

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>.

12. Vliv dlouhodobého vystavení grafenu na viabilitu a motilitu A549 buněk (Ústav biologie a genetiky)

© Univerzita Karlova, 2025

© Ústav biologie a genetiky, 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/10.14712/9788024659848.12>

12 VLIV DLOUHODOBÉHO VYSTAVENÍ GRAFENU NA VIABILITU A MOTILITU A549 BUNĚK ZDRAVOTNÍCH SLUŽEB

Následující text představuje komentář ke studii Šestáková B, Schröterová L, Bezrouk A et al. The Effect of Chronic Exposure of Graphene Nanoplates on the Viability and Motility of A549 Cells. *Nanomaterials*. 2022;12(12):2074. <https://doi.org/10.3390/nano12122074>. Metodiky jsou podrobně popsány v příloze.

12.1 ÚVOD

Grafen a jeho deriváty patří mezi často využívané nanomateriály v mnoha technických oborech a v biomedicínských aplikacích.¹⁻³ Vzhledem k rozsahu výroby a distribuce lze předpokládat i jejich šíření a kumulaci ve složkách životního prostředí a s tím související potenciální chronickou expozici živých organismů.^{4,5}

Většina toxikologických dat o vlivu grafenu a jeho derivátů na organismus byla odvozena od výsledků akutních nebo subakutních forem expozic (jednorázové aplikace vyšších dávek). V praxi ovšem převažují expozice chronické (opakované aplikace nízkých dávek), jejichž toxický potenciál může mít od potenciálu vyvolaného akutními či subakutními formami expozic významně odlišný charakter.⁶⁻⁸ Z tohoto důvodu se prezentovaná studie zaměřila na biologickou odpověď buněčné linie A549 na chronickou expozici netoxické koncentrace grafenu.

12.2 CÍLE

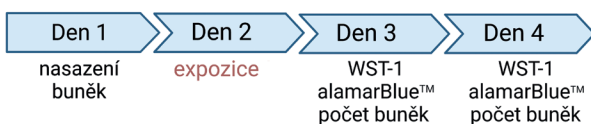
Cílem studie bylo porovnání biologické odpovědi buněk A549 (odvozených z plicního karcinomu) na akutní a chronickou (osmítýdenní) expozici grafenovým plátkům (GP). Byla sledována morfologie exponovaných buněk, akutní a chronická cytotoxicita, změny buněčného cyklu a buněčná migrace.

12.3 MATERIÁL A METODIKA

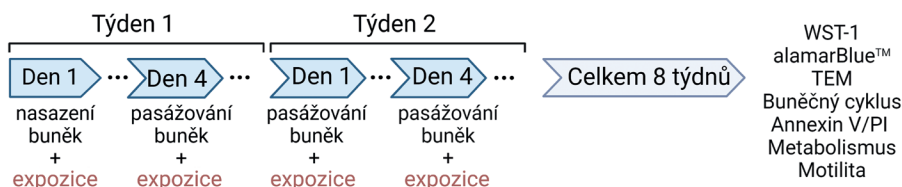
12.3.1 Expozice buněk GP

Buňky A549 (ATCC, cat. no. CCL-185) byly kultivovány v aMEM bez fenolové červeně s 10 % FSB, 1 % antibiotik (penicilinem, streptomycinem), 10 mM HEPES, 1 mM pyruvátu sodného a 2 mM L-glutaminu při 37 °C v atmosféře 5 % CO₂ (pasážování proběhlo dvakrát týdně). Buňky byly jednorázově (akutní toxicita) i opakovaně (chronická toxicita) exponovány GP o koncentracích 5, 15 a 30 µg GP / ml média (Obrázek 4).

Akutní toxicita



Chronická toxicita



Obrázek 4. Schéma expozice buněk A549

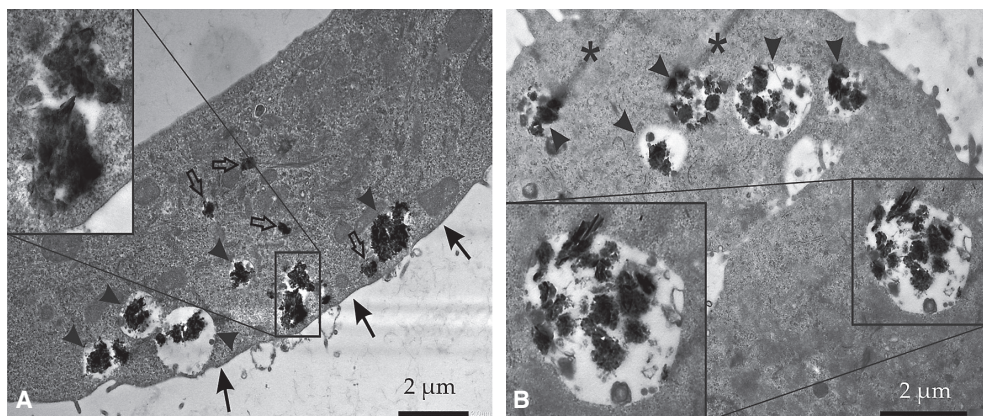
12.4 VÝSLEDKY

12.4.1 Morfologické změny exponovaných buněk

Analýza exponovaných buněk A549 pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) potvrdila internalizaci GP. Po akutní (jednorázové) expozici (Obrázek 5A) byly GP lokalizovány uvnitř buněk v blízkosti volného povrchu. Částice tvořily shluky, které byly umístěny v membránově vázaných vezikulách (viz šipky) nebo se nacházely volně v cytoplasmě (viz prázdné šipky). Po chronické (opakované) osmitýdenní expozici (Obrázek 5B) byly téměř všechny shluky GP lokalizovány uvnitř vezikul vázaných na membránu (viz šipky). Vezikuly dosahovaly větších rozměrů (než po akutní expozici) a vyskytovaly se v různých částech buněk. „Šmouhy“ na obrázku 2B (označeny hvězdičkami) vznikly pravděpodobně při přípravě preparátu (krájení). Měřítka A 2 µm (mag. 4000×), vložka (mag. 11 100×); B 2 µm (mag. 5000×), vložka (7400×).

12.4.2 Akutní cytotoxicita

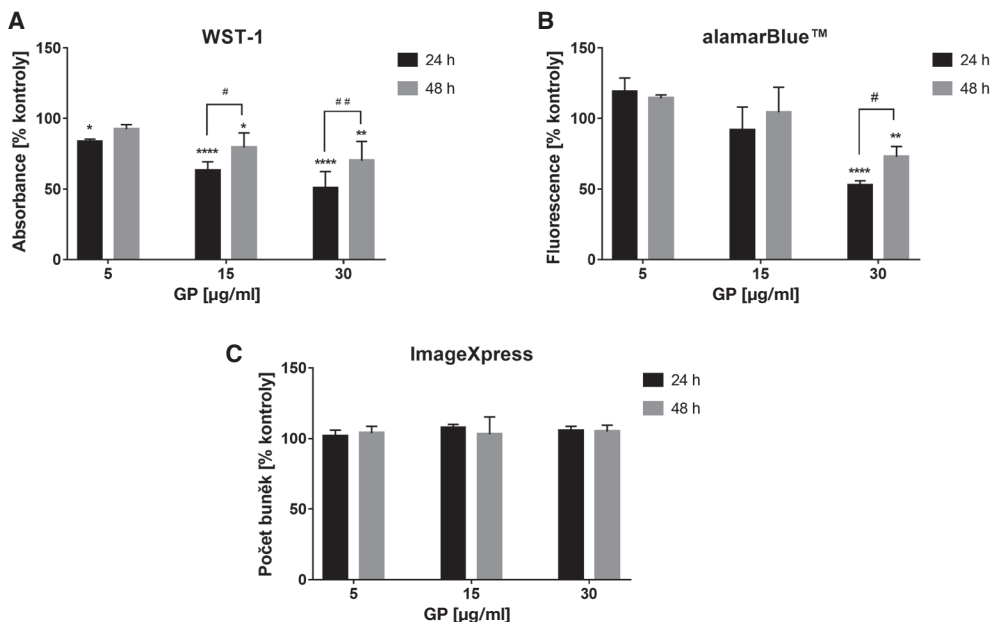
Akutní cytotoxicita GP vůči buňkám linie A549 (vliv na buněčnou viabilitu za 24 a 48 hodin) byla hodnocena pomocí testů WST-1 a alamarBlue™. Oba testy potvrdily významné



Obrázek 5. Transmisní elektronová mikroskopie buněk linie A549 po akutní (A) a chronické (B) expozici GP

snížení metabolické aktivity exponovaných buněk oproti kontrolám. Za povšimnutí stojí, že po 24hodinové expozici bylo snížení významnější (Obrázek 6).

Cytotoxický vliv expozice GP na linii A549 však nepodpořily výsledky stanovení počtu buněk po 24 a 48hodinové expozici GP (za použití ImageXpress Micro XLS systému). Test neprokázal pokles viability u žádné z expozičních koncentrací (Obrázek 6).

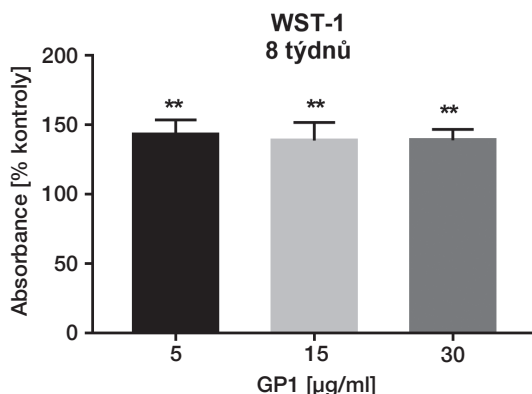


Obrázek 6. Akutní cytotoxicita GP vůči buňkám linie A549

Poznámka: Testy (A) WST-1, (B) AlamarBlue™, (C) počet buněk. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 mM) ± SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$. Statisticky významný rozdíl mezi dvěma inkubačními časy v rámci jedné koncentrace grafenu * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

12.4.3 Chronická cytotoxicita

Chronická cytotoxicita GP vůči buňkám linie A549 byla hodnocena pomocí testu metabolické aktivity WST-1. Po uplynutí expoziční doby (osm týdnů opakované expozice) se dávkově závislé rozdíly mezi použitými koncentracemi (5, 15 a 30 μg GP / ml média) postupně vyrovnaly a testy WST-1 ukázaly zhruba stejné (významné) snížení metabolické aktivity oproti kontrole (Obrázek 7). K určení viability chronicky exponovaných buněk byl použit Annexin V / Dead Cell Apoptosis Kit pro průtokovou cytometrii. Kumulace grafenu uvnitř buněk snižovala jejich viabilitu ve srovnání s kontrolou (Tabulka 1).



Obrázek 7. Chronická cytotoxicita GP vůči buňkám linie A549

Poznámka: Test WST-1. Data představují průměr vyjádřený jako procento kontroly (0 mM) \pm SD ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný pokles hodnot oproti kontrolám ** $p < 0,01$.

Tabulka 1. Chronická cytotoxicita GP vůči buňkám linie A549 (Annexin V / Dead Cell Apoptosis Kit)

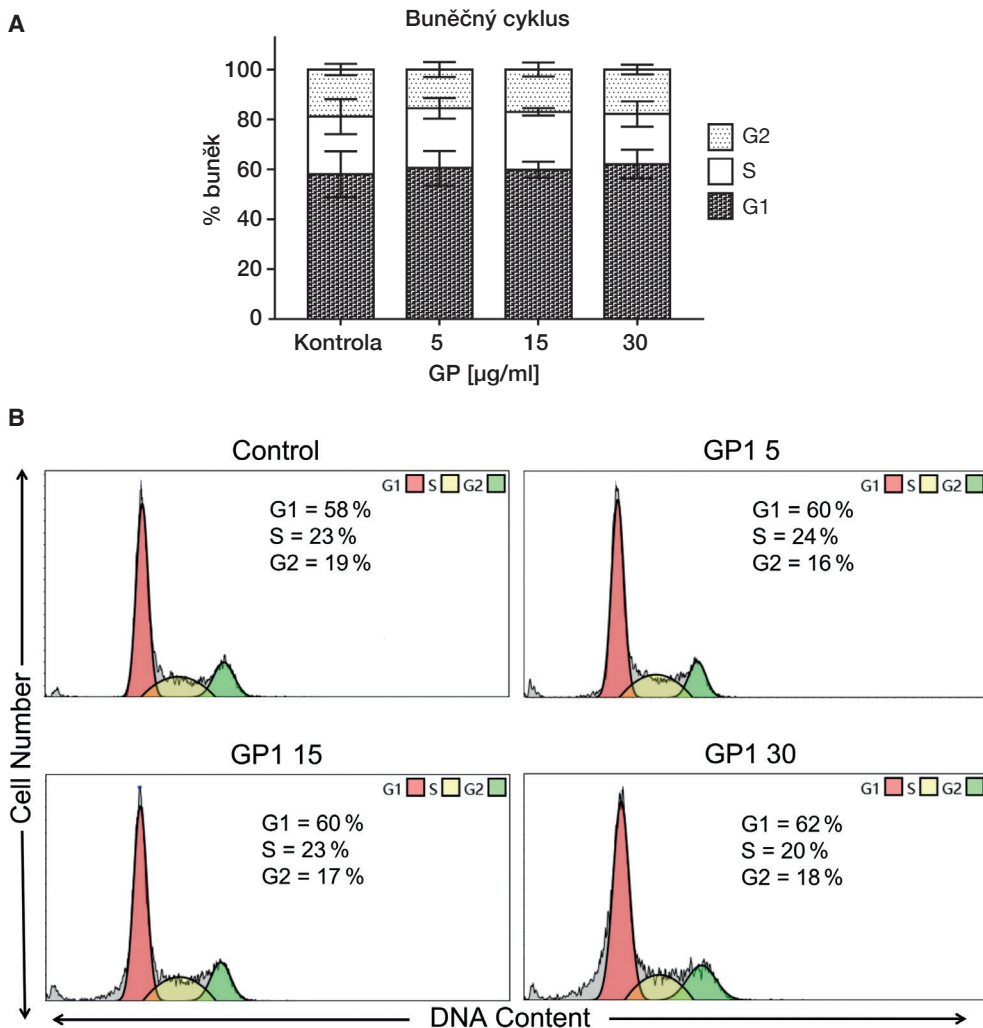
Expozice	Mrtvé buňky
Kontrola	0,97 \pm 0,20 %
GP (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	6,67 \pm 0,98 %
GP (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	7,55 \pm 0,10 %
GP (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	7,90 \pm 2,15 %

12.4.4 Analýza buněčného cyklu

Změny průběhu buněčného cyklu linie A549, chronicky exponované GP, byly sledovány pomocí průtokové cytometrie a značení DNA propidium jodidem. Testovány byly tři koncentrace GP (5, 15 a 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Zastoupení buněk (v procentech) se v jednotlivých fázích cyklu významně nelišilo od kontrol. Vlivem expozice grafenu tedy nedocházelo ke změnám v průběhu buněčného cyklu (expozice grafenu nezměnila rychlost dělení buněk; Obrázek 8).

12.4.5 Buněčná migrace

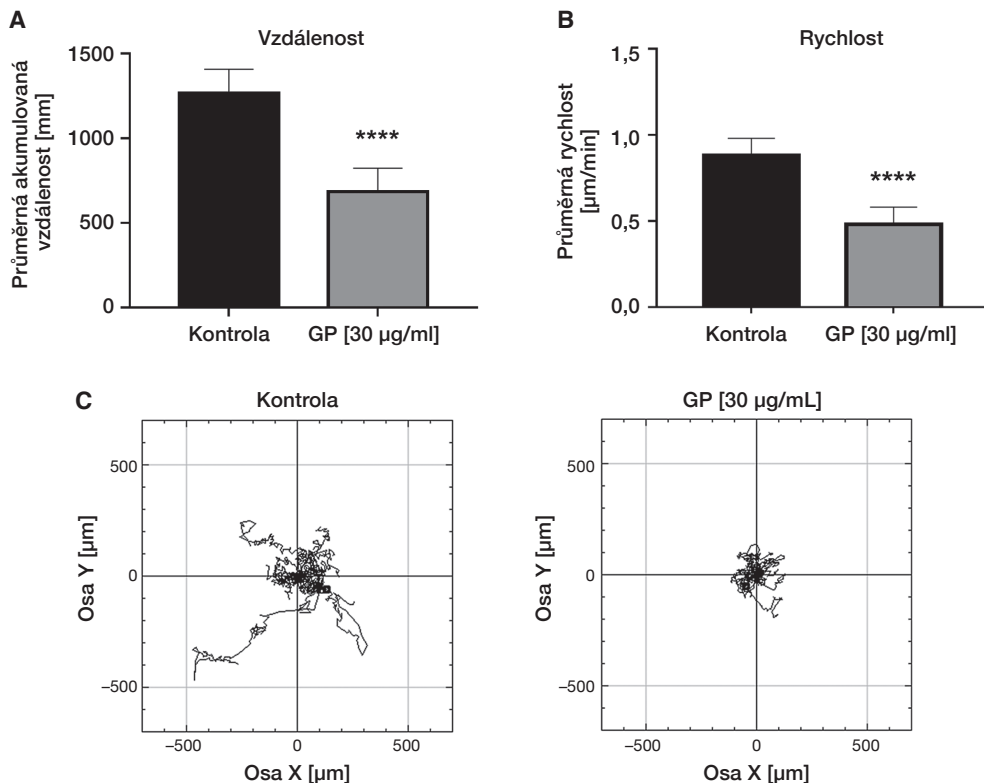
Důležitým ukazatelem expozice buněk xenobiotiky je změna jejich motility. Jak vyplynulo z 24hodinových sledování, buňky linie A549 exponované GP vykazovaly menší pohyblivost při hodnocení spontánní motility (Obrázek 9) i chemotaktické migrace (Obrázek 10) (ve srovnání s kontrolou). Je zajímavé, že u exponovaných buněk nedošlo ke změně energetického metabolismu, který by mohl snížení motility vysvětlovat.



Obrázek 8. Analýza změn cyklu buněk linie A549 chronicky exponovaných grafenem (GP, v přístroji popis GP1) v koncentracích 5, 15 a 30 mg/ml

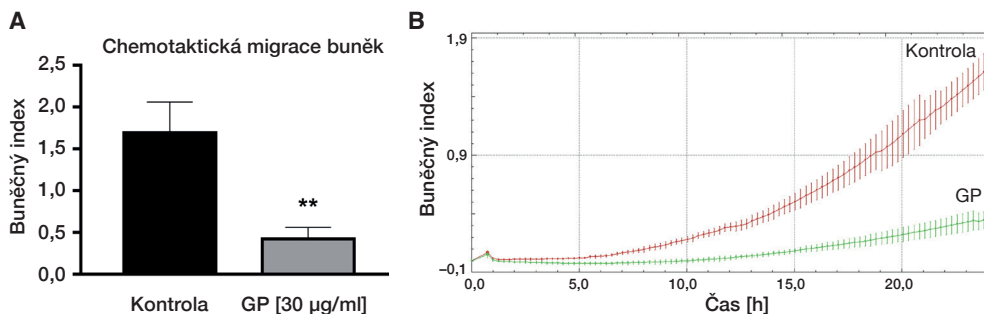
Poznámka: (A) Distribuce fází buněčného cyklu (průměr ± SD, n = 3). (B) Repräsentativní histogramy analýzy buněčného cyklu z jednoho ze tří nezávislých experimentů. G1 fáze červené píky, S-fáze žlutá plocha pod křivkou, G2 fáze zelené píky. Statistická významnost byla hodnocena Studentovým t-testem.

Spontánní pohyblivost buněk



Obrázky 9. Sledování spontánní motility buněk linie A549 exponovaných GP

Poznámka: (A) Průměrná akumulovaná vzdálenost a (B) průměrná rychlost buněk a kontrol exponovaných GP v průběhu 24 hodin. Statistická významnost byla hodnocena nepárovým t-testem. **** významně odlišné od kontrol, $p < 0,0001$. (C) Grafické znázornění spontánní buněčné motility.



Obrázek 10. Sledování chemotaktické migrace buněk linie A549 exponovaných GP

Poznámka: (A) Buněčný index (24hodinová migrace) kontrolních a exponovaných buněk. Statistická významnost byla hodnocena nepárovým t-testem. ** významně odlišné od kontrol, $p < 0,05$. (B) Reprezentativní migrační křivky kontrolních a exponovaných buněk ze tří nezávislých experimentů.

12.5 SHRnutí

V rámci uvedené studie byla hodnocena biologická odpověď buněk linie A549 (odvozených z plicního karcinomu) na akutní a chronickou (osmítýdenní) expozici GP. Testované buňky byly sledovány z pohledu morfologie (TEM), cytotoxicity (WST-1, alamarBlue™, Annexin V / Dead Cell Apoptosis), analýzy buněčného cyklu a spontánní motility a migrace.

Výsledky studie ukázaly, že akutní expozice GP (5, 15 a 30 µg/ml) významně snižovala metabolickou aktivitu buněk A549. Chronická expozice metabolické aktivity buněk A549 naopak zvyšovala. Docházelo ke kumulaci GP v různých částech buněk, nicméně přítomnost GP nevedla ke změnám proliferace ani ke změnám buněčného cyklu. Nebyly nalezeny ani zvýšené hladiny ukazatelů mitochondriálního stresu.

Významné snížení bylo zjištěno u spontánní buněčné pohyblivosti a u chemotaktické migrace. Spontánní motilita byla snížena na 54 % a chemotaktická migrace dokonce na 25 % (ve srovnání s kontrolou).

Vzhledem k tomu, že buněčná motilita je klíčovou složkou životně důležitých biologických procesů, přítomnost buněk s kumulovanými GP by mohla vážně narušovat regeneraci tkání.

12.6 LITERATURA

1. Sang M, Shin J, Kim K, Yu KJ. Electronic and Thermal Properties of Graphene and Recent Advances in Graphene-Based Electronics Applications. *Nanomaterials*. 2019;9(3):374. doi:10.3390/nano9030374.
2. Mahmoudi T, Wang Y, Hahn YB. Graphene and Its Derivatives for Solar Cells Application. *Nano Energy*. 2018;47:51–65. doi:10.1016/j.nanoen.2018.02.047.
3. Yang K, Feng L, Shi X, Liu Z. Nano-Graphene in Biomedicine: Theranostic Applications. *Chem Soc Rev*. 2013;42(2):530–547. doi:10.1039/c2cs35342c.
4. Pikula K, Johari SA, Golokhvast K. Colloidal Behavior and Biodegradation of Engineered Carbon-Based Nanomaterials in Aquatic Environment. *Nanomaterials*. 2022;12(23):4149. doi:10.3390/nano12234149.
5. Pelin M, Sosa S, Prato M, Tubaro A. Occupational Exposure to Graphene-Based Nanomaterials: Risk Assessment. *Nanoscale*. 2018;10(34):15894–15903. doi:10.1039/c8nr04950e.
6. Kan Z, Zhao KX, Jiang C et al. Respiratory Exposure to Graphene Oxide Induces Pulmonary Fibrosis and Organ Damages in Rats Involving Caspase-1/p38MAPK/TGF-β1 Signaling Pathways. *Chemosphere*. 2022;303:135181. doi:10.1016/j.chemosphere.2022.135181.
7. Falagan-Lotsch P, Grzincic EM, Murphy CJ. One Low-Dose Exposure of Gold Nanoparticles Induces Long-Term Changes in Human Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(47):13318–13323. doi:10.1073/pnas.1616400113.
8. Mohammadinejad R, Moosavi MA, Tavakol S et al. Necrotic, Apoptotic and Autophagic Cell Fates Triggered by Nanoparticles. *Autophagy*. 2019;15(1):4–33. doi:10.1080/15548627.2018.1509171.

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

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