

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>.

9. Imunotoxicita

(Tereza Švadláková, Ctirad Andrýs)

© Univerzita Karlova, 2025

© Tereza Švadláková, Ctirad Andrýs, 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/10.14712/9788024659848.9>

9 IMUNOTOXICITA

Rostoucí produkce a aplikační potenciál uhlíkových nanomateriálů (CNM) jde ruku v ruce s nárůstem rizika jejich přímého kontaktu s člověkem. Z toho důvodu představují CNM časté téma toxikologických studií, v nichž bývá frekventovaným nálezem zvýšená produkce prozánětlivých cytokinů.¹ Je tedy zřejmé, že v možném toxickém působení CNM má esenciální úlohu imunitní systém. Tato vysoce organizovaná, striktně regulovaná síť specializovaných buněk a molekul představuje naši obrannou bariéru proti cizím mikroorganismům a částicím. Imunitní dohled, který zahrnuje rozpoznání a eliminaci vlastních infikovaných, poškozených nebo jinak abnormálních struktur a buněk, je zároveň kritickým faktorem pro udržení vnitřní homeostázy. Její narušení pak může vést ke vzniku chronických abnormalit vedoucích k rozvrácení celého systému. Důležitá je též skutečnost, že složky imunitního systému jsou zastoupeny téměř v celém organismu, tudíž vzájemná interakce s postupujícími CNM je nevyhnutelná. V případě biomedicínské aplikace může být interakce i cílená (adjuvancia, nosiče). Z uvedeného tedy vyplývá naprostá nutnost hodnocení vzájemných interakcí mezi CNM a složkami imunitního systému.

Jak bylo již mnohokrát zmíněno a shrnuto v mnoha publikacích, v posledních letech byly CNM intenzivně studovány jak pro potenciální biomedicínské využití, tak v rámci možného rizika pro lidské zdraví.¹⁻³ Podstatným faktem je, že většina CNM, převážně nemodifikovaných, může přetrvávat v organismu po velmi dlouhou dobu. Ty se pak hromadí nejčastěji v mezibuněčných prostorách a přítomných makrofázích.^{4,5} Naopak povrchová úprava jako oxidace vede ke změnám v reaktivitě umožňující např. enzymatickou degradaci navázáním endogenních peroxidáz pocházejících z granulocytů.^{6,7} Je zřejmé, že specifické funkce především přirozené imunity se vždy nějakým podílem účastní zpracování, degradace nebo eliminace CNM. Kdykoli během těchto procesů může dojít k poškození daných buněk, případně narušení jejich primárních funkcí. Takovéto působení zahrnující cytotoxické, nežádoucí imunopresivní a imunostimulační působení se nazývá imunotoxicita.⁸

9.1 ROZPOZNÁNÍ CNM SLOŽKAMI IMUNITNÍHO SYSTÉMU

Po vstupu do organismu jsou CNM rozeznávány několika způsoby. Dominantní úlohu zde hrají vrozené imunitní mechanismy (mechanismy přirozené imunity) zprostředkované hlavními efektoři přirozené imunity, profesionálními fagocyty. Jejich hlavní funkcí je identifikovat rizikové (především infekční) částice, pohltnit je a rozložit. K tomu využívají širokou škálu

intracelulárních (cytoplazmatických) a membránových receptorů (PRR, *pattern recognition receptors*), které rozpoznávají motivy spojené s poškozením buněk a tkání (DAMP, *damage-associated molecular patterns*) a evolučně zakonzervované motivy, typicky se vyskytující u různých skupin mikroorganismů (MAMP, *microbe-associated molecular patterns*) a patogenních mikroorganismů (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*).

Příkladem intracelulárních receptorů je skupina NOD-like (*nucleotide-binding oligomerization domain*) receptory (NLR), které jsou kromě jiného také součástí inflamazomu, viz dále. Významný podíl na rozpoznání CNM mají pravděpodobně membránové Toll-like receptory (TLR), které zahrnují TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 a TLR10 zakotvené v cytoplazmatické membráně, případně TLR3, TLR7, TLR8 a TLR9 lokalizované na membránách intracelulárních váčků.⁹ V tomto ohledu hraje klíčovou úlohu vysoce reaktivní povrch CNM, díky kterému na sebe váží nejruznější PAMP např. lipopolysacharid (LPS).

LPS tvoří součást buněčné stěny gramnegativních bakterií a v krvi je rozeznáván pomocí TLR4, kdy skrze aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) indukuje produkci prozánětlivých cytokinů, jako jsou interleukin-6 a TNF- α (*tumor necrosis factor alfa*).¹⁰ Samotný LPS patří mezi nejčastější kontaminanty v chemikáliích a na laboratorních površích a díky termostabilitě ho nelze snadno odstranit.¹¹ Z toho vyplývá častý kontakt s CNM, na které se pomocí hydrofobních a elektrostatických interakcí naváže.^{12,13} Takto kontaminované CNM se pro fagocyty stávají lépe rozeznatelné a tím pádem i více imunogenní a potenciálně cytotoxické.¹³ K této situaci ovšem nedochází jen v případě CNM, jak vyplývá z některých studií, které pozorovaly zesílení imunitní odpovědi i vůči simultánní expozici LPS spolu s nanočásticemi zlata či oxidu titaničitého.^{14–16} Není překvapivé, že kontaminované nanočástice mohou být ve zvýšené míře také fagocytovány.

Nedávná studie provedená na myších j774.1 makrofázích ukázala na vyšší efektivitu v pohlcování vícečetných uhlíkových nanotrubic (MWCNT) a nemodifikovaného grafenu v přítomnosti LPS oproti CNM zbavených pyrogenů, přičemž zároveň docházelo k aktivaci inflamazomu NLR4, jehož hlavním stimulantem je bakteriální flagelin.¹³ Je logické, že navázaný kontaminant je fagocytován spolu s CNM, což vede k situaci, kdy jeho intracelulární koncentrace značně převyšuje běžné podmínky. Zároveň dochází k pohlcení i takových adsorbentů, které by do buněk jinak nepronikly. CNM včetně ostatních nanočástic tedy mohou fungovat jako takzvané „trojské koně“.¹⁵ Následná imunitní odpověď pak nemusí odpovídat „čistým“ CNM, což často vede i ke zkreslení dat imunologických a cytotoxických testů.

Podobně jako přítomnost kontaminace ovlivňuje rozeznání částic vznik proteinové korony. Jedním z nejvýznamnějších proteinů je v tomto ohledu sérový albumin, který po adsorpci na povrch CNM obvykle brání nespecifickým interakcím, které mezi samotnou částicí a buněčnou membránou mohou nastat. Důkazem je *in vitro* studie, ve které bovinní sérový albumin (BSA) snižoval pohlcování grafen oxidu (GO) buňkami A549.¹⁷ Naopak bezsérové podmínky v nedávné studii Yana et al. vedly k nárůstu pohlcení uhlíkových teček THP-1 makrofágy.¹⁸ Podobný maskovací efekt byl potvrzen pro sérový fibrinogen, gamma globulin a transferin, přičemž důsledkem byla i nižší cytotoxicita.^{19,20}

Ačkoliv proteinová korona moduluje ingesci i cytotoxicitu CNM, základem je jejich struktura a chemické modifikace. Ukázalo se, že nehlédě na přítomnost séra, nemodifikované CNT a fullereny jsou schopny pomocí nespecifických hydrofobních interakcí aktivovat některé TLR a vyvolat zánět spojený s produkcí cytokinů.^{21,22} Totéž se ovšem neprokázalo pro GO.²¹ Na rozdíl od CNT, GO a potažmo grafen disponují planární strukturou, která nabízí

lepší adsorbční kapacitu. Vznikající proteinová korona tak kromě lepšího maskování může zvyšovat tloušťku grafenových šupin a tím ovlivnit výsledné interakce.²³

Na druhou stranu, navázané proteiny mohou změnit svoji konformaci, což vede k odhalení potenciálně vazebných míst, jak např. naznačuje studie sledující vazbu mezi MWCNT a scavenger receptorem SR-A1.²⁴ Za fyziologických podmínek váže SR-A1 polyanionické skupiny a nijak nereaguje s BSA, avšak v této studii byla pozorována zvýšená ingesce MWCNT právě v přítomnosti BSA. Autoři navíc vyhodnotili efekt jako semiaditivní, jelikož dalším z určujících faktorů byla karboxylace MWCNT. Zatímco karboxylované MWCNT byly snadno fagocytovány myšimi RAW makrofágy a transfekovanými CHO (mSR-A1) buňkami, nemodifikované a amino-funkcionalizované MWCNT zůstaly nepohlčené. Zajímavostí bylo, že endocytóza MWCNT vedla ve výsledku ke snížení počtu volných receptorů na povrchu buněk, čímž ovlivnila následnou fagocytózu běžných SR-A1 agonistů.²⁵

Zvláštní postavení v rozpoznání CNM má vazba složek komplementového systému, který patří mezi základní regulační a efektorové mechanismy vrozené imunity. Po aktivaci kterékoliv ze tří cest (klasické, alternativní i lektinové) dochází k tvorbě prozánětlivých fragmentů komplementových proteinů, které slouží jako opsonizační a chemotaktické působky výrazně stimulující imunitní odpověď. Jedním z mechanismů účinku je v přítomnosti buněčných povrchů bakteriálních, nádorových anebo stresovaných buněk sestavení proteinového komplexu MAC (*membrane attack complex*) perforujícího buněčnou membránu s následným kolapsem buňky. Jako součást biokorony tedy komplementové proteiny mohou jednak umožňovat vstřebávání CNM do buněk, jednak může jejich interakce vyvolat neregulovanou nežádoucí aktivaci vedoucí k patologické imunitní reakci a k narušení homeostázy.

Jedna z raných studií prokázala vazbu C1q složky komplementu na povrch jednotlivých (SWCNT) i dvoustěnných (DWCNT) trubic, kdy u DWCNT potvrdila aktivaci také alternativní dráhy.²⁶ Vazba C1q byla potvrzena také u nanodiamantů (ND), u kterých vedla k jejich aglutinaci, ale bez následné aktivace komplementové kaskády. Nicméně navázaná C1q usnadnila fagocytózu makrofágy spojenou s jejich aktivací a produkcí cytokinů.²⁷ Wibroe et al. prokázali aktivaci komplementu u GO, přičemž míra aktivace souvisela s obsahem kyslíku.²⁸ V závislosti na funkcionalizaci byl nemodifikovaný GO schopen rovněž štěpit C3 složku, která iniciuje alternativní cestu aktivace.²⁹ Naproti tomu vazba faktoru H aktivaci GO inhibovala, přičemž ochrana byla silnější než u albuminu.³⁰

Z uvedeného vyplývá, že rozpoznání a následnou ingesci lze ovlivnit správnou modifikací. Za tímto účelem se nejčastěji volí modifikace pomocí polyethylenglykolu (PEG), který obvykle CNM alespoň částečně maskuje.^{31,32} Nicméně nelze zapomenout na význam vlastních charakteristik a individuality různých CNM, kdy v kombinaci s uvedenými modifikacemi mohou negativní reakce také zesílit, či dokonce vyvolat.³³

Uvedené výsledky jsou jen malou sondou do složité problematiky rozpoznání a pohlčování CNM buňkami. O výsledné reakci tak rozhodují vlastní fyzikálně-chemické charakteristiky, tvorba proteinové korony a možná přítomnost kontaminace. V *in vitro* experimentech hraje důležitou roli i výběr buněčného modelu. Vzhledem k faktu, že nanočástice včetně CNM jsou zpracovány a eliminovány především fagocytárním aparátem, jsou v rámci imunotoxicity nejčastěji využívané lidské primární makrofágy odvozené z kostní dřeně, leukemická monocytární linie THP-1 a z nich odvozené makrofágy, myší imortalizované makrofágy j774a.1 a RAW264.7, případně myši primární makrofágy.³⁴ Hlavním mechanismem vstupu CNM do buněk pak bývá nejčastěji fagocytóza a receptorem zprostředkovaná endocytóza.^{24,25,35–37} U menších částic lze pozorovat volnou difúzi, případně makropinocytózu.^{38–40} V souvislosti

zejména s dlouhými rigidními CNT bývá také často zmiňována nekompletní nebo též frustrovaná fagocytóza.^{41,42} K té dochází v případě, kdy buňka není schopna pohltit částice větší, než je ona sama, a díky následnému poškození buněčných struktur dochází k jejímu zániku.

9.2 ZÁNĚT

Stěžejní otázkou při zkoumání imunotoxicity CNM je jejich schopnost vyvolat nebo utlumit zánět. Pomineme-li vliv specifických modifikací nebo kontaminace, základní mechanismus působení, který zahrnuje oxidativní stres a mechanické poškození, vychází z jejich intracelulární distribuce a depozice. Ty závisí na stejné škále faktorů jako předešlé rozpoznání a vstup. U profesionálních fagocytů pozorujeme tendenci uzavřít CNM v endozomech, případně fagosomech a autofagosomech, což teoreticky brání dalšímu poškození. Jedná se především o ND a grafenové plátky/šupiny (GP).^{39,43}

Buňky bez fagocytárních funkcí nejsou schopny CNM soustředit do endozomů, čímž riziko poškození intracelulárních struktur stoupá. Buňky ztrácejí své homeostatické mechanismy a umírají. Příkladem mohou být B lymfocyty, u kterých byla na rozdíl od monocytů prokázána vyšší citlivost vůči karboxylovaným ND, přestože pohlcovaly ND násobně méně. Nicméně pohlcené ND vyvolaly u monocytů produkci prozánětlivých cytokinů.⁴⁴ Další studie založená na THP-1 modelu sledovala vysokou akumulaci ND v lysozomech, kdy však ND o velikosti 100 nm byly schopné jejich membránu proříznout. To mělo za následek uvolnění katepsinu B a aktivaci prozánětlivé odpovědi.³⁹ Podobný efekt bývá pravidelně nacházen u CNT, kdy zejména dlouhé rigidní trubice pronikají membránou intracelulárních váčků a výsledné poškození v kombinaci s oxidativním stresem aktivuje inflamazom, hlavní mediátor zánětu vyvolaným nanočásticemi.^{45–47}

Z obecného hlediska je inflamazom cytoplazmatický makromolekulární komplex, který je sestavován na základě identifikace signálů nebezpečí pocházejících z infekčních agens PAMP a MAMP nebo signálů poškození buňky DAMP. Výsledkem je konverze neaktivního proteolytického enzymu prokaspázy-1 na aktivní formu, která nadále mění prekurzory cytokinů pro-IL-1 β a pro-IL-18 na biologicky účinné formy IL-1 β a IL-18. Dochází k zánětlivé reakci, která za extrémní situace může vyústit v zánětlivou smrt buňky, pyroptózu.⁴⁸

Inflamazomů existuje několik typů, přičemž z hlediska imunotoxicity nanomateriálů se jeví jako klíčový inflamazom NLRP3 (*nod-like receptor family pyrin domain containing 3*).⁴⁹ Dosud byly popsány tři cesty aktivace NLRP3. Nejvíce probádaná je tzv. kanonická cesta u makrofágů, která vyžaduje dva signály. První signál (*priming*) pochází obvykle z prostředí mimo buňku a poskytují ho často struktury patogenů (PAMP), např. LPS. Díky němu dojde k aktivaci signální dráhy NF- κ B a přepisu genů pro prekurzory kaspázy-1 a IL-1 β . Druhý signál, pocházející obvykle z vnitřního prostředí buňky, poskytují patogeny proniknuvší do cytoplazmy, nebo vychází z poškození a stresu buňky. Právě druhý signál iniciuje vlastní aktivaci NLRP3. Nekanonickou aktivaci NLRP3 zahajují endogenní kaspáza-4 a kaspáza-5 (u myší kaspáza-11), které specificky váží LPS intracelulárních patogenů. Následkem toho se uvolňuje ATP, které působí jako autokrinní stimulant. Dochází k tvorbě velkého množství membránových pórů a nakonec osmotické lýze buňky, pyroptóze.⁵⁰ Nejméně prozkoumaná tzv. alternativní cesta aktivace NLRP3 je charakteristická pro monocyty. Liší se absencí druhého signálu, kdy k plné aktivaci stačí samotná stimulace LPS.⁵¹

Jak bylo zmíněno, jedním z důsledků akumulace CNT a ND ve fagocytech je uvolnění katepsinu B, který je zároveň druhým signálem pro kanonickou cestu aktivace NLRP3. Z toho vyplývá, že jejich (hlavně CNT) prozánětlivý potenciál závisí na jejich intracelulární koncentraci. Keshavan et al. ve své práci porovnávali vliv tří typů MWCNT na THP-1 a primární makrofágy a z HL-60 odvozené neutrofilů. Zatímco u makrofágů, které čile fagocytovaly, došlo v případě dlouhých MWCNT k pyroptóze, neutrofilů, které MWCNT nepohlcovaly, si zachovaly svoji životnost.⁵² Podobně tomu bylo u buněčné epiteliální linie A549 při srovnání s THP-1 a myšimi NR8383 makrofágy, kdy přednostní fagocytóza trubic makrofágy u nich vedla k uvolnění chemokinů IL-8 a CXCL1.⁵³

Kromě aktivace inflamazomu může poškození lysozomů CNM vést také k narušení procesu autofagie.⁵⁴ Autofagie je komplexní mechanismus, který obvykle zajišťuje buněčné přežití odstraňováním nesprávně složených nebo agregovaných proteinů a poškozených organel nebo eliminací intracelulárních patogenů. V případě nutriční deprivace může autofagie buňce zajistit energii a živiny metabolizací části cytoplazmy. Navíc působí modulačně a je jedním z inhibitorů inflamazomu.⁵⁵ Důležitou etapou autofagického procesu je obklopení vteřelce dvojitou membránou a vytvoření autofagozomu. Následuje splynutí autofagozomu s lysozomem, které vede k usmrcení a rozkladu patogenu. Posledním krokem je prezentace antigenních peptidů získaných z vteřelce imunitním buňkám v kontextu s HLA molekulami. Případné narušení některého z těchto kroků např. destabilizací lysozomu CNT může vést k selhání tzv. autofagického toku a k smrti buňky.^{56,57}

V kontrastu s CNT, nemodifikovaný „čistý“ grafen ve formě GP, které zřejmě zůstávají uzavřené v intracelulárních váčcích, sám o sobě prozánětlivě ani cytotoxicky nepůsobí.^{43,58,59} To dokládá i *in vivo* studie zkoumající inhalační expozici a následnou distribuci GP v potkaním modelu. Autoři zde potvrdili, že inhalovaný grafen byl pohlcen alveolárními makrofágy bez dalšího efektu na plicní tkáň.⁵

Na druhou stranu, u modifikovaného grafenu, nejčastěji GO, bývá hodnocení prozánětlivého účinku ve svých výsledcích výrazně méně konzistentní. Starší studie uváděly možnou aktivaci TLR4 a TLR9 s následnou kumulací autofagozomů spojenou s poškozením cytoskeletu, tvorbou prozánětlivých cytokinů a buněčnou smrtí.^{60,61} Bohužel zde nebyl diskutován možný vliv kontaminace. Jiná studie hodnotící GO zbarvený LPS cytotoxické účinky nepotvrdila. U předstimulovaných makrofágů (*priming*) však došlo k aktivaci NLRP3. Autoři diskutovali možný mechanický stres.⁶²

Jako další z mechanismů prozánětlivého působení GO byl navržen možný vliv na lipidovou dvojvrstvu, kdy dochází k jejímu narušení v důsledku „vytrhávání“ lipidových raftů přímým kontaktem s povrchem GO. Tento efekt je obzvláště důležitý při kontaktu s neutrofilů, kdy se vlivem narušení jejich membrány vytváří tzv. extracelulární neutrofilové pasti (NET) a neutrofilů hynou NETotickou smrtí.^{63,64} Bohužel, přestože je GO jedním z nejméně studovaných CNM, jednoznačné výsledky stále chybí. Podobně jako u ostatních CNM je zkoumaný zánětlivý účinek závislý na součtu mnoha faktorů a často pomíjené hodnocení biologické kontaminace může výsledná data značně ovlivnit.

9.3 IMUNOMODULACE

Jako vysoce integrovaný a dynamický nástroj musí imunitní systém reagovat na mnoho stimulů zároveň. Během toho zajišťuje správné rozeznávání, zpracování a eliminaci jak

vlastních poškozených či nádorových buněk, tak vnějších patogenů. Současně musí své působení regulovat a zahájit reparaci poškozených tkání. Nanočástice, které postrádají atributy infekčního agens, a tudíž přímo nevyvolávají akutní cytotoxické ani prozánětlivé reakce, mohou tyto funkce ovlivnit. Platí to zejména pro CNM, které setrvávají v organismu dlouhou dobu a nemetabolizují se. Dobrým příkladem jsou výše zmíněné nemodifikované GP, u kterých nebyl pomocí monocyto-makrofágových modelů prokázán žádný, nebo jen minimální prozánětlivý vliv. Naopak se zdá, že endocytóza GP vede u lidských izolovaných monocytů k jejich lepšímu přežívání a diferenciaci. Pozorován byl též vliv na zesílení cytokinové odpovědi na stimulaci vybranými mikroorganismy.⁶⁵

K podobným výsledkům došli Lebre et al. u myších makrofágů derivovaných z kostní dřeně. Zjistili, že přítomnost grafenu zesiluje tvorbu IL-6 a TNF- α po stimulaci TLR agonisty a že grafen patrně podporuje jev, kterému se říká „trénink vrozené imunity“ nebo také „přirozená imunitní paměť“.⁶⁶ Analogicky s adaptivní imunitou zajišťuje tento jev výraznější sekundární odpověď vrozené imunity na opakovaný stimul patogenem. Předpokládaným mechanismem jsou metabolické a epigenetické změny vyvolané opakovanými kontakty s cizorodými částicemi a patogenními stimuly.⁶⁷

Jak bylo řečeno, základním mechanismem reakce na poškozující nebo nebezpečný podnět je zánět. Klíčová je jeho regulace a vyváženost, tzn. maximální úroveň obranného zánětu s minimalizací jeho poškozující složky. Regulaci zánětu zajišťují humorální i buněčné mechanismy imunity. Jedním z nich je polarizace monocyto-makrofágového systému do jednotlivých subpopulací. Základní subpopulace se označují M1 a M2, přičemž M1 subpopulace je prozánětlivá a zesiluje imunitní odpověď, kdežto M2 subpopulace je regulační, účastní se tlumení imunitní odpovědi a napomáhá regeneraci a hojení tkání poškozených zánětem. Polarizace monocyto-makrofágového systému do M1 a M2 je velice efektivní a důležitá součást imunitní odpovědi a je spojena s metabolickými a genetickými změnami buněk.

Bylo prokázáno, že CNM mohou do tohoto procesu vstupovat. Kupříkladu v jedné studii byl sledován vliv fragmentovaných GP na mitochondriální kapacitu lidských a myších makrofágů v závislosti na polarizačním stavu buněk. Autoři studie vyhodnotili převládající polarizaci směrem k M2, tedy protizánětlivý efekt GP.⁶⁸ Schopnost ovlivnit polarizaci makrofágů do M1 nebo M2 byla studována u celé řady dalších CNM. Kinaret et al. zjistili, že zatímco grafitová nanovláknina preferenčně polarizovala THP-1 makrofágy do M1, dlouhé CNT vyvolaly polarizaci M1 i M2 a krátké MWCNT polarizovaly makrofágy do M2. Všechny tři typy testovaných CNT vyvolaly produkci IL-1 β , ale v případě MWCNT bez změny dalších polarizačních znaků.⁶⁹ Zhang et al. zkoumali efekt SWCNT a MWCNT na myší alveolární makrofágy. Nanotrubice většinou v prvním kroku měnily fenotyp makrofágů do M1, ale při delší expozici došlo k přesmyku na fenotyp M2. Navíc kondicionované médium od M2 makrofágů sekretujících TGF- β (*transforming growth factor*) vyvolávalo *in vitro* diferenciaci fibroblastů.⁷⁰ Zdá se, že necytotoxické hladiny CNT obecně podněcují makrofágy k určité autoregulaci. Tato zjištění by mohla vysvětlovat negativní roli inhalovaných CNT v rozvoji plicní fibrózy.

Přesný mechanismus, jakým CNM působí metabolické a epigenetické změny předcházející tvorbě přirozené imunitní paměti a změnám polarizace u monocyto-makrofágového systému, není zatím jasný. Svoji roli v něm může hrát autofagie, která je často s CNM spojována, a u cirkulujících monocytů je esenciální pro jejich přežívání a následnou diferenciaci.⁷¹ Za fyziologických podmínek autofagie brzdí sestavení inflamazomu a produkci prozánětlivých cytokinů. Avšak data některých studií, která dokládají zvýšenou produkci prozánětlivých

cytokinů, tento mechanismus spíše vyvrací.^{65,72} Vedle toho situaci komplikují i změny cytoskeletu, které probíhají při endocytóze a následném pokusu o zpracování a eliminaci CNM buňkou. Nelze vyloučit, že sama endocytóza spolu s reorganizací cytoskeletu může poskytnout dostatečný signál pro přežití a diferenciaci buňky.^{73,74} Připomeňme též důležitý fakt, že přímé ovlivnění cytoskeletu, např. reakci s aktinovými vlákny, bývá pro CNM pozorováno řadou autorů.^{38,75,76} Efekt na cytoskelet by mohl být i nepřímý především při nadměrné akumulaci CNM v cytoplazmě, kdy jsou jednotlivé organely a cytoskeletální vlákna jednoduše „utlačeny“.

V rámci hodnocení imunomodulačního potenciálu CNM je nutné zmínit dendritické buňky. Ty představují nepostradatelnou buněčnou populaci, jejíž základní funkcí je prezentace antigenních peptidů spolu s kostimulačními a prozánětlivými signály T lymfocytům. Dendritické buňky tvoří hlavní spojení mezi přirozenou a adaptivní imunitou a rozhodují o tom, do jakého subsetu se bude naivní T lymfocyt po kontaktu diferencovat: zda bude imunitní odpověď založená na produkci protilátek (*Th2 subset*), nebo zda budou zapojeny buněčné mechanismy jako cytotoxicita a zesílená fagocytóza (*Th1 subset*). Narušení jejich funkce tedy představuje významné riziko pro fungování celého imunitního systému.⁷⁷ Vliv různých variant GO na buněčnou linii dendritických buněk DC2.4 zkoumali Yang et al. Zjistili, že jednovrstvý GO vyvolával agregaci buněk bez výrazného cytotoxického účinku. Vícevrstvý GO byl naproti tomu cytotoxický a vyvolával produkci reaktivních forem kyslíku (ROS). V obou případech došlo k produkci TNF- α bez produkce IL-6. V následujícím experimentu však jednovrstevný GO stimuloval zvýšení produkce TNF- α i IL-6 vůči LPS, na rozdíl od vícevrstvého GO, kde pravděpodobně vlivem cytotoxicity došlo k inhibici.⁷⁸ Zhou et al. pro změnu zkoumali vliv laterální velikosti GO na jeho schopnost interagovat s buněčnou membránou. Zjistili, že se malé částice GO snadněji internalizovaly, zatímco větší adherovaly k membráně a způsobily změny exprese adhezních molekul, zejména ICAM-1, která je nezbytná pro interakci dendritických buněk s T lymfocyty. Následnou kokultivací s T lymfocyty potvrdili tvorbu buněčných shluků indikující zesílení T lymfocytární aktivity.⁷⁹ V obdobné studii velké částice GO zvyšovaly u dendritických buněk diferencovaných z monocytů expresi kostimulačních molekul CD80 a CD83 a napomohly tak k jejich maturaci.⁸⁰ Navázání PEGu a výběr menších GO tento efekt inhiboval, což znovu potvrzuje esenciální role modifikace a velikosti.⁸¹

Pozitivní výsledky nepřímé prozánětlivé modulace pomocí CNM byly pozorovány rovněž *in vivo* s využitím zvířecích modelů nemocí. Řada z nich se zaměřila na hodnocení alergické reakce (konkrétně hypersenzitivitu typu 1). Park et al. ve své práci exponovali myši různým dávkám MWCNT. Následná analýza vzorků krve a bronchoalveolární laváže odhalila spolu se zvýšeným počtem neutrofilů i vyšší hladinu prozánětlivých cytokinů. K nejvýraznějšímu nárůstu došlo u IL-4, IL-10 a IL-5, což svědčí o aktivitě proalergického Th2 subsetu pomocných induktorových T lymfocytů.⁸²

Obdobných výsledků dosáhli Inoue et al., kdy po souběžné intratracheální expozici ovalbuminu a MWCNT došlo oproti samostatným expozicím (placebo, ovalbumin, nebo MWCNT) k silnější aktivaci alergického zánětu s tvorbou protilátek IgE.⁸³ Podobný pokus prezentovali Nygaard et al. Myši vystavoval působení ovalbuminu a dvou typů CNT (MWCNT a SWCNT). V obou případech sloužily CNT jako adjuvans zvyšující produkci ovalbumin specifického IgE.⁸⁴

Opačné výsledky přinesly experimenty s GO, který produkci IgE inhiboval, nicméně na myším modelu astmatu byla pozorována zvýšená hyperreaktivita a remodelace (hyperplazie gobletových buněk spolu s hypertrofií hladkého svalstva).⁸⁵ Výsledky těchto studií naznačují,

že CNT obecně mohou stimulovat alergický zánět v podobě Th2 imunitní odpovědi. Slouží však spíše jako adjuvans než přímý alergen. To je obzvláště důležité za situace, kdy alergeny adherují k jejich povrchu. Výsledná alergická reakce tím tedy může být značně ovlivněna. Jak bylo zmíněno, CNM mohou také přispívat k nevratné remodelaci tkání dýchacích cest a zhoršovat tak průběh chronických plicních onemocnění. K tomuto tvrzení přispívá studie provedená Beyelerem et al., jejichž DWCNT v dávce 0,08 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ podané intratracheálně zesílily akumulaci a aktivaci makrofágů a dendritických buněk v plicním parenchymu myšičího modelu chronické obstrukční choroby plic.⁸⁶ Soliman et al. pak navíc prokázali, že chronická expozice MWCNT je spojená se zvýšenou aktivací a akumulací alveolárních makrofágů, což vede k zánětu a tvorbě granulomů.⁸⁷

CNM ovšem nemusí být pouze prozánětlivé. Modelovým příkladem může být práce Dellinger et al., jež zkoumala vliv fullerenu na revmatoidní artritidu v myšičím modelu. Peritoneální administrace fullerenu vedla k jejich hromadění v afektovaných kloubech, kde vyvolávaly útlum zánětu spojený se snížením eroze, redukcí zánětlivé chrupavčité tkáně a poklesem hladiny TNF- α .⁸⁸ Zajímavých výsledků dosáhli Babu Mija a Rajiv Saxena při výzkumu vlivu modifikovaných SWCNT na myšičí model akutní i chronické reakce štetu proti hostiteli.⁸⁹ Tato nežádoucí reaktivita vzniká po HLA neshodné transplantaci kmenových buněk krvetvorby u pacientů s krevními malignitami, případně jinými diagnózami. Nový, transplantovaný imunitní systém napadá a ničí buňky různých tkání příjemce. Nejčastěji jsou postiženy GIT, kůže, dýchací systém a ledviny. Je nutné podávat imunosupresivní léky, mnohdy doživotně. Ve zmíněné studii vedlo intravenózní podání SWCNT ke snížení proliferace T i B lymfocytů a omezení tvorby cytotoxických T lymfocytů a protilátek specifických proti hostitelským antigenům.⁸⁹

Tlumivý efekt konkrétně grafenových kvantových teček (GQD) objevili i Tomic et al. Zjistili, že GQD utlumily zánět v nervové tkáni potkanů trpících autoimunitní encefalitidou. Výsledkem intraperitoneální expozice bylo zmírnění příznaků, snížení demyelinizace a infiltrace centrálního nervového systému imunitními buňkami, snížení poškození axonů, a ve výsledku ovlivnění vitality nervových buněk.⁹⁰ Uhlíkové tečky (CD) vykazují obecně imunosupresivní efekt pravděpodobně kvůli jejich antioxidačním vlastnostem. Například CD syntetizované z kyseliny citronové a glutathionu úspěšně inhibovaly zánětlivou odpověď vyvolanou LPS na modelu myšičích makrofágů J774A.1 utlumením signalizace NF- κB a tvorby IL-12 a vylučováním kyslíkových radikálů.⁹¹ V jiném experimentu CD vyrobené z melasy tlumily produkci oxidu dusnatého stimulovanou LPS na modelu makrofágů RAW 264.7.⁹²

Velmi komplikovanou a obtížně uchopitelnou otázkou je interakce nanočástic s mikrobiotou střeva, kůže a sliznic. Jedná se o velmi komplexní ekosystém zahrnující desítky až stovky různých mikrobiálních a mykotických species. Jejich přínos pro člověka je bez diskuze, a kromě nutričních benefitů je mikrobiota esenciální pro nastavení optimální střevní bariéry proti patogenním mikroorganismům. Úloha mikrobioty je však daleko komplexnější. Zásadní je modulační efekt na imunitní systém, zejména v nastavení tolerance vůči různým mikrobiálním i potravním antigenům. Regulační buňky diferencované v mukózním imunitním systému byly nalezeny i ve vzdálených nikách organismu, například v centrálním nervstvu. To dalo vzniknout představě, že střevní mikrobiota může ovlivnit vznik a průběh autoimunitních onemocnění, jako je např. roztroušená skleróza.^{93,94} CNM mohou střevní mikrobiotu ovlivnit především svým možným selektivním antimikrobiálním účinkem na některé kmeny bakterií a tím mohou narušit osídlovací vzory na sliznicích. Jako příklad můžeme uvést čistý grafen,

který v koncentracích okolo 100 µg/ml podporuje butyrát produkující mikroorganismy, jako jsou *Clostridium fimetarium*, *Clostridium hylemona* a *Sutterella wadsworthensis*.⁹⁵

Dosud prezentované výsledky jasně ukazují, že CNM mohou mít zásadní imunomodulační potenciál. Některé jsou schopny blokovat imunitní reakci a tím působit protizánětlivě, jiné a za jiných podmínek mohou naopak imunitní odpověď podporovat a zánětu napomáhat. Speciální pozornost se musí věnovat především takovým CNM, které na první pohled samy o sobě žádnou, ať už cytotoxickou, nebo prozánětlivou odpověď nevyvolávají, avšak mohou sloužit jako adjuvans či další signál.

9.4 ELIMINACE

Pro využití CNM v medicíně je zásadní biodegradabilita – schopnost organismu odstranit z těla nežádoucí materiály. CNM jsou ze své podstaty velmi odolné a špatně degradovatelné. Nicméně je možné je za určitých podmínek eliminovat. Důležitou úlohu v tom má právě imunitní systém. Jedním z faktorů určujících biodegradabilitu CNM je poměr uhlíku a kyslíku (C/O) ve struktuře částice a její hydrofilní charakter. Kotchey et al. ve své studii ověřili, že GO lze narušit křenovou peroxidázou.⁹⁶ Podobně myeloperoxidáza (MPO), která se nachází v granulích neutrofilů, byla schopna degradovat GO v přítomnosti stop peroxidu vodíku, přičemž efektivita byla úměrná množství karboxylových skupin a míře stability ve vodném prostředí.⁷

V jiné studii neutrofilly produkovaly myeloperoxidázu v přítomnosti SWCNT navzdory jejich pokrytí PEG.⁹⁷ V *in vivo* studii provedené na MPO knockoutovaných myších byl oproti divokým kmenům sledován pokles degradace, což je v souladu s předešlými *in vitro* studii.⁹⁸ *In vitro* byl také proveden pokus degradovat GO pomocí eozinofilní peroxidázy (EPO) v přítomnosti peroxidu vodíku a bromidu sodného. Přestože byla degradace nekompletní, objevila se již po 90 hodinách od expozice.⁶ Pozorování potvrzuje i starší studie Ardóna et al., kteří použili EPO z lidských a myších eosinofilů pro degradaci oxidovaných SWCNT.⁹⁹

Na degradaci CNM by se mohla podílet také NADPH oxidáza a s ní související enzymatické systémy účastníci se tzv. oxidativního vzplanutí při aktivaci fagocytů. Jejich role byla potvrzena opět Kaganem et al., již zkoumali degradaci oxidovaných SWCNT peroxinitritem z aktivovaných THP-1 makrofágů. Schopnost štěpit SWCNT byla také výrazně snížena u NADPH deficitních myší.¹⁰⁰

Podobné výsledky vyšly ve studii Houa et al., v níž porovnávali degradaci čistých, oxidovaných a OH-substituovaných SWCNT na modelu RAW264.7 buněk. Respirační vzplanutí u modelových buněk bylo dle předpokladu účinné při degradaci oxidované a OH varianty, naproti tomu čisté SWCNT, které reaktivní místa postrádají, degradaci odolaly.¹⁰¹

9.5 ZÁVĚR

Závěrem lze říct, že jakožto rodina exogenních částic nabízí CNM širokou škálu možných interakcí s imunitním systémem. V závislosti na jejich formě, velikosti, tvaru, funkcionalizaci a čistotě mohou buď přímo vyvolat zánět, nebo působit nepřímo modulací základních funkcí imunitních buněk, kdy tyto změny nemusí nutně korelovat se zvýšenou cytotoxicitou.

Prezentované výsledky naznačují, že tvar a velikost jsou rozhodující vlastnosti ovlivňující přímé prozánětlivé účinky CNM a následné chování imunitních buněk. Imunitní systém

funguje jako vysoce organizovaná síť a v důsledku toho může narušení jedné části ovlivnit celý systém. Musíme vzít v úvahu, že kumulace CNM v lidském těle, zejména v plicích, může mít negativní vliv na imunitní obranu proti běžným patogenům. Na druhou stranu, při pečlivém návrhu a charakterizaci CNM jsou jejich imunomodulační vlastnosti atraktivní pro biomedicínské aplikace. Tyto aplikace jsou založeny buď na přímém účinku CNM, nebo na účinku, který mají CNM ve spojení s jinými materiály nebo reagensy.

Bohužel je evidentní, že v našich znalostech jsou stále mezery. Celkově vzato je hodnocení imunotoxického potenciálu CNM zásadním úkolem, i když ne snadným, a pozornost by měla být věnována nejen správné charakterizaci a vyloučení kontaminace, ale také složení média. Nezbytným krokem je také doplnění modelů lidských primárních buněk, neboť bychom mohli snadno přehlédnout často opomíjené, ale velmi důležité vzájemné ovlivňování probíhající během buněčné komunikace.

9.6 LITERATURA

1. Mukherjee SP, Bottini M, Fadeel B. Graphene and the Immune System: A Romance of Many Dimensions. *Front Immunol.* 2017;8:673. doi:10.3389/fimmu.2017.00673.
2. Yuan X, Zhang X, Sun L, Wei Y, Wei X. Cellular Toxicity and Immunological Effects of Carbon-Based Nanomaterials. *Part Fibre Toxicol.* 2019;16(1):18. doi:10.1186/s12989-019-0299-z.
3. Fadeel B, Bussy C, Merino S et al. Safety Assessment of Graphene-Based Materials: Focus on Human Health and the Environment. *ACS Nano.* 2018;12(11):10582–10620. doi:10.1021/acsnano.8b04758.
4. Park EJ, Lee SJ, Lee K et al. Pulmonary Persistence of Graphene Nanoplatelets May Disturb Physiological and Immunological Homeostasis. *J Appl Toxicol.* 2017;37(3):296–309. doi:10.1002/jat.3365.
5. Kim JK, Shin JH, Lee JS et al. 28-Day Inhalation Toxicity of Graphene Nanoplatelets in Sprague-Dawley Rats. *Nanotoxicology.* 2016;10(7):891–901. doi:10.3109/17435390.2016.1172678.
6. Kurapati R, Martin C, Palermo V, Nishina Y, Bianco A. Biodegradation of Graphene Materials Catalyzed by Human Eosinophil Peroxidase. *Faraday Discuss.* 2021;227:189–203. doi:10.1039/C9FD00094A.
7. Kurapati R, Russier J, Squillaci MA et al. Dispersibility-Dependent Biodegradation of Graphene Oxide by Myeloperoxidase. *Small.* 2015;11(32):3985–3994. doi:10.1002/sml.201500340.
8. Hussain S, Vanoirbeek JA, Hoet PH. Interactions of Nanomaterials with the Immune System. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2012;4(2):169–183. doi:10.1002/wnan.175.
9. Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell.* 2020;180(6):1044–1066. doi:10.1016/j.cell.2020.02.041.
10. Bertani B, Ruiz N. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus.* 2018;8(1):10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018. doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018.
11. Gorbet MB, Sefton MV. Endotoxin: The Uninvited Guest. *Biomaterials.* 2005;26(34):6811–6817. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.04.063.
12. Vallhov H, Qin J, Johansson SM et al. The Importance of an Endotoxin-Free Environment During the Production of Nanoparticles Used in Medical Applications. *Nano Lett.* 2006;6(8):1682–1686. doi:10.1021/nl060860z.
13. Lahiani MH, Gokulan K, Williams K, Khodakovskaya MV, Khare S. Graphene and Carbon Nanotubes Activate Different Cell Surface Receptors on Macrophages Before and After Deactivation of Endotoxins. *J Appl Toxicol.* 2017;37(11):1305–1316. doi:10.1002/jat.3483.

14. Liu Z, Li W, Wang F et al. Enhancement of Lipopolysaccharide-Induced Nitric Oxide and Interleukin-6 Production by PEGylated Gold Nanoparticles in RAW264.7 Cells. *Nanoscale*. 2012;4(22):7135–7142. doi:10.1039/c2nr32629a.
15. Bianchi MG, Allegri M, Costa AL et al. Titanium Dioxide Nanoparticles Enhance Macrophage Activation by LPS Through a TLR4-Dependent Intracellular Pathway. *Toxicol Res*. 2015;4(2):385–398. doi:10.1039/c4tx00193a
16. Li Y, Shi Z, Radauer-Preiml I et al. Bacterial Endotoxin (Lipopolysaccharide) Binds to the Surface of Gold Nanoparticles, Interferes with Biocorona Formation and Induces Human Monocyte Inflammatory Activation. *Nanotoxicology*. 2017;11(9–10):1157–1175. doi:10.1080/17435390.2017.1370112.
17. Duan G, Kang S-g, Tian X et al. Protein Corona Mitigates the Cytotoxicity of Graphene Oxide by Reducing Its Physical Interaction with Cell Membrane. *Nanoscale*. 2015;7(37):15214–15224. doi:10.1039/C5NR03338G.
18. Yan H, Cacioppo M, Megahed S et al. Influence of the Chirality of Carbon Nanodots on Their Interaction with Proteins and Cells. *Nat Commun*. 2021;12(1):7208. doi:10.1038/s41467-021-27353-9.
19. Chong Y, Ge C, Yang Z et al. Reduced Cytotoxicity of Graphene Nanosheets Mediated by Blood-Protein Coating. *ACS Nano*. 2015;9(6):5713–5724. doi:10.1021/acsnano.5b01711.
20. Ge C, Du J, Zhao L et al. Binding of Blood Proteins to Carbon Nanotubes Reduces Cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(41):16968–16973. doi:10.1073/pnas.1105270108.
21. Mukherjee SP, Bondarenko O, Kohonen P et al. Macrophage Sensing of Single-Walled Carbon Nanotubes Via Toll-Like Receptors. *Sci Rep*. 2018;8(1):1115. doi:10.1038/s41598-018-19393-z.
22. Turabekova M, Rasulev B, Theodore M et al. Immunotoxicity of Nanoparticles: A Computational Study Suggests that CNTs and C60 Fullerenes Might Be Recognized as Pathogens by Toll-Like Receptors. *Nanoscale*. 2014;6(7):3488–3495. doi:10.1039/C3NR06465A.
23. Park SJ. Protein-Nanoparticle Interaction: Corona Formation and Conformational Changes in Proteins on Nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:5783–5802. doi:10.2147/IJN.S254808.
24. Huynh MT, Mikoryak C, Pantano P, Draper R. Scavenger Receptor A1 Mediates the Uptake of Carboxylated and Pristine Multi-Walled Carbon Nanotubes Coated with Bovine Serum Albumin. *Nanomaterials (Basel)*. 2021;11(2):539. doi:10.3390/nano11020539.
25. Wang R, Lohray R, Chow E et al. Selective Uptake of Carboxylated Multi-Walled Carbon Nanotubes by Class A Type 1 Scavenger Receptors and Impaired Phagocytosis in Alveolar Macrophages. *Nanomaterials*. 2020;10(12):2417. doi:10.3390/nano10122417.
26. Salvador-Morales C, Flahaut E, Sim E et al. Complement Activation and Protein Adsorption by Carbon Nanotubes. *Mol Immunol*. 2006;43(3):193–201. doi:10.1016/j.molimm.2005.01.019.
27. Belime A, Thielens NM, Gravel E et al. Recognition Protein C1q of Innate Immunity Agglutinates Nanodiamonds Without Activating Complement. *Nanomedicine*. 2019;18:292–302. doi:10.1016/j.nano.2019.02.002.
28. Wibroe PP, Petersen SV, Bovet N et al. Soluble and Immobilized Graphene Oxide Activates Complement System Differently Dependent on Surface Oxidation State. *Biomaterials*. 2016;78:20–26. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.11.034.
29. Tan X, Feng L, Zhang J et al. Functionalization of Graphene Oxide Generates a Unique Interface for Selective Serum Protein Interactions. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013;5(4):1370–1377. doi:10.1021/am3029933.
30. Belling JN, Jackman JA, Yorulmaz Avsar S et al. Stealth Immune Properties of Graphene Oxide Enabled by Surface-Bound Complement Factor H. *ACS Nano*. 2016;10(11):10161–10172. doi:10.1021/acsnano.6b04760.
31. Ghosh S, Chatterjee K. Poly(Ethylene Glycol) Functionalized Graphene Oxide in Tissue Engineering: A Review on Recent Advances. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:5991–6006. doi:10.2147/IJN.S249717.

32. Ravelli D, Merli D, Quartarone E, Profumo A, Mustarelli P, Fagnoni M. PEGylated Carbon Nanotubes: Preparation, Properties and Applications. *RSC Adv.* 2013;3(33):13569–13582. doi:10.1039/c3ra40444d.
33. Luo N, Weber JK, Wang S et al. PEGylated Graphene Oxide Elicits Strong Immunological Responses Despite Surface Passivation. *Nat Commun.* 2017;8(1):14537. doi:10.1038/ncomms14537.
34. Gustafson HH, Holt-Casper D, Grainger DW, Ghandehari H. Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem. *Nano Today.* 2015;10(4):487–510. doi:10.1016/j.nantod.2015.06.006.
35. Cui X, Wan B, Yang Y, Ren X, Guo L-H. Length Effects on the Dynamic Process of Cellular Uptake and Exocytosis of Single-Walled Carbon Nanotubes in Murine Macrophage Cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):1518. doi:10.1038/s41598-017-01746-9.
36. Yaron PN, Holt BD, Short PA, Lösche M, Islam MF, Dahl KN. Single Wall Carbon Nanotubes Enter Cells by Endocytosis and Not Membrane Penetration. *J Nanobiotechnology.* 2011;9:45–45. doi:10.1186/1477-3155-9-45.
37. Thoo L, Fahmi MZ, Zulkipli IN, Keasberry N, Idris A. Interaction and Cellular Uptake of Surface-Modified Carbon Dot Nanoparticles by J774.1 Macrophages. *Cent Eur J Immunol.* 2017;42(3):324–330. doi:10.5114/ceji.2017.70978.
38. Li Y, Yuan H, von dem Bussche A et al. Graphene Microsheets Enter Cells Through Spontaneous Membrane Penetration at Edge Asperities and Corner Sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(30):12295–12300. doi:10.1073/pnas.1222276110.
39. Knotigova PT, Mašek J, Hubatka F et al. Application of Advanced Microscopic Methods to Study the Interaction of Carboxylated Fluorescent Nanodiamonds With Membrane Structures in THP-1 Cells: Activation of Inflammasome NLRP3 as the Result of Lysosome Destabilization. *Mol Pharm.* 2019;16(8):3441–3451. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.9b00441.
40. Li L, Chen L, Lu Y et al. Aggregated Carbon Dots-Loaded Macrophages Treat Sepsis by Eliminating Multidrug-Resistant Bacteria and Attenuating Inflammation. *Aggregate.* 2022;4(1):e200. doi:10.1002/agt2.200.
41. Brown DM, Kinloch IA, Bangert U et al. An In Vitro Study of the Potential of Carbon Nanotubes and Nanofibres to Induce Inflammatory Mediators and Frustrated Phagocytosis. *Carbon N Y.* 2007;45(9):1743–1756. doi:10.1016/j.carbon.2007.03.023.
42. Boyles MS, Young L, Brown DM et al. Multi-Walled Carbon Nanotube Induced Frustrated Phagocytosis, Cytotoxicity and Pro-Inflammatory Conditions in Macrophages Are Length Dependent and Greater Than That of Asbestos. *Toxicol In Vitro.* 2015;29(7):1513–1528. doi:10.1016/j.tiv.2015.05.018.
43. Svadlakova T, Hubatka F, Turanek Knotigova P et al. Proinflammatory Effect of Carbon-Based Nanomaterials: In Vitro Study on Stimulation of Inflammasome NLRP3 Via Destabilisation of Lysosomes. *Nanomaterials.* 2020;10(3):418. doi:10.3390/nano10030418.
44. Fusco L, Avitabile E, Armuzza V et al. Impact of the Surface Functionalization on Nanodiamond Biocompatibility: A Comprehensive View on Human Blood Immune Cells. *Carbon N Y.* 2020;160:390–404. doi:10.1016/j.carbon.2020.09.064.
45. Meunier E, Coste A, Olganier D et al. Double-Walled Carbon Nanotubes Trigger IL-1 β Release in Human Monocytes Through NLRP3 Inflammasome Activation. *Nanomedicine.* 2012;8(6):987–995. doi:10.2217/nnm.12.75.
46. Sun B, Wang X, Ji Z et al. NADPH Oxidase-Dependent NLRP3 Inflammasome Activation and Its Important Role in Lung Fibrosis by Multiwalled Carbon Nanotubes. *Small.* 2015;11(17):2087–2097. doi:10.1002/sml.201402210.
47. Palomäki J, Välimäki E, Sund J et al. Long, Needle-Like Carbon Nanotubes and Asbestos Activate the NLRP3 Inflammasome Through a Similar Mechanism. *ACS Nano.* 2011;5(9):6861–6870. doi:10.1021/nn200595c.
48. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: Mechanism of Action, Role in Disease, and Therapeutics. *Nat Med.* 2015;21(7):677–687. doi:10.1038/nm.3893.

49. Sun B, Wang X, Ji Z, Li R, Xia T. NLRP3 Inflammasome Activation Induced by Engineered Nanomaterials. *Small*. 2013;9(9–10):1595–1607. doi:10.1002/smll.201202083.
50. He Y, Hara H, Nunez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci*. 2016;41(12):1012–1021. doi:10.1016/j.tibs.2016.09.002.
51. Gritsenko A, Yu S, Martin-Sanchez F et al. Priming Is Dispensable for NLRP3 Inflammasome Activation in Human Monocytes In Vitro. *Front Immunol*. 2020;11:565924. doi:10.3389/fimmu.2020.565924.
52. Keshavan S, Gupta G, Martin S, Fadeel B. Multi-Walled Carbon Nanotubes Trigger Lysosome-Dependent Cell Death (Pyroptosis) in Macrophages but Not in Neutrophils. *Nanotoxicology*. 2021;15(9):1125–1150. doi:10.1080/17435390.2021.1964629.
53. Horie M, Tabei Y, Sugino S et al. Comparison of the Effects of Multiwall Carbon Nanotubes on the Epithelial Cells and Macrophages. *Nanotoxicology*. 2019;13(7):861–878. doi:10.1080/17435390.2019.1592258.
54. Wan B, Wang ZX, Lv QY et al. Single-Walled Carbon Nanotubes and Graphene Oxides Induce Autophagosome Accumulation and Lysosome Impairment in Primarily Cultured Murine Peritoneal Macrophages. *Toxicol Lett*. 2013;221(2):118–127. doi:10.1016/j.toxlet.2013.06.208.
55. Perrotta C, Cattaneo MG, Molteni R, De Palma C. Autophagy in the Regulation of Tissue Differentiation and Homeostasis. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:1563. doi:10.3389/fcell.2020.602901.
56. Zhang X-j, Chen S, Huang K-x, Le W-d. Why Should Autophagic Flux Be Assessed?. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(5):595–599. doi:10.1038/aps.2012.184.
57. Cohignac V, Landry MJ, Ridoux A et al. Carbon Nanotubes, but Not Spherical Nanoparticles, Block Autophagy by a Shape-Related Targeting of Lysosomes in Murine Macrophages. *Autophagy*. 2018;14(8):1323–1334. doi:10.1080/15548627.2018.1474993.
58. Malanagahalli S, Murera D, Martin C et al. Few Layer Graphene Does Not Affect Cellular Homeostasis of Mouse Macrophages. *Nanomaterials*. 2020;10(2):228. doi:10.3390/nano10020228.
59. Murera D, Malaganahalli S, Martin C et al. Few Layer Graphene Does Not Affect the Function and the Autophagic Activity of Primary Lymphocytes. *Nanoscale*. 2019;11(21):10493–10503. doi:10.1039/C9NR00846B.
60. Chen GY, Yang HJ, Lu CH et al. Simultaneous Induction of Autophagy and Toll-Like Receptor Signaling Pathways by Graphene Oxide. *Biomaterials*. 2012;33(27):6559–6569. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.05.064.
61. Qu G, Liu S, Zhang S et al. Graphene Oxide Induces Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Dependent Necrosis in Macrophages. *ACS Nano*. 2013;7(7):5732–5745. doi:10.1021/nn402330b.
62. Mukherjee SP, Kostarelou K, Fadeel B. Cytokine Profiling of Primary Human Macrophages Exposed to Endotoxin-Free Graphene Oxide: Size-Independent NLRP3 Inflammasome Activation. *Adv Healthc Mater*. 2018;7(4):1700815. doi:10.1002/adhm.201700815.
63. Zhang X, Cao F, Wu L, Jiang X. Understanding the Synergic Mechanism of Weak Interactions Between Graphene Oxide and Lipid Membrane Leading to the Extraction of Lipids. *Langmuir*. 2019;35(43):14098–14107. doi:10.1021/acs.langmuir.9b02536.
64. Mukherjee SP, Lazzaretto B, Hultenby K et al. Graphene Oxide Elicits Membrane Lipid Changes and Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Chem*. 2018;4(2):334–358. doi:10.1016/j.chempr.2017.12.017.
65. Svadlakova T, Kolackova M, Vankova R et al. Carbon-Based Nanomaterials Increase Reactivity of Primary Monocytes Towards Various Bacteria and Modulate Their Differentiation Into Macrophages. *Nanomaterials*. 2021;11(10):2510. doi:10.3390/nano11102510.
66. Lebre F, Boland JB, Gouveia P et al. Pristine Graphene Induces Innate Immune Training. *Nanoscale*. 2020;12(20):11192–11200. doi:10.1039/C9NR09661B.
67. Cheng SC, Quintin J, Cramer RA et al. mTOR- and HIF-1 α -Mediated Aerobic Glycolysis as Metabolic Basis for Trained Immunity. *Science*. 2014;345(6204):1250684. doi:10.1126/science.1250684.

68. Povo-Retana A, Mojena M, Boscá A et al. Graphene Particles Interfere with Pro-Inflammatory Polarization of Human Macrophages: Functional and Electrophysiological Evidence. *Small*. 2021;5(11):2100882. doi:10.1002/adbi.202100882.
69. Kinaret PAS, Scala G, Federico A, Sund J, Greco D. Carbon Nanomaterials Promote M1/M2 Macrophage Activation. *Small*. 2020;16(21):1907609. doi:10.1002/smll.201907609.
70. Zhang X, Luo M, Zhang J et al. Carbon Nanotubes Promote Alveolar Macrophages Toward M2 Polarization Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Fibroblast-to-Myofibroblast Transdifferentiation. *Nanotoxicology*. 2021;15(5):588–604. doi:10.1080/17435390.2021.1905098.
71. Zhang Y, Morgan MJ, Chen K, Choksi S, Liu ZG. Induction of Autophagy Is Essential for Monocyte-Macrophage Differentiation. *Blood*. 2012;119(12):2895–2905. doi:10.1182/blood-2011-08-372383.
72. Clarke AJ, Simon AK. Autophagy in the Renewal, Differentiation and Homeostasis of Immune Cells. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(3):170–183. doi: 10.1038/s41577-018-0095-2.
73. Moujaber O, Stochaj U. The Cytoskeleton as Regulator of Cell Signaling Pathways. *Trends Biochem Sci*. 2020;45(2):96–107. doi:10.1016/j.tibs.2019.11.003.
74. Hohmann T, Dehghani F. The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork. *Cells*. 2019;8(4):362. doi:10.3390/cells8040362.
75. Tian X, Yang Z, Duan G et al. Graphene Oxide Nanosheets Retard Cellular Migration Via Disruption of Actin Cytoskeleton. *Small*. 2017;13(3):1602133. doi:10.1002/smll.201602133.
76. Wang J, Wang P, He Y et al. Graphene Oxide Inhibits Cell Migration and Invasion by Destroying Actin Cytoskeleton in Cervical Cancer Cells. *Aging*. 2020;12(17):17625–17633. doi:10.18632/aging.103821.
77. Krejsek J, Andrýs C, Krčmová I. *Imunologie člověka*. Garamon s. r. o.; 2016. ISBN-13: 978-80-86472-74-4.
78. Yang Z, Pan Y, Chen T et al. Cytotoxicity and Immune Dysfunction of Dendritic Cells Caused by Graphene Oxide. *Front Pharmacol*. 2020;11:1206. doi:10.3389/fphar.2020.01206.
79. Zhou Q, Gu H, Sun S et al. Large-Sized Graphene Oxide Nanosheets Increase DC–T-Cell Synaptic Contact and the Efficacy of DC Vaccines Against SARS-CoV-2. *Adv Mater*. 2021;33(40):2102528. doi:10.1002/adma.202102528.
80. Lin H, Peng S, Guo S et al. 2D Materials and Primary Human Dendritic Cells: A Comparative Cytotoxicity Study. *Small*. 2022;18(20):2107652. doi:10.1002/smll.202107652.
81. Uzhviyuk SV, Bochkova MS, Timganova VP et al. Interaction of Human Dendritic Cells with Graphene Oxide Nanoparticles In Vitro. *Bull Exp Biol Med*. 2022;172(5):664–670. doi:10.1007/s10517-022-05451-0.
82. Park EJ, Cho WS, Jeong J et al. Pro-Inflammatory and Potential Allergic Responses Resulting from B Cell Activation in Mice Treated with Multi-Walled Carbon Nanotubes by Intratracheal Instillation. *Toxicology*. 2009;259(3):113-121. doi:10.1016/j.tox.2009.02.009.
83. Inoue K, Koike E, Yanagisawa R et al. Effects of Multi-Walled Carbon Nanotubes on a Murine Allergic Airway Inflammation Model. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;237(3):306–316. doi:10.1016/j.taap.2009.04.003.
84. Nygaard UC, Hansen JS, Samuelsen M et al. Single-Walled and Multi-Walled Carbon Nanotubes Promote Allergic Immune Responses in Mice. *Toxicol Sci*. 2009;109(1):113–123. doi:10.1093/toxsci/kfp057.
85. Shurin MR, Yanamala N, Kisin ER et al. Graphene Oxide Attenuates Th2-Type Immune Responses but Augments Airway Remodeling and Hyperresponsiveness in a Murine Model of Asthma. *ACS Nano*. 2014;8(6):5585-5599. doi:10.1021/nn406454u.
86. Beyeler S, Steiner S, Wotzkow C et al. Multi-Walled Carbon Nanotubes Activate and Shift Polarization of Pulmonary Macrophages and Dendritic Cells in an In Vivo Model of Chronic Obstructive Lung Disease. *Nanotoxicology*. 2020;14(1):77–96. doi:10.1080/17435390.2019.1663954.

87. Soliman E, Elhassanny AEM, Malur A et al. Impaired Mitochondrial Function of Alveolar Macrophages in Carbon Nanotube-Induced Chronic Pulmonary Granulomatous Disease. *Toxicology*. 2020;445:152598. doi:10.1016/j.tox.2020.152598.
88. Dellinger AL, Cunin P, Lee D et al. Inhibition of Inflammatory Arthritis Using Fullerene Nanomaterials. *PLoS One*. 2015;10(4):e0126290. doi:10.1371/journal.pone.0126290.
89. Mia MB, Saxena RK. Poly Dispersed Acid-Functionalized Single Walled Carbon Nanotubes Target Activated T and B Cells to Suppress Acute and Chronic GVHD in Mouse Model. *Immunol Lett*. 2020;224:30–37. doi:10.1016/j.imlet.2020.05.006.
90. Tomic J, Stanojevic Z, Vidicevic S et al. Graphene Quantum Dots Inhibit T Cell-Mediated Neuroinflammation in Rats. *Neuropharmacology*. 2019;146:95–108. doi:10.1016/j.neuropharm.2018.11.030.
91. Wang H, Zhang M, Ma Y et al. Carbon Dots Derived from Citric Acid and Glutathione as a Highly Efficient Intracellular Reactive Oxygen Species Scavenger for Alleviating the Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Macrophages. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(37):41088–41095.
92. Yavuz E, Dinc S, Kara M. Effects of Endogenous Molasses Carbon Dots on Macrophages and Their Potential Utilization as Anti-Inflammatory Agents. *Appl Phys A*. 2019;126:22. doi: 10.1007/s00339-019-3189-1.
93. Chen H, Wang B, Gao D et al. Broad-Spectrum Antibacterial Activity of Carbon Nanotubes to Human Gut Bacteria. *Small*. 2013;9(16):2735–2746. doi:10.1002/smll.201202792.
94. Bantun F, Singh R, Alkhanani MF et al. Gut Microbiome Interactions with Graphene-Based Nanomaterials: Challenges and Opportunities. *Sci Total Environ*. 2022;830:154789. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.154789.
95. Lahiani MH, Gokulan K, Williams K, Khare S. Impact of Pristine Graphene on Intestinal Microbiota Assessed Using a Bioreactor-Rotary Cell Culture System. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(29):25708–25719. doi:10.1021/acsami.9b07635.
96. Kotchey GP, Allen BL, Vedala H et al. The Enzymatic Oxidation of Graphene Oxide. *ACS Nano*. 2011;5(3):2098–2108. doi:10.1021/nn103265h.
97. Vlasova II, Vakhrusheva TV, Sokolov AV et al. PEGylated Single-Walled Carbon Nanotubes Activate Neutrophils to Increase Production of Hypochlorous Acid, the Oxidant Capable of Degrading Nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;264(1):131–142. doi:10.1016/j.taap.2012.07.027.
98. Shvedova AA, Kapralov AA, Feng WH et al. Impaired Clearance and Enhanced Pulmonary Inflammatory/Fibrotic Response to Carbon Nanotubes in Myeloperoxidase-Deficient Mice. *PLoS One*. 2012;7(3):e30923. doi:10.1371/journal.pone.0030923.
99. Andón FT, Kapralov AA, Yanamala N et al. Biodegradation of Single-Walled Carbon Nanotubes by Eosinophil Peroxidase. *Small*. 2013;9(16):2721–2720. doi:10.1002/smll.201202508.
100. Kagan VE, Kapralov AA, St. Croix CM et al. Lung Macrophages “Digest” Carbon Nanotubes Using a Superoxide/Peroxynitrite Oxidative Pathway. *ACS Nano*. 2014;8(6):5610–5621. doi:10.1021/nn406484b.
101. Hou J, Wan B, Yang Y, Ren XM, Guo LH, Liu JF. Biodegradation of Single-Walled Carbon Nanotubes in Macrophages Through Respiratory Burst Modulation. *Int J Mol Sci*. 2016;17(13):409. doi:10.3390/ijms17030409.

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 nanotrubicice (<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	fototerminální 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