cytotoxicity, cellular uptake and transport kinetics of doxorubicin transferrin conjugate in the human leukemia cells. *Toxicology in Vitro*. 2014, 28, 187-197.
8. Burley, K.; Allford, S. Managing the risk of cardiotoxicity: an audit of lymphoma patients receiving doxorubicin-based chemotherapy at Musgrove Park Hospital, Taunton. *British Journal of Haematology*. 2014, 165, 70-70.
9. Kitamura, H.; Tsukamoto, T.; Shibata, T.; Masumori, N.; Fujimoto, H.; Hirao, Y.; Fujimoto, K.; Kitamura, Y.; Tomita, Y.; Tobisu, K.; Niwakawa, M.; Naito, S.; Eto, M.; Kakehi, Y.; Urologic Oncology Study Group of the Japan Clinical Oncology, G. Randomised phase III study of neoadjuvant chemotherapy with methotrexate, doxorubicin,

- vinblastine and cisplatin followed by radical cystectomy compared with radical cystectomy alone for muscle-invasive bladder cancer: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG0209. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2014, 25, 1192-1198.
10. Condello, M.; Cosentino, D.; Corinti, S.; Di Felice, G.; Multari, G.; Gallo, F.R.; Arancia, G.; Meschini, S. Voacamine Modulates the Sensitivity to Doxorubicin of Resistant Osteosarcoma and Melanoma Cells and Does Not Induce Toxicity in Normal Fibroblasts. *Journal of Natural Products*. 2014, 77, 855-862.
  11. Manocha, B.; Margaritis, A. Controlled release of doxorubicin from doxorubicin/gamma-polyglutamic acid ionic complex. *Journal of Nanomaterials*. 2010.
  12. Zhang, S.; Liu, X.B.; Bawa-Khalfe, T.; Lu, L.S.; Lyu, Y.L.; Liu, L.F.; Yeh, E.T.H. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature Medicine*. 2012, 18, 1639-+.
  13. Park, K. Facing the truth about nanotechnology in drug delivery. *ACS Nano*. 2013, 7, 7442-7447.
  14. Allen, T.M.; Cullis, P.R. Drug delivery systems: Entering the mainstream. *Science*. 2004, 303, 1818-1822.
  15. Duncan, R.; Sat, Y.N. Tumour targeting by enhanced permeability and retention (EPR) effect. *Annals of Oncology*. 1998, 9, 39-39.
  16. Maeda, H. Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond. *Journal of Controlled Release*. 2012, 164, 138-144.
  17. Svenson, S. Theranostics: Are we there yet? *Molecular Pharmaceutics*. 2013, 10, 848-856.
  18. Peer, D.; Karp, J.M.; Hong, S.; FaroKhazad, O.C.; Margalit, R.; Langer, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*. 2007, 2, 751-760.
  19. Snustad, D.P.; Simmons, M.J. *Genetika, Nakladatelství Masarykovy univerzity, Brno, 2009*.
  20. Yildiz, I.; Lee, K.L.; Chen, K.; Shukla, S.; Steinmetz, N.F. Infusion of imaging and therapeutic molecules into the plant virus-based carrier cowpea mosaic virus: Cargo-loading and delivery. *Journal of Controlled Release*. 2013, 172, 568-578.
  21. Huska, D.; Adam, V.; Babula, P.; Hrabeta, J.; Stiborova, M.; Eckschlager, T.; Trnkova, L.; Kizek, R. Square-wave voltammetry as a tool for investigation of doxorubicin interactions with DNA isolated from neuroblastoma cells. *Electroanalysis*. 2009, 21, 487-494.
  22. Changenet-Barret, P.; Gustavsson, T.; Markovitsi, D.; Manet, I.; Monti, S. Unravelling molecular mechanisms in the fluorescence spectra of doxorubicin in aqueous solution by femtosecond fluorescence spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2013, 15, 2937-2944.



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.

## Příprava nanočástic – kvantových teček v terestrických organismech

Markéta Komínková<sup>1</sup>, Ondřej Zítka<sup>1,2</sup>, René Kizek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>2</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

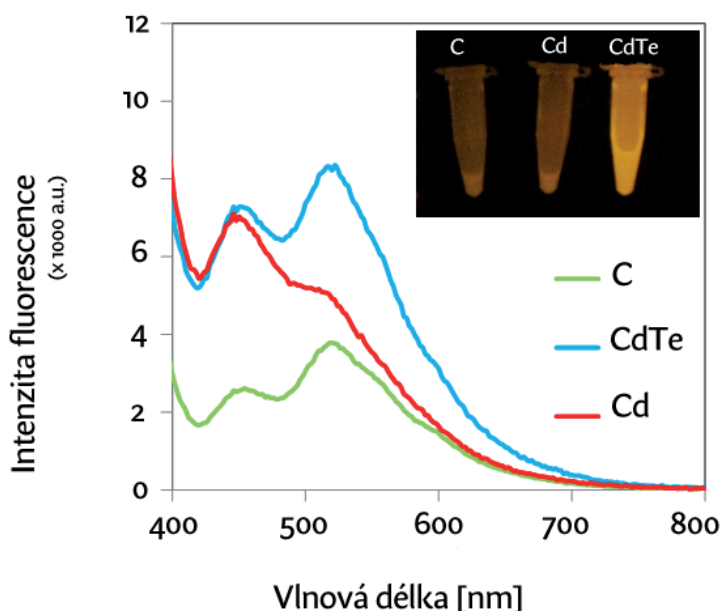
### Úvod

Jednou z nejnovějších možností syntézy kvantových teček (QDs) je biosyntéza, díky které je možné snížit potenciaální toxicitu těchto nanočástic. Mezi organismy, u kterých byla schopnost biosyntézy QDs, prokázána, patří řada mikroorganismů, jako jsou *Escherichia coli*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella aerogenes*, *Gluconoacetobacter xylinus*, kvasinek jako jsou *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulopsis species*, *Rhodospiridium diobovatum*, ale také hub, například *Fusarium oxysporum*. Ačkoli těmito organismy byly vytvořeny různé varianty QDs (ZnS, PdS, CdS and CdSe) mezi nejběžněji biosyntetizovanými patří CdTe. Mimo výše uvedených organismů byla však biosyntéza nanočástic zaznamenána i u rostlin, zejména díky použití rostlinných extraktů. Ani u zvířat není biosyntéza výjimkou, byla již popsána u potkanů a myši, a také u žížal. Při biosyntéze CdTe v organismech dochází ke zvýšení genové exprese kov vázajících proteinů, jako jsou metallothionein a fytochelatin.

### Výsledky a diskuse

Z žížal (*Eisenia fetida*), které rostly po dobu 11 dnů v prostředí s  $\text{CdCl}_2$  nebo v prostředí s  $\text{CdCl}_2$  a  $\text{Na}_2\text{TeO}_3$ , byly provedeny stěry

chloragogenních buněk, které obklopují střevo žížal. Tyto buňky nahrazují játra obratlovců, dochází v nich k vlastní biosyntéze QDs. Emise stěrů je nejintenzivnější v zelené oblasti viditelného světla (**Obr. 1**). Srovnatelné fluorescenční vlastnosti vykazovali i QDs získané z žížal (*Lumbricus rubellus*)<sup>1</sup>. Z dalších provedených analýz vyplývá, že i přes stejnou koncentraci aplikovaného  $\text{CdCl}_2$  vykazovaly



**Obr. 1:** Porovnání fluorescence (excitace při 415 nm) stěrů chloragogenních buněk žížal žijících v prostředí kadmia (Cd), kadmia a teluru (CdTe), a kontrolních žížal (C)

žížaly s přidáním  $\text{Na}_2\text{TeO}_3$  nižší koncentrace kadmia i nižší míru oxidativního stresu.

### Závěr

Díky biosyntéze dochází ke snížení oxidativního stresu a dalších negativních účinků na

organismy vystavené působení těžkých kovů. Získané kvantové tečky je možné využít pro další biologické aplikace.

## Poděkování

*Práce byla finančně podpořena projektem NanoBioMetalNet CZ.1.07/2.4.00/31.0023.*

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

## Literatura

1. Sturzenbaum S. R., Hockner M., Panneerselvam A., Levitt J., Bouillard J. S., Taniguchi S., Dailey L. A., Khanbeigi R. A., Rosca E. V., Thanou M., Suhling K., Zayats A. V., Green M.: Nature Nanotechnology, 8, 57 (2013).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.



## NÁVŠTĚVA BRUKER AXS GMBH KARLSRUHE

Zbyněk Heger<sup>a,b</sup>, Jan Zítka<sup>a</sup>, René Kizek<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

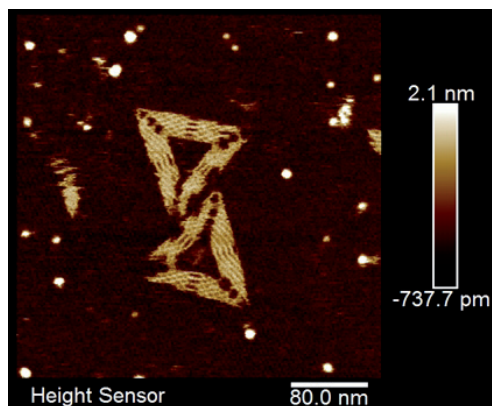
### Úvod

Cílem pracovní cesty bylo zmapování aplikačních možností různých typů mikroskopů atomárních sil (dále AFM - atomic force microscopy), nabízených firmou Bruker Corp. s ohledem na potencionální kupní zájem.

Pracovní cesta byla plánována na dva dny cestovní (18. a 21. 8.) a dva dny pracovní (19. a 20. 8.), strávené v showroomech firmy s danými přístroji, a to především s ohledem na velký počet plánovaných vzorků, které byly dovezeny z Laboratoří Metalomiky a Nanotechnologií Mendelovy univerzity.

Vzhledem k biomedicínskému zaměření Laboratoře Metalomiky a Nanotechnologií byly veškeré další práce prováděny právě na přístroji FastScan, který oproti ostatním nabízí rapidně sníženou dobu skenování vzorků se zachováním výborné citlivosti. Jeho výhodou je také protektivní obal, fungující jako Faradayova klec s termo- a akustickou izolací, zvyšující kvalitu výsledného skenu.

Výsledkem dvou pracovních dnů byla celá řada snímků (přivezené vzorky a DNA origami), získaných pro účely Laboratoře Metalomiky a Nanotechnologií a mini-experiment s pevností a adhezí bakteriofága lambda. Důležitou částí setkání bylo také technické představení přístroje, ve kterém byla ukazována běžná údržba, nanášení vzorků na různé typy imobilizačních povrchů (mica, grafit) či výměna katileveru s mikrožhlou. V rámci softwarové části byla předvedena konfigurace laseru a optické části přístroje a také možnosti různých skenovacích módů a popsán běžný troubleshooting. Během pracovních dnů byly hojně diskutovány výhody a nevýhody jednotlivých přístrojů pro různé biologické, ale i chemické aplikace.



**Obr. 1:** AFM mikrofotografie DNA origami pořízená na přístroji Dimension Icon (Bruker, Billerica, MA, USA). Autoři děkují Dr. Hartmutu Stadlerovi za perfektní technickou asistenci při získávání tohoto snímku na přístroji firmy Bruker AXS GMBH





plynová chromatografie ICP-OES příprava vzorku  
elementární ANALÝZA elektrochemie SEA  
analýza povrchů **separační** techniky  
**REOLOGIE** **ATOMOVÁ** spektroskopie  
**GC** temperace **kapalinová** chromatografie  
**UV-VIS** spektrometrie **LIMS** lyofilizátory  
B.E.T. **GC-MS** koncentrátory **CHNSO** analýza  
Hypercarb **AAS** hmotnostní SPEKTROMETRIE  
**HPLC** centrifugy **EXTRUZE** ICP-MS **SERVIS**  
**termická** analýza **AIR monitoring** TracePLOT **XPS**  
**TEXTURA** spotřební materiál **NMR** automatické dávkování



**Reg.č.projektu:** CZ.1.07/2.3.00/20.0148

**Název projektu:** Mezinárodní spolupráce v oblasti „in vivo“ zobrazovacích technik



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ