

Toto PDF obsahuje kapitolu z knihy:
Zdeněk Fiala, Drahomíra Holmannová (ed.):
Uhlíkové nanomateriály. Biomedicínské aplikace a toxicita,
Praha: Karolinum 2025,
<https://doi.org/10.14712/9788024659848>.

3. Respirační toxicita

(Zdeněk Fiala, Drahomíra Holmannová)

© Univerzita Karlova, 2025

© Zdeněk Fiala, Drahomíra Holmannová, 2025

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

<https://doi.org/10.14712/9788024659848.3>

3 RESPIRAČNÍ TOXICITA

Dýchací systém je řazen k nejdůležitějším cestám vstupu škodlivin do organismu. Inhalační expozice uhlíkovým nanomateriálům (CNM) může indukovat širokou škálu reakcí, včetně patologických procesů reprezentovaných rozvojem akutního nebo chronického zánětu s infiltrací tkáně imunitními buňkami a zvýšenou hladinou oxidačního stresu. Dalšími příklady patologických dějů souvisejících s expozicí CNM mohou být poškození genomu a rozvoj nádorového bujení. Důležitým fenoménem patologických procesů je změna složení mikrobioty dýchacích cest indukovaná expozicí, která zánět a související poškození dále posiluje. Na buněčné úrovni dochází v důsledku inhalační expozice CNM k narušení buněčných membrán, apoptóze, poškození DNA, epigenetickým změnám, mitochondriální a lysozomální dysfunkci, narušení cytoskeletu a mitózy, transformaci buněk a k formování kolagenních deposit (fibrotizace) či tvorbě granulomů. CNM nepoškozují pouze respirační epitel, s nímž jsou v první fázi vniknutí do dýchacích cest v přímém kontaktu, ale také podslizniční tkáň, kde se nachází svalovina dýchacích cest a další tkáň. Ovlivňují též složení surfaktantu.

Intenzita a rozsah poškození respiračního systému je dán fyzikálně-chemickými vlastnostmi CNM. Velikost, průměr, tvar, plocha a komponenty navázané na povrch částic (funkcionalizace) modifikují vstup částic do různých regionů dýchacího systému. Zde mohou CNM vytvářet depozita nebo mohou být translokovány mimo dýchací cesty mechanismem transcytózy skrze epitelové buňky (a bariéru vzduch–krev) nebo mechanismem translokace pomocí fagocytujících buněk. Další možností jejich translokace je mukociliární či fagocytární clearance. Penetrační potenciál mají hlavně vláknité nanočástice, které se poměrně snadno dostávají do pleury, lymfatických uzlin, jater, ledvin, kardiovaskulárního systému a mohou vyvolávat řadu orgánových onemocnění.^{1–3} Některé CNM ve tkáních perzistují; příkladem může být grafen, který zůstává deponován ve tkáních delší dobu než jeho oxidované formy, které jsou snáze rozložitelné enzymy exprimovanými neutrofily (například myeloperoxidáza) či oxidačními procesy.⁴

Bylo uvedeno, že CNM mohou vyvolávat nežádoucí reakce akutního či chronického charakteru. Z tohoto důvodu jsou některé z nich v pracovním prostředí považovány za rizikové.⁵ V roce 2013 vydal National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) bulletin, v němž shrnuje výsledky padesáti čtyř *in vivo* studií, ve kterých byla experimentálně zvířata exponována jednovrstvným (SWCNT) a vícevrstvným (MWCNT) nanotrubicím. Expozice vyvolávaly lokální i systémovou odpověď, která zahrnovala zánět, tvorbu granulomů a plicní fibrózu.⁶ V roce 2014 klasifikovala International Agency for Research on Cancer (IARC) MWCNT-7 jako skupinu 2B, tedy jako potenciální lidský karcinogen.⁷

3.1 IN VITRO STUDIE

In vitro pokusy testující respirační toxicitu byly doposud nejčastěji prováděny na primárních bronchiálních epitelových buňkách, alveolárních epitelových buňkách, rezidentních imunitních buňkách a na vrstvách, které chrání sliznici dýchacích cest (například na surfaktantu). Většina těchto studií prokázala toxické účinky CNM v podobě indukce zánětu a senescence, zvýšení hladiny oxidačního stresu, poškození DNA, epigenetických změn a změn v proteomu a lipidomu. Nejčastěji testovanými CNM jsou grafen, oxid grafenu (GO) a jeho deriváty, uhlíkové nanotrubičky (CNT) a uhlíkové nanorohy (CNH).

Autoři Frontiñan-Rubio et al. testovali na normálních lidských bronchiálních epitelových buňkách (NHBE) a na nádorových buňkách lidského plicního karcinomu (A549) toxicitu GO, vícevrstevného grafenu (FLG) a malého vícevrstevného grafenu (sFLG). Již po šesti až dvaceti čtyřech hodinách indukovala expozice CNM četné buněčné nekrózy a apoptózy. Cytotoxicita se zvyšovala po dobu sedmi dní, 90% úmrtnosti buněk bylo dosaženo při koncentracích 5 µg/ml. Jako rezistentnější vůči expozici se jevila buněčná kultura A549.⁸

V jiných studiích hodnotily týmy vedené Nafisehem Nasirzadehem a Srikanthem Valabanim toxicitu grafenu a GO na dvou typech buněk dýchacích cest. Jednalo se o buněčnou linii A549 a nenádorovou plicní epitelovou buněčnou linii (BEAS-2B). V obou studiích byla potvrzena cytotoxicita obou testovaných CNM. Toxicita byla závislá na výši a délce expozice. Inhibiční koncentrace grafenu (IC₅₀) byla 40653 µg/ml, koncentrace bez účinku 0,059 µg/ml.^{9,10}

Hodnocení cytotoxického účinku derivátů grafenu vůči buňkám respiračního traktu se věnovala i skupina autorů Mittal et al. Ve svém experimentu porovnávala cytotoxický účinek GO, teplem redukováného GO a chemicky redukováného GO na BEAS-2B a A549 buněčné linie. I tato skupina autorů prokázala závislost míry respirační toxicity na fyzikálně-chemických vlastnostech CNM. Vyšší toxicitu vykazovaly částice s redukovanou laterální velikostí a vyšším počtem funkčních skupin. Zajímavým poznatkem bylo zjištění, že různé typy GO indukují rozdílné typy buněčné smrti. Smrt byla ve většině případů vyvolána zvýšenou hladinou oxidačního stresu. Jako senzitivnější se v těchto experimentech jevila buněčná linie A549.¹¹

Velmi důležitou kapitolu v testování respirační toxicity CNM tvoří experimenty s CNT. Například autoři Azari et al. studovali toxicitu krátkých a dlouhých MWCNT (8–26 nm a 2,11–7,20 µm) a grafitu vůči buněčné linii A549. Oba typy MWCNT vykazovaly cytotoxicitu již od koncentrace 8 µg/ml, zatímco u grafitu byla hraniční koncentrace 16 µg/ml. Autoři našli významně zvýšené úrovně oxidačního stresu a peroxidace lipidů. Oba ukazatele negativně korelovaly s viabilitou buněk. Z testovaných materiálů vykazoval nejnižší toxicitu grafit.¹² Ve studii Barthel et al. byla testována toxicita dvou typů MWCNT (NM-403 a Mitsui-7) vůči buněčné linii BEAS-2B. Buňky byly exponovány koncentracím 0,125–1 µg/cm² po dobu šesti týdnů. Již po čtyřech týdnech expozice indukovaly oba typy MWCNT nevratné morfologické změny, epitelální mezenchymální tranzici, mitotické abnormality a tvorbu mikrojadér.¹³

Poněkud odlišné výsledky prezentovali Phuyal et al. Ani třináctitýdenní expozice nenádorových buněk lidského bronchiálního epitelu (HBEC-3KT) MWCNT (koncentrace 1,92 mg/cm² a 0,96 mg/cm²) neovlivnila viabilitu buněk a nepoškozovala jejich DNA. Na druhou stranu autoři pozorovali sníženou míru buněčné proliferace, zvýšenou hladinu oxidačního stresu a změny proteomu a lipidomu. Posledně uvedené zahrnovalo zvýšenou expresi

proapoptotických molekul Bax, HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor 1-alpha*) a HSP70 (*heat shock protein 70*). Poněkud překvapivé byly nálezy zvýšených koncentrací triglyceridů, sfingomyelinu, ceramidů, fosfatidyletanolaminů a cholesterolu.¹⁴

Některé CNM zřejmě zasahují i do epigenetických charakteristik biologických systémů formou změn genomových metylací. Autoři Li et al. exponovali buněčnou linii A549 nízkým koncentracím fullerenu, MWCNT a SWCNT. Z výsledků vyplývá, že již koncentrace 0,1 mg/l zvyšovaly míru globální metylace a redukovaly expresi DNA metyltransferázy, hlavně DNMT3b. Pozorovaný jev ovlivňuje expresi řady genů, což má za následek změny v proteomu.¹⁵ Další důkazy o schopnosti CNM zasahovat do exprese genů přinesla studie autorů Chena et al. Jejich experiment byl prováděn na buňkách BEAS-2B, které byly exponovány po dobu šesti měsíců subchronickým dávkám SWCNT (0,1 μ g/ml). Autoři pozorovali spuštění maligní transformace aktivací signálních cest Akt/p53/Bcl-2, zvýšení exprese proteinů z rodiny Ras a antiapoptotického Bcl-2, snížení exprese proapoptotické molekuly Bax a destabilizaci exprese p53.¹⁶

Ve studii autorů Spannbruckera et al. se prokázalo, že CNM disponují potenciálem k navození buněčné senescence (charakteristický znak stárnutí). V první z těchto studií byly potkaní plicní epitelové buňky RLE-6TN exponovány CNM s komerčním názvem Printex 90 (zbavených endotoxinů). Expoziční dávky bez prokázané cytotoxicity měly za následek nevratnou redukci proliferace (a kumulaci) proteinů blokujících buněčný cyklus (p21 a p16), tedy navodily senescenci. Snížila se též aktivita redox senzitivní histonové deacetylázy SIRT1 a koncentrace konexinu-43. Také výsledky druhé studie přinesly důkazy o tom, že MWCNT mohou v buňkách BEAS-2B indukovat senescenci, zvyšovat oxidační stres a omezovat jejich proliferaci. Dále byl pozorován nárůst exprese proteinů p21 a p16, β -galaktosidázy (enzymu asociovaného se senescencí), nárůst exprese TGF β (*transforming growth factor β* ; polypeptidový faktor s potenciálem exacerbace senescence) a poškození DNA v podobě tvorby γ H2A.X.^{17,18}

Výše uvedený CNM Printex 90 byl předmětem i další studie, tentokrát autorů Ji et al. V jejich experimentu byly Printexu 90 exponovány buňky zdravé bronchiální sliznice a buňky chronickou bronchitidou změněné sliznice. Expozice měla za následek nárůst intenzity oxidačního stresu a indukci zánětu, spojeného se zvýšenou expresí chemokinu CXCL-8 a matrixové metaloproteázy 9. Biologická odpověď na expozici byla silnější v případě tkáň změněné chronickou bronchitidou. V souladu s obecnými toxikologickými principy lze předpokládat, že osoby se zánětlivými onemocněními respiračního traktu budou vnímavější k toxickému působení CNM.¹⁹

Další skupinu častěji testovaných CNM tvoří CNH. I u těchto nanočástic byl prokázán toxický potenciál pro respirační systém, přičemž charakter a intenzita biologické odpovědi je modifikována především velikostí částic a typem experimentální buněčné linie. Například ve studii provedené autory Schramm et al. byly buňky A549, buňky nemalobuněčného bronchoalveolárního karcinomu (NCI-H322) a buňky primárního lidského nosního epitelu (HNEpC) exponovány frakcím CNH (60–80 nm a 60–200 nm). Expozice snižovala viabilitu všech uvedených buněčných linií, narušovala buněčný metabolismus a redukovala mitochondriální aktivitu. Míra poškození se lišila podle typu buněčné linie; jako nejsenzitivnější (vůči expozici CNH) se jevíly buňky HNEpC.²⁰

V experimentální *in vitro* toxikologii se stále více rozšiřuje používání tkáňových modelů. Obecně se předpokládá, že jednovrstvé buněčné kultury neposkytují takový rozsah toxikologických informací jako trojrozměrné struktury, které se charakterem více přibližují tkáním

a orgánům. V dosud provedených experimentech zaměřených na respirační toxicitu byly využívány vícevrstvé kultury a trojrozměrné modely složené z různých typů buněčných linií (bronchiální epitel, alveolární fibroblasty, myocyty a imunitní buňky). Tyto experimentální struktury ve většině případů potvrdily, že CNM mohou závažně poškozovat buňky respiračního traktu. Například autoři Barosova et al. připravili experimentální model, v němž byly zastoupeny buňky A549, fibroblasty (MRC-5) a makrofágy (THP-1). Tato buněčná směs byla jednorázově (po dobu 24 hodin) a opakovaně (po dobu 96 hodin) exponována dvěma typům aerosolizovaných MWCNT (Mitsui-7 a Nanocyl) o koncentracích 2–10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Dlouhodobá, tedy opakovaná expozice indukovala zánětlivou odpověď a redukovala hladinu glutathionu. K podobnému výsledku došli i Chortarea et al., kteří prezentovali trojrozměrný model epitelové bariéry dýchacích cest. Opakovaná třídní expozice MWCNT o koncentracích 25, 125 a 250 mg/ml redukovala hladinu glutathionu (kratší expozice k patologickým změnám nevedly).^{21,22}

Autoři Di Cristo et al. studovali vliv opakované expozice GO na trojrozměrné rekonstrukci lidské bronchiální tkáň. Expoziční koncentrace (maximálně 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ po dobu 4 týdnů) byly extrapolovány z hodnot alveolární depozice CNM, které odrážejí celou pracovní dobu expozice člověka. Výsledky neprokázaly významné toxické účinky GO ve smyslu snížení viability buněk a narušení integrity plicní tkáň. Opakovaná expozice však po 14 dnech spustila prozánětlivou odpověď, narušila bariérové funkce epitelu a způsobila akumulaci autofagozomů (proces vyplývající z blokády degradace autofagozomů). Výsledky naznačují, že opakovaná expozice GO vytváří „časové okno“ (v této studii zhruba 30 dnů opakované expozice), ve kterém inhibice autofagie zvyšuje senzitivitu exponovaných osob k plicním infekcím a plicním onemocněním. Autoři zdůrazňují význam fyziologicky relevantních modelů a expozičních koncentrací (odvozených od reálných expozic) pro získání výchozích dat využitelných v procesu hodnocení zdravotních rizik.²³

Poněkud atypický cílový expoziční objekt zvolili autoři Hu et al., kteří sledovali vliv GO na surfaktant dýchacích cest. Surfaktant se nachází na sliznici respiračního traktu a má ochranný charakter. Z výsledků vyplynulo, že expozice GO vytváří v surfaktantu póry a touto cestou snižuje jeho biofyzikální a ochranné funkce.²⁴ Podobné výsledky prezentovali i autoři Dorota Kondej a Tomasz Sosnowski, podle kterých expozice CNT a CNH (expoziční koncentrace 0,2–0,8 mg/ml) mění v závislosti na dávce elasticitu, viskozitu a mechanické vlastnosti surfaktantu.²⁵

In vitro studie tedy přinášejí důkazy o tom, že CNM vykazuje toxicitu vůči respiračnímu traktu, nejen k buněčným liniím samotným, ale také k trojrozměrným modelům a ochranným prvkům dýchacích cest. To může mít výrazný negativní dopad na živé organismy.

3.2 IN VIVO STUDIE

Testování respirační toxicity CNM *in vivo* bývá prováděno nejčastěji formou inhalační nebo intratracheální aplikace (expozice). Tyto formy umožňují sledování účinků jak lokálních (na plicní tkáň), tak i systémových (po absorpci CNM z plicní tkáň do systémové cirkulace). Výsledky studií často uvádějí zvýšení hladiny oxidačního stresu, indukci zánětu a maligní transformace. Vedle lokálních plicních komplikací byly popsány také extrapulmonální patologie, vznikající v důsledku translokace CNM z dýchacích cest do kardiovaskulárního systému, jater a ledvin. Míra expozic indukovaného poškození závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech CNM a na rychlosti jejich eliminace z organismu.

MWCNT jsou patrně nejčastěji testovanými CNM v *in vivo* studiích respirační toxicity. Například autoři Sager et al. exponovali potkany (formou celotělové inhalace) MWCNT-7. Inhalovaná kumulativní dávka (koncentrace za daný čas se pohybovala mezi 22,5 až 180 mg/m³ a byla podávána po tři dny šest hodin denně. Pozornost autorů byla zaměřena jak na projevy toxicity, tak i na změny genových expresí. MWCNT-7 byly detekovány v plicní tkáni, kde indukovaly mírné až středně závažné patologické změny, například zvýšení buněčnosti (kumulace zánětlivých imunitních buněk v plicní tkáni), zesílení alveolárních sept, alveolitidu, fibrotické změny a vznik granulomů. Provedená bronchoalveolární laváž odhalila zvýšenou hladinu laktátdehydrogenázy a zvýšené počty alveolárních makrofágů a polymorfonukleárních leukocytů. Byly zjištěny změny exprese genů ovlivňujících karcinogenezi, leukocytární migraci, zánětlivou odpověď, mitózu a adhezi. Charakter změn byl dávkově závislý.²⁶

Autoři Alswady-Hoff et al. sledovali změnu délky telomer a fibrotické procesy u myši po intrapleurální (injekční) expozici MWCNT (5 a 50 µg/myš). Po expozici byly zjištěny závažné fibrotické změny v pleure a indukce zánětu a hyperplazie v mezoteliálních buňkách. Došlo k nárůstu exprese genů, které jsou zapojeny do těchto procesů. Rovněž bylo pozorováno zkrácení telomer v buňkách pleury a plic exponovaných zvířat (zkracování telomer je jedním ze znaků biologického stárnutí).²⁷ Změny v genové expresi po expozici MWCNT popsali také týmy Khaliullin et al. a Rahman et al. V první studii byly myši faryngeálně exponovány suspenzi MWCNT (40 µg/myš). Nanočástice penetrovaly do plicní tkáně, kde způsobovaly fibrózu a vyvolávaly vznik granulomatózních lézí a aglomerátů makrofágů. Byla detekována změna exprese mRNA v plicní tkáni i v plné krvi. Změny expresí se týkaly genů, které souvisely s výše popsanými patologiemi. Jednalo se například o geny zodpovídající za aktivaci imunitních buněk a jejich maturaci.²⁸ Ve druhé studii byly myši intratracheálně exponovány dvěma MWCNT (Mitsui-7 nebo NM-401) v různých dávkách (36 a 109 µg/myš nebo 26 a 78 µg/myš). Z výsledků vyplývá, že nanočástice perzistovaly v plicní tkáni ještě 90 dní po expozici. Expozice oběma typům MWCNT měla za následek poškození DNA, indukci zánětu a fibrózy a zvýšení exprese proteinu p53.²⁹

Zásahy do exprese genů a poškození DNA jsou úzce spjaté s rizikem karcinogeneze. Ve studii Saleh et al. byli potkani exponováni dvouvrstevným nanotubicím (DWCNT) v dávkách 0,125, 0,25 a 0,5 mg/potkan nebo MWCNT-7 v dávce 0,5 mg/potkan, a to obden po dobu 15 dní. Potkani byli sledováni následující dva roky. Z výsledků vyplývá, že DWCNT dlouhodobě perzistovaly v plicní tkáni, indukovaly zánět a zvyšovaly počty makrofágů a expresi cytokinů. U potkanů s MWCNT došlo k tvorbě depozit kolagenu a fibrotizaci, ta byla patrná také u nejvyšší dávky DWCNT. Ta také významně zvyšovala riziko pleurálního mezoteliomu.³⁰

K podobným výsledkům došli i jiní autoři. Například Gaté et al. porovnávali respirační účinky expozice MWCNT o různé délce, průměru, ploše a funkcionalizaci. Studie byla provedena na potkanech, kteří byli exponováni NM-401 (dlouhé, tlusté MWCNT) nebo NM-403 (krátké, tenké MWCNT). Expozice byla prováděna intratracheálně (jednorázově) nebo inhalálně (opakovaná 28denní expozice). Všechny expoziční scénáře indukovaly zánět v plicní tkáni, který byl spojený s influxem neutrofilů. Nejvyšší míra poškození, včetně fibrotizace, byla nalezena u potkanů, kteří byli vystaveni nejvyšším dávkám NM-401.³¹ Autoři Numano et al. ve své studii porovnávali toxické účinky intratracheální expozice potkanů uhlíkovým nanovláknům VGCFTM-H (dávky 0,2, 0,4 a 0,8 mg/kg) a MWCNT-7 (dávky 0,4 a 0,8 mg/kg; doba expozice osm týdnů). Z výsledků vyplývá, že vyšší míru poškození plic a pleury induko-

vala expozice MWCNT-7. Poškození zahrnovalo intenzivní zánět, buněčnou infiltraci plicní tkáně, alveolární, pleurální a brániční fibrózu a proliferaci plicního mezotelu.³² V jiné studii exponovali autoři Numano et al. intratracheálně potkany MWCNT-7 (jedenkrát týdně po dobu dvanácti týdnů; celková podaná dávka 1,5 mg/potkan). Autoři zjistili, že MWCNT po expozici translokovaly do pleurální dutiny, subpleurální tkáně a intrapleurálního prostoru; 35 týdnů po poslední expozici došlo k tvorbě mezoteliomů. Vznik mezoteliomů po aplikaci MWCNT potvrdili také Wang et al.^{33,34}

Poněkud odlišné výsledky prezentovali Kasai et al. V jejich studii byli potkani 104 týdnů inhalačně exponováni MWCNT-7 o koncentracích 0,02, 0,2 a 2 mg/m³. Histologické vyšetření tkáně pleury prokázalo přítomnost hyperplastických změn a fokální fibrózy, ale tento nálezn byl pozorován pouze u samců. U žádného ze zvířat nebyl zjištěn mezoteliom, na druhou stranu ale byly nalezeny nenádorové změny v dýchacích cestách (například bronchoalveolární hyperplazie) a maligní plicní nádory (bronchoalveolární karcinom, adenoskvamózní karcinom a adenokarcinom).³⁵

Z pohledu ochrany zdraví člověka má mimořádný význam studium dlouhodobých účinků expozice. Jednou z takových studií je práce Knudsen et al., která byla zaměřena na histologickou analýzu plicní tkáně myši jeden rok po jednorázové intratracheální expozici 54 µg směsi jedenácti dobře charakterizovaných MWCNT. Analýza potvrdila perzistenci MWCNT v plicní tkáni. Krátké, tenké MWCNT vytvářely v plicní tkáni aglomeráty, zatímco dlouhé, tlusté byly v tkáni přítomny jednotlivě. Tenké spletené MWCNT vyvolávaly zánět s infiltrací tkáně makrofágy a tvorbu granulomů. Přirozené NRCWE-040 byly translokovány do jater a způsobovaly poškození DNA. Z výsledků je zřejmé odlišné chování různých typů MWCNT v organismu, včetně rizika jejich perzistence.³⁶ Spletené MWCNT byly použity také ve studii autorů Kim et al. Potkani inhalovali různé dávky MWCTN (0,257, 1,439 a 4,253 mg/m³) po dobu 28 dní (6 hodin denně, 5 dní v týdnu). V závislosti na dávce vyvolávaly MWCNT záněty plic s tvorbou granulomů, zvýšeným počtem imunitních buněk a buněčnou smrtí. Retenční poločas nejvyšší koncentrace byl 35 dní, což je kratší poločas než pro rigidní MWCNT.³⁷

V podobně zaměřené studii exponovali Honda et al. potkany intratracheálně jedné dávce dvou typů SWCNT (krátkým SWCNT; dávka 0,2 a 1,0 mg/kg) a dlouhým SWCNT (dávka 1,0 mg/kg). Reakce respiračního traktu byla vyhodnocena za 26, 52 a 104 týdnů po expozici. Po 52 a 104 týdnech byl v plicích zjištěn zánět, depozita SWCNT a fibróza alveolárních sept. Vyšší poškození bylo nalezeno u potkanů exponovaných dlouhým SWCNT.³⁸

Výše uvedené studie prokazují translokaci inhalovaných MWCNT z respiračního traktu například do pleury a pleurální dutiny. Studie autorů Mercera et al. prokázala translokaci MWCNT i do dalších tkání. Myši byly v jejich experimentu inhalačně exponovány MWNT-7 (koncentrace 5 mg/m³, 5 hod/den) po dobu 12 dnů. V tracheobronchiálních lymfatických uzlinách myši byly nalezeny aglomeráty MWNT-7, jednotlivé MWNT-7 pak byly nalezeny v bráni, hrudní stěně, játrech, ledvinách, srdci a mozku. Depozita MWNT-7 byla vyšší 336. den po ukončení expozice než během prvního expozičního dne.³⁹

Vedle velmi často testovaných CNT (SWCNT a MWCNT) je pozornost věnována pochopitelně i dalším CNM, zastoupených fullereny, grafeny, GO, sazemi (CB) a nanodiamanty (ND). Například Caldeira et al. exponovali myši intratracheálně fullerenu (C₆₀; dávka 1,0 mg/kg). Expozice indukovala plicní zánět s velmi vážným poškozením terminálních dýchacích cest, kolapsem alveol, ztluštěním sept a s plicním edémem. Na buněčné úrovni došlo k mitochondriálním dysfunkcím, redukcii produkce ATP a ke zvýšení oxidačního stresu. Fulleren tedy vykazoval značnou toxicitu pro respirační trakt.⁴⁰

Grafen a materiály odvozené od grafenu (například GO) představují technologicky velmi významné CNM, nicméně ani u nich nelze vyloučit poškozující biologické účinky. Například autoři Kan et al. exponovali intratracheálně potkany GO. Ve své práci uvádějí, že expozice GO je spojena se zvýšenou expresí faktorů a aktivací dráhy kaspáza-1/p38MAPK/TGF- β 1 (dráha je zapojena do procesu fibrotizace plicní tkáně). Studie rovněž popisuje reversibilní poškození plicní tkáně, jater, slinivky a velmi vážné poškození varlat.⁴¹

Autoři Poulsen et al. prokázali, že jednorázová intratracheální expozice myši GO a redukovánému GO (rGO) (dávky 18, 54 nebo 162 $\mu\text{g}/\text{myš}$) narušuje transkriptom v plicní a jaterní tkáni (indukce zvýšení/snížení exprese různých genů). Expozice GO narušila již po prvním dni od aplikace expresi genů 1363, 3302 a 2343. Redukovaný GO narušil expresi genů 805 a 860 (dávky 54 a 162 μg). Během následujících devadesáti dní po expozici se počty rozdílně exprimovaných genů postupně snižovaly. Nejčastěji byly alterovány geny, které se podílí na rozpoznání patogenů (Tlr2, Myd88), geny ovlivňující aktivitu imunitního systému (Il6, Cxcr5, Tgf β 1) a geny regulující lipidový metabolismus (Ldlr, Apoa2) a oxidační stres.⁴²

Autoři Rodrigues et al. se zaměřili na studium vlivu různých velikostí částic GO a MWCNT na jejich biologické účinky u myši. Ve své práci použili různě velké částice GO (velké: 1–30 μm ; malé: 50 nm až 2 μm ; a velmi malé: menší než 300 nm). Ze skupiny MWCNT byly použity Mitsui-7. Aerosolizované CNM byly jednorázově aplikovány intratracheálně (dávka 50 $\mu\text{g}/\text{myš}$). Z výsledků vyplývá, že velké GO způsobovaly dlouhodobé poškození plic (včetně tvorby granulomů) a indukovaly produkci zánětlivých cytokinů (patologické změny perzistovaly po dobu 90 dní). Po expozici malým a velmi malým GO docházelo k menšímu rozsahu poškození a k plnému vyhojení po 28 dnech. Mimoplicní translokace GO byla zaznamenána jen u malých GO, které byly nalezeny rovněž v trávicím traktu a v ledvinách.⁴³

Ve studii autorů Shin et al. byli potkani exponováni po dobu pěti dnů grafenu o různých koncentracích (0,68–0,94 mg/m^3). Přímá toxicita v tomto experimentu prokázána nebyla, 28 dnů od ukončení expozice byla zjištěna pouze infiltrace plicní tkáně makrofágy, které fagocytovaly nanočástice.⁴⁴ Z uvedeného je zřejmé, že modifikace grafenu mohou disponovat, v některých případech, vyšším toxickým potenciálem než grafen.

Yanamala et al. porovnávali účinky kombinací různých druhů nanočástic (grafen, GO, rGO, MWCNT a CB; dávky 4 a 40 μg) o různých velikostech na orofaryngeálně exponovaných myších. Jedna skupina byla exponována kombinací rGO a MWCNT a druhá grafenu, GO a CB. Zatímco u první skupiny myši byla detekována zánětlivá odpověď s následným vyhojením poškozené tkáně, ve skupině druhé došlo ke vzniku chronických změn (tvorba granulomů a fibróza). U obou skupin bylo zjištěno perzistující vaskulární poškození.⁴⁵

Ve studii autorů Khosravi et al. byly myši vystaveny subakutní celotělové inhalační expozici ND (koncentrace 3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, tři hodiny denně, pět dní v týdnu; doba expozice 30 dnů). Autoři uvádějí nálezy zvýšených hladin oxidačního stresu v plicích, mozku a v srdci, mitochondriální dysfunkce a související snížení hladiny glutathionu. Přítomnost oxidačního stresu naznačuje možnost rozvoje zánětlivého procesu a poškození DNA.⁴⁶

Závěrem chceme prezentovat studii autorů Ganguly et al., kteří porovnáli toxicitu ultrajemných uhlíkových nanočástic (CNM < 100 nm) dle různých typů podání. Myši vystavili CNM buď inhalačně (inhalace 4 nebo 24 hodin), nebo intraarteriálně ekvivalentem celkově inhalované dávky (koncentrace 440 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Biologické vzorky byly analyzovány 4 a 24 hodin po vystavení CNM v případě inhalační expozice a po 4 hodinách v případě infuze). Inhalační expozice indukovala jak lokální plicní zánětlivou odpověď, tak systémovou zánětlivou odpověď. Byly nalezeny zvýšené počty granulocytů a monocytů v periferní krvi a byly zjištěna

indukce zánětu v srdečně-cévním systému a v játrech (nejvyšší míra poškození byla zjištěna u srdečně-cévního systému). Byl též prokázán protrombotický efekt CNM. Arteriální infuze indukovala jen mírnou zánětlivou odpověď.⁴⁷

Výsledky *in vitro* i *in vivo* studií svědčí o potenciální nebezpečnosti expozice CNM a o významném vlivu formy expozice na biologickou odpověď.

3.3 PRACOVNÍ EXPOZICE

V současné době existuje řada provozů, v nichž jsou vyráběny (nebo během výroby vznikají) CNM. Vzhledem k jejich mimořádným fyzikálně-chemickým vlastnostem (a praktickému uplatnění) lze předpokládat, že počet CNM technologií bude v nejbližším čase významně narůstat. S ohledem na výsledky studií *in vitro* a *in vivo*, které ve velké míře respirační toxicitu potvrzují, je naprosto nezbytné pokračovat zvýšenou měrou ve studiu expozičních rizik pro člověka. Významným „přítěžujícím“ faktorem humánní expozice CNM je subchronický až chronický charakter expozic (zejména v pracovním prostředí), kterému se experimentální studie *in vitro* a *in vivo* věnovaly zatím jen málo.^{48, 49}

V oblasti humánních expozic CNM bylo provedeno několik studií, jejichž výsledky se příliš neliší od dat získaných z pokusů *in vitro* a *in vivo*. Humánní expozice vedla k systémové zánětlivé odpovědi, ke zvýšení oxidačního stresu a ke změně transkriptomu.

Například studie autorů Lee et al. sledovala devět pracovníků exponovaných MWCNT. U pracovníků nebyly zjištěny změny plicních funkcí, hematologické změny ani změny vybraných biochemických parametrů. Analýza vydechaného vzduchu však odhalila (v porovnání s kontrolami) zvýšená množství ukazatelů oxidačního stresu malondialdehydu, 4-hydroxy-2-hexenal a n-hexanal.⁵⁰

Autoři Schubauer-Barigen et al. realizovali studii, v níž bylo zapojeno 108 pracovníků exponovaných CNT a nanovláknům. Ačkoli byly koncentrace CNM nízké, u 18 % z nich byly zjištěny CNM ve sputu. Nicméně ze spirometrického vyšetření vyplynulo, že u žádného zaměstnance nedošlo ke snížení plicních funkcí či k jejich patologickým změnám. Autoři uvádějí nálezy pozitivní asociace mezi respiračními alergiemi a koncentracemi a dobou expozice CNM.⁵¹

Ukazatele zánětu a fibrózy dýchacích cest u osob pracovně exponovaných MWCNT byly předmětem studie Fatkhutdinové et al. V jejich práci byla měřena míra inhalační pracovní expozice MWCNT (vnější průměr 8–15 nm, vnitřní průměr 4–8 nm, délka minimálně 2 μm) a byly odebrány vzorky tekutiny z nosní laváže, sputa a vzorky krevního séra 10 exponovaných osobám a 12 kontrolním neexponovaným osobám. Osoby byly exponované MWCNT po dobu delší než jeden rok. Expozice MWCNT zvyšovala hladiny vybraných prozánětlivých ukazatelů nejen ve sputu (IL-1β, IL-4, TNF-α, IL-5, IL-6, IL-8, a marker fibrotizačních plicních procesů KL-6), ale také v séru (IL-1β, IL-4, TNF-α a protizánětlivý IL-10). Navíc byly detekovány vyšší hladiny TGF-β u exponovaných osob mladších 35 let v porovnání se staršími exponovanými osobami a neexponovanými vrstevníky. Výsledky naznačují, že MWCNT mohou indukovat jak lokální zánětlivou a fibrotickou reakci v plicní tkáni, tak systémovou zánětlivou odpověď.⁵²

K podobným závěrům dospěli také kolektiv autorů Vlaanderen et al. V jejich studii participovalo 22 pracovníků s prokázanou expozicí MWCNT a 39 kontrol (první fáze studie). O tři měsíce později byly opakovaně hodnoceny vybrané ukazatele u deseti pracovníků a šesti

kontrol (druhá fáze studie). U exponovaných osob byly v první fázi studie nalezeny zvýšené koncentrace chemokinů CXCL-11, CCL-20, bazického fibroblastového růstového faktoru (FGF-BASIC) a solubilního receptoru IL-1RII. Ke snížení došlo v případě IL-16 a CTAC (*T-cell-attracting chemokine*). Plicní funkce a hladiny surfaktantu A a D alterovány nebyly. Ve druhé fázi studie byl zjištěn vyšší hladiny CTAC, CCL-20 a FGF-BASIC. Na základě těchto výsledků se autoři domnívají, že expozice MWCNT má prozánětlivý a profibrotický charakter.⁵³

Ve studii Shvedova et al. byly zjištěny významné změny v expresi nekódujících RNA (lncRNA, miRNA) i mRNA u pracovníků exponovaných nejméně šest měsíců MWCNT. U osob vystavených MWCNT byla zachycena změna exprese 977 lncRNA (expese 529 lncRNA se zvýšila, 448 lncRNA se snížila), 11 miRNA (u sedmi zvýšená exprese u 4 snižená) a v případě mRNA to bylo 785 genů (292 bylo zvýšeno, 493 sniženo).

Jednalo se hlavně o geny zapojené do kontroly buněčného cyklu, buněčné proliferace, apoptózy a karcinogeneze. Často byla zvýšená aktivita nekódujících RNA, které zvyšují expresi genů kódujících prozánětlivé cytokiny a složky prozánětlivých signálních drah.⁵⁴

3.4 ZÁVĚR

Dýchací soustava je v úzkém kontaktu s látkami, které se nachází v ovzduší. Fyzikálně-chemické vlastnosti CNM předurčují jejich osud v organismu, v tomto případě v dýchacích cestách, tj. do jakých etází dýchacích cest se dostávají, zda pronikají skrz dýchací soustavu až do krevního oběhu, kumulují se či jsou snadno eliminovány. Výsledky studií *in vitro*, *in vivo* i studií pracovních expozic naznačují, že expozice CNM mohou vést ke zvýšení oxidačního stresu, indukci zánětu a také měnit genovou expresi buněk. To vše jsou rizikové faktory, které mohou vést k destruktivním chronickým zánětům, fibrotizaci tkáně se ztrátou funkční tkáně a také k tumorigenezi. V případě přestupu CNM z dýchacích cest do krevního oběhu se mohou kumulovat v jiných tkáních a primárně poškozovat také samotný kardiovaskulární systém. V toxicitě CNM vůči dýchacímu systému hrají důležitou roli dávka a délka expozice.

3.5 LITERATURA

1. Rodrigues AF, Newman L, Jasim D et al. Size-Dependent Pulmonary Impact of Thin Graphene Oxide Sheets in Mice: Toward Safe-by-Design. *Adv Sci*. 2020;7(12):1903200. doi:10.1002/advs.201903200.
2. Ghafari J, Moghadasi N, Omari Shekaftik S. Oxidative Stress Induced by Occupational Exposure to Nanomaterials: A Systematic Review. *Ind Health*. 2020;58(6):492–502. doi:10.2486/indhealth.2020-0073.
3. Sturm R. Clearance of Carbon Nanotubes in the Human Respiratory Tract: A Theoretical Approach. *Ann Transl Med*. 2014;2(5):46. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2014.04.12.
4. Kagan VE, Konduru NV, Feng W et al. Carbon Nanotubes Degraded by Neutrophil Myeloperoxidase Induce Less Pulmonary Inflammation. *Nat Nanotechnol*. 2010;5(5):354–359. doi:10.1038/nano.2010.44.
5. Ursini CL, Fresegna AM, Ciervo A et al. Occupational Exposure to Graphene and Silica Nanoparticles. Part II: Pilot Study to Identify a Panel of Sensitive Biomarkers of Genotoxic, Oxidative, and Inflammatory Effects on Suitable Biological Matrices. *Nanotoxicology*. 2021;15(2):223–237. doi:10.1080/17435390.2020.1850903.

6. Centers for Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health. Occupational Exposure to Carbon Nanotubes and Nanofibers. *Current Intelligence Bulletin 65*. Department of Health and Human Services; 2013.
7. Grosse Y, Loomis D, Guyton KZ et al. Carcinogenicity of Fluoro-Edenite, Silicon Carbide Fibres and Whiskers, and Carbon Nanotubes. *Lancet Oncol.* 2014;15(13):1427–1428. doi:10.1016/S1470-2045(14)71109-X.
8. Frontiñan-Rubio J, González VJ, Vázquez E, Durán-Prado M. Rapid and Efficient Testing of the Toxicity of Graphene-Related Materials in Primary Human Lung Cells. *Sci Rep.* 2022;12(1):1–13. doi:10.1038/s41598-022-11840-2.
9. Nasirzadeh N, Azari MR, Rasoulzadeh Y, Mohammadian Y. An Assessment of the Cytotoxic Effects of Graphene Nanoparticles on the Epithelial Cells of the Human Lung. *Toxicol Ind Health.* 2019;35(1):79–87. doi:10.1177/0748233718817180.
10. Vallabani NVS, Mittal S, Shukla RK et al. Toxicity of Graphene in Normal Human Lung Cells (BEAS-2B). *J Biomed Nanotechnol.* 2011;7(1):106–107. doi:10.1166/JBN.2011.1224.
11. Mittal S, Kumar V, Dhiman N, Chauhan LKS, Pasricha R, Pandey AK. Physico-Chemical Properties Based Differential Toxicity of Graphene Oxide/Reduced Graphene Oxide in Human Lung Cells Mediated Through Oxidative Stress. *Sci Rep.* 2016;6:39548. doi:10.1038/SREP39548.
12. Azari M, Mohammadian Y. Comparing In Vitro Cytotoxicity of Graphite, Short Multi-Walled Carbon Nanotubes, and Long Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020;27(13):15401–15406. doi:10.1007/S11356-020-08036-4.
13. Barthel H, Darne C, Gaté L, Visvikis A, Seidel C. Continuous Long-Term Exposure to Low Concentrations of MWCNTs Induces an Epithelial-Mesenchymal Transition in BEAS-2B Cells. *Nanomater.* 2021;11(7):1742. doi:10.3390/NANO11071742.
14. Phuyal S, Kasem M, Knittelfelder O et al. Characterization of the Proteome and Lipidome Profiles of Human Lung Cells After Low Dose and Chronic Exposure to Multiwalled Carbon Nanotubes. *Nanotoxicology.* 2018;12(2):138–152. doi:10.1080/17435390.2018.1425500.
15. Li J, Tian M, Cui L et al. Low-Dose Carbon-Based Nanoparticle-Induced Effects in A549 Lung Cells Determined by Biospectroscopy Are Associated With Increases in Genomic Methylation. *Sci Rep.* 2016;6(1):1–11. doi:10.1038/srep20207.
16. Chen D, Stueckle TA, Luanpitpong S, Rojanasakul Y, Lu Y, Wang L. Gene Expression Profile of Human Lung Epithelial Cells Chronically Exposed to Single-Walled Carbon Nanotubes. *Nanoscale Res Lett.* 2015;10(1):1–12. doi:10.1186/S11671-014-0707-0.
17. Spannbrucker T, Ale-Agha N, Goy C et al. Induction of a Senescent-Like Phenotype and Loss of Gap Junctional Intercellular Communication by Carbon Nanoparticle Exposure of Lung Epithelial Cells. *Exp Gerontol.* 2019;117:106–112. doi:10.1016/J.EXGER.2018.11.017.
18. Lucas JH, Wang Q, Muthumalage T, Rahman I. Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) Cause Cellular Senescence in TGF- β Stimulated Lung Epithelial Cells. *Toxics.* 2021;9(6):144. doi:10.3390/TOXICS9060144.
19. Ji J, Ganguly K, Mihai X et al. Exposure of Normal and Chronic Bronchitis-Like Mucosa Models to Aerosolized Carbon Nanoparticles: Comparison of Pro-Inflammatory Oxidative Stress and Tissue Injury/Repair Responses. *Nanotoxicology.* 2019;13(10):1362–1379. doi:10.1080/17435390.2019.1655600.
20. Schramm F, Lange M, Hoppmann P, Heutelbeck A. Cytotoxicity of Carbon Nanohorns in Different Human Cells of the Respiratory System. *J Toxicol Environ Health A.* 2016;79(22-23):1085–1093. doi:10.1080/15287394.2016.1219594.
21. Barosova H, Karakocak BB, Septiadi D, Petri-Fink A, Stone V, Rothen-Rutishauser B. An In Vitro Lung System to Assess the Proinflammatory Hazard of Carbon Nanotube Aerosols. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):1–20. doi:10.3390/IJMS21155335.

22. Chortarea S, Clift MJD, Vanhecke D et al. Repeated Exposure to Carbon Nanotube-Based Aerosols Does Not Affect the Functional Properties of a 3D Human Epithelial Airway Model. *Nanotoxicology*. 2015;9(8):983–993. doi:10.3109/17435390.2014.993344.
23. Di Cristo L, Grimaldi B, Catelani T, Vázquez E, Pompa PP, Sabella S. Repeated Exposure to Aerosolized Graphene Oxide Mediates Autophagy Inhibition and Inflammation in a Three-Dimensional Human Airway Model. *Mater Today Bio*. 2020;6:100050. doi:10.1016/J.MTBIO.2020.100050.
24. Hu Q, Jiao B, Shi X, Valle RP, Zuo YY, Hu G. Effects of Graphene Oxide Nanosheets on the Ultrastructure and Biophysical Properties of the Pulmonary Surfactant Film. *Nanoscale*. 2015;7(43):18025–18029. doi:10.1039/C5NR05401J.
25. Kondej D, Sosnowski TR. Interactions of Carbon Nanotubes and Carbon Nanohorns With a Model Membrane Layer and Lung Surfactant in Vitro. *J Nanomater*. 2019;2019(1):9457683. doi:10.1155/2019/9457683.
26. Sager TM, Umbright CM, Mustafa GM et al. Pulmonary Toxicity and Gene Expression Changes in Response to Whole-Body Inhalation Exposure to Multi-Walled Carbon Nanotubes in Rats. *Inhal Toxicol*. 2022;34(7–8):200–218. doi:10.1080/08958378.2022.2081386.
27. Alswady-Hoff M, Samulin-Erdem J, Aleksandersen M et al. Multiwalled Carbon Nanotubes Induce Fibrosis and Telomere Length Alterations. *Int J Mol Sci*. 2022;23(11):6005. doi:10.3390/ijms23116005.
28. Khaliullin TO, Yanamala N, Newman MS, Kisin ER, Fatkhutdinova LM, Shvedova AA. Comparative Analysis of Lung and Blood Transcriptomes in Mice Exposed to Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2020;390:114898. doi:10.1016/j.taap.2020.114898.
29. Rahman L, Jacobsen NR, Aziz SA et al. Multi-Walled Carbon Nanotube-Induced Genotoxic, Inflammatory and Pro-Fibrotic Responses in Mice: Investigating the Mechanisms of Pulmonary Carcinogenesis. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2017;823:28-44. doi:10.1016/j.mrgentox.2017.08.005.
30. Saleh DM, Luo S, Ahmed OHM et al. Assessment of the Toxicity and Carcinogenicity of Double-Walled Carbon Nanotubes in the Rat Lung After Intratracheal Instillation: A Two-Year Study. *Part Fibre Toxicol*. 2022;19(1):1–21. doi:10.1186/s12989-022-00469-8.
31. Gaté L, Knudsen KB, Seidel C et al. Pulmonary Toxicity of Two Different Multi-Walled Carbon Nanotubes in Rat: Comparison Between Intratracheal Instillation and Inhalation Exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2019;375:17–31. doi:10.1016/j.taap.2019.05.001.
32. Numano T, Sugiyama T, Kawabe M et al. Lung Toxicity of a Vapor-Grown Carbon Fiber in Comparison With a Multi-Walled Carbon Nanotube in F344 Rats. *J Toxicol Pathol*. 2021;34(1):57. doi:10.1293/TOX.2020-0064.
33. Numano T, Higuchi H, Alexander DB et al. MWCNT-7 Administered to the Lung by Intratracheal Instillation Induces Development of Pleural Mesothelioma in F344 Rats. *Cancer Sci*. 2019;110(8):2485–2492. doi:10.1111/cas.14121.
34. Wang Q, Wang Q, Zhao Z et al. Pleural Translocation and Lesions by Pulmonary Exposed Multi-Walled Carbon Nanotubes. *J Toxicol Pathol*. 2020;33(3):145–151. doi:10.1293/tox.2019-0075.
35. Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M et al. Lung Carcinogenicity of Inhaled Multi-Walled Carbon Nanotube in Rats. *Part Fibre Toxicol*. 2016;13:53. doi:10.1186/S12989-016-0164-2.
36. Knudsen KB, Berthing T, Jackson P et al. Physicochemical Predictors of Multi-Walled Carbon Nanotube-Induced Pulmonary Histopathology and Toxicity One Year After Pulmonary Deposition of 11 Different Multi-Walled Carbon Nanotubes in Mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2019;124(2):211–227. doi:10.1111/bcpt.13119.
37. Kim JK, Jo MS, Kim Y et al. 28-Day Inhalation Toxicity Study With Evaluation of Lung Deposition and Retention of Tangled Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Nanotoxicology*. 2020;14(2):250–262. doi:10.1080/17435390.2019.1700568.

38. Honda K, Naya M, Takehara H, Kataura H, Fujita K, Ema M. A 104-Week Pulmonary Toxicity Assessment of Long and Short Single-Wall Carbon Nanotubes After a Single Intratracheal Instillation in Rats. *Inhal Toxicol.* 2017;29(11):471–482. doi:10.1080/08958378.2017.1394930.
39. Mercer RR, Scabilloni JF, Hubbs AF et al. Extrapulmonary Transport of MWCNT Following Inhalation Exposure. *Part Fibre Toxicol.* 2013;10(1):38. doi:10.1186/1743-8977-10-38.
40. Caldeira D de AF, Mesquita FM, Pinheiro FG et al. Acute Exposure to C60 Fullerene Damages Pulmonary Mitochondrial Function and Mechanics. *Nanotoxicology.* 2021;15(3):352–365. doi: 10.1080/17435390.2020.1863498.
41. Kan Z, Zhao KX, Jiang C et al. Respiratory Exposure to Graphene Oxide Induces Pulmonary Fibrosis and Organ Damages in Rats Involving Caspase-1/p38MAPK/TGF- β 1 Signaling Pathways. *Chemosphere.* 2022;303:135181. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2022.135181.
42. Poulsen SS, Bengtson S, Williams A et al. A Transcriptomic Overview of Lung and Liver Changes One Day After Pulmonary Exposure to Graphene and Graphene Oxide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2021;410:115343. doi:10.1016/J.TAAP.2020.115343.
43. Rodrigues AF, Newman L, Jasim D et al. Size-Dependent Pulmonary Impact of Thin Graphene Oxide Sheets in Mice: Toward Safe-by-Design. *Adv Sci.* 2020;7(12):1903200. doi:10.1002/ADVS.201903200.
44. Shin JH, Han SG, Kim JK et al. 5-Day Repeated Inhalation and 28-Day Post-Exposure Study of Graphene. *Nanotoxicology.* 2015;9(8):1023–1031. doi:10.3109/17435390.2014.998306.
45. Yanamala N, Desai IC, Miller W et al. Grouping of Carbonaceous Nanomaterials Based on Association of Patterns of Inflammatory Markers in BAL Fluid With Adverse Outcomes in Lungs. *Nanotoxicology.* 2019;13(8):1102–1116. doi:10.1080/17435390.2019.1640911.
46. Khosravi Y, Salimi A, Pourahmad J, Naserzadeh P, Seydi E. Inhalation Exposure of Nano Diamond Induced Oxidative Stress in Lung, Heart, and Brain. *Xenobiotica.* 2018;48(8):860–866. doi:10.1080/00498254.2017.1367974.
47. Ganguly K, Etehadieh D, Upadhyay S et al. Early Pulmonary Response Is Critical for Extra-Pulmonary Carbon Nanoparticle Mediated Effects: Comparison of Inhalation Versus Intra-Arterial Infusion Exposures in Mice. *Part Fibre Toxicol.* 2017;14(1):1–17. doi:10.1186/s12989-017-0200-x.
48. Adamec V, K ob olov a K, Urb anek M,  abanov a K, Bencko V, Tu ek M. The Presence of Fine and Ultrafine Particulate Matter in the Work Environment. *Cent Eur J Public Health.* 2020;28(Supplement):31–36. doi:10.21101/cejph.a6174.
49. Pelclova D, Zdimal V, Komarc M et al. Three-Year Study of Markers of Oxidative Stress in Exhaled Breath Condensate in Workers Producing Nanocomposites, Extended by Plasma and Urine Analysis in Last Two Years. *Nanomaterials.* 2020;10(12):2440. doi:10.3390/nano10122440.
50. Lee JS, Choi YC, Shin JH et al. Health Surveillance Study of Workers Who Manufacture Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Nanotoxicology.* 2015;9(6):802–811. doi:10.3109/17435390.2014.978404.
51. Schubauer-Berigan MK, Dahm MM, Erdely A et al. Association of Pulmonary, Cardiovascular, and Hematologic Metrics With Carbon Nanotube and Nanofiber Exposure Among U.S. Workers: A Cross-Sectional Study. *Part Fibre Toxicol.* 2018;15(1):1–14. doi:10.1186/s12989-018-0258-0.
52. Fatkhutdinova LM, Khaliullin TO, Vasil'yeva OL et al. Fibrosis Biomarkers in Workers Exposed to MWCNTs. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016;299:125–131. doi:10.1016/j.taap.2016.02.016.
53. Vlaanderen J, Pronk A, Rothman N et al. A Cross-Sectional Study of Changes in Markers of Immunological Effects and Lung Health Due to Exposure to Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Nanotoxicology.* 2017;11(3):395–404. doi:10.1080/17435390.2017.1308031.
54. Shvedova AA, Yanamala N, Kisin ER, Khaliullin TO, Birch ME, Fatkhutdinova LM. Integrated Analysis of Dysregulated ncRNA and mRNA Expression Profiles in Humans Exposed to Carbon Nanotubes. *PLoS One.* 2016;11(3):e0150628. doi:10.1371/journal.pone.0150628.

ZKRATKY

16HBE	lidská bronchiální epiteliální buněčná linie (<i>human bronchial epithelial cells</i>)
3HFWC	hyper-harmonizovaný vodní komplex hydroxylovaného fullerenu C ₆₀
A549	alveolární epiteliální buňky A549 (<i>adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells</i>)
ABCA-1	<i>ATP-binding cassette transporter</i>
ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
ARPE-19	imortalizované lidské retinální buňky
AST	aspartátaminotransferáza
BAL	bronchoalveolární laváž
BEAS-2B	imortalizovaná a nenádorová linie lidských plicních epiteliálních buněk (<i>bronchial epithelial cells</i>)
BMEC	mozkové mikrovaskulární endoteliální buňky (<i>bone marrow microvascular endothelial cells</i>)
BSA	bovinní sérový albumin
BUN	<i>blood urea nitrogen</i>
C ₆₀	fulleren
CaCo2	buněčná linie lidského kolorektálního adenokarcinomu (<i>human colon adenocarcinoma cell line</i>)
Caco-2	imortalizované lidské buňky kolorektálního adenokarcinomu
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAT	kataláza
CB	saze (<i>carbon black</i>)
CD	uhlíkové tečky (<i>carbon dots</i>)
CDH1	kadherin 1
CFU	kolonie tvořící jednotku
CHCE-T	lidské rohovkové epitelové buňky
CNF	uhlíková nanovláknina (<i>carbon nanofibres</i>)
CNH	uhlíkové nanorohy (<i>carbon nanohorns</i>)
CNM	uhlíkové nanomateriály (<i>carbon nanomaterials</i>)
CNP	uhlíkové destičky (<i>carbon platelets</i>)
CNS	centrální nervová soustava
CNT	uhlíkové nanotrubicce (<i>carbon nanotubes</i>)
CPPED1	<i>calcineurin-like phosphoesterase domain containing 1</i>
CT	počítačová tomografie
CVD	chemická depozice z plynné fáze

DAMP	<i>damage/danger-associated molecular patterns</i>
DWCNT	dvoustěnné uhlíkové nanotrubičky (<i>double-walled carbon nanotubes</i>)
EC ₅₀	polovina maximální účinné koncentrace
EEG	elektroencefalografie
EKG	elektrokardiografie
EPC	endoteliální progenitorové buňky
EPO	eozinofilní peroxidáza
FBN1	fibrilin 1
FBS	fetální bovinní sérum
FDT	fotodynamická terapie
FLG	vícevrstvý grafen (<i>few layer graphene</i>)
FLGO	několikvrstvý grafen oxid (<i>few-layer graphene oxide</i>)
FN1	fibronektin
FSF1	fibroblasty z kůže lidského obličeje
FSH	folikuly stimulující hormon
FTT	fototermální terapie
GGT	γ -glutamyltransferáza
GIT	gastrointestinální trakt
GNP	grafenové nanodestičky (<i>graphene nanoplatelets</i>)
GO	oxid grafenu (<i>graphen oxide</i>)
GO-DOTA	oxid grafenu funkcionalizovaný kyselinou 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctovou
GO-QD	kvantové tečky oxidu grafenu (<i>graphene oxide quantum dots</i>)
GP	grafenové plátky
GPCR	receptor spřažený s G proteinem (<i>G protein-coupled receptors</i>)
GQD	grafenové kvantové tečky (<i>graphene quantum dots</i>)
H2AFX	<i>histone family member X</i>
H9c2	kardiomyoblasty
HaCaT	imortalizované keratinocyty
HASMC	buňky hladké svaloviny aorty (<i>human aortic smooth muscle cells</i>)
HBEC-3KT	nenádorové buňky lidského bronchiálního epitelu
hConECs	lidské epitelové spojivkové buňky
hCorECs	lidské epitelové buňky rohovky
HEB	hematoencefalická bariéra
HEK-293T	lidské embryonální ledvinné buňky
HepG2	buňky hepatocelulárního karcinomu
HK-2	dospělé lidské buňky proximální tubulárního epitelu
HLF	lidské plicní fibroblasty (<i>human lung fibroblasts</i>)
HNEpC	primární buňky lidského nosního epitelu
hpf	hodin po fertilizaci
HSC 2012	Hazard Communication Standard
Hsp90	<i>heat shock protein 90</i>
HT29	buňky lidského kolorektálního adenokarcinomu s epiteliální morfologií
HUVEC	endoteliální buňky lidské pupečnickové žíly (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICAM-1	solubilní intercelulární adhezni molekuly 1 (<i>intercellular adhesion molecules</i>)
IL	interleukin
LLC-PK1	prasečí buňky proximálního ledvinného tubulu
LOX-1	<i>lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor</i>
LPS	lipopolysacharid

MAMP	<i>microbe-associated molecular patterns</i>
MPO	myeloperoxidáza
MWCNT	vícetěnné uhlíkové nanotrubičky (<i>multi-walled carbon nanotubes</i>)
MWCNT-PVP	mnohovrstvé uhlíkové nanotrubičky funkcionalizované polyvinylpyrrolidonem
MWCNT-TEPA	MWCNT funkcionalizované tetraetylenpentaminem
NCI-H322	nemalobuněčný bronchoalveolární karcinom
NCM460	epitelové buňky tlustého střeva
ND	nanodiamanty
NET	extracelulární neutrofilové pasti (<i>neutrofil extracellular traps</i>)
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NHBE	normální lidské bronchiální epitelové buňky
NHDF	lidské dermální fibroblasty
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health
NIR	blízké infračervené záření
NKR-52E	kryší epitelové buňky ledvin
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NLRP3	<i>NOD-like receptor family pyrin domain containing 3</i>
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
Ox-MWCNT	oxidované MWCNT
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PEG	polyethylenglykol
PEG-MWCNT	polyethylenglykolované MWCNT
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PTEN	homolog fosfatázy a TENSinu (<i>phosphatase and TENsin homolog</i>)
RES	retikuloendoteliální systém
rGO	redukovaný GO
RhE	SkinEthic™ model rekonstruované lidské epidemirs
ROS	volné kyslíkové radikály (<i>reactive oxygen species</i>)
RPE	retinální pigmentový epitel
RTG	rentgenové záření
SAEC	epitelové buňky nižších etází dýchacích cest (<i>small airway epithelial cells</i>)
sFLG	malý vícevrstevný grafen (<i>small few-layer graphene</i>)
SLGO	jednovrstvý grafen oxid (<i>single-layer graphene oxide</i>)
SOD1	superoxiddismutáza
SWCNT	jednovrstvé uhlíkové nanotrubičky (<i>single-wall carbon nanotubes</i>)
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TGFB1	transformující růstový faktor β (<i>transforming growth factor β</i>)
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
T-MWCNT	dispergované Tweenem-80
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
VCAM-1	solubilní vaskulární buněčné adhezni molekuly 1 (<i>vascular cell adhesion molecule</i>)
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor
Vero	buněčná linie epitelialních buněk ledvin z afrického kočkodana zeleného
ZO-1	zonula occludens-1