

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>.

11. Reprodukční a vývojová toxicita

(Drahomíra Holmannová)

© Univerzita Karlova, 2025
© 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/10.14712/9788024659848.11>

MWCNT obnovilo produkci progesteronu (inhibiční účinek je pravděpodobně reverzibilní). Vedle uvedeného byla popsána také zvýšená produkce volných kyslíkových radikálů (ROS) a narušený mitochondriální membránový potenciál. Zdá se, že MWCNT by mohly mít potenciál endokrinních disruptorů.⁶

Reprodukční toxicita se samozřejmě *in vitro* ověřuje na samčích a samičích buňkách pohlavního systému a pohlavních buňkách.

Gurunathan et al. testovali vliv oxidu grafenu (GO) na Leydigovy (TM3) a Sertoliho (TM4) samčí zárodečné buňky. Pro expozici použili dva typy GO s průměrem částic 20 nm (GO-20) a 100 nm (GO-100). Oba typy GO snižovaly viabilitu buněk (silnější vliv byl pozorován u GO-20). Vlivem expozice docházelo k uvolňování laktátdehydrogenázy a k narušování mitochondriálního membránového potenciálu. Byl pozorován nárůst produkce ROS a poškození DNA (oxidace nukleotidů a tvorba 8-oxo-d-guanosinu). Expozice snižovala expresi proapoptotických genů (Bax, Bak, p53, p21, kaspáza-3) a zvyšovala expresi antiapoptotických genů (Bcl2), což může být problematické, neboť mohou přežít i poškozené buňky. K účinkům GO (obou typů) byly citlivější Leydigovy buňky.⁷

V jiné studii (Ji et al.) byly použity Sertoliho buňky a GC-2 spd buňky (myší testikulární zárodečné buněčné linie), které byly exponovány kvantovým tečkám oxidu grafenu (GO-QD). Uvedená expozice sice neovlivňovala viabilitu buněk, nicméně indukovala proces apoptózy. Pomocí transmisní elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že expozice GO-QD zvyšovala počty autofagozómů. Autofagozóm je sférická struktura s dvojitou membránou, která je klíčovou strukturou v procesu makroautofagie (vnitrobuněčný degradační systém cytoplazmatických komponent a mikroorganismů). Zformovaný autofagozóm fúzuje s lysozomem, což umožňuje degradaci sekvestrovaného materiálu. Přestože nebylo zjištěno narušení procesu fúze autofagozómů s lysozomy, docházelo ke kumulaci nedegradovaného materiálu. Autoři tento jev připisují snížené funkci lysozomů (snížení funkce lysozomů je spojeno také se stárnutím a senescencí buněk).⁸

GC-2-spd buňky použili také autoři Xu et al. v experimentu s expozicí MWCNT (0,05, 0,25, 0,5 a 1, 5 $\mu\text{g/ml}$ / 24 h). Od dávky 0,5 $\mu\text{g/ml}$ / 24 h pozorovali kumulaci MWCNT v mitochondriích, což vedlo k narušení jejich funkcí, včetně snížení produkce ATP.⁹ Reprodukční toxicita MWCNT byla testována také na spermích bizonů a prasat divokých. Sanand et al. exponovali spermie bizonů MWCNT o koncentracích 1, 10, 25, 50, 75 a 100 $\mu\text{g/ml}$ po dobu 30, 60 a 120 minut. V závislosti na čase a dávce byla pozorována snížená viabilita buněk, závažné narušení integrity buněčné membrány, zvýšené hladiny malondialdehydu (ukazatel oxidačního stresu) a snížená aktivita antioxidantních enzymů (glutathionperoxidázy a superoxiddismutázy).¹⁰

Autoři Bernabò et al. exponovali spermie divočáka suspenzi GO o koncentracích 0,5, 1, 5, 10 a 50 $\mu\text{g/ml}$. Koncentrace 5–50 $\mu\text{g/ml}$ interagovaly s membránou spermií a narušovaly její fluiditu. Redukovaly viabilitu buněk a narušovaly jejich fertilizační a adhezní kapacitu a integritu akrozomu. Koncentrace 0,5 a 1 $\mu\text{g/ml}$ však fertilizační kapacitu buněk naopak podporovaly. Je zřejmé, že charakter vlivu expozice GO na komponenty reprodukčního systému významně závisí na hladině expozičních koncentracích (dávkách).¹¹

Zajímavé výsledky přinesly práce zaměřené na vlivy expozice fullerenu (C_{60}). Například autoři Li et al. exponovali spermie divočáka karboxylovanému fullerenu (C_{60} -COOH; 2 $\mu\text{g/ml}$; 10 dní). Expozice zvýšila motilitu spermií, zlepšila integritu akrozomu a zvýšila mitochondriální aktivitu. Došlo rovněž ke snížení hladiny oxidačního stresu.¹² Autoři další studie (Türk et al.) přidali do vzorků spermatu beranů hydratovaný fulleren (200 nM, 400 nM,

800 nM, 1 μ M a 5 μ M C₆₀) a následně byly vzorky standardním způsobem zamrazeny. Po rozmrazení vykazovaly vzorky spermií exponované vyšším dávkám C₆₀ lepší motilitu, kvalitnější membrány a vyšší aktivity antioxidantních enzymů (glutathionperoxidáza, kataláza).¹³ Ke stejným výsledkům v obdobně strukturovaném experimentu dospěli i autoři Güngör et al. Vzorky spermatu, exponované vyšším dávkám C₆₀, obsahovaly více živých spermií s vyšší mírou motility. Vlivem expozice došlo k poklesu hladin malondialdehydu a nárůstu aktivity glutathionperoxidázy a katalázy.¹⁴ Zdá se tedy, že fullerén chrání spermie, a to patrně i díky tomu, že snižuje poškozující oxidační stres.

Významné informace přináší studie, ve kterých jsou CNM exponovány lidské spermie. Asghar et al. zjistili, že expozice lidských spermií karboxylovaným jednovrstvým uhlíkovým nanotubicím (SWCNT) vedla ke zvýšení produkce ROS. Stejná expozice spermií redukovanému GO (rGO) však tento účinek nevykázala. Žádná z použitých expozičních koncentrací (1–25 μ g/ml) obou použitých typů CNM nesnižovala viabilitu spermií.¹⁵ S lidskými spermii pracovali také Aminzadeh et al., kteří studovali důsledek jejich expozice karboxylovaným SWCNT a MWCNT (0,1–100 μ g/ml / 5 hod). Žádný z expozičních CNM nesnižoval viabilitu buněk, nicméně v závislosti na dávce bylo pozorováno snížení jejich motility a zvýšení produkce ROS.¹⁶

Vedle samčích pohlavních buněk byla ve studiích pochopitelně věnována pozornost i samičím pohlavním buňkám (oocytům). Například autoři Lin et al. studovali poškození myších oocytů po expozici kvantovým tečkám grafenu (GQD; 0,5, 1,0 a 1,5 mg/ml; doba 2, 8,5 a 12 hodin). Expozice GQD narušovala maturaci oocytů; při koncentracích 1 a 1,5 mg/ml docházelo ke snížení extruze prvního polárního tělíska. Rovněž bylo pozorováno zvýšení produkce ROS a poškození DNA. Pomocí elektronové transmisní mikroskopie byla registrována kumulace GQD v blízkosti jádra a mitochondrií, což mělo za následek narušení jejich morfologie a funkcí.¹⁷

Tvůrci jiné studie (Lei et al.) exponovali potkaní oocyt-granulózní buňky fullerenu o koncentracích 1, 10, a 100 μ g/ml. Dvouhodinová expozice významně redukovala tvorbu transzonálních protruzí. Transzonální protruze vycházejí z vnitřních vrstev granulóznic buněk a vytvářejí „výběžky“, které překračují zónu pelucida a dosahují až k oocytům. Vrstva granulóznic buněk obaluje oocyty a transzonální protruze zajišťuje spojení mezi granulózou a oocytem. Takto vzniká funkční komplex, který je nezbytný pro normální vývoj oocytů. Redukce tvorby transzonálních protruzí, popisovaná v daném experimentu, byla závislá na dávce. Expozice fullerenu snižovala rovněž expresi granulózového konexinu 43, který je důležitou součástí mezibuněčných spojů. Dvouhodinová expozice fullerenu měla za následek snížení jeho exprese o 56 %, což vedlo ke snížení tvorby cyklického adenosinmonofosfátu v oocyty a k urychlení obnovy meiózy. Uvedený děj má za následek pokles kvality oocytů.¹⁸ Důkazy o reprodukční toxicitě fullerenu však nejsou zcela jednoznačné. Například autoři Mrdanović et al. nenalezli známky genotoxicity (nárůst počtu mikrojadra a chromozomálních aberací) u CHO-K1 buněk (ovariálních buněk křečků) ani po relativně vysokých expozičních dávkách (11–221 μ M / 24 h). Nižší expoziční hladiny fullerenu hladiny genotoxických markerů dokonce snižovaly.¹⁹

Kultura CHO-K1 buněk byla použita i v dalších experimentech s CNM. Například Yadav et al. tyto buňky exponovali MWCNT. Expozice měla za následek remodelaci cytoskeletu, konkrétně zvýšení počtu cytoplazmatických vakuol a tvorbu lamelopodií (v důsledku polymerizace aktinu). Remodelace cytoskeletu byla doprovázena zvýšenou expresí genů spojených s cytoskeletem a buněčnou motilitou (Dic-1, kofilin a Rac1).²⁰ Danute Batiuskaite, Nora

Grinceviciute a Valentinas Snitka exponovali CHO-K1 buňky GO (12,5–50,0 µg/ml). GO snižoval viabilitu buněk v závislosti na dávce (ze 44 % na 11 %), pronikal do buněk a ovlivňoval jejich morfolonii, strukturu a schopnost vytvářet kolonie.²¹ Výsledky *in vitro* studií tedy naznačují potenciální reprodukční toxicitu CNM, a to již ve fázi produkce pohlavních hormonů, poškození buněk pohlavních orgánů i pohlavních buněk samotných.

11.2 IN VIVO STUDIE

S ohledem na závažnost dané problematiky byla reprodukční toxicita testována na široké škále organismů od červů přes hmyz a ryby až po savce, především myši a potkany. Často používanými nižšími experimentálními organismy jsou hlístice, hlavně *Caenorhabditis elegans* (háďátka obecná). Na tomto organismu testovali například autoři Kim et al. reprodukční toxicitu GO. Po dvouhodinové expozici koncentrací 10 mg GO / l byl GO distribuován po celém organismu, včetně reprodukčního systému, a po 48 hodinách od podání byla zjištěna kumulace GO okolo zárodečných buněk a embryí. GO narušoval spermatogenezi, snižoval počty spermií, indukoval nárůst oxidačního stresu a narušoval metabolismus tuků.²²

Reprodukční toxicitu GO a rGO (5 až 50 mg/l) testovali na *Caenorhabditis elegans* také autoři Chatterjee et al. Expozice měla za následek akumulaci GO v reprodukčních orgánech. Známky reprodukční toxicity byly patrné již při koncentracích 5 mg/l a koncentrace 50 mg/l reprodukci zcela zablokovaly. Významně nižší míra reprodukční toxicity byla zjištěna u rGO.²³ Tvůrci další studie (Zhao et al.) zjistili, že expozice *Caenorhabditis elegans* GO redukuje reprodukční kapacitu, narušuje vývoj gonád a indukuje apoptózu zárodečných buněk v důsledku poškození DNA a alterace epigenetické signalizace.²⁴ Vedle evidentních projevů reprodukční toxicity GO (vůči *Caenorhabditis elegans*) nebyla tato forma toxicity pozorována při expozicích *Caenorhabditis elegans* grafenu a PLA-Gu (*poly-lactic acid-graphene*) o koncentracích 50 µg/ml až 1000 µg/ml.²⁵

Hojně jsou využívány ke zjišťování reprodukční toxicity také hmyzí modely. Například autoři Kapeta-Kaczmarek et al. dlouhodobě exponovali *Acheta domesticus* (cvrček domácí) nanodiamantům (ND) v dávkách 20 µg/g a 200 µg/g. Kolonie byly exponovány denně od dvou týdnů po narození do úmrtí posledního cvrčka. Zatímco kontrolní kolonie přežila 28 dní, exponovaná kolonie pouze 21 dní. Expozice ND (zejména vyšší dávka) negativně ovlivnila také produkci vajíček a proces líhnutí. Zatímco samice s nejvyšší expozicí kladly v průběhu 24 hodin průměrně 15 vajíček, samice s nižší expozicí 25 vajíček a kontrolní kolonie dokonce 35 vajíček. Z výsledků je zřejmé, že expozice ND může negativně ovlivňovat plodnost.²⁶ Martins et al. testovali reprodukční toxicitu oxidovaných MWCNT a GO (expozice 10, 100 a 1000 µg/g) na *Spodoptera frugiperda* (blýskavka kukuřičná). V závislosti na dávce vyvolaly obě formy expozice snížení fertility a plodnosti. Došlo také ke snížení počtů nakladených a vylíhnutých vajíček.²⁷

Poněkud kontroverzní výsledky přinesly studie reprodukční toxicity prováděné na *Drosophila melanogaster* (octomilka obecná). Autoři Philbrook et al. exponovali *Drosophila melanogaster* hydroxylovaným SWCNT v dávce 10mg/kg. Uvedená dávka nijak neovlivnila porodnost ani plodnost exponovaných organismů.²⁸ Jiné výsledky však uvádějí tvůrci dalšího experimentu (Priyadarsiny et al.), kteří *Drosophila melanogaster* exponovali GO v dávkách 50 a 300 mg/l a v závislosti na dávce pozorovali nárůst oxidačního stresu (ROS), poškození orgánů a snížený počet vylíhnutých much z nakladených vajíček. Rozdíl ve výsledcích autoři

přisuzují odlišným expozičním hladinám.²⁹ Nárůst oxidačního stresu vlivem expozice GO pozorovali také Fang et al. Koncentrace 25 mg GO/l indukovala u *Bombyx mori* (bourec morušový) produkci ROS, což mělo za následek poškození DNA ovariálních buněk, snížení počtu oogonií a oocytů v ovariích a nárůst tvorby vakuol ve folikulárních buňkách. U larev byla zjištěna redukce gonosomatického indexu o 41 %. Rovněž došlo ke snížení exprese genů důležitých pro vývoj ovarií.³⁰

CNM se ve značné míře kumulují ve vodních organismech a mohou významně ovlivňovat jejich reprodukční systémy.

Mesarič et al. exponovali *Paracentrotus lividus* (ježovka dlouhostrná) GO a sazím (CB, carbon black) koncentracím 0,0001–1,0 mg CNM / l po dobu jedné hodiny. Z výsledků vyplývá, že i nejnižší koncentrace CB (0,0001 mg/l) snižovala (přibližně o 50 %) schopnost spermií oplodnit vajíčka. GO neovlivňoval fertilizaci ani při nejvyšší koncentraci 1,0 mg/l. Zajímavým nálezem byly vývojové anomálie v gastrulách i v larvách po oplodnění spermii, které byly vystaveny GO nebo CB.³¹

Reprodukční toxicitu fullerenu testovali také autoři další studie (Sumi et al.). Sladkovodní ryby *Anabas testudineus* (lezoun indický) byly exponovány koncentracím 5 a 10 mg/l krátkodobě (24, 48, 72 a 96 hodin) a dlouhodobě (7, 15, 30 a 60 dní). Expozice fullerenu obecně snižovala váhu ovarií i varlat a redukovala aktivitu antioxidantního enzymu superoxidodismutázy. Dlouhodobá expozice indukovala závažné histologické změny v ovariích i varlatech. V ovariích byly nalezeny atrezie, ztlustění oocytu během vitelogeninové fáze a zcela degenerované oocyty. Ve varlatech byly zjištěny vakuoly, snížený počet spermií a spermatocytů a deformace semenotvorného epitelu. Výsledky experimentu ukazují na výraznou reprodukční toxicitu fullerenu.³²

V další studii (Carrillo et al.) byly rybky *Danio rerio* (dánio pruhované) exponovány po dobu 48 hodin karboxylovaným MWCNT o koncentracích 0,5 a 1,0 ppm. Expozice vedla ke zvýšení oxidačního stresu a k peroxidaci lipidů v ovariální a testikulární tkáni.³³ *Danio rerio* použili ve své studii také Chen et al. Jejich experimenty měly komplexnější charakter a byly zaměřeny na hodnocení míry „endokrinní disrupce“ (změny endokrinních signálů) vlivem společné expozice GO a bisfenolu A. Z výsledků vyplývá, že kombinovaná expozice bisfenolu A a GO (50 a 500 ng/l) indukovala významně vyšší míru toxicity než samostatné expozice těmto látkám. Sedmidenní kombinovaná expozice dospělých samečů významně zvyšovala hladiny vitelogeninu a estradiolu a snižovala hladiny testosteronu a folikuly stimulujícího hormonu (FSH). Samotná expozice GO (koncentrace 250 ng GO/l) nevyvolávala změny v koncentracích hormonů.³⁴

Reprodukční toxicita GO byla zjištěna také u *Oryzias latipes* (medaka japonská). Autoři Dasmahapatra et al. podali těmto rybám intraperitoneálně dávky 25 a 200 µg/g a sledovali jejich účinek následujících 21 dní. V závislosti na dávce došlo ke snížení plodnosti již během prvních dní po aplikaci. Dávka 200 µg/g významně snižovala počty vylíhnutých mláďat, ke zvyšování mortality embryí nicméně nedocházelo. Histologická analýza prokázala aglomeráty GO v gonádách. Významnější změny ve folikulogenezi a v Leydigových buňkách zjištěny nebyly.³⁵

Sedmidenní expozice SWCNT (10 a 50 µg/l), v experimentu s *Cyprinus carpio* (kapr obecný) (Deepa et al.), měla za následek pokles exprese steroidogenních genů a genů souvisejících s varlaty. V séru byly nalezeny snížené hodnoty testosteronu a 11-ketosteronu. Rovněž byla zjištěna změněná morfologie varlat.³⁶

Reprodukční toxicita CNM byla testována i na obojživelnících. Autoři Zhao et al. zjistili, že MWCNT o koncentracích 0,5 a 2,5 mg/l, aplikované 56 dní, inhibovaly růst/vývoj orgánů

Xenopus tropicalis (drápatka obecná), a to včetně gonád, ovarií i varlat. Tvorba oocytů a spermií expozicí nicméně narušena nebyla.³⁷

Výsledky studií na savcích (primárně na myších a potkanech) neposkytují tak jednoznačné výsledky jako předcházející studie na červech, hmyzu a rybách, které prokazují reprodukční toxicitu. Například Zhang et al. aplikovali orálně (nebo nitrožilně) myším samcům GO-QD (60–300 a 25–150 mg/kg/den). Expozice GO-QD nezměnila sexuální chování myši, kvalitu spermatu ani hladiny testosteronu. I vysoké dávky byly velmi rychle eliminovány a nedocházelo k jejich kumulaci. Samice, které byly oplodněny samci exponovanými GO-QD, měly několik generací mláďat, z nichž se žádná zdravotně nelišila od mláďat z kontrolních skupin.³⁸

Podobné výsledky přinesla i další studie (Skovmand et al.), jejíž tvůrci intratracheálně exponovali myši GO, amorfnímu CB (Flammruss 101), CB (Printex 90) a uhlíkovým nanočásticím ze spalovacích motorů (SRM1650b). Žádná z uvedených expozičních neovlivnila kvalitu spermatu ani hladiny testosteronu exponovaných zvířat.³⁹ Znamky reprodukční toxicity vybraného CNM nebyly zaznamenány ani ve studii Lianga et al. Opakovaná intravenózní aplikace GO (25 mg/kg/den) nevyvolala u myších samců změny v jejich reprodukční aktivitě, hormonálních hladinách a kvalitě spermatu. Vliv expoziční se neprojevil ani na potomcích těchto myši. Součástí studie byla i intraperitoneální aplikace vysoké dávky 60 mg GO / kg / den po dobu 5 dní. Ani tato expozice neměla za následek poškození pohlavních orgánů exponovaných myši.⁴⁰

Výše uvedené studie nenalezly známky reprodukční toxicity CNM, nicméně některé jiné studie došly k opačnému závěru. Například autoři Farshad et al. aplikovali myším po dobu pěti týdnů SWCNT a MWCNT v dávkách 10 a 50 mg/kg/den. Vyšší dávky SWCNT výrazně redukovaly hmotnost těla, varlat i nadvarlat a chámovodu. V případě MWCNT došlo pouze k redukci tělesné hmotnosti. Expozice vyšším dávkám SWCNT i MWCNT snižovaly počty spermií a jejich viabilitu a motilitu, a naopak zvyšovaly hladinu oxidačního stresu. Autoři uvedené jevy připisují narušení mitochondriálních funkcí s následným snížením produkce ATP. Histologická analýza vzorků varlat odhalila závažné poškození tkáně a snížený spermatogenní index.⁴¹

V jiné studii (Akhavan et al.) aplikovali výzkumníci intravenózně myším samcům GO o koncentracích 2, 20, 200 a 2000 µg/ml. Po osmi týdnech expozice byly myši usmrceny. Analýzy prokázaly kumulaci GO v mnoha tkáních, včetně štítné žlázy a varlat. Bylo zjištěno na dávce závislé snížení kvality spermatu (viability a motility spermií) a morfologické změny spermií (na ocas i na hlavě). Koncentrace nad 200 µg/ml zvyšovaly produkci ROS, což bylo provázeno fragmentací DNA a vznikem chromozomálních aberací. Samice inseminované exponovanými samci měly během gravidity snížené hladiny FSH, luteinizačního hormonu, progesteronu a prolaktinu. Vývoj jejich plodů byl zpomalen a postnatální viabilita byla snížena o 15 %. Výsledky naznačují, že GO působí toxicky jak na exponované myši samce, tak i na jejich potomstvo.⁴² Zdá se, že CNM mohou negativně ovlivňovat i myši samice. Hougaard et al. aplikovali intratracheálně MWCNT dospělým myším samicím před zabřeznutím (67 µg NM-400 MWCNT). Samci exponování nebyli. Doba gravidity byla u exponovaných samic v průměru o pět dní delší než u myši kontrolních. Bylo také pozorováno poškození plic a jater, které přetrvávalo minimálně čtyři měsíce.⁴³

Autoři Johansson et al. zjistili, že intratracheálně aplikované MWCNT (2, 18 a 67 µg) prodloužily estrální cyklus myších samic (během kterého došlo k expozici MWCNT) z pěti až šesti dnů na sedm až osm dnů. Další estrální cyklus byl ale naopak zkrácen na přibliž-

ně 4,3 dne. Expozice MWCNT ovlivnila také termín porodu. U myší exponovaných 2 μg MWCNT došlo k porodu o dva dny dříve než v kontrolní skupině. Překvapivým jevem bylo, že dávky 18 μg a 67 μg porod naopak oddálily.⁴⁴

Toxické účinky na reprodukční systém byly popsány také u fullerenu C_{60} . V třicetidenním inhalačním pokusu na myších a potkanech (inhalace pouze nosem) byly použity dva typy fullerenu. Jednalo se o fulleren C_{60} o průměru 1 μm (mikro- C_{60}) a fulleren C_{60} o průměru 50 nm (nano- C_{60}). Mikro- C_{60} byl aplikován v koncentracích 2, 15 a 30 mg/m^3 , nano- C_{60} v koncentracích 0,5 a 2 mg/m^3 . Oba typy fullerenu snížily u obou druhů zvířat motilitu spermií a prodloužily estrální cyklus.⁴⁵

Ze studií, které pracovaly výhradně s potkany, lze uvést například dvě práce Nareshe Nirmala, Kumua Awasthiho a Placherila Johna, kteří potkanům po dobu 7, 15 a 30 dnů intraperitoneálně aplikovali GO (0,4; 2 a 10 mg/kg) a hydroxylované MWCNT (0,4; 2 a 10 mg/kg ; celkově 15 dávek). Expozice GO redukovala v závislosti na dávce počet spermií, spermatogonií a spermatid a způsobila pokles motility spermií. Došlo také ke změnám v testikulární tkáni, k atrofii semenotvorných tubulů s redukcí zárodečného epitelu a k vakuolizaci.⁴⁶ Rovněž hydroxylované MWCNT snižovaly počty spermií a jejich motilitu a ovlivňovaly morfologii buněk (nálezy bezhlavých spermií a poruch ocasu). Histologická analýza testikulární tkáně odhalila poškození semenotvorných tubulů a vakuolizaci v důsledku zeslabení zárodečného epitelu.⁴⁷

V jiné studii na potkanech (Farombi et al.) vědci intraperitoneálně aplikovali (po dobu pěti dnů) karboxylované MWCNT v dávkách 0,25, 0,5, 0,75 a 10 $\text{mg}/\text{kg}/\text{den}$. Expozice MWCNT zvyšovala hladiny peroxidů a malondialdehydu a aktivity antioxidantních enzymů (superoxid-dismutázy a glutamát pyruvát transaminázy) ve varlatech, nadvarlatech a spermiích. Poklesly naopak hladiny glutathionu a glutathionperoxidázy a poklesla též hladina testosteronu a počet spermií (se zvýšeným výskytem abnormálních spermií).⁴⁸

Výsledky *in vivo* sice ne ve všech případech potvrzují reprodukční toxicitu CNM, nicméně pokud existují studie, které ji potvrzují, je nezbytné se tomuto tématu věnovat hlouběji. Je vysoké riziko, že CNM mohou vykazovat toxicitu také k lidskému reprodukčnímu systému.

11.3 VÝVOJOVÁ TOXICITA

Vývojové poruchy a defekty mohou mít genetický podklad nebo mohou být způsobeny expozicí rodičů či plodu chemickým, fyzikálním či biologickým faktorům. Z pohledu chemických faktorů jsou obzvláště nebezpečné ty látky, které penetrují přes placentu do embrya či plodu.

Boyin Liu, Eva Campo a Torsten Bossing použili pro sledování vývojové toxicity embrya octomílek (*Drosophila melanogaster*). Do embryí injekčně vpravili po 5 pg MWCNT. Injektivované MWCNT pronikaly do buněk, ale nedostaly se k jádrům a zůstávaly v cytoplazmě. Expozice indukovala smrt ektodermálních kmenových buněk, ale neurální kmenové buňky ovlivněny nebyly. Uvedený jev naznačuje variabilitu toxického účinku MWCNT podle typů buněk.⁴⁹

Dziewięcka et al. exponovali cvrčky domácí (*Acheta domestica*) GO (0,2, 2 a 20 $\mu\text{g}/\text{g}$ v potravě) a sledovali jeho vliv na tři následující generace. Změny indukované GO byly patrné ve všech generacích. Expozice zkracovala délku života, snižovala počet larev na samici a zkracovala dobu líhnutí. Doba líhnutí byla výrazně kratší v první a třetí generaci. Ve třetí generaci cvrčků byl navíc zjištěn nárůst míry poškození DNA a genomová nestabilita. Je

zajímavé, že druhá generace nevykazovala změny ekvivalentní změnám pozorovaným v první a třetí generaci. Zdá se tedy, že vývojová toxicita GO postihuje více generací a míra postihu nemá lineární charakter.⁵⁰

Velmi důležité jsou studie vývojové toxicity na vodních živočiších, neboť ve vodním prostředí může docházet k významné kumulaci CNM. Autoři Martínez-Paz et al. testovali vývojovou toxicitu MWCNT (expoziční koncentrace 10, 100 a 1000 µg/ml) na vodní larvu *Chironomus riparius*. Expozice MWCNT snižovala expresi genů odpovědných za produkci proteinů, zapojených do reparačních mechanismů DNA. Nejvyšší dávky snižovaly i expresi Hsp70 a Hsp27 genů. Produkty těchto genů jsou zapojeny do cytoprotekce, podílí se na stabilizaci četných onkoproteinů, podporují proliferaci, inhibují apoptózu a fungují též jako chaperony a proteazomy. To samozřejmě vede k poruchám vývoje larev.⁵¹

Studie autorů Zhua et al. byla provedena na larvách korýše žabronožky solné (*Artemia salina*), které byly exponovány oxidovaným SWCNT o koncentracích až 600 mg/l po dobu 12, 18, 24 a 36 hodin. Expozice významně zvýšila mortalitu larev a produkci ROS. Po 24 hodinách došlo ke zkrácení délky těla a narušení plavání (v míře závislé na dávce). Poruchy plavání byly způsobeny poškozením žaber, na která se navazovaly SWCNT.⁵²

Autoři jiné studie (Mesarič et al.) studovali vliv expoziční spermií ježovky dlouhoostné (*Paracentrotus lividus*) CB nebo GO (0,0001–1,0 mg/l) na stav dalších generací. Embrya vzniklá ze spermií exponovaných CB nebo GO vykazovala zpomalení vývoje (nepravidelný tvar embrya, abnormální migrace primárních mezenchymálních buněk a narušení skeletogeneze) a měla sníženou aktivitu cholinesterázy. Intenzita vývojové toxicity byla závislá na dávce.³¹

Z ryb je v experimentální toxikologii často používáno danio pruhované (*Brachydanio rerio*). Na této rybě testovali D'Amora et al. vývojovou toxicitu GO, oxidovaných uhlíkových nanocibulí (oxi-CNO) a oxidovaných nanorohů (oxi-CNH). Vajíčka ryb byla vystavena koncentracím 5, 10, 50, 100 µg CNM / ml / 120 hpf (hodin po fertilizaci). Zatímco oba oxidované druhy CNM vykazovaly poměrně vysokou biokompatibilitu, u GO byly zjištěny na dávce závislé známky vývojové toxicity. Expozice GO alterovala líhnutí, snižovala míru přežití o 25 %, zpomalovala vývoj embrya a snižovala jeho srdeční frekvenci a pohyblivost. Byl zaznamenán zvýšený výskyt malformací (například flexury ocasu, poškození žloutkového vřívku či perikardiální edém).⁵³ Vývojovou toxicitu GO potvrdili také autoři Yang et al. Expozice 10 µg/ml snížila líhnavost a narušila pohyblivost plodu. Byl nalezen zvýšený výskyt malformací a potvrzena vyšší hladina oxidačního stresu. Analýza genové exprese odhalila, že expoziční GO zvýšila expresi mRNA pro synapsin, neurogenin-1, α 1-tubulin, SHH (*sonic hedgehog protein*) a rbl13 protein, které jsou spojené s vývojem nervové soustavy. Již koncentrace 0,01 µg GO/ml zvyšovala expresi mRNA prozánětlivých cytokinů, (například IL-6, IL-8, TNF α a IFN γ). Je zřejmé, že expoziční GO působí na embryo neurotoxicky a indukuje zánět.⁵⁴

Bangeppagari et al. se zaměřili na studium kardiotoxických účinků GO (expoziční koncentracím 0,1–1 mg/ml) na embrya dania pruhovaného. Koncentrace do 0,3 mg/l nebyly kardiotoxické, avšak vyšší koncentrace oddalovaly líhnutí a zvyšovaly mortalitu embryí. Podrobnější analýza prokázala závažné vývojové defekty srdce a cév a poruchy hemoglobinizace.⁵⁵

Studie Jaworského et al. srovnávala toxicitu grafenu a GO (koncentrace 5, 10, 20, 50 a 100 µg/ml) na čtyřech biologických modelech, včetně dania pruhovaného. Vyšší toxicitu vykazovala expoziční GO. U dania pruhovaného se po expoziční GO zvýšil počet nevylih-

nutých embryí a vývojových abnormit (například malformace ocasu a perikardiální edém). Koncentrace 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$ obou typů CNM vedly ke smrti a koagulaci embryí, což snižovalo míru přežití.⁵⁶

Také tvůrci další studie (Chen et al.) potvrdili, že GO (v expozičních koncentracích 10 a 100 mg/ml) působí toxicky na embrya dania pruhovaného. Po 24 hpf byl GO nalezen i v chorionu, do nějž spontánně pasivně penetroval pomocí endocytózy. V embryu docházelo ke kumulaci GO hlavně v oblasti očí, žloutkového váčku a v srdci. To vedlo k vývojovým defektům spojených s poškozením mitochondrií a s nárůstem hladiny oxidačního stresu.⁵⁷

V rozsáhlé studii s embryi dania pruhovaného použili autoři Lopez et al. několik druhů a velikostí částic GO. Konkrétně se jednalo o částice 250 nm \times 250 nm (sGO), 400 nm \times 400 nm (mGO), 1 μm \times 1 μm (lGO), částečně redukované částice 400 nm \times 400 nm (prGO) a redukované částice (rGO) 400 nm \times 400 nm a 2 μm \times 2 μm . Embrya byla exponována koncentracím 2,32, 5, 10,7, 23,2 a 50 $\mu\text{g/ml}$ v časech až 120 hpf. Nejvyšší míra vývojové toxicity byla nalezena při expozici mGO. Došlo k významnému zvýšení mortality a výskytu malformací. Například expozice koncentraci 50 $\mu\text{g mGO / ml}$ po dobu jedné hodiny dokázala narušit membránu žloutkového váčku, což mělo za následek vytékání žloutku a smrt embrya. Rovněž byly pozorovány změny ve fotomotorické odpovědi (chování) embryí.⁵⁸

Falinski et al. exponovali larvy a embrya dania pruhovaného různým typům oxidovaných MWCNT (ox-MWCNT) o koncentracích 10 až 50 $\mu\text{g ox-MWCNT/ml/24 hpf}$. Expozice ox-MWCNT zvyšovala hladinu oxidačního stresu a mortalitu embryí, avšak mezi těmito dvěma ukazateli nebyl nalezen významný vztah. Zdá se tedy, že zvýšená tvorba ROS není jedinou příčinou zvýšené mortality. Autoři se domnívají, že významnou roli ve zvýšené úrovni mortality hrají (vedle ROS) i fyzikálně-chemické vlastnosti CNM a jejich agregace v tkáních.⁵⁹ K podobným závěrům (při použití jiných typů MWCNT) dospěli i Martinez et al. Ve své studii testovali krátké a dlouhé MWCNT (krátké 110–170 nm průměr a 5–9 μm délka; dlouhé 6–13 nm průměr a 2,5–20 μm délka), kterými byly exponovány larvy a embrya dania pruhovaného (koncentrace 0,005, 0,05, 0,5, 5 a 50 ppm / 24 a 48 hpf). Expozice oběma typům MWCNT negativně ovlivňovala líhivost a mortalitu embryí. U larev došlo po expozici dlouhým MWCNT k narušení vývoje nervové a kardiovaskulární soustavy, což se projevilo jako poruchy v lokomoci a poruchy srdečního rytmu. Navíc došlo k poklesu migrace neutrofilů a k malformacím larev. Expozice larev krátkým MWCNT negativně ovlivňovala vývoj jejich nervové soustavy a migraci neutrofilů.⁶⁰

Mezi další CNM, u kterých byl zjišťován potenciál vývojové toxicity, patří fulleren. Jako příklad lze uvést studii Zhua et al. Expozice embryí dania pruhovaného fullerenu (50 mg/l) významně zvýšila jejich mortalitu a negativně ovlivnila líhnutí. Tyto účinky byly zmírněny přidávkem glutathionu do expoziční směsi. Expozice fullerenu o koncentraci 1,5 mg/l v průběhu 12 až 96 hpf snižovala (v závislosti na čase) míru přežití embryí a jejich srdeční frekvenci a indukoval vznik perikardiálního edému.⁶¹

Studie Wanga et al. byla zaměřena na interakce účinků při kombinované expozici embryí dania pruhovaného MWCNT a BDE-47 (2,2',4,4'-tetrabromodifenyl éteru). Embrya byla akutně (96 hodin) exponována jednotlivým látkám i jejich kombinaci (koncentrace 5, 10, a 50 $\mu\text{g BDE-47 / l}$ a 50 mg MWCNT / l). Expozice samotnému BDE-47 vyvolala významně vyšší míru akutní toxicity než expozice samotným MWCNT. V případě kombinované expozice byly pozorovány antagonistické interakce, kdy ukazatele akutní toxicity BDE-47 byly redukovány vlivem přítomnosti MWCNT. Byly sledovány ukazatele oxidačního stresu (ROS, superoxididismutáza, kataláza a malondialdehyd), apoptózy (míra apoptózy a aktivity

kaspázy-3 a kaspázy-9) a poškození DNA (kometový test). Z výsledků vyplývá, že ačkoli MWCNT vykazují samy o sobě vývojovou toxicitu, zjevně mohou mírnit účinky jiných látek s vyšší mírou vývojové toxicity.⁶² Také další studie (Jurgelèné et al.) byla zaměřena na interakce účinků čtyřdenní expozice embryí a larev pstruha potočního (*Salmo trutta*) samotnému GO a dále směsi GO a kovových prvků, běžných v životním prostředí (chrom, měď, nikl a zinek). Zatímco u larev byl GO nalezen pouze v oblasti žaber, u embryí pronikl až do chorionu a zde způsobil poškození tkáně. Při použití GO ve směsi s kovovými prvky byla pozorována vysoká sorpční kapacita GO, který uvedené kovové prvky vázal do komplexu a tím snižoval jejich toxický potenciál.⁶³

Studie autorů Sawosze et al. se zabývala otázkou poškození kuřecích embryí grafenem. Oplozená vejce byla 19 dnů exponována vodné suspenzi grafenu o koncentracích 50–10 000 µg/l. Expozice významně snížila přežití embryí, nicméně neovlivnila sledované biochemické parametry a hmotnost. Histologická analýza vzorků mozkové tkáně ukázala změněnou strukturu s nárůstem vakuol a cév s kumulací leukocytů a poškozením mitochondrií. Při koncentracích vyšších než 1000 µg/l bylo zjištěno snížení exprese PCNA mRNA (*proliferating cell nuclear antigen*). PCNA je zapojen do syntézy DNA během replikace a do postreplikační reparace DNA.⁶⁴

Další studií, zaměřenou na možné poškození kuřecích embryí vybranými CNM, prezentovali Schmidt et al. Ve svých experimentech porovnávali účinky grafenu, GO a rGO o koncentracích 50, 500 a 5000 µg/ml. Uvedené CNM byly injikovány do oplozených vajec, která byla následných 18 dnů inkubována. V závislosti na dávce bylo pozorováno snížení míry přežití embryí ve všech skupinách (nejtoxicičtější byl v tomto ohledu GO). Při histologických analýzách jaterní tkáně bylo zjištěno, že grafen poškodil membrány hepatocytů a mitochondrií (narušení membrán a degradace mitochondriálních krist). Expozice GO membrány hepatocytů nepoškozovala, nicméně zvyšovala počet intracelulárních vakuol a vážně poškozovala mitochondrie. Expozice rGO vedla k dezintegraci cytoplazmy a fragmentaci mitochondrií. Z výsledků dále vyplývá, že grafen a rGO mají pravděpodobně antioxidační účinky. Při použití expozičních koncentrací 50 a 500 µg/ml bylo zjištěno snížení hladiny ukazatele oxidačního poškození DNA (8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu).⁶⁵

Autoři Kurantowicz et al. testovali účinky šesti typů CNM, které byly injikovány do bílku oplozených vajíček. Jednalo se o ND, grafit, grafen, malý GO, velký GO a rGO. Stav embryí byl vyhodnocován za 5, 10, 15 a 20 dnů inkubace. U všech testovaných CNM, s výjimkou ND, došlo k poklesu doby přežití (nejzávažnější byly účinky velkého GO). Žádná z expozičních neovlivnila váhu jater, ledvin, srdce, mozku či ledvin. Morfologie erytrocytů, hodnoty oxidačního stresu a vybraných biochemických parametrů se mezi skupinami nelišily.⁶⁶ Některé výsledky této studie jsou však v rozporu s výsledky studie Jaworského et al., publikované v témže roce, která byla zaměřena na hemokompatibilitu redukováného grafenu, GO a rGO. Kuřecí oplozená vajíčka byla exponována uvedeným CNM o koncentracích 50, 500 a 5000 µg/ml a následně byly sledovány morfologické změny erytrocytů. Expozice způsobily dezintegraci membrány, deformování tvaru (echinocyty, knizocyty) a destrukci erytrocytů (hemolýzu). Nejzávažnější hemolytická reakce byla pozorována po expozici grafenu o nejvyšší koncentraci.⁶⁷

Savčí vývojová toxicita CNM byla testována primárně na myších. Autoři Lui et al. exponovali orálně gravidní myši GO (expozice dávkám 2, 10 a 40 mg/kg denně během 7. až 16. gestačního dne). V závislosti na dávce byly pozorovány komplikace vývoje plodu, včetně zvýšené resorpce embryí. Byl zaznamenán významný pokles hmotnosti mláďat a živých plo-

dů, došlo k vývinu kosterních malformací a ke zvýšení mortality. Autoři tyto jevy připisují poškození mikrobiomu střeva. Poškození je podle nich spojeno s narušením placentálních bariérových funkcí a plod tak není dostatečně chráněn před vlivem xenobiotik.⁶⁸

Gravidní myši byly použity i ve studii autorů Fujitaniho et al. Studie byla zaměřena na účinky expozice MWCNT (expozice dávkám 2, 3, 4, and 5 mg/kg), aplikovaných intraperitoneálně nebo intratracheálně v devátý den gestace. Expozice zvýšila míru resorpce embryí ve všech sledovaných skupinách. Intraperitoneální podání vedlo u všech expozičních dávek ke kosterním malformacím (zkrácení končetin, zkrácený či chybějící ocas a fúze obratlů). Podobné účinky byly pozorovány i u intratracheálního podání, ale pouze u vyšších expozičních dávek 4 a 5 mg/kg.⁶⁹

Autoři Fu et al. exponovali orálně kojící samice GO (koncentrace 0,5 mg/ml; po celé období laktace). Mláďata takto exponovaných matek pomaleji rostla a pomaleji přibývala na váze. Jak odhalila histologická analýza, jejich srdce, játra, plíce, ledviny, slezina a klky tenkého střeva byly atrofované.⁷⁰

Často je uváděno, že funkcionalizace CNM má za následek snížení toxicity a zvýšení biokompatibility. Nutno doplnit, že funkcionalizace má v některých případech i opačný účinek. Příkladem může být studie Caoa et al., která byla provedena na larvách dania pruhovaného (vývojové stadium starší tří dnů po oplození). Larvy byly exponovány karboxylovanému GO o koncentracích 10, 50 a 100 mg/l. Expozice měla za následek zvýšení míry oxidačního stresu a narušení vývoje nervového systému. To se následně projevilo ve formě abnormalit pohybové aktivity. Vlivem expozice rovněž došlo k nárůstu aktivit acetylcholinesterázy, ATPázy a exprese genů spojených s Parkinsonovou nemocí.⁷¹

Studie provedené na mnoha experimentálních modelech (od hmyzu až po savce) ukazují, že CNM mohou vážně poškozovat reprodukční systémy a vyvíjející se plod. Velmi důležitou roli v tomto procesu hraje charakter CNM, podaná dávka a časové období, po které jsou plody působení CNM vystaveny. S ohledem na nárůst produkce CNM (a s tím související nárůst pravděpodobnosti expozičního kontaktu s člověkem) akcentují výsledky studií bezpodmínečnou nutnost podrobnějšího výzkumu mechanismu působení těchto látek a odhadu úrovně akceptovatelného rizika expozice.

11.4 ZÁVĚR

Reprodukce je nezbytná pro přežití všeho živého. Její narušení, omezení, či dokonce neplodnost znamená zásah do populací, které v nejhorším případě může vést i k vymření některých druhů. Neméně zásadní je pak i správný prenatální i postnatální vývoj potomstva. Je tedy velmi důležité sledovat u chemických sloučenin a látek také jejich reprodukční a vývojovou toxicitu. Ve studiích *in vitro* i *in vivo* se ukazuje, že CNM mají toxický potenciál. Zasahují do produkce pohlavních hormonů, poškozují tkáň spojené s reprodukcí, a navíc mohou způsobit vývojové deformity a kumulovat se ve tkáních vyvíjejícího se plodu. Tuto problematiku je nezbytné dále studovat, aby se zabránilo poškození dalších generací.

11.5 LITERATURA

1. Meyer JD, McDiarmid M, Diaz JH, Baker BA, Hieb M. Reproductive and Developmental Hazard Management. *J Occup Environ Med*. 2016; 58(3):e94–e102. doi:10.1097/JOM.0000000000000669.
2. SCHC-OSHA Alliance. Hazard Communication Information Sheet Reflecting the US OSHA Implementation of the Globally Harmonized System (GHS) of Classification and Labelling of Chemicals. Produced by the SCHC-OSHA Alliance on Acute Dermal Toxicity; 2018.
3. Tyl RW. Toxicity Testing, Reproductive. In: *Encyclopedia of Toxicology*. 3. vyd. Academic Press; 2014. doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00439-5.
4. Buerki-Thurnherr T, Schaepper K, Aengenheister L, Wick P. Developmental Toxicity of Nanomaterials: Need for a Better Understanding of Indirect Effects. *Chem Res Toxicol*. 2018;31(8):641–642. doi:10.1021/ACS.CHEMRESTOX.8B00177.
5. Dugershaw BB, Aengenheister L, Hansen SSK, Hougaard KS, Buerki-Thurnherr T. Recent Insights on Indirect Mechanisms in Developmental Toxicity of Nanomaterials. *Part Fibre Toxicol*. 2020;17(1):1–22. doi:10.1186/S12989-020-00359-X.
6. Qu Y, Yang B, Jiang X, Ma X, Lu C, Chen C. Multiwalled Carbon Nanotubes Inhibit Steroidogenesis by Disrupting Steroidogenic Acute Regulatory Protein Expression and Redox Status. *J Nanosci Nanotechnol*. 2017;17(2):914–925. doi:10.1166/jnn.2017.12647.
7. Gurunathan S, Kang MH, Jeyaraj M, Kim JH. Differential Cytotoxicity of Different Sizes of Graphene Oxide Nanoparticles in Leydig (TM3) and Sertoli (TM4) Cells. *Nanomaterials*. 2019;9(2):139. doi:10.3390/nano9020139.
8. Ji X, Xu B, Yao M et al. Graphene Oxide Quantum Dots Disrupt Autophagic Flux by Inhibiting Lysosome Activity in GC-2 and TM4 Cell Lines. *Toxicology*. 2016;374:10–17. doi:10.1016/j.tox.2016.11.009.
9. Xu C, Liu Q, Liu H, Zhang C, Shao W, Gu A. Toxicological Assessment of Multi-Walled Carbon Nanotubes In Vitro: Potential Mitochondria Effects on Male Reproductive Cells. *Oncotarget*. 2016;7(26):39270–39278. doi:10.18632/oncotarget.9689.
10. Sanand S, Kumar S, Bara N, Kaul G. Comparative Evaluation of Half-Maximum Inhibitory Concentration and Cytotoxicity of Silver Nanoparticles and Multiwalled Carbon Nanotubes Using Buffalo Bull Spermatozoa as a Cell Model. *Toxicol Ind Health*. 2018;34(9):640–652. doi:10.1177/0748233718783389.
11. Bernabò N, Fontana A, Sanchez MR et al. Graphene Oxide Affects In Vitro Fertilization Outcome by Interacting with Sperm Membrane in an Animal Model. *Carbon*. 2018;129:428–437. doi:10.1016/j.carbon.2017.12.042.
12. Li X, Wang L, Liu H et al. C60 Fullerenes Suppress Reactive Oxygen Species Toxicity Damage in Boar Sperm. *Nano-Micro Lett*. 2019;11(1):1–17. doi:10.1007/s40820-019-0334-5.
13. Türk G, Koca RH, Güngör İH et al. Effect of Hydrated C60 Fullerene on Lipid, Vitamin and Amino Acid Composition in Frozen-Thawed Ram Semen. *Anim Reprod Sci*. 2022;238:106939. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2022.106939.
14. Güngör İH, Dayan Cinkara S, Acisu TC et al. Effect of Hydrated Carbon 60 Fullerene on Frozen Ram Semen Quality. *Biopreserv Biobank*. 2022;20(4):340–347. doi:10.1089/bio.2021.0001.
15. Asghar W, Shafiee H, Velasco V et al. Toxicology Study of Single-Walled Carbon Nanotubes and Reduced Graphene Oxide in Human Sperm. *Sci Rep*. 2016;6(1):1–11. doi:10.1038/srep30270.
16. Aminzadeh Z, Jamalán M, Chupani L et al. In Vitro Reprotoxicity of Carboxyl-Functionalised Single- and Multi-Walled Carbon Nanotubes on Human Spermatozoa. *Andrologia*. 2017;49(9):e12741. doi:10.1111/and.12741.
17. Lin YH, Zhuang SX, Wang YL et al. The Effects of Graphene Quantum Dots on the Maturation of Mouse Oocytes and Development of Offspring. *J Cell Physiol*. 2019;234(8):13820–13831. doi:10.1002/jcp.28062.

18. Lei R, Bai X, Chang Y et al. Effects of Fullerenol Nanoparticles on Rat Oocyte Meiosis Resumption. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3):699. doi:10.3390/ijms19030699.
19. Mrdanović J, Šolajić S, Bogdanović V, Stankov K, Bogdanović G, Djordjevic A. Effects of Fullerenol C60(OH)24 on the Frequency of Micronuclei and Chromosome Aberrations in CHO-K1 Cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2009;680(1–2):25–30. doi:10.1016/j.mrgentox.2009.08.008.
20. Yadav K, Ali SA, Mohanty AK, Muthusamy E, Subaharan K, Kaul G. MSN, MWCNT and ZnO Nanoparticle-Induced CHO-K1 Cell Polarisation is Linked to Cytoskeleton Ablation. *J Nanobio-technol.* 2021;19(1):1–24. doi:10.1186/s12951-021-00779-7.
21. Batiuskaite D, Grinceviciute N, Snitka V. Impact of Graphene Oxide on Viability of Chinese Hamster Ovary and Mouse Hepatoma MH-22A Cells. *Toxicol In Vitro.* 2015;29(5):1195–1200. doi:10.1016/j.tiv.2015.05.004.
22. Kim Y, Jeong J, Yang J, Joo SW, Hong J, Choi J. Graphene Oxide Nano-Bio Interaction Induces Inhibition of Spermatogenesis and Disturbance of Fatty Acid Metabolism in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology.* 2018;410:83–95. doi:10.1016/j.tox.2018.09.006.
23. Chatterjee N, Yang JS, Park K, Oh SM, Park J, Choi J. Screening of Toxic Potential of Graphene Family Nanomaterials Using In Vitro and Alternative In Vivo Toxicity Testing Systems. *Environ Health Toxicol.* 2015;30:e2015007. doi:10.5620/eh.t.e2015007.
24. Zhao Y, Wu Q, Wang D. An Epigenetic Signal Encoded Protection Mechanism is Activated by Graphene Oxide to Inhibit Its Induced Reproductive Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Biomaterials.* 2016;79:15–24. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.11.052.
25. Kong C, Aziz AI, Kakarla AB, Kong I, Kong W. Toxicity Evaluation of Graphene and Poly(Lactic-Acid) Using a Nematode Model. *Solid State Phenom.* 2019;290:101–106. doi:10.4028/www.scientific.net/SSP.290.101.
26. Karpeta-Kaczmarek J, Kędziorski A, Augustyniak-Jabłokow MA, Dziewięcka M, Augustyniak M. Chronic Toxicity of Nanodiamonds Can Disturb Development and Reproduction of *Acheta domesticus* L. *Environ Res.* 2018;166:602–609. doi:10.1016/j.envres.2018.05.027.
27. Martins CHZ, de Sousa M, Fonseca LC, Martinez DST, Alves OL. Biological Effects of Oxidized Carbon Nanomaterials (1D Versus 2D) on *Spodoptera frugiperda*: Material Dimensionality Influences on the Insect Development, Performance and Nutritional Physiology. *Chemosphere.* 2019;215:766–774. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.09.178.
28. Philbrook NA, Walker VK, Afroz ARMN, Saleh NB, Winn LM. Investigating the Effects of Functionalized Carbon Nanotubes on Reproduction and Development in *Drosophila melanogaster* and CD-1 Mice. *Reprod Toxicol.* 2011;32(4):442–448. doi:10.1016/j.reprotox.2011.09.002.
29. Priyadarini S, Sahoo SK, Sahu S, Mukherjee S, Hota G, Mishra M. Oral Administration of Graphene Oxide Nano-Sheets Induces Oxidative Stress, Genotoxicity, and Behavioral Teratogenicity in *Drosophila melanogaster*. *Environ Sci Pollut Res.* 2019;26(19):19560–19574. doi:10.1007/s11356-019-05357-x.
30. Fang Y, Lu Z, Li M et al. An Assessment of the Reproductive Toxicity of GONPs Exposure to *Bombyx mori*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021;210:111888. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111888.
31. Mesarić T, Sepčić K, Drobne D et al. Sperm Exposure to Carbon-Based Nanomaterials Causes Abnormalities in Early Development of Purple Sea Urchin (*Paracentrotus lividus*). *Aquat Toxicol.* 2015;163:158–166. doi:10.1016/j.aquatox.2015.04.012.
32. Sumi N, Chitra KC. Fullerene C60 Nanomaterial Induced Oxidative Imbalance in Gonads of the Freshwater Fish, *Anabas testudineus* (Bloch, 1792). *Aquat Toxicol.* 2019;210:196–206. doi:10.1016/j.aquatox.2019.03.003.
33. Carrillo Y, Torres-Duarte C, Oviedo MJ, Hirata GA, Huerta-Saquero A, Vazquez-Duhalt R. Lipid Peroxidation and Protein Oxidation Induced by Different Nanoparticles in Zebrafish Organs. *Appl Ecol Environ Res.* 2015;13(3):709–723. doi:10.15666/aer/1303_709723.

34. Chen P, Yang J, Wang R et al. Graphene Oxide Enhanced the Endocrine Disrupting Effects of Bisphenol A in Adult Male Zebrafish: Integrated Deep Learning and Metabolomics Studies. *Sci Total Environ*. 2022;809:151103. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.151103.
35. Dasmahapatra AK, Powe DK, Dasari TPS, Tchounwou PB. Assessment of Reproductive and Developmental Effects of Graphene Oxide on Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*. 2020;259:127221. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.127221.
36. Deepa S, Mamta SK, Anitha A, Senthilkumaran B. Exposure of Carbon Nanotubes Affects Testis and Brain of Common Carp. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2022;95:103957. doi:10.1016/J.ETAP.2022.103957.
37. Zhao J, Luo W, Xu Y, Ling J, Deng L. Potential Reproductive Toxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes and Their Chronic Exposure Effects on the Growth and Development of *Xenopus tropicalis*. *Sci Total Environ*. 2021;766:142652. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142652.
38. Zhang D, Zhang Z, Wu Y et al. Systematic Evaluation of Graphene Quantum Dot Toxicity to Male Mouse Sexual Behaviors, Reproductive and Offspring Health. *Biomaterials*. 2019;194:215–232. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.12.001.
39. Skovmand A, Jacobsen Lauvås A, Christensen P, Vogel U, Sørig Hougaard K, Goericke-Pesch S. Pulmonary Exposure to Carbonaceous Nanomaterials and Sperm Quality. *Part Fibre Toxicol*. 2018;15(1):1–12. doi:10.1186/s12989-018-0242-8.
40. Liang S, Xu S, Zhang D, He J, Chu M. Reproductive Toxicity of Nanoscale Graphene Oxide in Male Mice. *Nanotoxicology*. 2015;9(1):92–105. doi:10.3109/17435390.2014.893380.
41. Farshad O, Heidari R, Zamiri MJ et al. Spermatotoxic Effects of Single-Walled and Multi-Walled Carbon Nanotubes on Male Mice. *Front Vet Sci*. 2020;7:591558. doi:10.3389/fvets.2020.591558.
42. Akhavan O, Ghaderi E, Hashemi E, Akbari E. Dose-Dependent Effects of Nanoscale Graphene Oxide on Reproduction Capability of Mammals. *Carbon*. 2015;95:309–317. doi:10.1016/j.carbon.2015.08.017.
43. Hougaard KS, Jackson P, Kyjovska ZO et al. Effects of Lung Exposure to Carbon Nanotubes on Female Fertility and Pregnancy. A Study in Mice. *Reprod Toxicol*. 2013;41:86–97. doi:10.1016/j.reprotox.2013.05.006.
44. Johansson HKL, Hansen JS, Elfving B et al. Airway Exposure to Multi-Walled Carbon Nanotubes Disrupts the Female Reproductive Cycle without Affecting Pregnancy Outcomes in Mice. *Part Fibre Toxicol*. 2017;14:17. doi:10.1186/s12989-017-0197-1.
45. National Toxicology Program. Toxicity Studies of Fullerene C60 (1 µm and 50 nm) Administered by Nose-Only Inhalation to Wistar Han [CrI(Han)] Rats and B6C3F1/N Mice. *Toxic Rep Ser*. 2020;(87). doi:10.22427/NTP-TOX-87.
46. Nirmal NK, Awasthi KK, John PJ. Effects of Nano-Graphene Oxide on Testis, Epididymis and Fertility of Wistar Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2017;121(3):202–210. doi:10.1111/bcpt.12782.
47. Nirmal NK, Awasthi KK, John PJ. Effects of Hydroxyl-Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes on Sperm Health and Testes of Wistar Rats. *Toxicol Ind Health*. 2017;33(6):519–529. doi:10.1177/0748233716685661.
48. Farombi EO, Adedara IA, Forcados GE, Anao OO, Agbowo A, Patlolla AK. Responses of Testis, Epididymis, and Sperm of Pubertal Rats Exposed to Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes. *Environ Toxicol*. 2016;31(5):543–551. doi:10.1002/tox.22067.
49. Liu B, Campo EM, Bossing T. *Drosophila* Embryos as Model to Assess Cellular and Developmental Toxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNT) in Living Organisms. *PLoS One*. 2014;9(2):e88681. doi:10.1371/journal.pone.0088681.
50. Dziewięcka M, Flasz B, Rost-Roszkowska M, Kędziorski A, Kochanowicz A, Augustyniak M. Graphene Oxide as a New Anthropogenic Stress Factor – Multigenerational Study at the Molecular, Cellular, Individual and Population Level of *Acheta domesticus*. *J Hazard Mater*. 2020;396:122775. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.122775.

51. Martínez-Paz P, Negri V, Esteban-Arranz A, Martínez-Guitarte JL, Ballesteros P, Morales M. Effects at Molecular Level of Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNT) in *Chironomus riparius* (Diptera) Aquatic Larvae. *Aquat Toxicol*. 2019;209:42–48. doi:10.1016/j.aquatox.2019.01.017.
52. Zhu B, Zhu S, Li J, Hui X, Wang GX. The Developmental Toxicity, Bioaccumulation and Distribution of Oxidized Single-Walled Carbon Nanotubes in *Artemia salina*. *Toxicol Res*. 2018;7(5):897–906. doi:10.1039/c8tx00084k.
53. D'Amora M, Camisasca A, Lettieri S, Giordani S. Toxicity Assessment of Carbon Nanomaterials in Zebrafish During Development. *Nanomaterials*. 2017;7(12):414. doi:10.3390/nano7120414.
54. Yang X, Yang Q, Zheng G et al. Developmental Neurotoxicity and Immunotoxicity Induced by Graphene Oxide in Zebrafish Embryos. *Environ Toxicol*. 2019;34(4):415–423. doi:10.1002/tox.22695.
55. Bangeppagari M, Park SH, Kundapur RR, Lee SJ. Graphene Oxide Induces Cardiovascular Defects in Developing Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Model: In-Vivo Toxicity Assessment. *Sci Total Environ*. 2019;673:810–820. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.04.082.
56. Jaworski S, Strojny-Cieślak B, Wierzbicki M et al. Comparison of the Toxicity of Pristine Graphene and Graphene Oxide, Using Four Biological Models. *Materials*. 2021;14(15):4250. doi:10.3390/ma14154250.
57. Chen Y, Hu X, Sun J, Zhou Q. Specific Nanotoxicity of Graphene Oxide During Zebrafish Embryogenesis. *Nanotoxicology*. 2016;10(1):42–52. doi:10.3109/17435390.2015.1005032.
58. Lopez RM, White JR, Truong L, Tanguay RL. Size- and Oxidation-Dependent Toxicity of Graphene Oxide Nanomaterials in Embryonic Zebrafish. *Nanomaterials*. 2022;12(7):1050. doi:10.3390/nano12071050.
59. Falinski MM, Garland MA, Hashmi SM, Tanguay RL, Zimmerman JB. Establishing Structure-Property-Hazard Relationships for Multi-Walled Carbon Nanotubes: The Role of Aggregation, Surface Charge, and Oxidative Stress on Embryonic Zebrafish Mortality. *Carbon*. 2019;155:587–600. doi:10.1016/j.carbon.2019.08.063.
60. Martinez CS, Igartúa DE, Czarnowski I, Feas DA, Alonso S del V, Prieto MJ. Biological Response and Developmental Toxicity of Zebrafish Embryo and Larvae Exposed to Multi-Walled Carbon Nanotubes with Different Dimension. *Heliyon*. 2019;5(8):e02308. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02308.
61. Zhu X, Zhu L, Li Y, Duan Z, Chen W, Alvarez PJJ. Developmental Toxicity in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos After Exposure to Manufactured Nanomaterials: Buckminsterfullerene Aggregates (nC60) and Fullerol. *Environ Toxicol Chem*. 2007;26(5):976–979. doi:10.1897/06-583.1.
62. Wang W, Zhao X, Ren X, Duan X. Antagonistic Effects of Multi-Walled Carbon Nanotubes and BDE-47 in Zebrafish (*Danio rerio*): Oxidative Stress, Apoptosis and DNA Damage. *Aquat Toxicol*. 2020;225:105546. doi:10.1016/j.aquatox.2020.105546.
63. Jurgelėnė Ž, Montvydienė D, Šemčuk S et al. The Impact of Co-Treatment with Graphene Oxide and Metal Mixture on *Salmo trutta* at Early Development Stages: The Sorption Capacity and Potential Toxicity. *Sci Total Environ*. 2022;838:156525. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.156525.
64. Sawosz E, Jaworski S, Kutwin M et al. Toxicity of Pristine Graphene in Experiments in a Chicken Embryo Model. *Int J Nanomedicine*. 2014;9(1):3913–3922. doi:10.2147/IJN.S65633.
65. Szmidt M, Sawosz E, Urbańska K et al. Toxicity of Different Forms of Graphene in a Chicken Embryo Model. *Environ Sci Pollut Res*. 2016;23(19):19940–19948. doi:10.1007/s11356-016-7178-z.
66. Kurantowicz N, Sawosz E, Halik G et al. Toxicity Studies of Six Types of Carbon Nanoparticles in a Chicken-Embryo Model. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:2887–2898. doi:10.2147/IJN.S131960.
67. Jaworski S, Hinzmann M, Sawosz E et al. Interaction of Different Forms of Graphene with Chicken Embryo Red Blood Cells. *Environ Sci Pollut Res*. 2017;24(27):21671–21679. doi:10.1007/s11356-017-9788-5.

68. Liu X, Zhang F, Wang Z, Zhang T, Teng C, Wang Z. Altered Gut Microbiome Accompanying with Placenta Barrier Dysfunction Programs Pregnant Complications in Mice Caused by Graphene Oxide. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021;207:111143. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111143.
69. Fujitani T, Ohyama KI, Hirose A, Nishimura T, Nakae D, Ogata A. Teratogenicity of Multi-Wall Carbon Nanotube (MWCNT) in ICR Mice. *J Toxicol Sci.* 2012;37(1):81–89. doi:10.2131/jts.37.81.
70. Fu C, Liu T, Li L, Liu H, Liang Q, Meng X. Effects of Graphene Oxide on the Development of Offspring Mice in Lactation Period. *Biomaterials.* 2015;40:23–31. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.11.014.
71. Cao Z, Su M, Wang H et al. Carboxyl Graphene Oxide Nanoparticles Induce Neurodevelopmental Defects and Locomotor Disorders in Zebrafish Larvae. *Chemosphere.* 2021;270:128611 . doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128611.

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	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 adhezivní 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