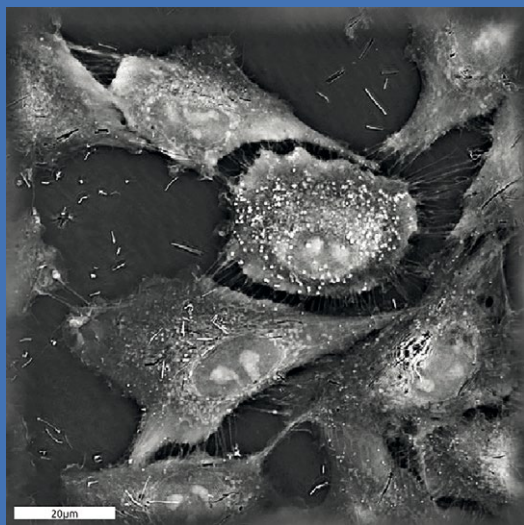
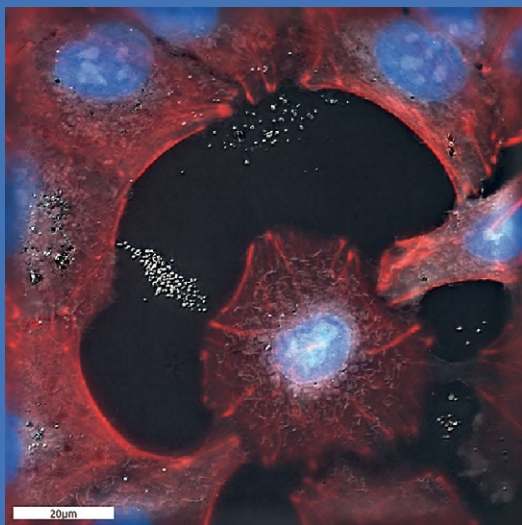


UHLÍKOVÉ NANOMATERIÁLY

Biomedicínské aplikace a toxicita



Zdeněk Fiala
Drahomíra Holmannová
editoři

Uhlíkové nanomateriály

Biomedicínské aplikace a toxicita

Zdeněk Fiala
Drahomíra Holmannová
editoři

Recenzovali:

prof. MUDr. Jiří Kassa, CSc. (Katedra toxikologie a vojenské farmacie,
Vojenská lékařská fakulta Univerzity obrany)

prof. MUDr. Milan Tuček, CSc. (Ústav hygieny a epidemiologie,
1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze)

Tato publikace byla připravena v roce 2023 v návaznosti na výstupy projektu NANOBIO (Posilování mezioborové spolupráce ve výzkumu nanomateriálů a při studiu jejich účinků na živé organismy, reg. č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007421, s finanční podporou EFRR). Vydání publikace bylo finančně podpořeno z programu Univerzity Karlovy „Cooperatio“, vědní oblasti HEAS (Zdravotnické vědy, Health Sciences).

Vydala Univerzita Karlova
Nakladatelství Karolinum
Praha 2025
Redakce Jakub Fráňa
Sazba DTP Nakladatelství Karolinum
Vydání první

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.

© Univerzita Karlova, 2025
© Zdeněk Fiala, Drahomíra Holmannová et al, 2025

ISBN 978-80-246-5954-1
ISBN 978-80-246-5984-8 (pdf)

<https://doi.org/10.14712/9788024659848>



Univerzita Karlova
Nakladatelství Karolinum

www.karolinum.cz
ebooks@karolinum.cz

Autorský kolektiv

Editoři:

Zdeněk Fiala a Drahomíra Holmannová (Ústav preventivního lékařství, Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové)

Autoři:

Zdeněk Fiala (Ústav preventivního lékařství, Lékařská fakulta v Hradci Králové)

Drahomíra Holmannová (Ústav preventivního lékařství, Lékařská fakulta v Hradci Králové)

Tereza Švadláková (Ústav klinické imunologie a alergologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové)

Michaela Hanzlová (Ústav preventivního lékařství, Lékařská fakulta v Hradci Králové)

Ctirad Andrýs (Ústav klinické imunologie a alergologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové)

Hana Bavorová (Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové)

Aleš Bezrouk (Ústav lékařské biofyziky, Lékařská fakulta v Hradci Králové)

Lenka Borská (Ústav preventivního lékařství, Lékařská fakulta v Hradci Králové)

Pavel Borský (Ústav preventivního lékařství, Lékařská fakulta v Hradci Králové)

Andrea Rybová (Ústav preventivního lékařství, Lékařská fakulta v Hradci Králové)

Dana Čížková (Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové)

Martina Koláčková (Ústav klinické imunologie a alergologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové)

Věra Králová (Ústav lékařské biologie a genetiky, Lékařská fakulta v Hradci Králové)

Jan Krejsek (Ústav klinické imunologie a alergologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové)

Jaroslav Mokrý (Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové)

Rishikaysh Pisal (Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové)

Emil Rudolf (Ústav lékařské biologie a genetiky, Lékařská fakulta v Hradci Králové)

Ladislava Schröterová (Ústav lékařské biologie a genetiky, Lékařská fakulta v Hradci Králové)

Blanka Šestáková (Ústav lékařské biologie a genetiky, Lékařská fakulta v Hradci Králové)

Jindra Šmejkalová (Ústav preventivního lékařství, Lékařská fakulta v Hradci Králové)

OBSAH

Předmluva předsedy Společnosti hygieny a komunitní medicíny ČLS JEP	11
Předmluva děkana Lékařské fakulty v Hradci Králové	13
Předmluva editorů	14
Úvod (Zdeněk Fiala, Drahomíra Holmannová)	16
Literatura	18
TEORETICKÁ ČÁST	21
1. Biomedicinské využití uhlíkových nanomateriálů (Zdeněk Fiala, Drahomíra Holmannová)	23
1.1 Diagnostika s využitím nanočástic	23
1.2 Ochrana proti RTG záření	27
1.3 Léčba s využitím uhlíkových nanočástic	28
1.4 Stenty a biokompatibilní uhlíkové nanomateriály v ortopedii, kardiologii a stomatologii	33
1.5 Scaffolds, regenerační medicína	34
1.6 Závěr	37
1.7 Literatura	37
2. Tokikokinetika a biologické interakce uhlíkových nanomateriálů (Zdeněk Fiala, Drahomíra Holmannová)	46
2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti	46
2.2 Aplikační (expoziční) cesty a distribuce v organismu	47
2.3 Prostup do intracelulárního prostředí a mechanismy buněčné toxicity	48
2.4 Závěr	49
2.5 Literatura	49
3. Respirační toxicita (Zdeněk Fiala, Drahomíra Holmannová)	52
3.1 <i>In vitro</i> studie	53
3.2 <i>In vivo</i> studie	55
3.3 Pracovní expozice	59
3.4 Závěr	60
3.5 Literatura	60
4. Kardiovaskulární toxicita (Zdeněk Fiala, Drahomíra Holmannová)	64
4.1 <i>In vitro</i> studie	64
4.2 <i>In vivo</i> studie	68
4.3 Pracovní expozice	70
4.4 Závěr	71
4.5 Literatura	71

5. Gastrointestinální toxicita a hepatotoxicita (Zdeněk Fiala, Drahomíra Holmannová)	74
5.1 <i>In vitro</i> studie	75
5.2 <i>In vivo</i> studie	78
5.3 Závěr	81
5.4 Literatura	81
6. Kožní a oční toxicita (Zdeněk Fiala, Drahomíra Holmannová)	85
6.1 <i>In vitro</i> studie	86
6.2 <i>In vivo</i> studie	89
6.3 Závěr	90
6.4 Literatura	91
7. Toxicita vůči močovému ústrojí (Zdeněk Fiala, Drahomíra Holmannová)	94
7.1 <i>In vitro</i> studie	94
7.2 <i>In vivo</i> studie	95
7.3 Závěr	97
7.4 Literatura	97
8. Neurotoxicita (Zdeněk Fiala, Drahomíra Holmannová)	99
8.1 <i>In vitro</i> studie	99
8.2 <i>In vivo</i> studie	102
8.3 Závěr	104
8.4 Literatura	105
9. Imunotoxicita (Tereza Švadláková, Ctirad Andrys)	108
9.1 Rozpoznání CNM složkami imunitního systému	108
9.2 Zánět	111
9.3 Imunomodulace	112
9.4 Eliminace	116
9.5 Závěr	116
9.6 Literatura	117
10. Genotoxicita (Andrea Rybová)	123
10.1 <i>In vitro</i> studie	124
10.2 <i>In vivo</i> studie	127
10.3 Závěr	129
10.4 Literatura	129
11. Reprodukční a vývojová toxicita (Drahomíra Holmannová)	133
11.1 <i>In vitro</i> studie	133
11.2 <i>In vivo</i> studie	136
11.3 Vývojová toxicita	139
11.4 Závěr	143
11.5 Literatura	144
PRAKTICKÁ ČÁST	149
12. Vliv dlouhodobého vystavení grafenu na viabilitu a motilitu A549 buněk (Ústav biologie a genetiky)	151
12.1 Úvod	151
12.2 Cíle	151
12.3 Materiál a metodika	152
12.4 Výsledky	152
12.5 Shrnutí	157
12.6 Literatura	157

13. Cytotoxický efekt grafenu závislý na dávce a času v pokusech <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> (PAEC buňky, C57Bl/6 myši) (Ústav histologie a embryologie)	158
13.1 Úvod	158
13.2 Cíle	158
13.3 Materiál a metodika	159
13.4 Výsledky	160
13.5 Shrnutí	163
13.6 Literatura	163
14. Vliv uhlíkových nanomateriálů na aktivitu imunitních buněk (lidské THP-1, lidské monocyty z periferní krve) (Ústav klinické alergologie a imunologie)	164
14.1 Úvod	164
14.2 Cíle	165
14.3 Materiál a metodika	165
14.4 Výsledky	166
14.5 Shrnutí	171
14.6 Literatura	172
15. Genotoxický potenciál grafenu v pokusech <i>in vitro</i> (THP-1 buňky) (Ústav preventivního lékařství)	173
15.1 Úvod	173
15.2 Cíle	173
15.3 Materiál a metodiky	174
15.4 Výsledky a diskuse	175
15.5 Shrnutí	178
15.6 Literatura	178
PŘÍLOHA: SOUBOR OPTIMALIZOVANÝCH METODIK PRO TESTOVÁNÍ CYTOTOXICITY, GENOTOXICITY A IMUNOTOXICITY NANOČÁSTIC	181
Metodiky Ústavu lékařské biologie a genetiky (Lékařská fakulta v Hradci Králové) (Věra Králová, Emil Rudolf, Ladislava Schröterová, Blanka Šestáková)	182
Test metabolické aktivity alamarBlue (test cytotoxicity)	182
Test záchytu neutrální červeně (<i>Neutral Red Uptake</i> – NRU; test cytotoxicity)	184
Počítání buněk pomocí obrazového cytometru metodou barvení jader DAPI (test cytotoxicity)	186
Dlouhodobé sledování buněčné proliferace pomocí kumulovaného počtu populačních zdvojení (test cytotoxicity)	188
Stanovení PDL u linie normálních dermálních fibroblastů během chronické expozice grafenovým nanočásticím	189
Test metabolické aktivity WST-1 (test cytotoxicity)	191
Literatura	194
Metodiky Ústavu histologie a embryologie ve spolupráci s Ústavem lékařské biofyziky (Lékařská fakulta v Hradci Králové) (Hana Bavorová, Aleš Bezrouk, Dana Čížková, Jaroslav Mokřý, Rishikaysh Písal)	196
LDH test (test cytotoxicity)	196
MTT test (test cytotoxicity)	198
Genová kvantifikace prostřednictvím RT-qPCR (Real-time qPCR)	199
xCELLigence (buněčná proliferace, adheze, viabilita, morfologie)	201
Histologická analýza	202
Transmisní elektronová mikroskopie	205
Literatura	208

**Metodiky Ústavu klinické imunologie a alergologie (ÚKIA, Fakultní nemocnice Hradec Králové)
ve spolupráci s Výzkumným ústavem veterinárního lékařství, v. v. i. (VÚVeL)**

(Ctirad Andrýs, Martina Koláčková, Jan Krejsek, Tereza Švadláková /ÚKIA/; František Hubatka,

Jaroslav Turánek, Pavlína Turánek Knötigová /VÚVeL/) 209

Příprava suspenze nanomateriálů pro testování imunotoxicity 209

Testování biologické kontaminace suspenzí NM 212

Hodnocení aktivace NLRP3 219

Výsledek hodnocení kanonické aktivace NLRP3 220

Hodnocení viability 221

Literatura 221

Metodiky Ústavu preventivního lékařství (Lékařská fakulta Hradec Králové)

(Zdeněk Fiala, Andrea Rybová, Jindra Šmejkalová, Martina Zemanová) 222

Mikronukleus test (test genotoxicity a cytotoxicity) 222

Kometový test (test genotoxicity) 226

Test chromozomálních aberací (test genotoxicity) 229

Literatura 232

Zkratky 235

Summary 238

PŘEDMLUVA PŘEDSEDY SPOLEČNOSTI HYGIENY A KOMUNITNÍ MEDICÍNY ČLS JEP

Oboru hygiena přináší každá doba nové problémy a výzvy. V minulosti se jednalo primárně o boj s infekčními nemocemi, o zlepšení nutričního stavu populace (podvýživa, nedostatek vitamínů a stopových prvků) a o zajištění zásobování nezávadnou pitnou vodou. V současnosti se objevují zdravotní hrozby v podobě nových nebo znovu se objevujících infekcí, klimatických změn či bioterorismu. Je nutné neprodleně reagovat na demografický vývoj populace, řešit zdravotní dopady migrace, zabývat se prevencí chronických neinfekčních onemocnění a v neposlední řadě věnovat pozornost zdravotním účinkům nových látek, materiálů a technologií.

K poslední uvedené nás vede i historická zkušenost. Učebnicovým příkladem je problematika rentgenového záření. Nikdo nepochybuje, že se jednalo o obrovský objev a Wilhelm Conrad Röntgen za něj právem získal první Nobelovu cenu za fyziku. Objev byl učiněn a publikován v roce 1895 a okamžitě vyvolal obrovský ohlas nejen v odborných kruzích. V krátké době došlo k masivnímu využívání technologie paprsků X. V českých zemích první rentgenový přístroj pořídil pro pobavení hostů majitel vyhlášeného hotelu U Černého koně v Praze, pro medicínské účely byl zakoupen následně zásluhou prof. Rudolfa Jedličky, který se tak stal zakladatelem české radiologie. Postupně se však ukázalo, že každá mince má dvě strany. Během následujících desetiletí významně narostl počet případů radiodermatitidy a onkologických onemocnění u lékařů, kteří byli záření exponováni. Samotnému profesoru Jedličkovi bylo amputováno několik prstů. Obětem průkopnické fáze radiologie je dokonce věnován památník v Hamburku. Dodatečně se pak začaly řešit možnosti ochrany zdraví lékařů, zdravotníků i pacientů.

Další příklad může uvést sám autor předmluvy z oblasti svého odborného zájmu. Ztužování tuků prostřednictvím parciální katalytické hydrogenace olejů bylo vyvinuto na počátku dvacátého století. Metoda dosáhla masivního rozšíření a margaríny, které obsahovaly takto ztužené tuky, byly dokonce prezentovány jako zdravější náhrada másla. Teprve v osmdesátých letech se začaly objevovat studie prokazující nepříznivý účinek transizomerů mastných kyselin, které při použití zmíněné technologie vznikají. Trvalo ještě víc jak třicet let, než se na úrovni EU přikročilo k jejich regulaci v potravinách. Podobných příkladů můžeme nalézt v naší historii mnoho. Patří k nim například výroba některých insekticidů, herbicidů, polychlorovaných bifenylnů či bromovaných retardérů hoření. Jejich používání bylo sice po určité době ze zdravotních důvodů zastaveno, nicméně jejich zbytky v prostředí a v potravních řetězcích stále ještě přetrvávají.

Hygienik bude samozřejmě vždy o krůček pozadu za realitou. Nelze dost dobře hodnotit rizika něčeho, co ještě nebylo náležitě prostudováno. Je velmi obtížné predikovat účinky, které se mohou projevit až s odstupem let, a navíc v kontextu s dalšími faktory působícími na člověka. Proto je důležité, aby ruku v ruce s vývojem a využíváním nových látek, materiálů a technologií bylo od počátku realizováno hodnocení potenciálních zdravotních rizik, které následně umožní odpovídající regulační kroky. Neodmyslitelnou součástí tohoto procesu je shromažďování objektivních informací o úrovních nebezpečnosti nově vznikajících agens.

Z výše uvedených důvodů proto velmi vítám monografii *Uhlíkové nanomateriály. Biomedicínské aplikace a toxicita*. Nanomateriály nacházejí pro své vlastnosti široké uplatnění v nejrůznějších oblastech včetně biomedicíny. Studium jejich účinků na organismus a hodnocení jejich potenciální nebezpečnosti je proto mimořádně důležité. Monografie podává detailní přehled využití nanomateriálů v medicíně, věnuje se jejich zdravotním rizikům vzhledem k současnému stavu poznání a nastiňuje potřebné směry výzkumu v této oblasti. Kromě rozsáhlé teoretické části, která vychází z dostupných literárních pramenů a čtivou formou prezentuje recentní poznatky, obsahuje monografie i komentované výsledky autorského týmu, který se problematikou dlouhodobě a systematicky zabývá.

doc. MUDr. Pavel Dlouhý, Ph.D.
přednosta Ústavu hygieny 3. LF UK
předseda Společnosti hygieny a komunitní medicíny ČLS JEP

PŘEDMLUVA DĚKANA LÉKAŘSKÉ FAKULTY V HRADCI KRÁLOVÉ

Vydáním monografie *Uhlíkové nanomateriály. Biomedicínské aplikace a toxicita* autorského kolektivu z pracovišť Lékařské fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové, pod vedením prof. Ing. Zdeňka Fialy, CSc., a MUDr. Drahomíry Holmannové, Ph.D., se široké veřejnosti předkládá ucelené dílo zabývající se aktuálním tématem použití nanomateriálů v medicíně a příbuzných biomedicínských oborech.

Výzkum nanomateriálů patří dnes k dynamicky se rozvíjejícím vědním oblastem, jež nabízejí široké spektrum možností využití v řadě odvětví. Úplný rozsah aplikace však zatím pochopitelně nemůže být znám, nicméně dosavadní poznatky a výsledky výzkumu jsou z tohoto pohledu opravdu optimistické.

V této knize jsou detailně popsány základní dosud známé uhlíkové nanomateriály, jejich struktura, složení a charakteristické vlastnosti, včetně možnosti využití v biomedicině. Současně jsou však také pojednány jejich nežádoucí účinky a rizika s nimi spojená, především jejich toxicita, s možnými následky pro lidský organismus.

Knihou staví na výsledcích rozsáhlého výzkumu projektu NanoBio, do kterého byla zapojena řada specializovaných pracovišť nejen u nás, ale i v zahraničí. Veřejnosti se tak dostává do rukou ucelená, precizně propracovaná monografie, která přináší nejnovější poznatky v dané problematice.

prof. MUDr. Jiří Mand'ák, Ph.D.

PŘEDMLUVA EDITORŮ

Nanomateriály bezesporu představují fascinující fenomén naší doby. Hlavním důvodem jejich velké popularity jsou unikátní fyzikální a chemické vlastnosti, kterými se významně odlišují od charakteru stejných chemických látek v makroměřítku. Nanomateriály se svými rozměry (a z nich vyplývajícími vlastnostmi) nacházejí v oblastech mezi makrolátkou, pro kterou platí klasické zákony fyziky, a atomárními nebo molekulárními stavy, pro které platí fyzika kvantová. Uhlíkové nanomateriály našly široké uplatnění v řadě výrobních odvětví, včetně elektroniky, zemědělství, potravinářství, kosmetiky, farmacie a lékařství. Nicméně, jako každý jiný výsledek lidské aktivity, mohou i ony za jistých okolností představovat zdroj nepříznivých zdravotních dopadů.

Velmi malé rozměry uhlíkových nanomateriálů (nanočástic) umožňují jejich rychlou absorpci a distribuci prakticky do všech tělních orgánů a tkání, kde ovlivňují základní biochemické a fyziologické mechanismy. Tak se stávají potenciálním rizikem pro zdraví člověka.

Úroveň našich vědomostí v oblasti hodnocení zdravotních rizik uhlíkových nanomateriálů je zatím omezená a neodpovídá dynamice nanomateriálového vývoje a výroby. Značnými komplikacemi jsou přitom specifické vlastnosti uhlíkových nanomateriálů a variabilita jejich chování ve tkáních živých organismů. To snižuje validitu standardně používaných testů toxicity a akcentuje nutnost jejich optimalizace (modifikace) a vývoj testů nových.

Z uvedených důvodů se kolegové z Lékařské fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy, Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice, Centra materiálů a nanotechnologií (CEMNAT) Univerzity Pardubice a Fakultní nemocnice Hradec Králové rozhodli pro realizaci široké mezioborové spolupráce ve výzkumu biologických interakcí nanomateriálů s živými organismy. Výsledkem jejich snah byl čtyřletý projekt NanoBio (projekt ERDF; OP VVV), ve kterém se sešli toxikologové, materiáloví inženýři, fyziologové, biologové, chemici, lékaři a experti na buněčnou mikrobiologii a mikroskopické techniky. Velmi důležitá byla projektová spolupráce s partnery z Trinity Translational Medicine Institute na Trinity College v Dublinu (prof. Yuri Volkov a Adriele Prina-Mello, Ph.D.) a z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v. v. i., v Brně (skupina prof. RNDr. Jaroslava Turánka, DSc.).

Vybraná pracoviště Lékařské fakulty v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové se dlouhodobě zabývají hodnocením nebezpečnosti chemických látek (Ústav preventivního lékařství, Ústav lékařské biologie a genetiky, Ústav histologie a embryologie, Ústav lékařské biofyziky a Ústav klinické imunologie a alergologie). V projektu NanoBio byla jejich aktivita orientována na hodnocení nebezpečnosti vybraných nanomateriálů, mezi nimiž dominovaly nanomateriály na bázi uhlíku.

Předkládaná kniha je rozdělena na dvě části. V části teoretické jsou sumarizovány autorům dostupné informace o biomedicinském využití uhlíkových nanomateriálů, o jejich toxikokinetice a biologických interakcích a o jejich potenciální nebezpečnosti (toxicitě). Praktickou (výzkumnou) část tvoří soubor optimalizovaných metodik pro testování cytotoxicity, genotoxicity a imunotoxicity nanočástic s uvedením nejvýznamnějších výsledků projektu NanoBio.

Závěrem považujeme za nutné zdůraznit skutečnost, že navzdory úspěchům na poli výzkumu charakteru biologických interakcí nanostruktur s živými organismy je úroveň našich vědomostí zatím stále ještě limitovaná. S ohledem na neustále se rozšiřující míru kontaktů člověka s těmito materiály je proto nezbytné analogicky rozšiřovat prostor pro studium patofyziologických mechanismů, jakými mohou nanomateriály organismus ovlivňovat. Pozornost by přitom měla být soustředěna především na zdravotní důsledky expozic chronických (dlouhodobě opakovaných expozic nízkým dávkám). Zároveň je ale nutné si uvědomit, že zdravotní hledisko (ve smyslu hodnocení úrovně rizika) je pouze jednou ze čtyř obecných součástí systému rozhodování o akceptování lidské aktivity s ohledem na její výsledky (výrobku, stavby a technologie), ve kterém neméně důležitou roli hrají i hlediska ekonomická, sociální a politická. A mezi všemi těmito hledisky je nutné hledat všeobecně přijatelný konsenzus.

Zdeněk Fiala a Drahomíra Holmannová

ÚVOD

Uhlík je jedním z nejběžnějších a nejdůležitějších prvků našeho „vesmírného prostoru“. Je základní složkou makromolekul nepostradatelných pro život, jakými jsou proteiny, lipidy, nukleové kyseliny a sacharidy. Uhlík vykazuje jedinečné chemicko-fyzikální vlastnosti, které jsou dále umocňovány u jeho nanomateriálových forem.^{1,2}

V souvislosti s uhlíkem i s výzkumem, jehož výsledky zde prezentujeme, považujeme za vhodné hned v úvodu připomenout jeho alotropii, vlastnost některých chemických prvků, která znamená schopnost daného prvku vyskytovat se v několika různých strukturních formách, jež mohou mít výrazně odlišné chemicko-fyzikální vlastnosti.³ Nejznámějšími přírodními alotropy krystalického uhlíku jsou diamanty a grafit, amorfni uhlíkové alotropy představuje uhlí, dřevěné uhlí a lampová čerň. Uhlíkové nanomateriály (CNM) byly prvně popsány v osmdesátých letech dvacátého století a ve velmi krátké době dokázaly vytvořit široké spektrum uhlíkových individualit zahrnující amorfni uhlíkové nanočástice (ultrajemné uhlíkové částice, uhlíkové nanočástice a uhlíkové tečky), uhlíkové nanomateriály s hybridizací sp^2 (fullereny, uhlíkové nanotrubic, uhlíkové „nanohorns“, grafeny a kvantové tečky grafenu) a nanodiamanty.^{4,5}

CNM jsou tvořeny čistým uhlíkem. Mají značnou stabilitu, vysokou elektrickou a tepelnou vodivost, mimořádné mechanické vlastnosti a vysokou biokompatibilitu s nízkou toxicitou. Díky hybridizaci sp^2 jsou vysoce hydrofobní. Mezi nejvýznamnější CNM patří grafit, oxid grafenu, redukovaný oxid grafenu, uhlíkové nanotrubic, fullereny, nanodiamanty a grafenové kvantové tečky.⁶

Grafen je dvojrozměrný materiál, monovrstva, kde jsou atomy uhlíku uspořádány ve voštinové mřížkové struktuře. Grafen má extrémně velký povrch, vysokou stabilitu a vysokou tepelnou a elektrickou vodivost. Je pružný, elastický, ale zároveň tvrdý a odolný. Je strukturní bází dalších uhlíkových alotropů (grafenoidů), včetně „nanoringů“, jednostěnných, dvoustěnných a víceštěnných nanotubic, grafitu, uhlíkových vláken a grafynu.^{7,8} Mezi klíčové technologie výroby grafenu jsou řazeny chemická nebo plazmová exfoliace surového grafitu, mechanické štěpení z přírodního grafitu, chemická depozice par a epitaxní růst grafenu na křemíkové ploše karbidu křemíku. Grafen je možné připravit z derivátů grafenu cestou rozpojování uhlíkových nanotubic nebo odpařováním fullerenu.⁹

Nejčastěji používané deriváty grafenu, **oxid grafenu (GO)** a **redukovaný GO (rGO)** lze připravit oxidací grafenu, respektive redukcí GO. Jako oxidační činidla bývají používána protonovaná rozpouštědla (kyselina dusičná, sírová, fosforečná nebo jejich směsi) a manganistan draselný. Proces vede k navázání karboxylových, hydroxylových a epoxidových skupin na

povrch grafenu a k modifikaci jeho vlastností. Příprava rGO zahrnuje chemickou, tepelnou nebo fototepelnou redukci GO (odstranění kyslíkových funkčních skupin).^{10,11} Nicméně ani intenzivní redukční reakce neodstraní všechny kyslíkové skupiny a nepřevéde GO kompletně na grafen. Hlavní funkční rozdíly mezi GO a rGO jsou v elektrické vodivosti. GO vykazuje nižší elektrickou vodivost a nižší mechanickou pevnost ve srovnání s rGO či grafenem.^{11,12}

Uhlíkové nanotrubic (CNT) jsou grafenové listy svinuté do válcového tvaru. Jsou klasifikovány na základě počtu stěn (jednostěnné, dvoustěnné nebo víceštěnné). Stejně jako grafen vykazují CNT vysokou elektrickou a tepelnou vodivost, pevnost a elasticitu a velký povrch, který lze snadno funkcionalizovat.¹³

Fullereny (buckyballs) jsou třídou uhlíkových alotropů kulovitého nebo elipsoidního tvaru. Jejich velikost odpovídá počtu uhlíků (například C_{60} , C_{70} nebo C_{80}). Nejběžnější fullerenová struktura C_{60} je molekula, která se skládá z 60 atomů uhlíku uspořádaných jako dvacet pravidelných šestiúhelníků a dvanáct pravidelných pětiúhelníků. Fullereny jsou rozpustné v organických rozpouštědlech (zejména C_{60} a C_{70}) a jsou snadno funkcionalizovatelné.¹⁴ Fullereny jsou skvělé antioxidanty a jejich antioxidační kapacitu lze zvýšit funkcionalizací hydroxylovými skupinami.^{15,16}

Mezi nejčastější metody syntézy CNT jsou řazeny chemická depozice z plynné fáze (CVD), obloukový výboj a pulzní laserová ablace. CVD je prováděna pomocí prekurzorových plynů obsahujících uhlík, jako je například CO_2 (oxid uhličitý), C_2H_2 (acetylen) nebo C_2H_4 (ethylen). Teplota při CVD se pohybuje kolem 350–1000 °C. Růst CNT ovlivňuje řada parametrů, mezi které patří reakční doba, teplota, velikost částic katalyzátoru nebo typ/rychlost reakčního plynu.^{13,17} Metoda obloukového výboje umožňuje přípravu CNT a fullerenu. Stejnoseměrné napětí oblouku je aplikováno přes grafitové elektrody ponořené do inertního plynu (helia). Na katodě vznikají víceštěnné CNT, fullereny se ukládají jako saze uvnitř komory. Pulzní laserová ablace grafitu představuje rychlou a levnou metodu přípravy, nevyžaduje použití katalyzátoru nebo vakua a poskytuje vysoce čisté produkty požadované velikosti a morfologie.^{17,18}

Nanodiamanty se skládají z diamantového jádra (sp^3 vázané atomy uhlíku) a amorfních uhlíkových vrstev (sp^2 vrstvy) pokrývajících jádro. Nanodiamanty jsou chemicky inertní, mají vysokou tvrdost, optickou průhlednost a vysokou tepelnou vodivost. Povrch nanodiamantů je možné funkcionalizovat skupinami hydroxylovými, karboxylovými, etherovými a karbonylovými.^{19,20} Takto funkcionalizované nanodiamanty vykazují značnou afinitu k vodě a k polárním organickým rozpouštědlům. V olejích a v nepolárních organických rozpouštědlech vytváří aglomeráty.^{19,21}

Grafenové kvantové tečky (GQD) jsou kvazisférické nanočástice s pozoruhodnými fotochemickými a fotoluminiscenčními vlastnostmi, které lze připravit destrukcí větších uhlíkových materiálů (grafenových nebo GO desek, uhlíkových vláken nebo CNT). K destrukci lze využít hydrotermální nebo solvotermální procesy nebo silné minerální kyseliny. GQD lze bez dalších chemických úprav rozpouštět ve většině polárních rozpouštědel. V roztocích vykazují, ve srovnání s jinými fluorescenčními barvivy, velmi dobrou stabilitu.^{22,23}

Jak již bylo zmíněno v předmluvě, CNM našly v krátké době široké uplatnění v řadě výrobních odvětví a dynamika jejich vývoje a výroby má vzestupnou tendenci.²⁴ Těto dynamice však neodpovídá úroveň našich vědomostí v oblasti hodnocení jejich zdravotních rizik pro člověka.²⁵ Vedení snahou o zlepšení stávajícího stavu provedli autoři knihy zhodnocení dostupných údajů o toxikokinetice, biologických interakcích, formách toxicity a biomedicinských aplikacích CNP, které doplnili nejvýznamnějšími experimentálními výsledky projektu NanoBio.

LITERATURA

1. Choudhary N, Hwang S, Choi W. Carbon Nanomaterials: A Review. In: Adhikari R, Kar P, Lee S, Tiwari N, eds. *Handbook of Nanomaterials Properties*. Springer; 2014:709–769. doi:10.1007/978-3-642-31107-9_37.
2. Fojtík A, Kálal M, Prnka T et al. *NANO – Fascinující Fenomén Současnosti*. COMTES FHT; 2014. ISBN: 978-80-260-7135-8.
3. Thomas S, Sarathchandran C, Ilangovan SA et al. *Handbook of Carbon-Based Nanomaterials*. Elsevier Inc.; 2021. ISBN: 9780128219966.
4. Zarzycki PK. *Pure and Functionalized Carbon-Based Nanomaterials*. CRC Press; 2020. ISBN: 9780367532147.
5. Pundir CS, Narang J. *Introduction to Carbon Nanomaterials*. Bentham Science Publishers; 2018. ISBN: 978-1-68108-596-8.
6. Speranza G. Carbon Nanomaterials: Synthesis, Functionalization and Sensing Applications. *Nanomater*. 2021;11(4):967. doi:10.3390/nano11040967.
7. Kitko KE, Zhang Q. Graphene-Based Nanomaterials: From Production to Integration with Modern Tools in Neuroscience. *Front Syst Neurosci*. 2019;13:26. doi:10.3389/FNSYS.2019.00026.
8. Peng Q, Dearden AK, Crean J et al. New Materials Graphyne, Graphdiyne, Graphone, and Graphane: Review of Properties, Synthesis, and Application in Nanotechnology. *Nanotechnol Sci Appl*. 2014;7(2):1–29. doi:10.2147/NSA.S40324.
9. Mbayachi VB, Ndayiragije E, Sammani T et al. Graphene Synthesis, Characterization and Its Applications: A Review. *Results Chem*. 2021;3:100163. doi:10.1016/j.rechem.2021.100163.
10. Brisebois PP, Siaj M. Harvesting Graphene Oxide – Years 1859 to 2019: A Review of Its Structure, Synthesis, Properties and Exfoliation. *J Mater Chem C*. 2020;8(5):1517–1547. doi:10.1039/c9tc03251g.
11. Rhazouani A, Gamrani H, El Achaby M et al. Synthesis and Toxicity of Graphene Oxide Nanoparticles: A Literature Review of In Vitro and In Vivo Studies. *Biomed Res Int*. 2021;2021(1):5518999. doi:10.1155/2021/5518999.
12. Morales-Torres S, Jiříčková A, Jankovský O et al. Synthesis and Applications of Graphene Oxide. *Mater*. 2022;15(3):920. doi:10.3390/MA15030920.
13. Rathinavel S, Priyadarshini K, Panda D. A Review on Carbon Nanotube: An Overview of Synthesis, Properties, Functionalization, Characterization, and the Application. *Mater Sci Eng B*. 2021;268:115095. doi:10.1016/J.MSEB.2021.115095.
14. Baskar AV, Benzigar MR, Talapaneni SN et al. Self-Assembled Fullerene Nanostructures: Synthesis and Applications. *Adv Funct Mater*. 2022;32(6):2106924. doi:10.1002/ADFM.202106924.
15. Mikheev IV, Sozarukova MM, Izmailov DY et al. Antioxidant Potential of Aqueous Dispersions of Fullerenes C₆₀, C₇₀, and Gd@C₈₂. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11):5838. doi:10.3390/IJMS22115838.
16. Grebowski J, Konopko A, Krokosz A et al. Antioxidant Activity of Highly Hydroxylated Fullerene C₆₀ and Its Interactions With the Analogue of α -Tocopherol. *Free Radic Biol Med*. 2020;160:734–744. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2020.08.017.
17. Shoukat R, Khan MI. Carbon Nanotubes: A Review on Properties, Synthesis Methods and Applications in Micro and Nanotechnology. *Microsyst Technol*. 2021;27(12):4183–4192. doi:10.1007/s00542-021-05211-6.
18. Ramazani A, Moghaddasi MA, Mashhadi Malekzadeh A et al. Industrial Oriented Approach on Fullerene Preparation Methods. *Inorg Chem Commun*. 2021;125:108442. doi:10.1016/J.INOCHE.2021.108442.
19. Nunn N, Torelli M, McGuire G et al. Nanodiamond: A High Impact Nanomaterial. *Curr Opin Solid State Mater Sci*. 2017;21(1):1–9. doi:10.1016/J.COSSMS.2016.06.008.

20. Barzegar Amiri Olia M, Donnelly PS, Hollenberg LCL, Mulvaney P, Simpson DA. Advances in the Surface Functionalization of Nanodiamonds for Biological Applications: A Review. *ACS Appl Nano Mater.* 2021;4(10):9985–10005. doi:10.1021/ACSANM.1C02698/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AN1C02698_0021.GIF.
21. Qin JX, Yang XG, Lv CF et al. Nanodiamonds: Synthesis, Properties, and Applications in Nanomedicine. *Mater Des.* 2021;210:110091. doi:10.1016/J.MATDES.2021.110091.
22. Zheng XT, Ananthanarayanan A, Luo KQ et al. Graphene Quantum Dots and Carbon Dots: Properties, Syntheses, and Biological Applications. *Small.* 2015;11(14):1620–1636. doi:10.1002/SMLL.201402648.
23. Ghaffarkhah A, Hosseini E, Kamkar M et al. Synthesis, Applications, and Prospects of Graphene Quantum Dots: A Comprehensive Review. *Small.* 2022;18(2):2102683. doi:10.1002/SMLL.202102683.
24. Pande K, Kumar VS, Sharma JA. *Novel Applications of Carbon Based Nano-materials*. Chopra S, ed. CRC Press; 2022. doi:10.1201/9781003183549.
25. Zielińska A, Costa B, Ferreira MV et al. Nanotoxicology and Nanosafety: Safety-by-Design and Testing at a Glance. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(13):1–22. doi:10.3390/ijerph17134657.

TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOMEDICÍNSKÉ VYUŽITÍ UHLÍKOVÝCH NANOMATERIÁLŮ

Uhlíkové nanomateriály (CNM) mají jedinečné vlastnosti, které mohou být využity v klinické diagnostice a léčbě. „Horkými kandidáty“ jsou grafen, grafen oxid (GO), uhlíkové nanotrubičky (CNT, MWCNT) a fullereny. Uvedené materiály mají vysokou stabilitu, pevnost, odolnost, výbornou elektrickou a tepelnou vodivost a často i dobrou biokompatibilitu (která je dále zvyšována funkcionalizací). Většina aplikací CNM se zatím nachází ve stádiích preklinického výzkumu. Jedním z důvodů je i skutečnost, že zatím máme nedostatečné vědomosti o interakcích CNM s tělními tkáněmi a z toho plynoucí vyšší míru nejistoty odhadu toxického potenciálu. V následujícím textu se pokusíme shrnout poznatky o oblastech medicíny, ve kterých se již nanomateriály s úspěchem využívají či se o jejich využití uvažuje.

1.1 DIAGNOSTIKA S VYUŽITÍM NANOČÁSTIC

1.1.1 Zobrazovací vyšetření

CNM zvyšují kvalitu výsledků a ve většině případů i snižují finanční náročnost vyšetřovacích postupů. Díky svým unikátním fyzikálně-chemickým vlastnostem se stávají součástí zobrazovacích metod, které identifikují různé patologické stavy (nádorovou tkáň nebo záněty).^{1,2} Většina uhlíkových nanočástic má přirozenou schopnost emitovat fluorescenci po expozici odpovídajícímu záření (indukce fotoexcitace).^{3,4} Často jsou používány uhlíkové kvantové tečky, grafen a uhlíkové nanotrubičky. Poslední zmíněné látky, především vícevrstvé nanotrubičky (MWCNT), mají extrémní plochu, na kterou lze navázat velké množství molekul s různými funkcemi. Ty mohou zlepšovat detekci cílových látek a zesilovat signál analytického procesu.⁵ Na tomto místě je však nutné zdůraznit, že pro výběr vhodného materiálu k zobrazovacímu vyšetření jsou dvě klíčová kritéria. Prvním kritériem je vhodnost (vysoká efektivita) daného CNM pro konkrétní diagnostický účel. Druhým, neméně důležitým kritériem je jejich snadná exkrece z organismu po splnění diagnostického úkolu.⁶

Díky přirozené rozmanitosti nanočástic a možnosti funkcionalizace je možné zacílit na zobrazení zcela určitých tkání, či dokonce buněk nebo organel. Pokud *in vivo* i klinické studie přinášejí důkazy o tom, že využití uhlíkových nanočástic v zobrazovacích metodách může přinést mnoho výhod. Jednou z nich je i skutečnost, že CNM mohou pronikat prakticky do všech tělních kompartmentů. Například po intravenózní aplikaci prostupují uhlíkové kvantové tečky poměrně rychle do tkání plic, jater a ledvin. Jsou schopny překonávat

i hematoencefalickou bariéru. Posledně uvedený fakt naznačuje možnost využívání uhlíkových kvantových teček při zobrazovacích vyšetřeních CNS.⁷

Další výhody CNM pro zobrazovací technologie představují procesy funkcionalizace. Například nanotrubice pokryté virem M13 mohou být specificky zachytávány v nádorových tkáních. Pokud jsou tyto částice označeny vhodným radionuklidem (například techneciem^{99m}), je možné nádory detekovat pomocí pozitronové emisní tomografie.^{8,9} Obdobně lze značením nanočástic fluorescenčními látkami usnadňovat a zpřesňovat výsledky výpočetní tomografie a magnetické rezonance. U magnetické rezonance je možné dosáhnout lepších výsledků i díky nanodiamantům, a pokud jsou na ně navázány ještě ionty manganu, dochází k dalšímu zlepšení kvality zobrazení.¹⁰ Tento efekt je možný díky tomu, že nanodiamanty fungují jako hyperpolarizační prvek.¹¹ Vyšetření má vyšší senzitivitu, kontrast a je možné detekovat více detailů.¹²

Uhlíkové nanočástice našly své uplatnění také při obrazové analýze hlubších vrstev tkání pomocí blízkého infračerveného záření (NIR). Vyšetření (*Near Infrared Optical Imaging*) využívá spektrum NIR-II (1000–1700 nm) a lze při něm získat údaje z nitra tkání ve velmi dobrém rozlišení bez autofluorescence. Díky tomu je možné provádět například celotělovou a mozkovou angiografii, při které je zobrazen krevní tok a mikrocirkulace. Vizualizace orgánů a tkání umožňuje využít tento typ zobrazení rovněž při nádorové terapii a chirurgických zákrocích.^{13,14}

Další oblastí uplatnění uhlíkových nanočástic je zobrazování intracelulárních struktur a intracelulárního transportu. K tomuto účelu jsou využívány uhlíkové kvantové tečky nebo nanodiamanty (ND) s křemíkovým centrem, které jsou buňkami snadno pohlcovány, vykazují přijatelnou fotostabilitu a mají úzká emisní spektra v oblasti NIR.^{15,16} Uhlíkové kvantové tečky mohou interagovat také s kmenovými buňkami, kde vedle detekce dochází i k podpoře jejich diferenciaci do specifických buněčných linií. Uvedený proces pak podporuje regeneraci poškozených tkání.¹⁶

V průběhu operačních zákroků lze uhlíkovými nanočásticemi detekovat lymfatické uzliny s nádorovými buňkami, které je pak možné ještě během operace odstraňovat. Identifikace metastatických uzlin je důležitá pro snížení rizika rekurence nádorů. Autoři Li s kolegy sledovali lymfatický transport a kumulaci uhlíkových nanočástic v uzlinách v průběhu gastrektomie pokročilých nádorů žaludku. U jedné skupiny pacientů byly před gastrektomií aplikovány uhlíkové nanočástice do žaludeční subserózy, druhá skupina pacientů podstoupila standardní operační protokol. Po aplikaci uhlíkových nanočástic nedošlo k žádné nežádoucí reakci a nanočástice se přednostně kumulovaly v drénujících lymfatických uzlinách, které zabarvovaly načerno. Touto metodou bylo možné detekovat i menší uzliny s metastázami, které by jinak mohly být přehlédnuty.¹⁷ Stejně výsledky přinesly i studie zaměřené na pacienty s nádory štítné žlázy, karcinomu prsu, tlustého střeva a konečníku. Podané uhlíkové nanočástice pre- a perioperačně zvyšovaly úspěšnost detekce lymfatických uzlin s nádorovými buňkami.^{18–20} V případě karcinomů štítné žlázy mohou uhlíkové nanočástice navíc pomáhat při rozlišení příštítných tělísek a lymfatických uzlin.²¹ U kolorektálního karcinomu je možné po endoskopické aplikaci nanočástic doslova „vytětovat“ oblast nádoru a prekancerózních lézí. Uvedené skutečnosti vedou k lepším operačním výsledkům i k redukcí operačního traumatu.²²

1.1.2 EEG

EEG umožňuje základní vyšetření stavu mozkové aktivity. Použití uhlíkových nanomateriálů má oproti jiným materiálům výhody zejména u klíčového prvku EEG, u snímacích elektrod. Zvýšení intenzity snímaného signálu podporuje například grafen a od něj odvozené nanomateriály. Garcia-Cortadella et al. popsali 64kanálový bezdrátový snímací systém na bázi grafenové suspenze, umožňující 24hodinové snímání mozkové aktivity. Systém byl použit u potkanů. Bylo jím možné snímat epikortikální mozkovou aktivitu volně se pohybujících zvířat a zkoumat asociace mezi chováním a nervovou aktivitou.²³ Autoři Ko et al. navrhli snímací elektrody obsahující grafen a GO. Jejich výhodou je, že mohou být použity bez vodivého gelu, aniž by to snížilo kvalitu výsledků (vodivý gel může být pro některé pacienty velmi nepříjemný).²⁴ K podobným (pozitivním) výsledkům dospěli také Faisal et al., když pro EEG použili „suché“ grafenové elektrody. Tyto elektrody zlepšily kontakt s pokožkou a měly v porovnání s komerčními suchými elektrodami vyšší výkonnost i po opakovaném použití. Přítomnost elektrolytů na pokožce (slané prostředí, pot) vedly k dalšímu zlepšení míry detekce.²⁵ Na závěr nutno doplnit, že grafenové elektrody nejsou využívány pouze k účelu detekce, ale lze je použít také ke stimulaci (hluboká mozková stimulace, retinální a kochleární implantáty).²⁶

1.1.3 EKG

Vynikající elektrická vodivost uhlíkových nanočástic umožňuje jejich využití v řadě elektro-technických komponent, například tranzistorů. Přítomnost nanočástic zesiluje získaný signál a redukuje nežádoucí šумы, což je velmi důležité pro snímání srdeční aktivity. Uhlíkové nanočástice (grafen, GO a MWCNT) byly rovněž použity pro přípravu snímacích elektrod EKG. Testování elektrod probíhalo pro krátkou a dlouhou monitoraci. Při dlouhé monitoraci byly elektrody součástí přenosného snímacího zařízení, což umožnilo snímání změn srdeční aktivity během celého dne.^{27–29}

1.1.4 Fotoakustická diagnostika

Fotoakustické zobrazování, využívané například ve fotoakustické mikroskopii nebo fotoakustické počítačové tomografii (CT), je řazeno do skupiny neinvazivních vyšetření. Jeho princip je založený na fotoakustickém efektu, při němž jsou světelné či laserové pulzy absorbovány exogenními nebo endogenními kontrastními látkami a konvertovány na termální energii s emisí ultrazvukového signálu. Fotoakustické CT má vysoké prostorově-časové rozlišení, které umožňuje zobrazení stavu hlubokých tkání, včetně diagnostiky nádorů mléčné žlázy, kůže, střeva a rekta. Jako kontrastního materiálu lze u této diagnostiky úspěšně využít uhlíkových nanočástic, například grafenu, CNT či GQD, které mohou být dále povrchově funkcionalizovány organickými polymery, peptidy, kovovými nanočásticemi nebo barvivy.^{30,31} Takto upravené komplexy pak mohou být zacíleny na specifické tkáně. Například jednoduché uhlíkové nanotrubičky (SWCNT), funkcionalizované cyklickými Arg-Gly-Asp peptidy, jsou preferenčně vychytávány různými typy nádorů (nikoliv však tkáněmi zdravými).³² Do nádorových tkání snadno prostupují také GQD, které po vystavení NIR-II mnohobarevně

fluorescenci emitují fotoakustický signál.³³ Poznamenáváme, že fotoakustický jev nemusí mít využití pouze diagnostické, ale že lze jej využít také léčebně, ve spojení s fototermiální terapií (viz dále).

1.1.5 Biomarkery a elektrochemické biosenzory

Pro správnou diagnostiku a posouzení průběhu nemoci je nezbytné průběžně stanovovat hladiny biomarkerů, které jsou pro dané onemocnění charakteristické. Jako biomarkery mohou sloužit například proteiny, nukleové kyseliny, hormony, antigeny, glukóza, lipidy a vitamíny, které je možné stanovovat v krvi (séru/plazmě), slinách, moči, sputu či vydechovaném vzduchu.^{34,35} Některé biomarkery jsou však standardními postupy obtížně stanovitelné, nicméně právě užití uhlíkových nanočástic může tyto metodiky významně zjednodušit a zvýšit jejich výpovědní hodnotu. Týká se to například diagnostiky diabetu, karcinomu plic a žaludku, halitózy, astmatu, selhávání jater a snížení ledvinových funkcí ze sloučenin detekovaných ve vydechovaném vzduchu. Stanovované látky zahrnují v těchto případech například hydrogen-sulfan, toluen, aceton, benzen, amoniak a oxid dusný.³⁶ V případě karcinomu plic lze ve vydechovaném vzduchu stanovovat benzen, styren, hexanal, 2,2,4,6,6-pentamethylheptan, propylbenzen, 2-methylheptan, dekan, cyklohexan, 1,2,4-trimethylbenzen a 2,4-dimethylheptan.³⁷

Grafen, jeho deriváty a CNT jsou schopny vázat myoglobin, kreatinkinázu, troponin a B typ natriuretického peptidu. Tato vlastnost je předurčuje jako imunosenzory diagnostiky poškození myokardu (z tělních tekutin a sekretů).^{38,39}

Velmi důležitým diagnostickým biomarkerem je glukóza. Její detekci je možné zlepšit použitím uhlíkových nanočástic (grafenu, CNT a GQD) konjugovaných s glukózovou oxidázou. Sensory pak mají velmi vysokou senzitivitu a selektivitu, což bylo ověřeno při testování v přítomnosti dalších interferujících sloučenin, jako jsou acetoaminofen, kyselina močová nebo kyselina askorbová.⁴⁰ Zajímavá je studie autorů Lin et al., kteří popsali SWCNT glukózový senzor s detekčním limitem 50 μm a velmi rychlou odpovědí; vyhodnocení výsledku trvá méně než 5 sekund. Senzor je možné propojit s chytrými telefony, které diabetiky průběžně informují o hodnotách glykemie.⁴¹ Hladinu glukózy je možné stanovovat rovněž neenzymatickou cestou pomocí grafenových elektrod funkcionalizovaných dalšími nanočásticemi. Metoda významně snižuje detekční limit stanovení. Například detekční limit glukózy při použití elektrod z redukovaného GO, funkcionalizovaného oxidem cíničitým, je 13,35 μm , při použití elektrod z GO, funkcionalizovaného měděnými nanokostkami, je limit dokonce 250 nM.⁴²

Souběžně s glykemií jsou standardně hodnoceny také hladiny cholesterolu. Analýzy zahrnují enzymatické i neenzymatické metody, při kterých mohou být využívány vlastnosti uhlíkových nanočástic. U enzymatických metod je možné na povrch částic navázat například cholesterol oxidázu.⁴³ U neenzymatických byla popsána funkcionalizace grafenu β -cyclodextrinem. Methylenová modř (redox indikátor) vytváří s nanomateriály relativně nestabilní komplexy, ve kterých může být nahrazována cholesterolem. To může být základem elektrochemické detekce (methylenová modř je uvolňována do média).⁴⁴

Uhlíkovými nanočásticemi lze detekovat také některé biomarkery spojené s neurodegenerativními onemocněními. Například grafen konjugovaný nanočásticemi zlata umožňuje stanovení plazmatických hladin α -synukleinu (Parkinsonova nemoc). Autoři Aminabad s kolegy, kteří tuto metodu popsali, uvádějí detekční rozsah 4–128 ng/ml.⁴⁵

Nanouhlíkové biosenzory významně usnadňují a urychlují diagnostiku infekčních onemocnění. Například grafen konjugovaný se specifickými protilátkami může na svém povrchu vázat řadu patogenů (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* či virus Zika). GO nanomateriály zase dobře detekují virus dengue a rotaviry.⁴⁶ V nedávné době se objevily studie, v nichž byly uhlíkové nanočástice s úspěchem použity k detekci SARS-CoV-2, a to nejen z tělních tekutin, ale také z vydechaného vzduchu.^{47–49} Je zřejmé, že detekční metody založené na uhlíkových nanočásticích jsou ve většině případů efektivnější a levnější než standardní metody detekce patogenů.

Metoda „real-time“ monitorování je proces, při kterém je možné průběžně sledovat uvolňování neurotransmiterů v nervovém systému. Ku příkladu Wu s kolegy prezentovali implantovanou aptamer-grafenovou mikrotranzistorovou sondu, která u myši vysoce senzitivně monitorovala uvolňování dopaminu *ex vivo* i *in vivo*. Časový monitoring neurotransmiterů – jak ukázala mimo jiné tato studie – výrazně přispívá k pochopení fyziologických zákonitostí změn nervového systému a je důležitým nástrojem pro vývoj léčby neurologických onemocnění.⁵⁰

1.2 OCHRANA PROTI RTG ZÁŘENÍ

Diagnostické a terapeutické postupy používané v radiologii a nukleární medicíně představují zvýšené riziko expozice ionizujícímu záření pro pacienty i obsluhující personál. Optimálně by měly být materiály používané pro ochranu před tímto zářením netoxické, lehké a měly by vykazovat vysokou míru redukce průchodu záření. Aktuálně jsou dostupné tradiční, velmi hmotnostně těžké stínící materiály obsahující olovo. Další skupinu stínících materiálů tvoří směsi olova s jiným, lehčím, prvkem, například cínem. Tyto materiály jsou přibližně o 25 % lehčí než standardní olověná stínění. Do třetí skupiny pak patří materiály, ve kterých je olovo nahrazeno jiným prvkem, například cínem, antimonem, wolframem či vizmutem. Jedná se o lehčí materiály (zhruba o 35–40 % oproti olovu) s jednoduchou recyklovatelností po vyřazení z provozu, která u stínění s obsahem olova není možná.

Další varianty materiálů, dále se přibližující k optimálním charakteristikám, by mohly být připravovány s využitím nanočástic. Například studie provedená Hashemim et al. testovala materiál (polyanilin) bez pokrytí GO a s pokrytím GO. Materiál pokrytý GO redukoval míru průchodu RTG záření významně více než materiál bez pokrytí.⁵¹ Bylo zjištěno, že nanokompozit polyvinylidenfluoridu (PVDF) a síranu barnatého redukuje míru průchodu RTG záření zhruba o 9 %. Přidáním GO se míra redukce zvýšila zhruba na 25 %.⁵² CNT redukuje míru průchodu významněji než pyrolytický grafit a fullereny (C₆₀). Pokrytí textilie 25mm vrstvou CNT redukovalo průchod RTG zhruba o 70 %.⁵³ Autoři Viegas et al. porovnávali stínící vlastnosti GO, pyrolytického grafitu, MWCNT a amorfního uhlíku (sazí) nanosených na PVDF. Nejvyšší míra redukce RTG záření byla zjištěna v případě GO.⁵⁴ Autoři Zarei s kolegy navrhli stínící materiál tvořený polyanilinem, vločkami GO a komplexem wolfram-vismut-cín. Materiál velmi efektivně redukoval míru průchodu RTG záření a autoři jej doporučili pro výrobu zástěr k ochraně pohlavních orgánů a štítné žlázy při RTG vyšetření.⁵⁵ Autoři Türkaslan et al. modifikovali komerčně dostupné tkaniny, používané k výrobě plášťů pro klinický personál, nanočásticemi GO. Modifikované tkaniny významně redukovaly průchod RTG záření a současně byly i velmi flexibilní, skladné, lehké a prodyšné.⁵⁶

1.3 LÉČBA S VYUŽITÍM UHLÍKOVÝCH NANOČÁSTIC

1.3.1 Adsorpce, hemofiltrace a hemodialýza

Díky své vysoké adsorpční kapacitě mohou uhlíkové nanočástice odstraňovat toxické látky ze systémové cirkulace (ionty, reaktivní intermediáty, prozánětlivé proteiny a toxické metabolity). Autoři Yishan Zheng s kolegy popsali adsorpci prozánětlivých cytokinů IL-6, IL-8 a TNF v cirkulaci na povrchu grafenu. Redukce hladiny cirkulačních cytokinů měla za následek zmírnění průběhu septických stavů a snížení rizika multiorgánového selhání s následným úmrtím na sepsi. Inkorporace grafenu do flexibilního polytetrafluoroetylenového (PTFE) filtru významně zvyšuje účinnost hemofiltrace.⁵⁷ Seredych et al. hodnotili míru schopnosti grafenu a grafenu kombinovaného s PTFE odstraňovat z cirkulace prozánětlivé cytokiny IL-6, IL-8 a TNF- α . Oba uvedené typy materiálů vykázaly velmi dobré výsledky (bylo dosaženo téměř 100% účinnosti).⁵⁸ Obdobná míra účinnosti byla popsána také u ND při odstraňování IL-1 β , IL-4, IL-6, IFN- γ a TNF- α .⁵⁹

Vedle prozánětlivých cytokinů mohou CNM na svém povrchu adsorbovat také celou řadu endogenních substancí. Například studie Wua et al. popsala redukci vysokých hladin bilirubinu v cirkulaci pomocí CNT s navázaným lyzinem a chitinem. Je však důležité poznamenat, že bilirubin vykazuje určitou míru toxicity vůči CNS; zvýšené hladiny bilirubinu jsou pak vyvolávány dysfunkcemi hepatobiliárního systému nebo mohou být důsledkem hemolýzy. Použití zmíněných modifikovaných CNT významně zvýšilo clearance bilirubinu.⁶⁰ Muhammad Ifran a jeho kolegové navrhli novou variantu hemodialyzační membrány, obsahující MWCNT. Autoři uvádějí biokompatibilitu, vysokou efektivitu filtrace (zejména při odstraňování močoviny a kreatininu) a sníženou míru „zanášení membrány“ (až o 30 %).⁶¹ Adsorpce na povrchu CNM je využívána také pro snižování hladin cholesterolu (rizikový faktor aterosklerózy a hepatosteatózy) a uplatňuje se u léčby geneticky podmíněných hypercholesterolemii.⁶²

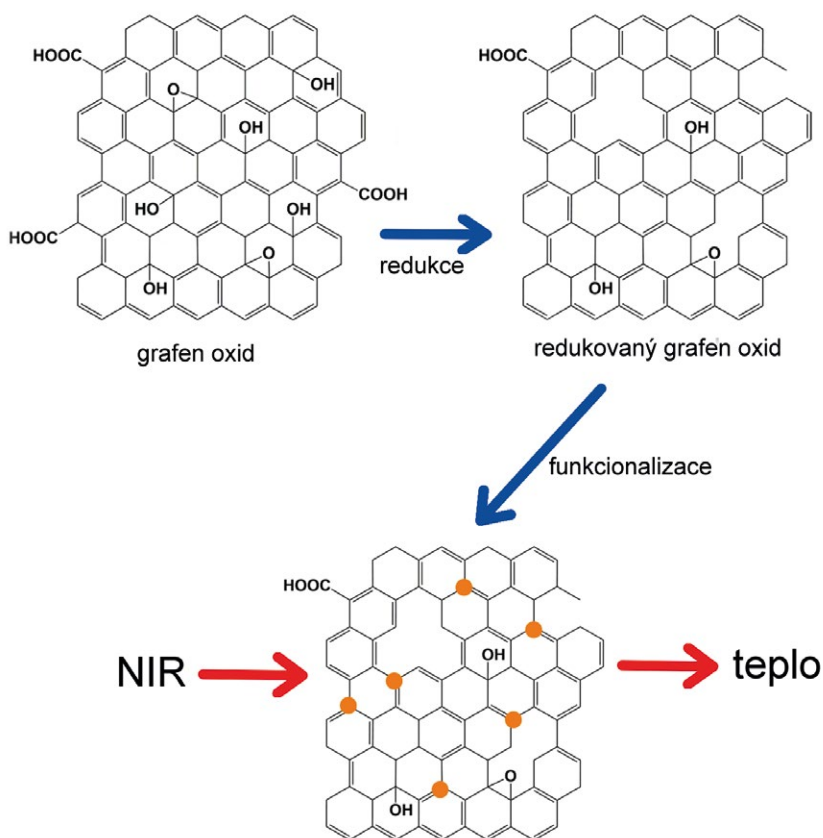
1.3.2 Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie (FDT) je využívána k cílené destrukci nádorových buněk pomocí reaktivních kyslíkových intermediátů (ROS). ROS (OCl^- , OH^- , H_2O_2 , O_2 , $^1\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{O}_2^{2-}$) vznikají v široké škále po expozici CNM světlu o určitých vlnových délkách. Například SWCNT indukují primárně superoxidový aniont ($\cdot\text{O}_2^-$), zatímco GQD spíše singletový kyslík ($^1\text{O}_2$).^{63,64} FDT je považována za velmi účinnou neinvazivní terapii s minimálními nežádoucími systémovými účinky. Pro aktivaci nanočástic je často používáno NIR, které penetruje do hlubších tkáňových vrstev než UV záření.^{65,66} FDT je používána také k léčbě bakteriálních a mykotických infekcí. Cuadrado et al. testovali antibakteriální a antimykotické účinky nanokompozitu složeného z GO a MWCNT. Nanokompozit byl přidán k bakteriálním a mykotickým kulturám a následně vystaven dávce ozáření 65 mW/cm² / 630 nm. Tímto postupem byly deaktivovány struktury *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Candida albicans*. V případě použití samotného GO byly deaktivovány pouze struktury bakterií.⁶⁷ Chen et al. prokázali, že funkcionalizovaný GO účinně deaktivuje (po expozici odpovídajícímu záření) struktury meticilin rezistentního *Staphylococcus aureus*.⁶⁸

1.3.3 Fototermální terapie

Fototermální terapie (FTT) je velmi blízká FDT a v praxi lze úspěšně obě metody kombinovat. FTT je založena na schopnosti CNM (většinou GO nebo CNT) transformovat světelnou energii na teplo. Tento proces umožňuje selektivní likvidaci nádorových buněk a uvolňování léčivých substrátů adsorbovaných na povrchu CMN (Obrázek 1).^{69,70}

Jako v případě FDT je i FTT minimálně invazivní, selektivní, dobře kontrolovatelná ve smyslu lokalizace a rozsahu použití a kombinovatelná s jinými terapiemi. Příkladem může být lokální nebo systémová chemoterapie u léčby nádorových onemocnění. Protinádorová léčiva jsou navázána na CMN a následně dopravena do postiženého tělního kompartmentu. Zde po ozáření NIR dochází k uvolnění tepla a navázaných léčiv. Postup významně zvyšuje účinnost onkologické léčby.



Obrázek 1. Princip fototermální terapie

GO je v prvním kroku redukován na rGO a následně funkcionalizován vybranými substráty (například léčivými či proteiny; zelené ovály). Po vystavení funkcionalizovaného rGO záření NIR (I, II) dojde k uvolnění tepla i navázaných substrátů.

(Drahomíra Holmannová; pro přípravu obrázku byl použit: Servier Medical Art. Servier, licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.)

In vitro a *in vivo* studie prokázaly, že pomocí FTT lze efektivně léčit nádory prsu, plic, močového měchýře a maligní melanom.^{71,72} Důležitá je skutečnost, že při FTT dochází, vedle destrukce nádorových buněk, k indukci protinádorové imunitní odpovědi. Apoptotické a nekrotické buňky při tomto procesu uvolňují s nádory asociované antigeny s charakterem DAMP (*damage/danger-associated molecular patterns* – molekuly, které iniciují a zároveň udržují neinfekční zánětlivou odpověď), stimulující vrozenou i specifickou imunitu.⁷³

Autoři Cheng et al. použili CNM s navázaným docetaxelem k léčbě metastáz v lymfatických uzlinách u myši. Nanočástice byly po aplikaci do cirkulace preferenčně vychytávány v uzlinách s metastatickými buňkami. Po laserové iradiaci došlo k lokálnímu uvolnění léku a lokálnímu zvýšení teploty, což vedlo k destrukci nádorových buněk.⁷⁴ Yunjian Li s kolegy popsali použití ND při léčbě karcinomu tlustého střeva u potkanů, při které byly ND s navázaným léčivem aplikovány orálně. Po adekvátním časovém úseku byla oblast tlustého střeva ozářena NIR-II, což mělo za následek lokální zvýšení teploty a uvolnění navázaného léčiva. Terapie vedla k významnému omezení růstu nádoru.⁷⁵ Pro FTT je možné využít také mezopórézní uhlíkové nanočástice, které mají vyšší absorpční koeficienty než grafen nebo SWCNT a v oblasti NIR-I a NIR-II indukují silnější fototermální i fotoakustický signál.⁷⁶

1.3.4 Výroba vakcín

Vakcíny jsou základním nástrojem primární prevence infekčních onemocnění, nicméně je lze s úspěchem využít i v terapii nádorových onemocnění či v imunoterapii. Velmi zjednodušeně můžeme říci, že vakcíny předkládají imunitnímu systému antigen, proti němuž se má rozvinout imunitní obranná reakce.⁷⁷ Důležitou součástí vakcíny však není jen složka nesoucí antigenní informaci, ale také „adjuvans“, které aktivuje imunitní systém. Jak již bylo zmíněno výše, na povrch CNM lze adsorbovat velké množství různorodých agens, včetně mikrobiálních a nádorových antigenů (či jiných imunogenních molekul), které zvyšují imunitní odpověď po očkování, a tedy i produkci protilátek a vznik paměťových buněk. Navíc poměrně dobře stimulují vrozenou imunitu. Nanočástice mohou v tomto procesu sloužit jako nosiče i jako adjuvans.⁷⁸ V experimentech *in vivo* (myši, potkani) byla porovnávána účinnost standardní vakcíny a vakcíny využívající CNT s navázanými antigeny patogenů a nádorových buněk. U vakcíny s CNT byla zaznamenána významně vyšší úroveň imunitní odpovědi. Byla zvýšena produkce neutralizujících specifických IgG proti patogenům a cytolytická aktivita T lymfocytů namířená proti patogenu nebo nádorovým buňkám.⁷⁹ Dong et al. popsali experiment s chřipkovou vakcínou využívající GO funkcionalizovaný polyetyleniminem. Po aplikaci myším vyvolala vakcína silnou protilátkovou i buněčnou imunitní odezvu, která dostatečně chránila před infekcí po vystavení patogenu.⁸⁰ Autoři Ho et al. použili v experimentu na myších chřipkovou vakcínu obsahující ND. Po aplikaci došlo k trojnásobnému navýšení produkce neutralizačních protilátek v porovnání s běžnou vakcínou.⁸¹

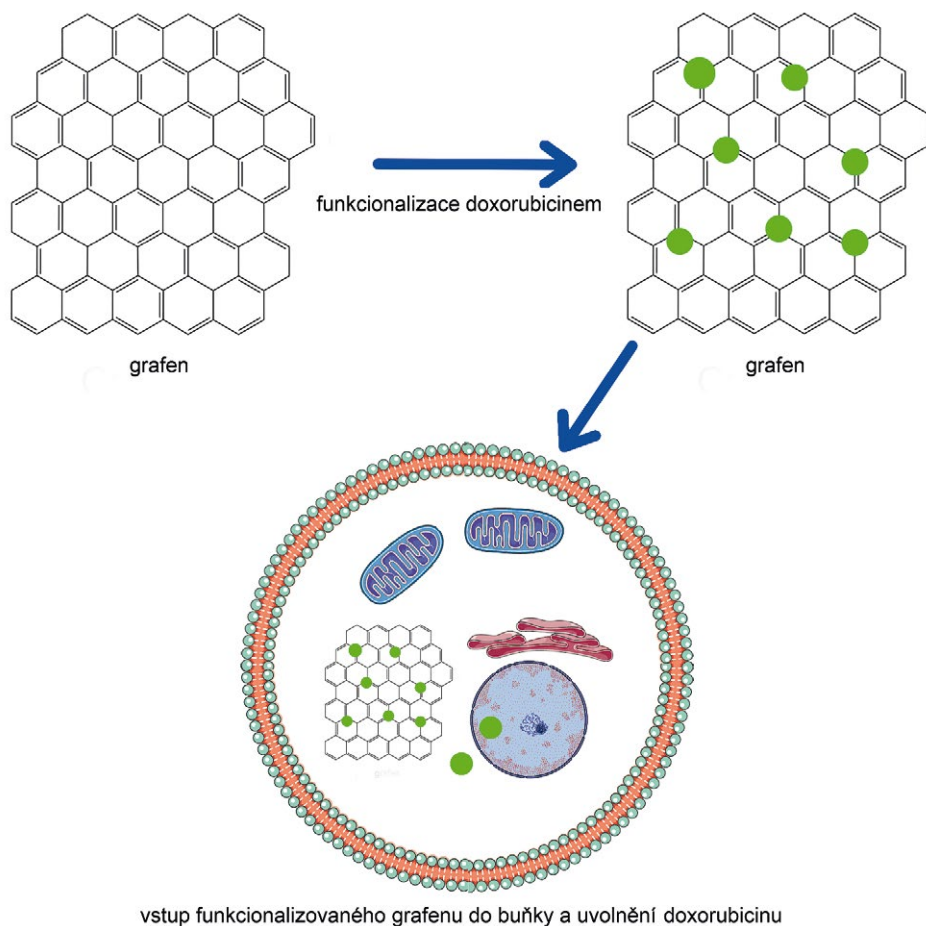
1.3.5 Platformy/nosiče léčiv

Při systémovém podávání je někdy obtížné dosáhnout dostatečných koncentrací léčiva v cílových kompartmentech (místech nádoru nebo infekce). Další zvyšování dávek bývá problematické z důvodu zvýšeného rizika poškození zdravých tkání. V předchozím textu bylo zmíněno,

že modifikací CNM je možné dosáhnout jejich preferenční kumulace v určitých typech tkání. CNM disponují velkou adsorpční plochou, na kterou mohou být navazována léčiva ve vysokých koncentracích, případně i kombinace léčiv. Použitím CNM jako nosiče tak lze dosahovat potřebných koncentrací léčiv v místech jejich maximálního účinku (Obrázek 2).

V buňkách je léčivo z komplexu CNM nosiče uvolňováno teplotou, změnou pH nebo enzymy.⁸² Zacilení léčby vede ke snížení hladiny léčiva v celém systému a tím i ke snížení pravděpodobnosti výskytu nežádoucích reakcí.

Mezi CNM, které lze takto funkcionalizovat, bývají často řazeny CNT, grafeny a fullereny. Funkcionalizujícími substráty bývají protinádorová a antimikrobiální léčiva či proteiny (například monoklonální protilátky).⁸³ V probíhajících experimentech *in vitro* i *in*



Obrázek 2. Nanočástice jako nosič léčiva

Na grafen je v prvním kroku navazován doxorubicin a receptor pro specifický antigen, který je exprimován cílovými buňkami. V druhém kroku komplex interaguje s antigenem a membránou a vstupuje do buňky, kde dochází k uvolnění navázaného léčiva.

(Drahomíra Holmannová; pro přípravu obrázku byl použit: Servier Medical Art. Servier, licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.)

in vivo jsou na CNM navazovány cisplatina, oxaliplatina, doxorubicin, metotrexát, paklitaxel, tamoxifen a rituximab.⁸⁴ Například Lay et al. navázali na polyetylen glykolované MWCNT (PEG-MWCNT) paklitaxel a tento komplex inkubovali s nádorovými buněčnými liniemi HeLa (karcinom děložního čípku) a MCF-7 (karcinom prsu). PEG-MWCNT vykazovaly nízkou cytotoxicitu a vysokou účinnost v likvidaci nádorových buněk (po uvolnění paklitaxelu).⁸⁵ Yu et al. připravili CNT s PEG, estradiolem a lobo-platinou, což představuje terapeutickou kombinaci pro léčbu nádorů prsu. Účinek této kombinace byl potvrzen v *in vitro* i *in vivo* studiích. Důležitým zjištěním bylo, že na rozdíl od standardní protinádorové léčby měla léčba s účastí CNT méně systémových nežádoucích účinků a účinnost si udržela i při nižších dávkovacích schématech.⁸⁶ Jako nosič lze použít také GO. Buskaran et al. navázali na GO protokatechovou, chlorogenní a listovou kyselinu, což vedlo k úspěšné likvidaci buněk karcinomu jater. Obdobně jako u předchozí práce byla pozorována dostatečná účinnost terapeutického komplexu i při relativně nízkých koncentracích léčiva.⁸⁷

Léčba s využitím CNM může být zacílená také pomocí molekul, které jsou exprimovány určitými typy buněk. Například nádorové buňky obecně exprimují vyšší množství receptorů pro kyselinu listovou. CNM s povrchově adsorbovanou kyselinu listovou budou tedy atrahovány k nádoru. K zacílení je možné použít rovněž specifické antigeny nádorových buněk či patogenů, resp. monoklonální protilátky, které se na antigeny a receptory cílových buněk vážou.^{88–90} Li et al. použili komplex GO s navázaným doxorubicinem v kombinaci se specifickým antigenem HN-1. Nanočástice byly intenzivně vychytávány buňkami orálního skvamózního karcinomu (CAL27), na který byly zacílené. Účinnost komplexu převyšovala účinnost samotného doxorubicinu.⁹¹

Kromě grafenu a jeho derivátů a CNT je možné jako nosiče použít také fullerény. I tento typ nanočástic je možné osadit léčivými, např. 5-aminolevulinovou kyselinou nebo doxorubicinem. Takto vzniklý komplex je schopen proniknout až do buněčného jádra.^{92,93} Snadný přístup tělními bariérami je obecně velkou výhodou CNM nosičů. Řada z nich proniká i přes hematoencefalickou bariéru a může léčiva dopravovat do CNS (léčba gliomů).⁹⁴

Vedle protinádorové léčby se CNM mohou uplatňovat i v dalších terapiích, například v procesu reparace poškozených tkání, kdy jsou na povrch CNM navazovány růstové faktory. Příkladem může být vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), který podporuje angiogenezi v ischemií poškozené srdeční tkáni. CNM mohou transportovat také látky s antimikrobiálním účinkem.^{38,95,96} Pokud hovoříme o antimikrobiálním efektu nanočástic, je nutné zmínit skutečnost, že ten mají i samotné nanočástice. Mohou urychlovat virovou clearance a pomáhají překonávat bakteriální antibiotickou rezistenci (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*). Jejich přirozené antimikrobiální účinky je možné dále zvyšovat adsorpcí nanočástic stříbra.⁹⁷ CNM mohou být využity také v léčbě zánětlivých onemocnění (například nespecifických střevních zánětů). Na jejich povrch jsou v tomto případě adsorbovány protizánětlivé či imunomodulační látky, které zasahují do průběhu zánětlivé odpovědi.⁹⁸

1.3.6 Genová terapie

CNM se uplatňují také jako nosiče genetické informace v genových terapiích.⁹⁹ Běžně se v genové terapii používají jako nosiče viry a touto formou je možné do buňky a jádra vnášet plazmidovou DNA, miRNA či siRNA.^{82,100,101} Genomové součásti pak mohou regulovat či inhibovat genovou expresi cílových genů (selektivně je blokovat). Postup je využíván například u léčby nádorových onemocnění, kdy lze blokací vybraných genů omezit dělení a růst nádorových buněk.

Andersen et al. publikovali metodu genové terapie s využitím SWCNT, na jejichž povrch navázali specifickou siRNA. V experimentu provedli inkubaci buněk karcinomu slinivky (PANC-1) ve dvou variantách, a to se samostatnou siRNA a dále s komplexem siRNA a SWCNT. Volná siRNA pronikala do buněk velmi obtížně, komplex siRNA a SWCNT však dosáhl transfekce téměř 92 %. Po internalizaci se siRNA uvolnila a interagovala s cílovým mutantním genem K-Ras, což vedlo k poklesu exprese mRNA K-Ras zhruba o 67 %.¹⁰² Studie autorů Wang et al. popsala experiment s komplexem GO s navázanou siRNA, který autoři inkubovali s buňkami karcinomu prsu. I v tomto případě pozorovali vysokou míru internalizace komplexu a inhibici dělení a růstu nádorových buněk.¹⁰³

Podobným způsobem je možné využít také grafeny, fullereny, GQD a ND.¹⁰¹

Pomocí genové terapie je možné léčit také řadu dalších patologických stavů. Příkladem může být inhibice zánětlivých procesů u nealkoholické hepatosteatózy cestou zacílení siRNA na CCR5 gen, tento výzkum je zatím ve fázích testování *in vitro*.¹⁰⁴ Využití genové terapie je stále rozšířenější a použití biokompatibilních nanočástic je pro elevaci její účinnosti jednoznačně přínosné.

1.4 STENTY A BOKOMPATIBILNÍ UHLÍKOVÉ NANOMATERIÁLY V ORTOPEDII, KARDIOLOGII A STOMATOLOGII

Biokompatibilita je nejdůležitějším předpokladem pro použití materiálů v medicíně. Běžně se pracuje se standardními netoxickými materiály, jejichž biokompatibilita je dále zvyšována speciálními povlaky. Tímto postupem lze vyrábět například stenty, kloubní náhrady nebo srdeční a zubní implantáty. Povrchová aplikace CNM na standardní materiály zlepšuje nejen jejich biokompatibilitu, ale i fyzikálně-chemické vlastnosti finálního produktu. CNM zlepšují odolnost, pevnost, hemokompatibilitu a antitrombotické vlastnosti materiálů, zvyšují míru reepitelizace a regenerace, zabraňují restenóze a chrání před infekcemi a tvorbou biofilmu.¹⁰⁵

Nerezová ocel s označením 316L vykazuje velmi dobrou biokompatibilitu a je dobrým kandidátem pro výrobu srdečně-cévních stentů. Negativem v jejím případě je skutečnost, že může zvyšovat riziko trombózy a restenózy. Vellayappan et al. zjistili, že pokrytí stentů vyrobených z oceli 316L s několika vrstvami grafenu výrazně zlepšuje jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a snižuje trombogenitu a riziko restenózy.¹⁰⁵ Autoři Wawrzyńska et al. uvedli, že úprava oceli 316L pomocí grafenu nejenže nezvyšuje toxicitu takto upraveného materiálu vůči buňkám lidského primárního arteriálního endotelu (HPCAEC), ale naopak podporuje jejich adhezi, proliferaci a metabolickou aktivitu, což v konečném efektu podporuje regeneraci poškozené cévy. Navíc se díky grafenu snižuje adheze trombocytů a tím i tvorba trombů.¹⁰⁶ Zajímavou studii provedli Ösmer Burak İstanbullu a Gulsen Akdogan, kteří navázali SWCNT metodu spin-coating na stenty vyrobené z 316L, 316LVM, CoCr-slítiny a Ti-slítiny. Takto

ošetřené stenty byly více inertní, nereagovaly se složkami a buňkami krve a také lépe odolávaly poškození. Autoři dále uvádějí, že polarizační odpor $1,433 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ a elektrochemická impedance $1,07 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ povlakem SWCNT zvýšily na $142,8 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ a $141,3 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$, tj. zvýšila se korozní odolnost, a to až k 90 % v případě 316LVM se SWCNT.¹⁰⁷

CNM jsou používány také pro výrobu umělých srdečních chlopní. Například Hastalex, který je tvořen funkcionalizovaným poly(carbonat-urea)urethanem (GO PCUU), má výborné mechanické vlastnosti, hemokompatibilitu a je odolný proti vzniku kalcifikací. Umělé srdeční chlopně je dále možné modifikovat polyuretanem a CNM s navázaným heparinem, což výrazně snižuje koagulaci a riziko vzniku trombů.^{108,109}

U kardiostimulátorů je problémem nízká kapacita baterií a nutnost jejich periodické výměny. Některé studie prokázaly, že GO v kombinaci s polyvinylidendifluoridem by mohl fungovat jako nanogenerátor v samonapájecích kardiostimulátorech. Když autoři Azimi et al. implantovali takto upravené kardiostimulátory psům, zjistili, že nanogenerátor je schopen získávat energii $0,487 \mu\text{J}$ z každého srdečního úderu. Tato hodnota je vyšší než prahová energie nutná pro stimulaci lidského srdce.¹¹⁰ V kardiologii se mohou uplatnit také ND, které snižují riziko vzniku trombů, omezují adhezi a aktivaci trombocytů a inhibují tvorbu fibrinových depozit. Navíc disponují protimikrobiálními účinky.¹¹¹

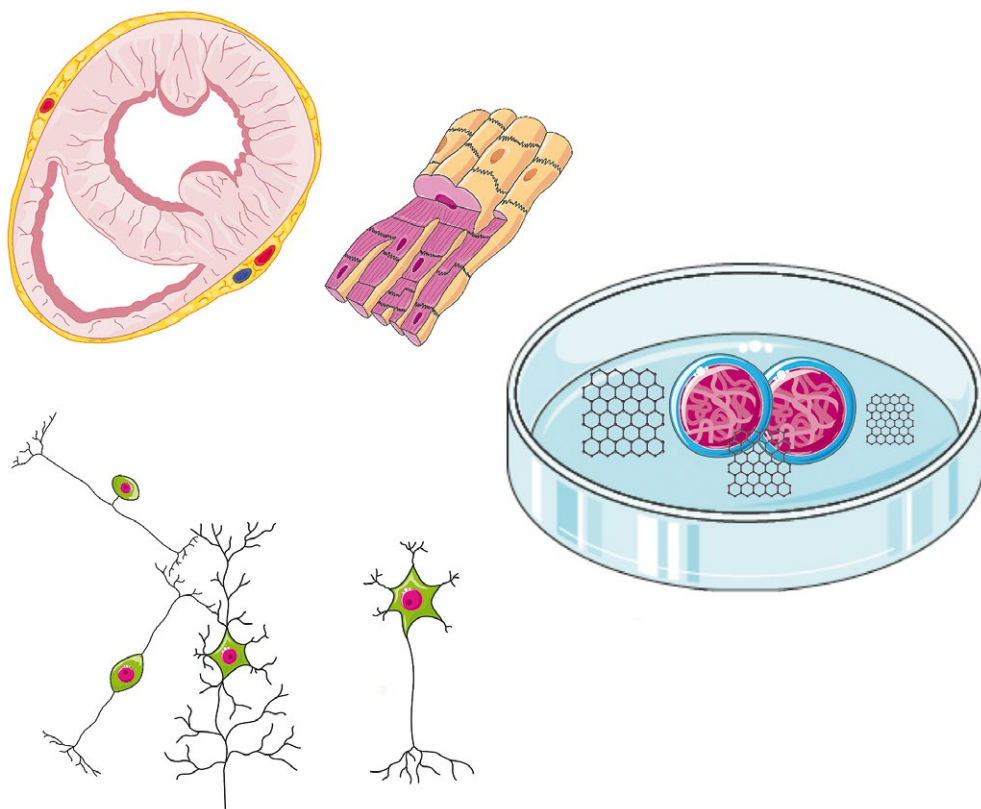
CNM nacházejí uplatnění i v ortopedii a ve stomatologii. Nanomateriály na povrchu náhrad a implantátů podporují regeneraci, přilnutí osteoblastů k náhradě a proliferaci. Tím se zlepšuje a urychluje vhojení náhrady a vznik kvalitní kostní tkáně. CNM rovněž zvyšují odolnost povrchu náhrad proti poškození a ořezu a prodlužují jejich životnost.¹¹²

Ve stomatologii je možné přidávat ND do zubních výplňových hmot, což zvyšuje pevnost v ohybu, pružnost a drsnost povrchu a snižuje ořez. Pro prevenci stomatitidy spojené se zubními náhradami je důležitá skutečnost, že ND v zubní pryskyřici snižují adhezenci *Candida albicans*.^{113–115} Obdobně lze do stomatologických výrobků přidávat i CNT, které mají antibakteriální účinky a potlačují i *Streptococcus mutans*, který je součástí zubního kazu. CNT aplikované na scaffoldech podporují významně regeneraci kostní tkáně po resekcii zubů a vkládání implantátů. Implantáty pokryté CNT zvyšují pravděpodobnost jejich úspěšného vhojení do kosti.¹¹⁶

1.5 SCAFFOLDY, REGENERAČNÍ MEDICÍNA

CNM jsou biokompatibilní a mohou pozitivně ovlivňovat životaschopnost, diferenciaci, dediferenciaci, proliferaci a adhezi mnoha typů buněk. Tyto vlastnosti předurčují použití CNM v systémech scaffoldů, umožňujících rychlou regeneraci tkání. Nejčastěji se jedná o tkáň nervového, kardiovaskulárního a pohybového systému (Obrázek 3).^{117,118}

Ve studiích týmů autorů Ning Liho a Rossany Rauti byl popsán pozitivní vliv grafenu na růst myších neuronů z hipokampu a na zvýšení počtu neuritů a prodloužení jejich délky. Grafen rovněž podporuje synaptogenezi a neurální aktivitu.^{119,120} Zhou et al. implantovali scaffold s grafenem potkanům po poranění mozku, které bylo spojené se zánikem buněk a rozvojem zánětu. Přítomnost scaffoldů ve striatu a v subventrikulárním prostoru vedla k omezení aktivace mikroglie a astrocytů (potlačení zánětu), což se v konečné fázi projevilo nižší mírou zjizvení mozkové tkáně.¹²¹ Jak ukázali Yan Zhang, Shu Qang a Ping Yang, GO a CNT jsou schopné indukovat diferenciaci myších embryonálních buněk do dopaminergních neuronů, což by mohlo být využíváno při léčbě Parkinsonovy nemoci.¹²²



Obrázek 3. Regenerační potenciál nanočástic

CNM (například grafen) mohou podporovat diferenciaci kmenových buněk a tvorbu tkání (například vytvoření myokardu či součástí nervové soustavy).

(Drahomíra Holmannová; pro přípravu obrázku byl použit: Servier Medical Art. Servier, licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.)

CNM trojrozměrné verze scaffoldů imitují mikroprostředí nervové soustavy a pozitivně ovlivňují chování neuronů a formování nervové tkáně. Severino et al. aplikovali neurony z hipokampu na trojrozměrný grafenový scaffold. Byla pozorována intenzivní proliferace neuronů a tvorba nových spojů. V porovnání s dvojrozměrnými scaffoldy docházelo i k vyšší míře synchronicity.¹²³ Lopéz-Dolado et al. implantovali potkanům trojrozměrný GO scaffold do oblasti míšního poškození. Následkem byla zvýšená intenzita regeneračních procesů v míše a zvýšená úroveň angiogeneze. Rovněž byly zjištěny nové neurony, axony a funkční cévy.¹²⁴

Vedle CNS ovlivňují CNM také regeneraci periferního nervového systému. Autoři Zhao et al. popsali pozitivní vliv scaffoldu s grafenem na růst a proliferaci Schwannových buněk.¹²⁵ Ke stejným výsledkům dospěli také Pi et al., kteří v první části své studie kultivovali Schwannovy buňky se scaffoldem s CNT a neurotrofním faktorem. Bylo pozorováno zvýšení proliferace, růstu a produkce myelinu. Ve druhé části studie byl tento scaffold použit na poškozený sedací nerv, což mělo za následek obnovení jeho funkcí.¹²⁶

Kromě tkání nervové soustavy mohou uhlíkové nanočástice zlepšovat i stav kostí, chrupavek, pokožky a svalové tkáně.¹²⁷ Poškození kostí (v důsledku úrazů) se v některých případech špatně hojí a vyžaduje operační řešení s použitím kostních štěpů. Problémem je ovšem jejich dostupnost a výrazně by pomohla příprava této funkční tkáně v laboratorních podmínkách.¹²⁸ Experimentální studie potvrzují, že CNM podporují diferenciaci kmenových buněk do osteoblastů a zvyšují osteogenezi a ektopickou tvorbu kostní tkáně. Například autoři Nie et al. popsali použití trojrozměrného porézního nanohydroxyapatitového scaffoldu s GO, který v *in vivo* experimentu na králíkovi s cirkulárním defektem kalvy (4mm průměr) umožnil jeho rychlé a plné vyhojení. Scaffold významně podpořil osteogenezi, buněčnou proliferaci a vznik kolagenových depozit.¹²⁹ K obdobným výsledkům došla i studie autorů Daneshmandiho et al., ve které byl použit trojrozměrný scaffold s funkcionalizovaným grafenem a fosforečnanem vápenatým. Scaffold indukoval diferenciaci lidských mezenchymálních kmenových buněk do osteoblastů v *in vitro* experimentu a navodil rychlé vyhojení defektu kalvy v experimentu *in vivo* na myších.¹³⁰ Li et al. použili k léčbě defektu femorálního epikondyly u králíků implantát z titanové slitiny pokryté grafenem. Grafenový povrch významně urychlil osteogenezi a kvalita nově vytvořené kosti, kostní mineralizace a vrůst implantátu do kosti byly lepší než u kontrolní skupiny, která dostala implantát bez grafenového krytí.¹³¹

CNM prokázaly svou účinnost také při regeneraci oční sítnice. Poškození sítnice je spojeno s ireverzibilním zhoršením zraku a slepotou a jedinou možností, jak zrak zlepšit/obnovit je regenerace sítnice. Autoři Chemla et al. popsali, že CNT a uhlíková nanovlákná (CNF) podporují diferenciaci lidských embryonálních kmenových buněk do prekursorových buněk fotoreceptorů, které by mohly být v klinické praxi (v rámci regeneračního procesu) implantovány do oční sítnice.¹³²

Kardiovaskulární onemocnění patří k nejčastějším příčinám populační morbidity a mortality. Ischemická choroba srdeční vede k nevratnému poškození srdečního svalu, který má limitovanou regenerační kapacitu. Dochází tak postupně k neléčitelným ztrátám srdečních funkcí, případně až k srdečnímu selhání. Zatím jedinou formou terapie tohoto stavu je transplantace srdce (ta má ovšem své zásadní omezení v podobě omezené dostupnosti orgánu). Studie dokladují, že CNM, aplikované v podobě scaffoldu nebo injikované v podobě hydrogelů (samostatně či s kmenovými buňkami), mohou indukovat regeneraci poškozené srdeční tkáně. Scaffoldy z CNM imitují extracelulární matrix, dávají mechanickou podporu a stimulují signály pro maturaci a diferenciaci kmenových buněk. Jejich velkou výhodou je biokompatibilita, mechanické vlastnosti a elektrická vodivost, nutná pro vytvoření funkční srdeční tkáně. Smith et al. použili ve své studii scaffold z PEG a scaffold z PEG/GO osazené neonatálními myocyty z komor potkanů. Scaffold z PEG/GO významně zvýšil úroveň růstu srdečních buněk, jejich vodivost i kontraktilitu.¹³³ Autoři Saravanan et al. připravili biodegradabilní chitosanový scaffold s GO/zlatými plátky a testovali jej v experimentech *in vitro* a *in vivo* (na izolovaném srdci a na potkaním modelu infarktu myokardu). Scaffold byl netoxický vůči buňkám potkaního hladkého svalu a fibroblastů a lidským kardiomyocytům a neaktivoval imunitní systém (nevývolával zánětlivou odpověď) v prostředí *in vitro*. V potkaním modelu byl indukovan infarkt podvazem jedné z větví levé koronární arterie a aplikován připravený scaffold. Po pěti týdnech bylo pozorováno (dle EKG) zlepšení srdeční vodivosti, přenosu vzruchů a kontraktility v postižené tkáni. Ultrazvukové vyšetření potvrdilo zvýšení ejekční frakce.¹³⁴ Nutno doplnit, že regenerace srdce (i ostatních tkání) významně závisí na stavu cévního systému. Scaffoldy s uhlíkovými nanočásticemi zlepšují angiogenezi a přispívají k obnově krevního průtoku v poškozených oblastech.³⁸ V této souvislosti potvrdila studie

autorů Mukherjee et al., že GO a redukováný GO významně zvyšují úroveň angiogeneze.¹³⁵ Polykaprolaktonový scaffold s GO, připravený Quianem et al., podpořil nejen růst Schwannových buněk, ale také angiogenezi, která je nezbytná pro regeneraci poškozeného nervu.¹³⁶

Regenerační potenciál CNM je využíván i při hojení poškozených částí kůže, obzvláště v situacích obtížně se hojících ran. Například diabetická poškození kůže (rány) jsou velmi rezistentní k jakékoli léčbě a mohou skončit i amputacemi končetin. Literatura uvádí, že použití CNM snižuje riziko infikování poškození kůže a urychluje její vyhojení s proliferací fibroblastů a reepitelizací, a to i v případě zmíněných diabetických ran či závažných popálenin.¹³⁷ Khalid et al. zjistili, že bakteriální celulóza, osazená MWCNT, indukuje u myši rychlejší uzávěr diabetické rány, reepitalizaci a vytvoření zdravé granulační tkáně. Nově vytvořená tkáň vykázala snížené hladiny prozánětlivých cytokinů (IL-1 α a TNF- α) a zvýšené hladiny vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF).¹³⁸ Antimikrobiální účinky CNM, v tomto případě grafenu, potvrdili Du et al. Nitrocelulóзовá membrána s grafenem, přiložená na myši ránu, zabránila infekci *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* a urychlila uzavření a vyhojení rány.¹³⁹

1.6 ZÁVĚR

CNM mají jedinečné fyzikálně-chemické vlastnosti, které umožňují jejich využití v klinické medicíně. Mohou výrazně zefektivnit, zrychlit, zpřesnit i zlevnit mnohé diagnostické i terapeutické postupy. Mohou najít uplatnění v tak zásadních klinických oborech, jako je onkologie (diagnostika i léčba), biochemie či regenerační medicína. V současné době však stále vyvstává nedeřešená otázka toxicity CNM. Zatímco využití v klinické biochemii či při EKG a EEG představuje minimální riziko, u přímého podání musíme zvažovat riziko toxicity a přínosu CNM. Ve prospěch využití CNM v klinické praxi hovoří fakt, že se často jedná o jednorázové vystavení nepříliš vysokým dávkám CNM. Vyšším rizikem je opakované podání či podání vysokých dávek.

1.7 LITERATURA

1. Thomas DT, Baby A, Raman V et al. Carbon-Based Nanomaterials for Cancer Treatment and Diagnosis: A Review. *ChemSelect*. 2022;7(36):e202202455. doi:10.1002/SLCT.202202455.
2. Nadar SS, Patil SP, Kelkar RK et al. Nanobiomaterials for Bioimaging. In: *Nanotechnology in Medicine and Biology*. Elsevier; 2022:189-234. doi:10.1016/B978-0-12-819469-0.00001-0.
3. Liu F, Gao Y, Li H, Sun S. Interaction of Propidium Iodide With Graphene Oxide and Its Application for Live Cell Staining. *Carbon*. 2014;71:190–195. doi:10.1016/j.carbon.2014.01.029.
4. Liu JJ, Li D, Zhang K, Yang M, Sun H, Yang B. One-Step Hydrothermal Synthesis of Nitrogen-Doped Conjugated Carbonized Polymer Dots With 31% Efficient Red Emission for In Vivo Imaging. *Small*. 2018;14(15):1703919. doi:10.1002/smll.201703919.
5. Sapna K, Sonia J, Kumara BN et al. Carbon Nanotubes for Bio-Imaging Applications. In: *Handbook of Carbon Nanotubes*. Springer, Cham; 2022. doi:10.1007/978-3-030-91346-5_40.
6. Liu J, Li R, Yang B. Carbon Dots: A New Type of Carbon-Based Nanomaterial With Wide Applications. *ACS Cent Sci*. 2020;6(12):2179–2195. doi:10.1021/acscentsci.0c01306.
7. Patel KD, Singh RK, Kim HW. Carbon-Based Nanomaterials as an Emerging Platform for Therapeutics. *Mater Horiz*. 2019;6(3):434–469. doi:10.1039/c8mh00966j.

8. Ghosh D, Bagley AF, Na YJ et al. Deep, Noninvasive Imaging and Surgical Guidance of Submillimeter Tumors Using Targeted M13-Stabilized Single-Walled Carbon Nanotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(38):13948–13953. doi:10.1073/pnas.1400821111.
9. Bayoumi NA, Emam AN. ^{99m}Tc Radiolabeling of Polyethylenimine Capped Carbon Dots for Tumor Targeting: Synthesis, Characterization and Biodistribution. *Int J Radiat Biol*. 2021;97(7):977–985. doi:10.1080/09553002.2021.1919781.
10. Kunuku S, Lin BR, Chen CH et al. Nanodiamonds Doped With Manganese for Applications in Magnetic Resonance Imaging. *ACS Omega*. 2023;8(4):4398–4409. doi:10.1021/ACSOMEGA.2C08043.
11. Saul P, Schröder L, Schmidt AB, Hövener JB. Nanomaterials for Hyperpolarized Nuclear Magnetic Resonance and Magnetic Resonance Imaging. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2023;15(4):e1879. doi:10.1002/wnan.1879.
12. Cherukula K, Lekshmi KM, Uthaman S et al. Multifunctional Inorganic Nanoparticles: Recent Progress in Thermal Therapy and Imaging. *Nanomater*. 2016;6(4):76. doi:10.3390/nano6040076.
13. Hu Z, Fang C, Li B et al. First-in-Human Liver-Tumour Surgery Guided by Multispectral Fluorescence Imaging in the Visible and Near-Infrared-I/II Windows. *Nat Biomed Eng*. 2020;4(3):259–271. doi:10.1038/s41551-019-0494-0.
14. Wan H, Yue J, Zhu S et al. A Bright Organic NIR-II Nanofluorophore for Three-Dimensional Imaging into Biological Tissues. *Nat Commun*. 2018;9(1):1171. doi:10.1038/s41467-018-03505-4.
15. Liu W, Alam MNA, Liu Y et al. Silicon-Vacancy Nanodiamonds as High Performance Near-Infrared Emitters for Live-Cell Dual-Color Imaging and Thermometry. *Nano Lett*. 2022;22(7):2881–2888. doi:10.1021/acs.nanolett.2c00040.
16. Liu H, Guo J, Aryee AA et al. Lighting Up Individual Organelles With Fluorescent Carbon Dots. *Front Chem*. 2021;9:784851. doi:10.3389/FCHEM.2021.784851.
17. Li Z, Ao S, Bu Z et al. Clinical Study of Harvesting Lymph Nodes With Carbon Nanoparticles in Advanced Gastric Cancer: A Prospective Randomized Trial. *World J Surg Oncol*. 2016;14(1):88. doi:10.1186/s12957-016-0835-3.
18. Ma JJ, Zhang DB, Zhang WF et al. Application of Nanocarbon in Breast Approach Endoscopic Thyroidectomy Thyroid Cancer Surgery. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2020;30(5):547–552. doi:10.1089/lap.2019.0794.
19. Liu P, Tan J, Tan Q et al. Application of Carbon Nanoparticles in Tracing Lymph Nodes and Locating Tumors in Colorectal Cancer: A Concise Review. *Int J Nanomed*. 2020;15:9671–9681. doi:10.2147/IJN.S281914.
20. Du J, Zhang Y, Ming J et al. Evaluation of the Tracing Effect of Carbon Nanoparticle and Carbon Nanoparticle-epirubicin Suspension in Axillary Lymph Node Dissection For Breast Cancer Treatment. *World J Surg Oncol*. 2016;14:164. doi:10.1186/s12957-016-0925-2.
21. Xu SW, Li ZF, Xu MB et al. The Role of Carbon Nanoparticle in Lymph Node Detection and Parathyroid Gland Protection During Thyroidectomy: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2020;15(11):e0223627. doi:10.1371/journal.pone.0223627.
22. Wang R, Zhan HL, Li DZ et al. Application of Endoscopic Tattooing With Carbon Nanoparticle in the Treatment for Advanced Colorectal Cancer. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*. 2020;23(1):56–64. Chinese. doi:10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2020.01.010.
23. Garcia-Cortadella R, Schwesig G, Jeschke C et al. Graphene Active Sensor Arrays for Long-Term and Wireless Mapping of Wide Frequency Band Epicortical Brain Activity. *Nat Commun*. 2021;12(1):1–17. doi:10.1038/s41467-020-20546-w.
24. Ko LW, Su CH, Liao PL et al. Flexible Graphene/GO Electrode for Gel-Free EEG. *J Neural Eng*. 2021;18(4):046060. doi:10.1088/1741-2552/abf609.
25. Faisal SN, Amjadipour M, Izzo K et al. Non-Invasive On-Skin Sensors for Brain Machine Interfaces With Epitaxial Graphene. *J Neural Eng*. 2021;18(6):066035. doi:10.1088/1741-2552/ac4085.
26. Bramini M, Alberini G, Colombo E et al. Interfacing Graphene-Based Materials With Neural Cells. *Front Syst Neurosci*. 2018;12:12. doi:10.3389/fnsys.2018.00012.

27. Cui TR, Li D, Huang XR et al. Graphene-Based Flexible Electrode for Electrocardiogram Signal Monitoring. *Appl Sci*. 2022;12(9):4526. doi:10.3390/APP12094526.
28. Tasneem NT, Pullano SA, Critello CD, Fiorillo AS, Mahbub I. A Low-Power On-Chip ECG Monitoring System Based on MWCNT/PDMS Dry Electrodes. *IEEE Sens J*. 2020;20(21):12799–12806. doi:10.1109/JSEN.2020.3001209.
29. Murastov G, Bogatova E, Brazovskiy K et al. Flexible and Water-Stable Graphene-Based Electrodes for Long-Term Use in Bioelectronics. *Biosens Bioelectron*. 2020;166:112426. doi:10.1016/J.BIOS.2020.112426.
30. Lee C, Jeon M, Kim C. Photoacoustic Imaging in Nanomedicine. In: *Appl Nanoscience Photomed*. Chandos Publishing. 2015:31–47. doi:10.1533/9781908818782.31.
31. Jia Z, Dai R, Zheng Z et al. Hollow Carbon-Based Nanosystem for Photoacoustic Imaging-Guided Hydrogenothermal Therapy in the Second Near-Infrared Window. *RSC Adv*. 2021;11(20):12022–12029. doi:10.1039/d1ra00093d.
32. De La Zerda A, Zavaleta C, Keren S et al. Carbon Nanotubes as Photoacoustic Molecular Imaging Agents in Living Mice. *Nat Nanotechnol*. 2008;3(9):557–562. doi:10.1038/nnano.2008.231.
33. Han Y, Liu H, Fan M et al. Near-Infrared-II Photothermal Ultra-Small Carbon Dots Promoting Anticancer Efficiency by Enhancing Tumor Penetration. *J Colloid Interface Sci*. 2022;616:595–604. doi:10.1016/j.jcis.2022.02.083.
34. Liu J, Li R, Yang B. Carbon Dots: A New Type of Carbon-Based Nanomaterial With Wide Applications. *ACS Cent Sci*. 2020;6(12):2179–2195. doi:10.1021/acscentsci.0c01306.
35. Cheraghi S, Taher MA, Karimi-Maleh H et al. Novel Enzymatic Graphene Oxide-Based Biosensor for the Detection of Glutathione in Biological Body Fluids. *Chemosphere*. 2022;287:132187. doi:10.1016/j.chemosphere.2021.132187.
36. Chen Y, Zhang Y, Pan F et al. Breath Analysis Based on Surface-Enhanced Raman Scattering Sensors Distinguishes Early and Advanced Gastric Cancer Patients From Healthy Persons. *ACS Nano*. 2016;10(9):8169–8179. doi:10.1021/acsnano.6b01441.
37. Peng G, Track E, Haick H. Detecting Simulated Patterns of Lung Cancer Biomarkers by Random Network of Single-Walled Carbon Nanotubes Coated With Nonpolymeric Organic Materials. *Nano Lett*. 2008;8(11):3631–3635. doi:10.1021/nl801577u.
38. Alagarsamy KN, Mathan S, Yan W et al. Carbon Nanomaterials for Cardiovascular Theranostics: Promises and Challenges. *Bioact Mater*. 2021;6(8):2261–2280. doi:10.1016/j.bioactmat.2020.12.030.
39. Demirbakan B, Sezgintürk MK. A Novel Ultrasensitive Immunosensor Based on Disposable Graphite Paper Electrodes for Troponin T Detection in Cardiovascular Disease. *Talanta*. 2020;213:120779. doi:10.1016/j.talanta.2020.120779.
40. Papanikolaou E, Simos YV, Spyrou K et al. Is Graphene the Rock Upon Which New Era Continuous Glucose Monitors Could Be Built? *Exp Biol Med*. 2023;248(1):14–25. doi:10.1177/15353702221134105.
41. Lin Y, Lu F, Tu Y, Ren Z. Glucose Biosensors Based on Carbon Nanotube Nanoelectrode Ensembles. *Nano Lett*. 2004;4(2):191–195. doi:10.1021/nl0347233.
42. Reghunath R, Devi K, Singh KK. Recent Advances in Graphene Based Electrochemical Glucose Sensor. *Nano-Struct Nano-Obj*. 2021;26:100750. doi:10.1016/j.nanoso.2021.100750.
43. Alagappan M, Immanuel S, Sivasubramanian R et al. Development of Cholesterol Biosensor Using Au Nanoparticles Decorated f-MWCNT Covered With Polypyrrole Network. *Arab J Chem*. 2020;13(1):2001–2010. doi:10.1016/j.arabjc.2018.02.018.
44. Agnihotri N, Chowdhury AD, De A. Non-Enzymatic Electrochemical Detection of Cholesterol Using β -Cyclodextrin Functionalized Graphene. *Biosens Bioelectron*. 2015;63:212–217. doi:10.1016/j.bios.2014.07.037.
45. Aminabad ED, Mobeid A, Hasanzadeh M et al. Sensitive Immunosensing of α -Synuclein Protein in Human Plasma Samples Using Gold Nanoparticles Conjugated With Graphene: An Innovative

- Immuno-Platform Towards Early Stage Identification of Parkinson's Disease Using Point of Care (POC) Analysis. *RSC Adv.* 2022;12(7):4346–4357. doi:10.1039/d1ra06437a.
46. Peña-Bahamonde J, Nguyen HN, Fanourakis SK et al. Recent Advances in Graphene-Based Biosensor Technology With Applications in Life Sciences. *J Nanobiotechnol.* 2018;16(1):75. doi:10.1186/s12951-018-0400-z.
 47. Kim S, Ryu H, Tai S et al. Real-Time Ultra-Sensitive Detection of SARS-CoV-2 by Quasi-Freestanding Epitaxial Graphene-Based Biosensor. *Biosens Bioelectron.* 2022;197:113803. doi:10.1016/j.bios.2021.113803.
 48. Zhu A, Luo X. Detection of Covid-19 Through a Heptanal Biomarker Using Transition Metal Doped Graphene. *J Phys Chem B.* 2022;126(1):151–160. doi:10.1021/acs.jpcc.1c09580.
 49. Jia H, Zhang A, Yang Y et al. A Graphene Oxide Coated Tapered Microfiber Acting as a Super-Sensor for Rapid Detection of SARS-CoV-2. *Lab Chip.* 2021;21(12):2398–2406. doi:10.1039/d0lc01231a.
 50. Wu G, Zhang N, Matarasso A et al. Implantable Aptamer-Graphene Microtransistors for Real-Time Monitoring of Neurochemical Release in Vivo. *Nano Lett.* 2022;22(9):3668–3677. doi:10.1021/acs.nanolett.2c00289.
 51. Hashemi SA, Mousavi SM, Faghihi R et al. Superior X-Ray Radiation Shielding Effectiveness of Biocompatible Polyaniline Reinforced With Hybrid Graphene Oxide-Iron Tungsten Nitride Flakes. *Polymers (Basel).* 2020;12(6):1407. doi:10.3390/polym12061407.
 52. Silva LA, Batista AMS, Serodre T et al. Enhancement of X-Ray Shielding Properties of PVDF/BaSO₄ Nanocomposites Filled With Graphene Oxide. *MRS Adv.* 2019;4(3–4):169–175. doi:10.1557/adv.2018.651.
 53. Fujimori T, Tsuruoka S, Fugetsu B et al. Enhanced X-Ray Shielding Effects of Carbon Nanotubes. *Mater Express.* 2011;1(4):273–278. doi:10.1166/mex.2011.1043.
 54. Viegas J, Silva LA, Batista AMS et al. Increased X-Ray Attenuation Efficiency of Graphene-Based Nanocomposite. *Ind Eng Chem Res.* 2017;56(41):11782–11790. doi:10.1021/acs.iecr.7b02711.
 55. Zarei M, Sina S, Hashemi SA. Superior X-Ray Radiation Shielding of Biocompatible Platform Based on Reinforced Polyaniline by Decorated Graphene Oxide With Interconnected Tungsten–Bismuth–Tin Complex. *Radiat Phys Chem.* 2021;188:109588. doi:10.1016/j.radphyschem.2021.109588.
 56. Türkaslan SS, Ugur ŞS, Türkaslan BE et al. Evaluating the X-Ray-Shielding Performance of Graphene-Oxide-Coated Nanocomposite Fabric. *Mater.* 2022;15(4):1441. doi:10.3390/MA15041441.
 57. Zheng Y, Pescatore N, Gogotsi Y et al. Rapid Adsorption of Proinflammatory Cytokines by Graphene Nanoplatelets and Their Composites for Extracorporeal Detoxification. *J Nanomater.* 2018;2018:6274072. doi:10.1155/2018/6274072.
 58. Seredych M, Haines B, Sokolova V et al. Graphene-Based Materials for the Fast Removal of Cytokines From Blood Plasma. *ACS Appl Bio Mater.* 2018;1(2):436–443. doi:10.1021/acsabm.8b00151.
 59. Yoo W, Lee W, Kim HN et al. Nanodiamond as a Cytokine Sponge in Infectious Diseases. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:862495. doi:10.3389/fbioe.2022.862495.
 60. Wu S, Duan B, Zeng X et al. Construction of Blood Compatible Lysine-Immobilized Chitin/Carbon Nanotube Microspheres and Potential Applications for Blood Purified Therapy. *J Mater Chem B.* 2017;5(16):2952–2963. doi:10.1039/c7tb00101k.
 61. Irfan M, Irfan M, Idris A et al. Fabrication and Performance Evaluation of Blood Compatible Hemodialysis Membrane Using Carboxylic Multiwall Carbon Nanotubes and Low Molecular Weight Polyvinylpyrrolidone Based Nanocomposites. *J Biomed Mater Res A.* 2019;107(3):513–525. doi:10.1002/jbm.a.36566.
 62. Vakhrushev AV, Vakhrushev AA, Chuckova NN et al. Adsorption of Cholesterol by Carbon Nanotubes. In: *Carbon Nanotubes and Nanoparticles*. Apple Academic Press; 2019:65–80. doi:10.1201/9780429463877-4.

63. Hsieh HS, Wu R, Jafvert CT. Light-Independent Reactive Oxygen Species (ROS) Formation Through Electron Transfer From Carboxylated Single-Walled Carbon Nanotubes in Water. *Environ Sci Technol*. 2014;48(19):11330–11336. doi:10.1021/es503163w.
64. Ge J, Lan M, Zhou B et al. A Graphene Quantum Dot Photodynamic Therapy Agent With High Singlet Oxygen Generation. *Nat Commun*. 2014;5(1):1–8. doi:10.1038/ncomms5596.
65. Chen L, Chen M, Zhou Y, Ye C, Liu R. NIR Photosensitizer for Two-Photon Fluorescent Imaging and Photodynamic Therapy of Tumor. *Front Chem*. 2021;9:629062. doi:10.3389/fchem.2021.629062.
66. de Freitas LF. Nanomaterials for Enhanced Photodynamic Therapy. In: *Photodynamic Therapy – From Basic Science to Clinical Research*. IntechOpen; 2021. doi:10.5772/intechopen.94255.
67. Cuadrado CF, Díaz-Barrios A, Campaña KO et al. Broad-Spectrum Antimicrobial ZnMintPc Encapsulated in Magnetic-Nanocomposites With Graphene Oxide/MWCNTs Based on Bimodal Action of Photodynamic and Photothermal Effects. *Pharmaceutics*. 2022;14(4):705. doi:10.3390/pharmaceutics14040705.
68. Chen Y, Huang W, Dong Y, Yu X, Mo A, Peng Q. Enhanced Antibacterial Activity of Indocyanine Green-Loaded Graphene Oxide via Synergistic Contact Killing, Photothermal and Photodynamic Therapy. *J Biomed Nanotechnol*. 2022;18(1):185–192. doi:10.1166/jbn.2022.3236.
69. Lu H, Zhao Q, Wang X et al. Multi-Stimuli Responsive Mesoporous Silica-Coated Carbon Nanoparticles for Chemo-Photothermal Therapy of Tumor. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2020;190:110941. doi:10.1016/j.colsurfb.2020.110941.
70. Yu J, Yang L, Yan J, Wang WC, Chen YC, Chen HH, Lin CH. Carbon Nanomaterials for Photothermal Therapies. In: Hui YY, Chang HC, Dong H, Zhang X, eds. *Carbon Nanomaterials for Bioimaging, Bioanalysis, and Therapy*. John Wiley & Sons Ltd. 2019:309–340. doi:10.1002/9781119373476.ch12.
71. McKernan P, Virani NA, Faria GNF et al. Targeted Single-Walled Carbon Nanotubes for Photothermal Therapy Combined With Immune Checkpoint Inhibition for the Treatment of Metastatic Breast Cancer. *Nanoscale Res Lett*. 2021;16(1):1–9. doi:10.1186/s11671-020-03459-x.
72. Wang S, Jin S, Li G et al. Transmucosal Delivery of Self-Assembling Photosensitizer-Nitazoxanide Nanocomplexes With Fluorinated Chitosan for Instillation-Based Photodynamic Therapy of Orthotopic Bladder Tumors. *ACS Biomater Sci Eng*. 2021;7(4):1485–1495. doi:10.1021/acsbiomaterials.0c01786.
73. Xu P, Liang F. Nanomaterial-Based Tumor Photothermal Immunotherapy. *Int J Nanomed*. 2020;15:9159–9180. doi:10.2147/IJN.S249252.
74. Cheng J, Liu Y, He L et al. Novel Multifunctional Nanoagent for Visual Chemo/Photothermal Therapy of Metastatic Lymph Nodes via Lymphatic Delivery. *ACS Omega*. 2020;5(7):3194–3206. doi:10.1021/acsomega.9b03258.
75. Li Y, Su Y, Pan H et al. Nanodiamond-Based Multifunctional Platform for Oral Chemo-Photothermal Combinational Therapy of Orthotopic Colon Cancer. *Pharmacol Res*. 2022;176:106080. doi:10.1016/j.phrs.2022.106080.
76. Zhou L, Jing Y, Liu Y et al. Mesoporous Carbon Nanospheres as a Multifunctional Carrier for Cancer Theranostics. *Theranostics*. 2018;8(3):663–675. doi:10.7150/THNO.21927.
77. van Eden W. Vaccination Against Autoimmune Diseases Moves Closer to the Clinic. *Hum Vaccin Immunother*. 2020;16(2):228–232. doi:10.1080/21645515.2019.1593085.
78. Gottardi R, Douradinha B. Carbon Nanotubes as a Novel Tool for Vaccination Against Infectious Diseases and Cancer. *J Nanobiotechnol*. 2013;11(1):1–7. doi:10.1186/1477-3155-11-30.
79. Scheinberg DA, McDevitt MR, Dao T, Mulvey JJ, Feinberg E, Alidori S. Carbon Nanotubes as Vaccine Scaffolds. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(15):2016–2022. doi:10.1016/j.addr.2013.07.013.
80. Dong C, Wang Y, Gonzalez GX et al. Intranasal Vaccination With Influenza HA/GO-PEI Nanoparticles Provides Immune Protection Against Homo- and Heterologous Strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(19):e2024998118. doi:10.1073/pnas.2024998118.

81. Ho TT, Pham VT, Nguyen TT et al. Effects of Size and Surface Properties of Nanodiamonds on the Immunogenicity of Plant-Based H5 Protein of A/H5N1 Virus in Mice. *Nanomater.* 2021;11(6):1597. doi:10.3390/nano11061597.
82. Zare H, Ahmadi S, Ghasemi A et al. Carbon Nanotubes: Smart Drug/Gene Delivery Carriers. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:1681–1706. doi:10.2147/IJN.S299448.
83. Daniyal M, Liu B, Wang W. Comprehensive Review on Graphene Oxide for Use in Drug Delivery System. *Curr Med Chem.* 2020;27(22):3665–3685. doi:10.2174/13816128256661902011296290.
84. Sequeira CA. Carbon Nanotubes in Cancer Research and Therapy. *Biomed J Sci Tech Res.* 2020;25(5):19437–19442. doi:10.26717/bjstr.2020.25.004252.
85. Lay CL, Liu HQ, Tan HR, Liu Y. Delivery of Paclitaxel by Physically Loading Onto Poly(Ethylene Glycol) (PEG)-Graft Carbon Nanotubes for Potent Cancer Therapeutics. *Nanotechnology.* 2010;21(6):065101. doi:10.1088/0957-4484/21/6/065101.
86. Yu S, Zhang YI, Chen L et al. Antitumor Effects of Carbon Nanotube-Drug Complex Against Human Breast Cancer Cells. *Exp Ther Med.* 2018;16(2):1103–1110. doi:10.3892/etm.2018.6334.
87. Buskaran K, Hussein MZ, Moklas MAM, Masarudin MJ, Fakurazi S. Graphene Oxide Loaded With Protocatechuic Acid and Chlorogenic Acid Dual Drug Nanodelivery System for Human Hepatocellular Carcinoma Therapeutic Application. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):5786. doi:10.3390/ijms22115786.
88. Rastogi V, Yadav P, Bhattacharya SS et al. Carbon Nanotubes: An Emerging Drug Carrier for Targeting Cancer Cells. *J Drug Deliv.* 2014;2014:670815. doi:10.1155/2014/670815.
89. Perepelytsina OM, Yakymchuk OM, Sydorenko MV, Bakalinska ON, Bloisi F, Vicari LRM. Functionalization of Carbon Nanomaterial Surface by Doxorubicin and Antibodies to Tumor Markers. *Nanoscale Res Lett.* 2016;11:314. doi:10.1186/s11671-016-1537-z.
90. Xiao Y, Gao X, Taratula O et al. Anti-HER2 IgY Antibody-Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes for Detection and Selective Destruction of Breast Cancer Cells. *BMC Cancer.* 2009;9:351. doi:10.1186/1471-2407-9-351.
91. Li R, Wang Y, Du J et al. Graphene Oxide Loaded With Tumor-Targeted Peptide and Anti-Cancer Drugs for Cancer Target Therapy. *Sci Rep.* 2021;11:1725. doi:10.1038/s41598-021-81218-3.
92. Serda M, Gawecki R, Dulski M et al. Synthesis and Applications of [60]Fullerene Nanoconjugate With 5-Aminolevulinic Acid and Its Glycoconjugate as Drug Delivery Vehicles. *RSC Adv.* 2022;12(11):6377–6388. doi:10.1039/d1ra08499b.
93. Biswas R, Yang S, Crichton RA et al. C60- β -Cyclodextrin Conjugates for Enhanced Nucleus Delivery of Doxorubicin. *Nanoscale.* 2022;14(12):4456–4462. doi:10.1039/d2nr00777k.
94. Wang B, Guo H, Xu H, Chen Y, Zhao G, Yu H. The Role of Graphene Oxide Nanocarriers in Treating Gliomas. *Front Oncol.* 2022;12:736177. doi:10.3389/FONC.2022.736177.
95. Teixeira-Santos R, Gomes M, Gomes LC, Mergulhão FJ. Antimicrobial and Anti-Adhesive Properties of Carbon Nanotube-Based Surfaces for Medical Applications: A Systematic Review. *iScience.* 2021;24(1):102001. doi:10.1016/j.isci.2020.102001.
96. Sengupta J, Hussain CM. Carbon Nanomaterials to Combat Virus: A Perspective in View of COVID-19. *Carbon Trends.* 2021;2:100019. doi:10.1016/j.cartre.2020.100019.
97. Xia MY, Xie Y, Yu CH et al. Graphene-Based Nanomaterials: The Promising Active Agents for Antibiotics-Independent Antibacterial Applications. *J Control Release.* 2019;307:16–31. doi:10.1016/j.jconrel.2019.06.011.
98. Zhang L, Gui S, Xu Y et al. Colon Tissue-Accumulating Mesoporous Carbon Nanoparticles Loaded With *Musca Domestica* Cecropin for Ulcerative Colitis Therapy. *Theranostics.* 2021;11(7):3417–3438. doi:10.7150/THNO.53105.
99. Mostafavi E, Zare H. Carbon-Based Nanomaterials in Gene Therapy. *OpenNano.* 2022;7:100062. doi:10.1016/J.ONANO.2022.100062.

100. Bates K, Kostarelos K. Carbon Nanotubes as Vectors for Gene Therapy: Past Achievements, Present Challenges and Future Goals. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(15):2023–2033. doi:10.1016/j.addr.2013.10.003.
101. Mostafavi E, Zare H. Carbon-Based Nanomaterials in Gene Therapy. *OpenNano.* 2022;7:100062. doi:10.1016/J.ONANO.2022.100062.
102. Anderson T, Hu R, Yang C, Yoon HS, Yong KT. Pancreatic Cancer Gene Therapy Using an siRNA-Functionalized Single Walled Carbon Nanotubes (SWNTs) Nanoplex. *Biomater Sci.* 2014;2(9):1244–1253. doi:10.1039/c4bm00019f.
103. Wang Y, Sun G, Gong Y, Zhang Y, Liang X, Yang L. Functionalized Folate-Modified Graphene Oxide/PEI siRNA Nanocomplexes for Targeted Ovarian Cancer Gene Therapy. *Nanoscale Res Lett.* 2020;15(1):1–11. doi:10.1186/S11671-020-3281-7.
104. Hasan MT, Campbell E, Sizova O et al. Multi-Drug/Gene NASH Therapy Delivery and Selective Hyperspectral NIR Imaging Using Chirality-Sorted Single-Walled Carbon Nanotubes. *Cancers.* 2019;11(8):1175. doi:10.3390/cancers11081175.
105. Vellayappan MV, Balaji A, Subramanian AP et al. Multifaceted Prospects of Nanocomposites for Cardiovascular Grafts and Stents. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:2785–2803. doi:10.2147/IJN.S80121.
106. Wawrzyńska M, Bil-Lula I, Krzywonos-Zawadzka A et al. Biocompatible Carbon-Based Coating as Potential Endovascular Material for Stent Surface. *Biomed Res Int.* 2018;2018:2758347. doi:10.1155/2018/2758347.
107. Istanbulu OB, Akdogan G. Blood-Repellent and Anti-Corrosive Surface by Spin-Coated SWCNT Layer on Intravascular Stent Materials. *Phys Eng Sci Med.* 2023;46:227–243. doi:10.1007/S13246-022-01212-5.
108. Ovcharenko EA, Seifalian A, Rezvova MA et al. A New Nanocomposite Copolymer Based On Functionalised Graphene Oxide for Development of Heart Valves. *Sci Rep.* 2020;10:5271. doi:10.1038/S41598-020-62122-8.
109. Dehghani F, Khorasani MT, Movahedi M. Fabrication of Polyurethane–Heparinized Carbon Nanotubes Composite for Heart Valves Application. *Mater Chem Phys.* 2022;280:125819. doi:10.1016/J.MATCHEMPHYS.2022.125819.
110. Azimi S, Golabchi A, Nekookar A et al. Self-Powered Cardiac Pacemaker by Piezoelectric Polymer Nanogenerator Implant. *Nano Energy.* 2021;83:105781. doi:10.1016/j.nanoen.2021.105781.
111. Beshchasna N, Saqib M, Kraskiewicz H et al. Recent Advances in Manufacturing Innovative Stents. *Pharmaceutics.* 2020;12(4):349. doi:10.3390/pharmaceutics12040349.
112. Bhong SY, More N, Choppadandi M, Kapusetti G. Review on Carbon Nanomaterials as Typical Candidates for Orthopaedic Coatings. *SN Appl Sci.* 2019;1:76. doi:10.1007/s42452-018-0082-z.
113. Gad MMA, Ali MS, Al-Thobity AM et al. Polymethylmethacrylate Incorporating Nanodiamonds for Denture Repair: In Vitro Study on the Mechanical Properties. *Eur J Dent.* 2022; 16(02): 286–295. doi:10.1055/s-0041-1735792.
114. Al-Harbi FA, Abdel-Halim MS, Gad MM et al. Effect of Nanodiamond Addition on Flexural Strength, Impact Strength, and Surface Roughness of PMMA Denture Base. *J Prosthodont.* 2019;28(1):e417–e425. doi:10.1111/JOPR.12969.
115. Fouda SM, Gad MM, Ellakany P et al. Effect of Low Nanodiamond Concentrations and Polymerization Techniques on Physical Properties and Antifungal Activities of Denture Base Resin. *Polymers.* 2021;13(24):4331. doi:10.3390/polym13244331.
116. Castro-Rojas MA, Vega-Cantu YI, Cordell GA, Rodriguez-Garcia A. Dental Applications of Carbon Nanotubes. *Molecules.* 2021;26(15):4423. doi:10.3390/molecules26154423.
117. 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.

118. Wei M, Li S, Le W. Nanomaterials Modulate Stem Cell Differentiation: Biological Interaction and Underlying Mechanisms. *J Nanobiotechnol.* 2017;15(1):75. doi:10.1186/s12951-017-0310-5.
119. Li N, Zhang X, Song Q et al. The Promotion of Neurite Sprouting and Outgrowth of Mouse Hippocampal Cells in Culture by Graphene Substrates. *Biomaterials.* 2011;32(35):9374–9382. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.08.065.
120. Rauti R, Musto M, Bosi S, Prato M, Ballerini L. Properties and Behavior of Carbon Nanomaterials When Interfacing Neuronal Cells: How Far Have We Come? *Carbon.* 2019;143:430–446. doi:10.1016/j.carbon.2018.11.026.
121. Zhou K, Motamed S, Thouas GA et al. Graphene Functionalized Scaffolds Reduce the Inflammatory Response and Supports Endogenous Neuroblast Migration When Implanted in the Adult Brain. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151589. doi:10.1371/journal.pone.0151589.
122. Zhang Y, Wang S, Yang P. Effects of Graphene-Based Materials on the Behavior of Neural Stem Cells. *J Nanomater.* 2020;2020(1):2519105. doi:10.1155/2020/2519105.
123. Severino FPU, Ban J, Song Q et al. The Role of Dimensionality in Neuronal Network Dynamics. *Sci Rep.* 2016;6(1):1–14. doi:10.1038/srep29640.
124. López-Dolado E, González-Mayorga A, Gutiérrez MC, Serrano MC. Immunomodulatory and Angiogenic Responses Induced by Graphene Oxide Scaffolds in Chronic Spinal Hemisectioned Rats. *Biomaterials.* 2016;99:72–81. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.05.012.
125. Zhao Y, Gong J, Niu C et al. A New Electrospun Graphene-Silk Fibroin Composite Scaffolds for Guiding Schwann Cells. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2017;28(18):2171–2185. doi:10.1080/09205063.2017.1386835.
126. Pi W, Zhang Y, Li L et al. Polydopamine-Coated Polycaprolactone/Carbon Nanotube Fibrous Scaffolds Loaded With Brain-Derived Neurotrophic Factor for Peripheral Nerve Regeneration. *Biofabrication.* 2022;14(3):035006. doi:10.1088/1758-5090/ac57a6.
127. Bramini M, Alberini G, Colombo E et al. Interfacing Graphene-Based Materials With Neural Cells. *Front Syst Neurosci.* 2018;12:12. doi:10.3389/fnsys.2018.00012.
128. Du Z, Wang C, Zhang R, Wang X, Li X. Applications of Graphene and Its Derivatives in Bone Repair: Advantages for Promoting Bone Formation and Providing Real-Time Detection, Challenges and Future Prospects. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:7523–7551. doi:10.2147/IJN.S271917.
129. Nie W, Peng C, Zhou X et al. Three-Dimensional Porous Scaffold by Self-Assembly of Reduced Graphene Oxide and Nano-Hydroxyapatite Composites for Bone Tissue Engineering. *Carbon.* 2017;116:325–337. doi:10.1016/j.carbon.2017.02.013.
130. Daneshmandi L, Holt BD, Arnold AM, Laurencin CT, Sydlik SA. Ultra-Low Binder Content 3D Printed Calcium Phosphate Graphene Scaffolds as Resorbable, Osteoinductive Matrices That Support Bone Formation In Vivo. *Sci Rep.* 2022;12(1):6960. doi:10.1038/S41598-022-10603-3.
131. Li K, Wang C, Yan J et al. Evaluation of the Osteogenesis and Osseointegration of Titanium Alloys Coated With Graphene: An In Vivo Study. *Sci Rep.* 2018;8(1):1843. doi:10.1038/s41598-018-19742-y.
132. Chemla Y, Avraham ES, Markus A et al. Carbon Nanostructures as a Scaffold for Human Embryonic Stem Cell Differentiation Toward Photoreceptor Precursors. *Nanoscale.* 2020;12(36):18918–18930. doi:10.1039/d0nr02256j.
133. Smith AST, Yoo H, Yi H et al. Micro-and Nano-Patterned Conductive Graphene-PEG Hybrid Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering. *Chem Commun.* 2017;53(53):7412–7415. doi:10.1039/c7cc01988b.
134. Saravanan S, Sareen N, Abu-El-Rub E et al. Graphene Oxide-Gold Nanosheets Containing Chitosan Scaffold Improves Ventricular Contractility and Function After Implantation Into Infarcted Heart. *Sci Rep.* 2018;8(1):15069. doi:10.1038/s41598-018-33144-0.
135. Mukherjee S, Sriram P, Barui AK et al. Graphene Oxides Show Angiogenic Properties. *Adv Healthc Mater.* 2015;4(11):1722–1732. doi:10.1002/adhm.201500155.

136. Qian Y, Song J, Zhao X et al. 3D Fabrication With Integration Molding of a Graphene Oxide/Polycaprolactone Nanoscaffold for Neurite Regeneration and Angiogenesis. *Adv Sci*. 2018;5(4):1700499. doi:10.1002/advs.201700499.
137. Kaur G, Narayanan G, Garg D, Sachdev A, Matai I. Biomaterials-Based Regenerative Strategies for Skin Tissue Wound Healing. *ACS Appl Bio Mater*. 2022;5(5):2069–2106. doi:10.1021/acsbm.2c00035.
138. Khalid A, Madni A, Raza B et al. Multiwalled Carbon Nanotubes Functionalized Bacterial Cellulose as an Efficient Healing Material for Diabetic Wounds. *Int J Biol Macromol*. 2022;203:256–267. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.01.146.
139. Du S, Liu B, Li Z et al. A Nanoporous Graphene/Nitrocellulose Membrane Beneficial to Wound Healing. *ACS Appl Bio Mater*. 2021;4(5):4522–4531. doi:10.1021/acsbm.1c00261.

2 TOXIKOKINETIKA A BIOLOGICKÉ INTERAKCE UHLÍKOVÝCH NANOMATERIÁLŮ

Chování uhlíkových nanomateriálů (CNM) v biologických systémech je ovlivňováno mnoha faktory a prozatím neumožňuje formulaci ucelenějších závěrů. Konečný toxický/terapeutický účinek CNM silně závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech, aplikačních (expozičních) cestách, charakteru distribuce v organismu, způsobech prostupu částic do intracelulárního prostředí a na mechanismech indukce buněčné toxicity. Uvedené faktory modulují interakce CNM s buněčnými membránami, buněčnou internalizaci a interference s buněčnými funkcemi. Z pohledu toxikokinetiky mohou CNM zasahovat do všech hlavních pochodů, které ovlivňují osud xenobiotik v organismu (absorpce, distribuce, kumulace, biotransformace a eliminace).

2.1 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI

Uspořádání atomů v nanočásticích (krystalická struktura) významně ovlivňuje funkčnost CNM.¹ Podle krystalické struktury lze rozlišit sférické CNM (například fullereny a nanodiamanty), jednorozměrné CNM (například CNT), dvojrozměrné CNM (například grafen) a trojrozměrné CNM (například nanodiamanty a grafit).²

Velikost a povrch částic významně modifikují jejich absorpci, distribuci, kumulaci, biotransformaci a eliminaci. Velikost částic determinuje vstup CNM do systémové cirkulace po všech formách expozice, mimo aplikaci nitrožilní (v případě agregace částic je determinujícím faktorem velikost agregátů). Menší částice mají obecně vyšší míru translokace s vyšší biologickou dostupností. Po vstupu do systémové cirkulace jsou částice s průměrem větším než 2 μm separovány plicními kapilárními cévami. Menší částice se distribuují do tkání a orgánů (mimo kostní dřev) a velmi malé částice s průměrem pod 100 nm vstupují (vedle ostatních tkání a orgánů) i do kostní dřevě.^{2,3}

Vlastnosti povrchu CNM, reprezentované především nábojem, hydrofilitou/hydrofobitou a funkčními skupinami, určují charakter jejich interakcí s biologickými systémy. Ty mohou mít povahu elektrostatických či hydrofobních interakcí, vodíkových vazeb nebo π - π interakcí.^{4,5} Vysoká interakční aktivita může významně omezovat vstup a chování částic CNM v biologickém systému.

Povrchový náboj významně určuje míru translokace částic do intracelulárního prostředí. Kladně nabitě částice jsou translokovány snadněji než částice neutrální či částice záporně nabitě. Povrchový náboj ovlivňuje rovněž vazbu částic na plazmatické proteiny, jejich průnik

hematoencefalickou bariérou a jejich interakce s krevními buňkami (hemolýzu a agregaci krevních destiček).⁶ Pozitivní povrchový náboj bývá často spojován s toxickými projevy a prozánětlivým potenciálem. Bylo prokázáno, že vyšší hustota pozitivního povrchového náboje úzce souvisí s oxidačním stresem, mitochondriální dysfunkcí a produkcí IL-8.^{7,8}

Rovněž tvar částic významně modifikuje proces jejich přestupu přes buněčnou membránu do intracelulárního prostředí (endocytózu).⁹ Různé tvary částic jsou pohlcovány odlišnými způsoby, přičemž endocytóza sférických CNM je obecně rychlejší než endocytóza jiných tvarů (tyčinky, pláty nebo hranoly).⁶ Tvar má vliv i na variabilitu distribuce absorbovaných částic v organismu. Například fullereny (kulatý tvar) a CNT (tubulární tvar) sice vykazují podobný distribuční obraz, avšak liší se charakterem kumulace v retikuloendoteliálním systému (RES). Oxidované víceštěnné uhlíkové nanotrubičky (MWCNT) a oxid grafenu (GO) s velmi podobnými povrchovými funkcemi prezentují zcela odlišné distribuční obrazy.^{7,10} Tvar částic má rovněž vliv na toxicitu. Například MWCNT (na rozdíl od sférických částic) jsou schopny blokovat autofagický tok.¹¹ Expozice makrofágů RAW246.7 nanočásticím sazí (*carbon black*) a nanografitu vyvolala apoptózu a nekrózu, zatímco MWCNT tento efekt nevykázaly.^{12,13}

Povrchová modifikace/funkcionalizace (kovalentní a nekovalentní formy) se často používá k ovlivnění biologických vlastností/stability, biokompatibility, biologické rozložitelnosti, farmakokinetiky, distribuce, kumulace a toxicity CNM. Povrch může být modifikován širokou škálou atomů a molekul, včetně polymerů.² Mezi typické modifikátory lze zařadit kovy, např. stříbro, zlato, dále polyethylenglykol (PEG), fluorescenční sondy, kyselinu ethylen-diamintetraoctovou (EDTA) atd.^{14,15}

Tvorba korony představuje spontánní adsorpci biomolekul, zejména proteinů, na povrch CNM.¹⁶ Proteinová korona se může skládat ze stovek proteinů, které mění velikost CNM, jejich náboj, morfologii, stav agregace a charakter interakcí s jinými molekulami. Těmito cestami může korona ovlivňovat absorpci, distribuci, kumulaci, biotransformaci i eliminaci CNM.¹⁷ Kromě uvedených typických toxikologických deskriptorů může proteinová korona významně ovlivňovat i aktivitu imunitního systému (aktivaci komplementu) a koagulaci.^{18–20}

Mezi další důležité faktory, které ovlivňují chování CNM v biologických systémech, patří agregace, povrchová energie, chemická reaktivita a biologické prostředí (pH, iontová síla, viskozita a anorganické či organické sloučeniny), stabilita částic, mezimolekulární interakce, tvorba komplexů, proces přenosu náboje a konformační změny biologických makromolekul při interakcích s částicemi.^{7,21}

2.2 APLIKAČNÍ (EXPOZIČNÍ) CESTY A DISTRIBUCE V ORGANISMU

Míra a intenzita toxického účinku CNM úzce souvisí s velikostí dávky a formou expozice. Základními expozičními formami, které přicházejí v životním (pracovním) prostředí obecně v úvahu, jsou inhalace, ingesce a dermální expozice.^{22,23} Nejčastější formou medicínské aplikace bývá naproti tomu aplikace intravenózní, která představuje téměř 100% biologickou dostupnost.²⁴

Inhalační absorpce vede k vysoké akumulaci částic v respiračním traktu s jejich následnou translokací do přilehlých struktur (pohrudnice, plicnice) a do systémové cirkulace. Paralelně dochází k jejich eliminaci z organismu prostřednictvím mukociliárního systému.^{25,26}

K absorpci a následné translokaci do systémové cirkulace dochází rovněž po perorální expozici. Po intraperitoneálním podání se částice dostávají do kontaktu s orgány v dutině břišní a různou měrou prostupují do jejich tkání.^{27,28}

Prostup CNM do tkání závisí na typu buněk, jejich proliferační a regenerační aktivitě a na obranných mechanismech jejich povrchových vrstev (přítomnost povrchově aktivních látek, slzného filmu či hleny a pohyb řasinek).²⁹ Některé tkáně a orgány jsou schopny ve zvýšené míře CNM vylučovat (ledviny, dýchací cesty), jiné, zejména retikuloendoteliální tkáně, CNM kumulují (lymfatické uzliny, plíce, slezina, játra).^{30,31}

Hlavním mechanismem záchytu CNM v RES je pravděpodobně opsonizace. Snížení míry této formy záchytu je možné dosáhnout oslabením interakcí mezi CNM a opsoniny, například cestou redukce povrchového náboje nebo zvýšením hydrofility částice.³² Jednu z neúčinnějších forem funkcionalizace CNM za účelem dosažení proteinové rezistence představuje potažení částic PEG.^{33,34} Výsledky studií uvádějí, že CNM pokryté PEG cirkulují déle a jsou RES zachycovány méně. Další důležitou vlastností CNP je jejich schopnost procházet hemoencefalickou bariérou.^{35,36}

2.3 PROSTUP DO INTRACELULÁRNÍHO PROSTŘEDÍ A MECHANISMY BUNĚČNÉ TOXICITY

Na buněčné úrovni závisí translokace CNM do intracelulárního prostoru především na míře a charakteru interakcí částic s buněčnou membránou, které jsou, společně s interakcemi částic s vnitrobuněčným prostředím hlavními determinujícími faktory buněčné toxicity a genotoxicity.^{6,37}

Mezi nejznámější formy internalizace nanočástic jsou řazeny fagocytóza, makropinocytóza a mikropinocytóza, endocytóza závislá na klatrinu, endocytóza nezávislá na klatrinu, endocytóza závislá na kaveolinu, difúze atd.^{38–40} CNM tak mohou pronikat přímo do cytoplazmy, mohou do ní být uvolňovány z endozomů nebo mohou být internalizovány do vezikul vytvořených z buněčné membrány během endocytózy (endozomy, fagozomy a pinozomy).^{41,42}

V intracelulárním prostředí CNM interagují s mitochondriemi, endoplazmatickým retikulem a jádrem. Mohou ovlivňovat genom a interferovat se signálními cestami. V závislosti na charakteru CNM dochází v intracelulárním prostředí k jejich modifikaci. CNM (či jejich modifikované formy) jsou z buněk odstraňovány exocytózou.⁴³

Mezi nejznámější mechanismy buněčné toxicity (indukované CNM) patří narušování buněčných membrán, včetně membrán organel a jádra (poškození buněčné integrity a funkcí organel), tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS), interakce s enzymy, změny stability buněčného skeletu, změny buněčného cyklu, redukce mitózy, indukce apoptózy, interakce s DNA, indukce genové transkripce (prozánětlivé cytokiny) a epigenetických změn, změny replikace a translace, narušení opravných mechanismů DNA, spuštění zánětlivé odpovědi, sestavování multiproteinových komplexů (inflamozomů), produkce prozánětlivých cytokinů, uvolňování alarminů a prezentace intracelulárních antigenů.^{12,44}

2.4 ZÁVĚR

CNM představují vysoce heterogenní skupinu látek, jejíž členové se výrazně odlišují svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, a hlavně chováním v živých organismech. Mají různou schopnost pronikat do organismu a tkání, interagovat s buňkami a vstupovat do nich, ovlivňovat buněčnou aktivitu, a jsou také různě úspěšně eliminovány z organismu, tj. někdy může docházet ke tkáňové kumulaci. Velmi pestrá paleta interakcí s vnějším i vnitřním prostředím se tak stává základem pro jejich široké využití CNM nejen v medicíně, ale i v dalších oborech lidské činnosti. Zároveň s tím je však nutné mít na paměti, že CNM mohou vykazovat také určitou míru toxicity a vést k poškození životního prostředí, flóry a fauny včetně člověka. V následujících kapitolách bychom se oběma aspekty chtěli věnovat podrobněji.

2.5 LITERATURA

1. Nasir S, Hussein MZ, Zainal Z, Yusof NA. Carbon-Based Nanomaterials/Allotropes: A Glimpse of Their Synthesis, Properties and Some Applications. *Mater.* 2018;11(2):295. doi:10.3390/ma11020295.
2. Zarzycki PK. *Pure and Functionalized Carbon-Based Nanomaterials: Analytical, Biomedical, Civil, and Environmental Engineering Applications.* Routledge; 2022. ISBN: 9780367532147.
3. Rahmati M, Mozafari M. Biological Response to Carbon-Family Nanomaterials: Interactions at the Nano-Bio Interface. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:4. doi:10.3389/fbioe.2019.00004.
4. Lee A, Beak S, Lee S et al. Hydrophilic/Hydrophobic Characteristics on the Carbon Nanotube Buckypapers With Various Mechanical and Chemical Manufacture Process. *Diam Relat Mater.* 2020;110:108152. doi:10.1016/J.DIAMOND.2020.108152.
5. Camilli L, Capista D, Eramo P et al. Synthesis of Hydrophilic Carbon Nanotube Sponge via Post-Growth Thermal Treatment. *Nanotechnology.* 2022;33(24):245707. doi:10.1088/1361-6528/AC5BB7.
6. Sousa De Almeida M, Susnik E, Drasler B, Taladriz-Blanco P, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B. Understanding Nanoparticle Endocytosis to Improve Targeting Strategies in Nanomedicine. *Chem Soc Rev.* 2021;50(9):5397–5434. doi:10.1039/d0cs01127d.
7. Feng L, Liu Z. Biomedical Applications and Toxicology of Carbon Nanomaterials. In: Chen C, Wang H, eds. *Biomedical Applications of Carbon Nanomaterials.* Wiley-VCH; 2016:131–162. doi:10.1002/9783527692866.ch5.
8. Weiss M, Fan J, Claudel M et al. Density of Surface Charge Is a More Predictive Factor of the Toxicity of Cationic Carbon Nanoparticles Than Zeta Potential. *J Nanobiotechnology.* 2021;19(1):5. doi:10.1186/s12951-020-00747-7.
9. Rauti R, Musto M, Bosi S, Prato M, Ballerini L. Properties and Behavior of Carbon Nanomaterials When Interfacing Neuronal Cells: How Far Have We Come? *Carbon.* 2019;143:430–446. doi:10.1016/J.CARBON.2018.11.026.
10. Lin Z, Zhang H, Huang J, et al. Biodistribution of Single-walled Carbon Nanotubes in Rats, *Toxicology Research.* 2014; 3(6): 497–502. doi.org/10.1039/c3tx50059d.
11. 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.
12. 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):1–27. doi:10.1186/S12989-019-0299-Z.

13. Figarol A, Pourchez J, Boudard D et al. In Vitro Toxicity of Carbon Nanotubes, Nano-Graphite and Carbon Black, Similar Impacts of Acid Functionalization. *Toxicol Vitro*. 2015;30(1):476–485. doi:10.1016/j.tiv.2015.09.014.
14. Speranza G. Carbon Nanomaterials: Synthesis, Functionalization and Sensing Applications. *Nanomater*. 2021;11(4):967. doi:10.3390/nano11040967.
15. Díez-Pascual AM. Chemical Functionalization of Carbon Nanotubes With Polymers: A Brief Overview. *Macromol*. 2021;1(2):64–83. doi:10.3390/macromol1020006.
16. Bilardo R, Traldi F, Vdovchenko A, Resmini M. Influence of Surface Chemistry and Morphology of Nanoparticles on Protein Corona Formation. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2022;14(4):e1788. doi:10.1002/WNAN.1788.
17. Yu Q, Zhao L, Guo C, Yan B, Su G. Regulating Protein Corona Formation and Dynamic Protein Exchange by Controlling Nanoparticle Hydrophobicity. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:210. doi:10.3389/fbioe.2020.00210.
18. Pinals RL, Yang D, Rosenberg DJ et al. Protein Corona Composition and Dynamics on Carbon Nanotubes in Blood Plasma and Cerebrospinal Fluid. *bioRxiv*. Published January 13, 2020. doi:10.1101/2020.01.13.905356.
19. Kenry. Understanding the Hemotoxicity of Graphene Nanomaterials Through Their Interactions With Blood Proteins and Cells. *J Mater Res*. 2018;33(1):44–57. doi:10.1557/jmr.2017.388.
20. Palmieri V, Perini G, De Spirito M, Papi M. Graphene Oxide Touches Blood: In Vivo Interactions of Bio-Coronated 2D Materials. *Nanoscale Horiz*. 2019;4(2):273–290. doi:10.1039/C8NH00318A.
21. Gattoo MA, Naseem S, Arfat MY, Mahmood Dar A, Qasim K, Zubair S. Physicochemical Properties of Nanomaterials: Implication in Associated Toxic Manifestations. *Biomed Res Int*. 2014;2014(1):498420. doi:10.1155/2014/498420.
22. Podkolodnaya OA, Ignatieva EV, Podkolodnyy NL, Kolchanov NA. Routes of Nanoparticle Uptake Into Mammalian Organisms, Their Biocompatibility and Cellular Effects. *Biol Bull Rev*. 2012;2(4):279–289. doi:10.1134/s2079086412040068.
23. Paramasivam G, Palem VV, Meenakshy S et al. Advances on Carbon Nanomaterials and Their Applications in Medical Diagnosis and Drug Delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2024;241:114032. doi: 10.1016/j.colsurfb.2024.114032.
24. Holmannova D, Borsky P, Svadlakova T, Borska L, Fiala Z. Carbon Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Appl Sci*. 2022;12(15):7865. doi:10.3390/APP12157865.
25. Nemmar A, Hoet PHM, Vanquickenborne B et al. Passage of Inhaled Particles Into the Blood Circulation in Humans. *Circulation*. 2002;105(4):411–414. doi:10.1161/hc0402.104118.
26. Laux P, Riebeling C, Booth AM et al. Biokinetics of Nanomaterials: The Role of Biopersistence. *NanoImpact*. 2017;6:69–80. doi:10.1016/J.IMPACT.2017.03.003.
27. Jacobsen NR, Møller P, Clausen PA et al. Biodistribution of Carbon Nanotubes in Animal Models. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2017;121:30–43. doi:10.1111/bcpt.12705.
28. Chenthamara D, Subramaniam S, Ramakrishnan SG et al. Therapeutic Efficacy of Nanoparticles and Routes of Administration. *Biomater Res*. 2019;23(1). doi:10.1186/s40824-019-0166-x.
29. Zhang Y, Bai Y, Jia J et al. Perturbation of Physiological Systems by Nanoparticles. *Chem Soc Rev*. 2014;43(10):3762–3809. doi:10.1039/c3cs60338e.
30. Mortensen NP, Snyder RW, Pathmasiri W, Moreno Caffaro M, Sumner SJ, Fennell TR. Intravenous Administration of Three Multiwalled Carbon Nanotubes to Female Rats and Their Effect on Urinary Biochemical Profile. *J Appl Toxicol*. 2022;42(3):409–422. doi:10.1002/jat.4226.
31. Zhang A, Meng K, Liu Y et al. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of Nanocarriers in Vivo and Their Influences. *Adv Colloid Interface Sci*. 2020;284:102261. doi:10.1016/J.CIS.2020.102261.
32. Kotagiri N, Kim JW. Stealth Nanotubes: Strategies of Shielding Carbon Nanotubes to Evade Opsonization and Improve Biodistribution. *Int J Nanomedicine*. 2014;9(Supplement 1):85–105. doi:10.2147/IJN.S51854.

33. Yang ST, Luo J, Zhou Q, Wang H. Pharmacokinetics, Metabolism and Toxicity of Carbon Nanotubes for Bio-Medical Purposes. *Theranostics*. 2012;2(3):271–282. doi:10.7150/thno.3618.
34. Tang Y, Wang X, Li J et al. Overcoming the Reticuloendothelial System Barrier to Drug Delivery With a “Don’t-Eat-Us” Strategy. *ACS Nano*. 2019; 13(11):13015–13026. doi:10.1021/ACS.NANO.9B05679.
35. Hasannejad-Asl B, Pooresmaeil F, Choupani E et al. Nanoparticles as Powerful Tools for Crossing the Blood-Brain Barrier. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2022;22(1):18–26. doi:10.2174/187152732166622022092655.
36. Gonzalez-Carter D, Goode AE, Kiryushko D et al. Quantification of Blood–Brain Barrier Transport and Neuronal Toxicity of Unlabelled Multiwalled Carbon Nanotubes as a Function of Surface Charge. *Nanoscale*. 2019;11(45):22054–22069. doi:10.1039/C9NR02866H.
37. Augustine R, Hasan A, Primavera R, Wilson RJ, Thakor AS, Kevadiya BD. Cellular Uptake and Retention of Nanoparticles: Insights on Particle Properties and Interaction With Cellular Components. *Mater Today Commun*. 2020;25:101692. doi:10.1016/J.MTCOMM.2020.101692.
38. Foroozandeh P, Aziz AA. Insight Into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. *Nanoscale Res Lett*. 2018;13(1):1–12. doi:10.1186/S11671-018-2728-6.
39. Mosquera J, García I, Liz-Marzán LM. Cellular Uptake of Nanoparticles Versus Small Molecules: A Matter of Size. *Acc Chem Res*. 2018;51(9):2305–2313. doi:10.1021/ACS.ACCOUNTS.8B00292.
40. Singh U, Teja AG, Walia S, Vaswani P, Dalvi S, Bhatia D. Water Stable, Red Emitting, Carbon Nanoparticles Stimulate 3D Cell Invasion Via Clathrin-Mediated Endocytic Uptake. *Nanoscale Adv*. 2022;4(5):1375–1386. doi:10.1039/D1NA00813G.
41. Zhao J, Stenzel MH. Entry of Nanoparticles Into Cells: The Importance of Nanoparticle Properties. *Polym Chem*. 2018;9(3):259–272. doi:10.1039/C7PY01603D.
42. Li Y, Shi Z, Radauer-Preiml I et al. Immunotoxicity of Carbon-Based Nanomaterials, Starring Phagocytes. *Int J Mol Sci*. 2022;23(16):8889. doi:10.3390/IJMS23168889.
43. Oh N, Park JH. Endocytosis and Exocytosis of Nanoparticles in Mammalian Cells. *Int J Nanomedicine*. 2014;9(Supplement 1):51–63. doi:10.2147/IJN.S26592.
44. Marano F, Rodrigues-Lima F, Dupret JM, Baeza-Squiban A, Boland S. Cellular Mechanisms of Nanoparticle Toxicity. In: Bhushan B, ed. *Encyclopedia of Nanotechnology*. Springer; 2016: 498–505. doi:10.1007/978-94-017-9780-1_175.

3 RESPIRAČNÍ TOXICITA

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

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

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

3.1 IN VITRO STUDIE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.2 IN VIVO STUDIE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.3 PRACOVNÍ EXPOZICE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.4 ZÁVĚR

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

3.5 LITERATURA

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

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

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

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

4 KARDIOVASKULÁRNÍ TOXICITA

Kardiovaskulární onemocnění jsou řazena mezi nejčastější příčiny morbidity a mortality v populaci. Mezi známé rizikové faktory vzniku a progresu těchto onemocnění lze v posledních desetiletích řadit i expozici uhlíkovým nanomateriálům (CNM). CNM vstupují do kardiovaskulárního systému většinou inhalačně, perorálně nebo transdermálně (průnik skrze tkáň do cévního řečiště). V případech terapeutického použití přichází pochopitelně v úvahu i vstup intravenózní. CNM mohou interagovat s endotelem cév a srdečních tkání. Mezi poškozující vlivy CNM patří zvýšená hladina oxidačního stresu, indukce zánětu, interakce s iontovými kanály a zvýšená úroveň apoptózy, popř. nekrózy buněk. Uvedené procesy vedou ke kardiovaskulárním dysfunkcím, arytmiím, změnám krevního tlaku, vazokonstrikci, ateroskleróze, zvýšené koagulaci, hemolýze a k nežádoucí angiogenezi. Závažnou skutečností je také kumulace CNM v kardiovaskulárním systému.^{1,2}

Na druhou stranu ale nutno zmínit také výhody, které by pro kardiovaskulární systém mohly CNM představovat. Konkrétně se jedná o využití některých CNM jako scaffoldů, umožňujících diferenciaci buněk do podoby kardiomyocytů a podporujících jejich růst a generování elektrických impulzů. Takto vytvořené buněčné linie, či dokonce tkáň, by v budoucnu mohly být klíčovou součástí procesu regenerace srdeční tkáň.³

4.1 IN VITRO STUDIE

Většina *in vitro* studií byla prováděna na endoteliálních buňkách lidské pupečnickové žíly (*human umbilical vein endothelial cells*; HUVEC), na kardiomyocytech a na buňkách hladké svaloviny, která je součástí cévních stěn. Zajímavým jevem je diverzifikace biologické odpovědi podle typu buněk. Zatímco při expozici vaskulárních buněk převažují toxické účinky CNM, v případě kardiomyocytů se jedná spíše o účinky protektivní, ve smyslu podpory jejich proliferace a jejich funkcí.

V *in vitro* experimentech byly nejčastěji sledovány účinky grafenu, modifikací grafenu a uhlíkových nanotrubic (CNT).

Autoři Hashemi et al. exponovali buněčnou kulturu HUVEC suspenzi oxidu grafenu (GO) a grafenovým kvantovým tečkám (GQD) 4, 24 a 48 hodin (koncentrace 7,8, 15,6, 31,2, 62,5 a 125 µg/ml). Oba typy nanočástic, zejména ve vyšších koncentracích, snižovaly viabilitu buněk v důsledku narušení membránového potenciálu mitochondrií a následné indukce dějů vedoucích ke spuštění apoptózy. Po čtyřhodinové expozici buněk koncentrací 15 µg/ml

(GO i GQD) byla pozorována zvýšená exprese miR-21 (nekódující mikroRNA zapojená do karcinogeneze) a snížená exprese proapoptotického proteinu BAX, homologu fosfatázy a TENsinu (*phosphatase and TENsin homolog*, PTEN). Snížená exprese antiapoptotické molekuly Bcl2 byla pozorována jen u expozice GO. Souhrnně lze říci, že expozice GO indukovala významnější změny v expresích biomolekul.⁴

Kultivace buněčné kultury HUVEC s GO (25 a 50 µg/ml; 24 a 48 h) v experimentu autorů Cibecchini et al. vedla ke vzniku buněčných agregátů, k nárůstu hladiny oxidačního stresu, k poškození mitochondrií a k narušení struktury cytoskeletu. V důsledku těchto změn byla narušena schopnost buněk migrovat a vytvářet kapilární struktury. Byla tedy narušena angiogeneze.⁵

Grafen a GO mohou poškozovat i erytrocyty. Autoři Liao et al. zjistili u obou druhů CNM hemolytickou aktivitu, přičemž významná míra hemolýzy se začala projevovat přibližně od koncentrace 50 µg/ml. Míra hemolýzy s rostoucí expoziční koncentrací souvisela s velikostí částic GO. Nejvyšší míra hemolýzy byla pozorována u nejmenších částic a dosahovala zhruba 90 %.⁶

Toxicita GO byla studována také na kardiomyoblastech (H9c2). Arbo et al. exponovali kardiomyoblasty po dobu 24 hodin koncentracím GO 20, 40, 60, 80 a 100 µg/ml. V souvislosti s expozicí pozorovali u buněk narušení mitochondriálních funkcí, zvýšení produkce volných kyslíkových radikálů a poškození struktury DNA.⁷ V obdobné studii exponovali Zhang et al. buněčnou kulturu H9c2 GO a redukovanému GO (50 µg/ml / 24 h). Oba CNM (silnější účinek vykazoval rGO) zvyšovaly míru apoptózy a hladinu laktátdehydrogenázy. Byla narušena funkce mitochondrií a zvýšena hladina oxidačního stresu.⁸

V rámci kardiiovaskulárního systému je velmi zajímavá i oblast hematoencefalické bariéry, která je nezbytná jak pro ochranu, tak výživu nervové tkáně. Narušení cév může mít závažné následky. Je tedy důležité zjistit, zda CNM mohou narušit i cévy/kapiláry v této lokalitě.

Autoři Rosas-Hernandez et al. zjistili, že nanočástice grafenu mohou narušovat hematoencefalickou bariéru (HEB). Zvýšená permeabilita HEB je rizikovým faktorem pro poškození centrální nervové tkáně, což má za následek zrychlení degeneračních procesů. V experimentu uvedených autorů byly grafenu (koncentrace 50 a 100 µg/ml) exponovány mozkové mikrovaskulární endoteliální buňky (*brain microvascular endothelial cells*, BMEC). Tyto buňky jsou součástí HEB a u obou byly po expozici pozorovány zvýšené hladiny laktátdehydrogenázy, zvýšený výskyt nekrotických buněk a zvýšená permeabilita endotelu. Vyšší dávky způsobovaly fragmentaci DNA, zvýšenou míru apoptózy, a naopak sníženou expresi okcludinu (proteinu těsných mezibuněčných spojů).⁹

Autoři Ardoña et al. analyzovali poškození HEB po expozici grafenu, redukovanému GO (rGO), částečně redukovanému GO a GO (5, 10, 25 a 50 µg/ml). Více oxidované formy grafenu indukovaly významnější poškození a modifikovaly organizaci cytoskeletu (zvyšovaly endotelovou permeabilitu a tvorbu protruzí a filopodií buněk).¹⁰ Toxické vlivy na HEB byly prokázány také u mnohovrstevných nanotrubic (MWCNT). Autoři Yang et al. se zaměřili na vliv expozice MWCNT na permeabilitu HEB a za tímto účelem kultivovali kulturu BMEC s MWCNT (20 µg/ml / 24 h). Obdobně jako ve studiích zaměřených na expozici grafenu byla i zde pozorována zvýšená permeabilita HEB a snížená exprese okcludinu. Vedle toho autoři zjistili změny dalších faktorů, které obecně zvyšují buněčnou permeabilitu. Konkrétně se jednalo o narušení exprese zonula occludens-1 (periferního membránového proteinu, který patří do rodiny proteinů charakterizujících těsné buněčné spojení; ZO-1) a o zvýšenou aktivitu hemikanálů, které podporují expresi konexinu 43 a pannexinu. Karboxylované formy MWCNT uvedené změny neindukovaly.¹¹

Dále budeme pokračovat toxicitou uhlíkových nanotrubic: Zhao et al. studovali vliv MWCNT na buněčnou kulturu HUVEC. V jejich experimentu byly použity MWCNT s různým průměrem (XFM4 /10,33 ± 3,50 nm/ < XFM22 /21,55 ± 5,66 nm/ < XFM34 /38,80 ± 13,07 nm/; koncentrace 0, 4, 8, 16, 32 a 64 µg/ml / 24 h). Z výsledků vyplývá, že MWCNT snižovaly, v závislosti na koncentraci, viabilitu buněk. Nejsilnější účinek byl zaznamenán v případě expozice XFM4. U této expozice byla také zjištěna nejvyšší exprese IL-6, solubilních vaskulárních buněčných adhezních molekul 1 (VCAM-1) a volných kyslíkových radikálů (ROS). V experimentu byl zjištěn i nárůst endoplazmaticko-retikulárního stresu a snížení míry autofagie. Vlivem expozice MWCNT došlo rovněž k zvýšení adheze THP-1 monocytů na HUVEC. Studie prokázala, že toxický účinek MWCNT závisí jak na dávce, tak i na průměru částic.¹²

Studie autorů Longa et al. byla zaměřena na vztah mezi délkou MWCNT (0,5–2 µm a 10–30 µm) a jejich účinky na buněčnou kulturu HUVEC. Expozice zahrnovala koncentrace 2, 4, 8, 16 a 32 µg/ml (doba expozice 24 hodin). Oba typy MWCNT byly buňkami internalizovány s lokalizací CNM v jádru a v mitochondriích. Kratší MWCNT vykazovaly celkově nižší míru toxicity. Poněkud překvapivé bylo zjištění, že MWCNT neindukovaly produkci ROS, nicméně snižovaly koncentraci antioxidantního glutathionu. Delší MWCNT významně zvyšovaly expresi prozánětlivých cytokinů IL-6, TNF-α, solubilních intercelulárních adhezních molekul 1 (ICAM-1) a solubilních VCAM-1. Zvyšovaly rovněž adhezivitu THP-1 monocytů.¹³

Cao et al. studovali vaskulární účinky dvou typů MWCNT u myši s apolipoproteinem E(-/-), myši divokého typu a kultivovaných buněk. Myši ApoE(-/-) měly po pěti intracheálních instilacích MWCNT (25,6 µg/myš týdně po dobu 5 týdnů) zrychlenou progresi plaku v aortě. Expozice byla spojena s plicním zánětem, peroxidací lipidů, zvýšenou hladinou oxidativního stresu a se zvýšenou expresí genů reparačního mechanismu DNA a vaskulární aktivační odpovědi. Expozice MWCNT v kultivovaných lidských endoteliálních buňkách (HUVEC) zvyšovala expresi buněčných adhezních molekul (ICAM1 a VCAM1) a adhezi THP-1 na HUVEC. Expozice oběma typům MWCNT byla spojena se zvýšenou akumulací lipidů v pěnových buňkách odvozených od monocytů. Z výsledků vyplývá, že expozice MWCNT je spojena se zrychlenou progresí aterosklerózy, která by mohla souviset jak se zvýšenou adhezí monocytů na endotel, tak s transformací monocytů na pěnové buňky (zprostředkovanou oxidativním stresem).¹⁴

Dalším typem buněk, který v *in vitro* experimentech může reprezentovat kardiovaskulární systém, jsou buňky hladké svaloviny aorty (HASMC). Autoři Yang et al. exponovali tyto buňky MWCNT a karboxylovaným MWCNT (4, 8, 16, 32 a 64 µg/ml / 24 h). Obě formy MWCNT snižovaly aktivitu mitochondrií a zvyšovaly kumulaci lipidů v buňkách. Významně zvyšovaly také hladiny mRNA markerů endoplazmaticko-retikulárního stresu; mRNA pro DDIT3 a XBP-1 a mRNA proteinů zapojených do lipogeneze (SREBF 1, SREBF2, FASN). Autoři uvádějí, že kumulaci lipidů lze potlačit preexpozicí buněk inhibitorům endoplazmaticko-retikulárního stresu nebo antioxidantům. Z výsledků je zřejmé, že MWCNT poškozují hladkou svalovinu aorty a podporují progresi aterosklerózy.¹⁵

MWCNT mají protrombotické účinky a mohou intrinsickou cestou aktivovat koagulaci. Interagují primárně s faktorem IXa. Výzkumníci v kolektivech Andrewa Burkeho a Alana Gaffneyho popsali aktivaci trombocytů a tvorbu trombů v důsledku expozice různým modifikacím MWCNT. První tým použil 10, 50 a 100 µg/ml suspenze MWCNT, karboxylovaných MWCNT a amidovaných MWCNT, na jejichž povrchu byl vázán polyetylen glykol nebo

pluronic F-27 $/(C_3H_6O \cdot C_2H_4O)_x/$. Z výsledků vyplývá, že srážecí čas nejvíce zkracovaly karboxylované MWCNT. Ve studii s obdobným designem použili Gaffney et al. MWCNT s polyvinylovým povrchem. Autoři našli zvýšenou agregaci trombocytů, která se v související *in vivo* studii projevila jako zvýšená tvorba trombů.^{16,17}

Protrombogenní účinky byly potvrzeny také u jednovrstvých uhlíkových nanotrubic (SWCNT). Ve studii Holzera et al. SWCNT indukovaly expresi P-selektinu (membránového glykoproteinu trombocytů), což vedlo ke zvýšené tvorbě trombocyto-granulocytárních komplexů.¹⁸

Jiná studie (Rodríguez-Yáñez et al.) byla zaměřena na fibrinolytické účinky SWCNT. Buněčná kultura HUVEC byla exponována suspenzi SWCNT o koncentracích 5, 25 a 50 $\mu\text{g/ml}$. Autoři uvádějí, že již koncentrace 5 $\mu\text{g/ml}$ významně zvyšovala produkci volných radikálů; vyšší koncentrace snižovaly i viabilitu. Koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$ zvyšovala expresi genů asociovaných s fibrinolýzou (produkce tkáňového aktivátoru tromboplastinu a urokinázy) a expresi genu inhibitoru aktivátoru plazminogenu 1. Z výsledků je zřejmé, že SWCNT mohou poškozovat endotel a narušovat fibrinolýzu.¹⁹

Vedle buněk kardiiovaskulárního systému může expozice CNM ovlivňovat i složky krve. Autoři Yuvaraj et al. zjistili, že expozice MWCNT indukuje morfologické změny erytrocytů (zvyšuje počet echinocytů) a snižuje jejich viabilitu. Morfologické změny zasahují do reologických vlastností krve a zvyšují riziko kardiiovaskulárních onemocnění. V experimentu výše uvedených autorů byly sledovány účinky MWCNT a hydroxylovaných MWCNT o koncentracích 5, 25, 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$. Nejvyšší míra erytrocytárního poškození byla zjištěna u nejvyšších koncentrací MWCNT.²⁰

Dalšími typy CNM se zabývalo výrazně méně studií. Jednou z nich je například práce Solarska et al., v níž byla sledována cytotoxicita nanodiamantů (ND) vůči buněčné kultuře HUVEC (expozice 24, 48 a 72 h; koncentrace 2, 20 a 100 $\mu\text{g/ml}$). Autoři uvádějí, že vyšší koncentrace ND byly schopné navodit apoptózu a nekrózu buněk již po 24 hodinách.²¹ Předmětem studie autorů Ren et al. byla analýza vlivu expozice fullerenu (C_{60}) a jeho hydroxylovaného derivátu ($C_{60}\text{-OH}$) na expresi β_2 -adrenergního receptoru $\beta_2\text{AR}$. Tento receptor je exprimován v kardiiovaskulárním systému a jeho aktivace či blokace může mít významné dopady na funkce systému. Z výsledků vyplývá, že C_{60} i $C_{60}\text{-OH}$ mohou sice měnit lokální strukturu receptoru (hlavně distorzi helixu 4), nicméně tyto změny nedosahovaly stupně statistické významnosti. Dále bylo zjištěno, že C_{60} blokuje vazbu ligandů receptorového kanálu. Zdá se tedy, že fulleren a jeho deriváty zřejmě disponují jistou mírou toxického potenciálu vůči buňkám exprimujícím $\beta_2\text{AR}$.²²

Doposud uvedené studie se zabývaly pouze negativním dopadem expozice CNM na buňky kardiiovaskulárního systému. Závěrem této kapitoly je však nutno se zmínit také o jejich pozitivních vlivech. Je známo, že CNM podporují diferenciaci kardiomyocytů a přispívají k regeneraci poškozené srdeční tkáně. Například Bahrami et al. prezentovali scaffold s trojrozměrnou grafenovou pěnou, který podporoval adhezi a růst neonatálních kardiomyocytů. Přítomnost grafenu rovněž posílala expresi genů asociovaných s kontrakcí a relaxací kardiomyocytů a genů kódujících proteiny mezibuněčných spojů (troponin T, konexin 43).²³

Autoři Zhao et al. popsali scaffold připravený z rGO v kombinaci s hedvábným fibrinem. Materiál scaffoldu dokázal rekonstituovat myokardiální elektrické mikroprostředí, které je nezbytné pro regeneraci tkání po infarktu myokardu (podpora přežití kardiomyocytů).²⁴ Dobrou mírou biokompatibility GO a buněk hladké svaloviny krysí aorty (A7r5) prokázali ve své studii autoři Ren et al. Jak plyne z jejich výsledků, expozice GO neměnila viabilitu buněk,

expresi buněčných markerů ani buněčnou migraci. Naopak, malé vločky GO významně zvyšovaly proliferaci hladkosvalových buněk.²⁵

O scaffoldech a jejich využití v regenerační medicíně se můžete více dočíst v kapitole „Biomedicínské využití uhlíkových nanomateriálů“.

4.2 IN VIVO STUDIE

Díky své komplexitě přináší *in vivo* studie objektivnější pohled na účinky CNM a nutno přiznat, že ne vždy se jejich výsledky shodují s výsledky získanými ze studií *in vitro*. Dosud provedené studie *in vivo* se primárně zaměřovaly na zjišťování kardiotoxicity v podobě indukce kardiovaskulárních onemocnění či jejich progresu. Jednalo se například o aterosklerózu, kardiomyopatie nebo funkční poruchy myokardu.

Ve studii Zhanga et al. vyvolala čtrnáctidenní intravenózní expozice GO a rGO (4 mg/kg) u myši významný nárůst hladin oxidačního stresu a malondialdehydu a významný pokles hladin glutathionperoxidázy, superoxiddismutázy a myokardiálních enzymů (laktátdehydrogenázy, aspartátaminotransferázy, Na⁺/K⁺-ATPázy a Ca²⁺/Mg²⁺-ATPázy) v srdeční tkáni. Oba typy CNM indukovaly apoptózu kardiomyocytů (rGO vykazovala vyšší míru toxicity).⁸ Autoři Bangepparagari et al. sledovali vliv expozice GO na embryogenezi dánia pruhovaného (*Brachydanio rerio*). Součástí studie byla i analýza vlivu na kardiovaskulární systém. Vyšší expoziční koncentrace GO (0,4–1 mg/ml) zvyšovaly embryonální mortalitu, způsobovaly kardiovaskulární defekty, ovlivňovaly srdeční frekvenci a poškozovaly hemoglobinizaci.²⁶

V posledních letech se značně rozšířily biomedicínské aplikace GQD, zaměřené především na diagnostiku a léčbu rakoviny. Řada studií hodnotila GQD v biomedicínské oblasti, nicméně, pouze několik studií bylo orientováno na hodnocení možné toxicity. Jednou z těchto studií je práce Barros et al., která se zabývala dopadem vysokých koncentrací GQD na mikrocirkulaci zdravého zvířecího modelu. Jak plyne z dat, opakovaná aplikace GQD (intra-peritoneálně, dávka 1 g/kg) způsobila nevratné poškození mikrocirkulace (po sedmi dnech byla pozorována její úplná destrukce). Kromě toho GQD vykazovaly i hemolytickou aktivitu v lidských erytrocytech.²⁷

V kapitole zaměřené na *in vitro* experimenty byla zmíněna studie autorů Holzera et al. Vedle pokusů *in vitro* studie zahrnovala také pokus *in vivo*, ve kterém byly myšim opakovaně aplikovány SWCNT (1 mg/kg). Expozice SWCNT měla za následek zvýšenou tvorbu arteriální trombů. Výsledek byl v souladu s výsledkem experimentu *in vitro*, který prokázal protrombotický efekt SWCNT.¹⁸

Zdá se, že MWCNT mohou alterovat i morfologii a funkce kardiovaskulárního systému (funkce autonomního nervového systému). Například ve studii Zhenga et al. modifikovaly inhalačně podávané MWCNT (5 h / 5 mg/m³) srdeční rytmus pohybujících se potkanů. Autoři měřili EKG a krevní tlak před expozicí, v jejím průběhu a po jejím ukončení. Inhalační expozice vedla ke zvyšování systolického i diastolického tlaku a ke snižování tepové frekvence potkanů.²⁸

Intratracheální expozice MWCNT spontánně hypertenzním a normotenzním potkanům vedla ve studii Chena et al. k poškození cév, nárůstu krevního tlaku a tepové frekvence a ke zvýšeným hladinám endotelinu 1 a angiotenzin konvertujícího enzymu (ACE). Vyhodnocení bylo prováděno 7 a 30 dní po expozici (jednou denně / 4 po sobě jdoucí dny; celková dávka 1,2 mg/kg).²⁹

Nárůst klidové tepové frekvence vlivem expozice MWCNT pozorovali také autoři Hosseinpour et al., kteří intraperitoneálně aplikovali karboxylované MWCNT potkanům (v dávce 1 mg/kg). Autoři se domnívají, že elevace tepové frekvence nebyla vyvolána změnami autonomního nervového systému, ale že se jedná o následek blokování draslíkových kanálů.³⁰ Modifikaci aktivit iontových kanálů popsali také Tan et al. Ve své práci popsali *in vitro* expozici izolovaných kardiomyocytů (HEK293) MWCNT, která vedla k rozpadu Kv4 v buňkách exprimujících Kv4.2/4.3 a KChIP2 a podporovala obnovu z inaktivace v případech, kdy byly Kv4.2 nebo Kv4.3 exprimovány samostatně. Při delší expozici (6 h) MWCNT snižovaly hustotu Kv4.2, expresi Kv4.2/Kv4.3 (ale ne KChIP2) a omezovala přenos směrem k plazmatické membráně. Intravenózní podání MWCNT (2 mg/potkana) vyvolalo atrioventrikulární (AV) blok, a dokonce i srdeční asystolii (nebyla však pozorována tachyarytmie). Analýza vzorku srdeční tkáně odhalila, že MWCNT indukovaly zánět myokardu (bez tvorby koronárních sraženin).³¹ Výše uvedené studie se shodují v závěrech, že CNM mohou ovlivňovat srdeční funkce ve smyslu snižování/zvyšování tepové frekvence a zvyšování krevního tlaku.

Zajímavou studii prezentovali Thompson et al. Intratracheální aplikace MWCNT a funkcionalizovaných MWCNT (karboxylované a nitrogenované) v jejich experimentu interferovala s adenosinergickou signalizací, což vedlo k exacerbaci ischemicko-reperfučního poškození srdce. K tomuto jevu dochází například při infarktu myokardu po obnovení průtoku krve cévami. Důvodem je masivní nárůst oxidačního stresu jak v době ischemie, tak v době reperfúze. Myšim, které prodělaly ischemicko-reperfuční poškození, byly po 24 hodin podány suspenze MWCNT a funkcionalizovaných MWCNT (koncentrace 1 µg/ml) a po dalších 24 hodin byl zjišťován rozsah poškození srdeční tkáně. U všech testovaných MWCNT došlo k navýšení rozsahu poškození (největší poškození bylo zjištěno u nitrogenovaných MWCNT). Ve studii byla sledována rovněž hodnota cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) v srdeční tkáni a v plicích. Myokardiální koncentrace cAMP byla snížena ve skupině exponované MWCNT a nitrogenovaným MWCNT; v plicích k poklesu cAMP nedošlo. Autoři uvádějí i nález změny tonu v aortě (tonus je adenosinergně modulován).³²

S ischemicko-reperfučním poškozením pracovali také Urankar et al. V pokusu na myším modelu zjistili, že orofaryngeální aspirace MWCNT (čistých, karboxylovaných a nitrogenovaných) v dávce 0,01–100 µg vedla k rozsáhlému poškození srdeční tkáně (největší poškození bylo zjištěno opět u nitrogenovaných MWCNT). Poškození bylo hodnotitelné ještě 28 dní po expozici funkcionalizovaným MWCNT.³³

Mezi nejčastější kardiovaskulární onemocnění patří ateroskleróza, která svého nositele predisponuje k mnoha chronickým i akutním komplikacím. Údaje z odborné literatury dokládají, že expozice CNM může být jedním z rizikových faktorů vzniku a progresu aterosklerózy.

Christophersen et al. popsali ztlustění stěny aortálního oblouku po 10 týdnech opakované orální nebo pulmonální MWCNT expozice myši s deficitem apolipoproteinu E (4 a 40 µg každý týden). Nález indikuje rozsáhlejší cévní přestavbu bez zvětšení rozsahu aterosklerotických ložisek.³⁴ Spojitost mezi expozicí MWCNT a aterosklerózou však našli Xu et al. Ve svém experimentu aplikovali intravenózně 50, 100 a 200 µg/kg MWCNT potkanům s aterosklerózou. Nejvyšší dávka exacerbovala aterosklerotické léze, podpořila kumulaci lipidů v intimě aorty a indukovala vznik aortálních kalcifikací a poškození endotelu se zvýšením permeability.³⁵

Proaterosklerotická aktivita byla zjištěna také u jednovrstvých (SWCNT) a dvouvrstevných (DWCNT) nanotrubic. Suzuki et al. prezentovali experiment, ve kterém exponovali

(faryngeální aspirací) apolipoprotein E-deficitní myši (ApoE^{-/-}) SWCNT a MWCNT (10 a 40 µg; jedenkrát týdně po dobu 10 týdnů). Expozice vedla ke zvětšení aterosklerotických plaků a ke zvýšení exprese adhezni molekuly ICAM-1. Endoteliální progenitorové buňky (EPC) jsou mobilizovány z kostní dřeně do oběhu a následně migrují do místa poškození a opravy endotelu. Vystavení myši ApoE^{-/-} vysokým dávkám SWCNT nebo DWCNT snižovalo jednotky EPC tvořící kolonie v kostní dřeni a omezovalo jejich migrační funkci. Výsledky naznačují, že SWCNT a DWCNT zvyšují aterosklerozezi podporou adheze monocytů k endotelovým buňkám a indukci dysfunkce EPC.³⁶

Na vzniku a rozvoji aterosklerotických lézí se aktivně podílí cholesterol a jeho transportní mechanismy. Autoři Davis et al. vystavili myši subakutním inhalačním expozicím MWCNT (1 mg/m³ / 6 h / den / 14 dní). Z nálezů je zřejmé, že vlivem expozice došlo k nárůstu exprese LOX-1 (*the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor*) a k poklesu exprese ABCA-1 (*ATP-binding cassette transporter*). LOX-1 zprostředkovává internalizaci oxidovaného LDL a podporuje tvorbu proaterogenních faktorů (například kyslíkových radikálů nebo matrixové metaloproteázy 9). ABCA-1 (naopak) podporuje cholesterolový eflux. Autoři dále uvádějí, že v cévách exponovaných myši byla zjištěna fibrotická kolagenová depozita a byl pozorován nárůst aktivity MMP-9 a hladin prozánětlivých cytokinů (TNF-α, IL-1β, IL-6), volných radikálů a adhezni molekul ICAM-1 a VCAM-1.³⁷

Zajímavou studii připravil také Mandler et al. Hodnotili změny cévní aktivity (vazodilataci a vazokonstrikci) u myši, které faryngeální expozicí vystavili dávce 50 µg MWCNT. Po 24 hodin od expozice provedli (za použití intravitální mikroskopie) vyšetření arteriální dilatace a venulární leukocytární adhezi a rolling (pohyby leukocytů po endotelu). Jedná se o pohyb imunitních buněk po povrchu endotelu v závislosti na expresi adhezni molekul na endotelových buňkách. Po podání MWCNT došlo k narušení schopnosti relaxace cév, tj. snížila se vazodilatace. Naopak se zvýšila aktivace endotelu a s ní i exprese adhezni molekul, což bylo spojené s vyšší adhezí leukocytů k endotelu a jejich pohybu na něm. Dalším efektem, který byl zaznamenán, bylo zvýšení koncentrace prozánětlivých cytokinů a alterovala se produkce oxidu dusnatého a jeho signalizace. Výsledky nasvědčují tomu, že MWCNT indukuje mikrovaskulární dysfunkci.³⁸

4.3 PRACOVNÍ EXPOZICE

V pracovním prostředí mohou osoby být (a jsou) vystaveny expozici CNM. Bohužel dosud nebyla provedena rozsáhlejší (dlouhodobá) epidemiologická studie, která by významně přispěla k pochopení zákonitostí expozice člověka CNM a k odhadu úrovně zdravotních rizik plynoucích z této expozice. Nicméně několik dosud provedených průřezových (*cross-sectional*) studií naznačuje, že expoziční nálezy u lidí mohou být podobné nálezům *in vitro* a *in vivo* studií.

Schauer-Barigan et al. provedli průřezovou studii, do které bylo zapojeno celkem 108 pracovníků z 12 podniků, v nichž se vyráběly trubcové či vláknité uhlíkové nanomateriály. Přestože koncentrace CNM v pracovních atmosférách byly nízké, u 18 % pracovníků byly tyto ultrajemné částice detekovány ve sputu. Výskyt CNM byl u exponovaných osob pozitivně asociován s hodnotami systolického tlaku. Klidová tepová frekvence měla pozitivní asociaci s respirabilním elementárním uhlíkem a negativní asociaci s dobou vystavení CNM.³⁹

Průřezové studie autorů Kuijperse et al. se zúčastnilo 22 pracovníků exponovaných MWCNT a 42 kontrol. V první fázi byly vybrané ukazatele hodnoceny u všech exponovaných i kontrolních osob, ve druhé fázi byly stejné ukazatele hodnoceny po 5 měsících u 13 exponovaných osob. Hodnoty ukazatelů u exponovaných osob svědčily o aktivaci (a na dávce závislém) poškození endotelu (například zvýšená hladina adhezní molekuly ICAM-1).⁴⁰ Průřezová studie autorů Bearda et al. zahrnovala 108 pracovníků v expozici uhlíkovým nanotrúbkám a nanovláknům. U všech exponovaných osob byly zjištěny zvýšené hladiny ukazatelů aktivity a poškození endotelu (endotelin 1, ICAM-1 a VCAM-1) a změněné hladiny ukazatelů oxidačního stresu (snížené hladiny glutathionperoxidázy a superoxididismutázy a zvýšená hladina 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu).⁴¹

4.4 ZÁVĚR

Kardiovaskulární systém se málokdy dostává do kontaktu s CNM přímo. Musí dojít k parenterálnímu podání či přestupu CNM z jiných částí organismu, např. z dýchacího či trávicího systému. CNM se tak mohou dostat do kontaktu s cévním endotelem i srdečními tkáněmi, což může vyvolat také nežádoucí reakce, jak ukazují mnohé *in vitro* a *in vivo* studie, včetně studií pracovních expozic. Studie odhalily, že může dojít k poškození srdečního svalu i cév, to je dáno hlavně indukci oxidačního stresu a chronického poškozujícího zánětu. Na druhou stranu nemůžeme pominout fakt, že v rámci regenerační medicíny může kultivace buněk, např. kardiomyocytů, s CNM podpořit jejich životaschopnost, množení a tvorbu organoidů. V tomto ohledu hraje výraznou roli dávka a doba expozice a typ CNM.

4.5 LITERATURA

1. Kan H, Pan D, Castranova V. Engineered Nanoparticle Exposure and Cardiovascular Effects: The Role of a Neuronal-Regulated Pathway. *Inhal Toxicol.* 2018;30(9–10):335–342. doi:10.1080/08958378.2018.1535634.
2. Sharma V, Aneja B, Yata VK, Malakar D, Mohanty AK. Systemic Nanotoxicity and Its Assessment in Animal Models. In: Yata V, Ranjan S, Dasgupta N, Lichtfouse E, eds. *Nanopharmaceuticals: Principles and Applications Vol. 3. Environmental Chemistry for a Sustainable World.* Vol 48. Springer; 2020. doi:10.1007/978-3-030-47120-0_7.
3. Meyers K, Lee BP, Rajachar RM. Electroactive Polymeric Composites to Mimic the Electromechanical Properties of Myocardium in Cardiac Tissue Repair. *Gels.* 2021;7(2):53. doi:10.3390/gels7020053.
4. Hashemi MS, Gharbi S, Jafarinejad-Farsangi S, Ansari-Asl Z, Dezfuli AS. Secondary Toxic Effect of Graphene Oxide and Graphene Quantum Dots Alters the Expression of miR-21 and miR-29a in Human Cell Lines. *Toxicol In Vitro.* 2020;65:104796. doi:10.1016/j.tiv.2020.104796.
5. Cibecchini G, Veronesi M, Catelani T, Bandiera T, Guarnieri D, Pompa PP. Antiangiogenic Effect of Graphene Oxide in Primary Human Endothelial Cells. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2020;12(20):22507–22518. doi:10.1021/ACSAMI.0C03404.
6. Liao KH, Lin YS, MacOsco CW, Haynes CL. Cytotoxicity of Graphene Oxide and Graphene in Human Erythrocytes and Skin Fibroblasts. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2011;3(7):2607–2615. doi:10.1021/am200428v.
7. Arbo MD, Altknecht LF, Cattani S et al. In Vitro Cardiotoxicity Evaluation of Graphene Oxide. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2019;841:8–13. doi:10.1016/j.mrgentox.2019.03.004.

8. Zhang J, Cao HY, Wang JQ, Wu GD, Wang L. Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide Exhibit Cardiotoxicity Through the Regulation of Lipid Peroxidation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Dysfunction. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:616888. doi:10.3389/fcell.2021.616888.
9. Rosas-Hernandez H, Escudero-Lourdes C, Ramirez-Lee MA et al. Cytotoxicity Profile of Pristine Graphene on Brain Microvascular Endothelial Cells. *J Appl Toxicol.* 2019;39(7):966–973. doi:10.1002/JAT.3786.
10. Ardoña HAM, Zimmerman JF, Shani K et al. Differential Modulation of Endothelial Cytoplasmic Protrusions After Exposure to Graphene-Family Nanomaterials. *NanoImpact.* 2022;26:100401. doi:10.1016/j.impact.2022.100401.
11. Yang D, Shen J, Fan J, Chen Y, Guo X. Paracellular Permeability Changes Induced by Multi-Walled Carbon Nanotubes in Brain Endothelial Cells and Associated Roles of Hemichannels. *Toxicology.* 2020;440:152491. doi:10.1016/j.tox.2020.152491.
12. Zhao X, Chang S, Long J, Li J, Li X, Cao Y. The Toxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) to Human Endothelial Cells: The Influence of Diameters of MWCNTs. *Food Chem Toxicol.* 2019;126:169–177. doi:10.1016/J.FCT.2019.02.026.
13. Long J, Xiao Y, Liu L, Cao Y. The Adverse Vascular Effects of Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) to Human Vein Endothelial Cells (HUVECs) In Vitro: Role of Length of MWCNTs. *J Nanobiotechnol.* 2017;15(1):80. doi:10.1186/S12951-017-0318-X.
14. Cao Y, Jacobsen NR, Danielsen PH et al. Vascular Effects of Multiwalled Carbon Nanotubes in Dyslipidemic Apoe^{-/-} Mice and Cultured Endothelial Cells. *Toxicol Sci.* 2014;138(1):104–116. doi:10.1093/toxsci/kft328.
15. Yang H, Li J, Yang C, Liu H, Cao Y. Multi-Walled Carbon Nanotubes Promoted Lipid Accumulation in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2019;374:11–19. doi:10.1016/j.taap.2019.04.022.
16. Burke AR, Singh RN, Carroll DL et al. Determinants of the Thrombogenic Potential of Multiwalled Carbon Nanotubes. *Biomaterials.* 2011;32(26):5970–5978. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.059.
17. Gaffney AM, Santos-Martinez MJ, Satti A et al. Blood Biocompatibility of Surface-Bound Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Nanomedicine.* 2015;11(1):39–46. doi:10.1016/j.nano.2014.07.005.
18. Holzer M, Bihari P, Praetner M et al. Carbon-Based Nanomaterials Accelerate Arteriolar Thrombus Formation in the Murine Microcirculation Independently of Their Shape. *J Appl Toxicol.* 2014;34(11):1167–1176. doi:10.1002/JAT.2996.
19. Rodriguez-Yáñez Y, Bahena-Uribe D, Chávez-Munguía B et al. Commercial Single-Walled Carbon Nanotubes Effects in Fibrinolysis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Toxicol In Vitro.* 2015;29(5):1201–1214. doi:10.1016/J.TIV.2015.02.009.
20. Yuvaraj V, Rajiv S, Mukherjee A, Chandrasekaran N, Sastry TP. Toxicity Assessment of Carbon Nanotubes on Erythrocyte Morphology and Lymphocytes In Vitro. *Asian J Pharm Clin Res.* 2016;9(2):278–280.
21. Solarska K, Gajewska A, Bartosz G, Mitura K. Induction of Apoptosis in Human Endothelial Cells by Nanodiamond Particles. *J Nanosci Nanotechnol.* 2012;12(6):5117–5121. doi:10.1166/jnn.2012.4952.
22. Ren L, Jing Z, Xia F, Zhang JZ, Li Y. Toxic Effect of Fullerene and Its Derivatives Upon the Transmembrane β 2-Adrenergic Receptors. *Molecules.* 2022;27(14):4562. doi:10.3390/molecules27144562.
23. Bahrami S, Baheiraei N, Mohseni M et al. Three-Dimensional Graphene Foam as a Conductive Scaffold for Cardiac Tissue Engineering. *J Biomater Appl.* 2019;34(1):74–85. doi:10.1177/0885328219839037.
24. Zhao G, Feng Y, Xue L et al. Anisotropic Conductive Reduced Graphene Oxide/Silk Matrices Promote Post-Infarction Myocardial Function by Restoring Electrical Integrity. *Acta Biomater.* 2022;139:190–203. doi:10.1016/J.ACTBIO.2021.03.073.

25. Ren J, Braileanu G, Gorgojo P et al. On the Biocompatibility of Graphene Oxide Towards Vascular Smooth Muscle Cells. *Nanotechnology*. 2020;32(5):055101. doi:10.1088/1361-6528/abc1a3.
26. 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.
27. Barros AO da S, Ricci-Junior E, Pereira JX et al. High Doses of Graphene Quantum Dots Impact on Microcirculation System: An Observational Study. *Eur J Pharm Biopharm*. 2022;176:180–187. doi:10.1016/j.ejpb.2022.05.013.
28. Zheng W, McKinney W, Kashon ML, Pan D, Castranova V, Kan H. The Effects of Inhaled Multi-Walled Carbon Nanotubes on Blood Pressure and Cardiac Function. *Nanoscale Res Lett*. 2018;13:1–10. doi:10.1186/s11671-018-2603-5.
29. Chen R, Zhang L, Ge C et al. Subchronic Toxicity and Cardiovascular Responses in Spontaneously Hypertensive Rats After Exposure to Multiwalled Carbon Nanotubes by Intratracheal Instillation. *Chem Res Toxicol*. 2015;28(3):440–450. doi:10.1021/tx5004003.
30. Hosseinpour M, Azimirad V, Alimohammadi M, Shahabi P, Sadighi M, Nejad GG. The Cardiac Effects of Carbon Nanotubes in Rat. *Bioimpacts*. 2016;6(2):79–84. doi:10.15171/bi.2016.11.
31. Tan XQ, Cheng XL, Zhang L et al. Multi-Walled Carbon Nanotubes Impair Kv4.2/4.3 Channel Activities, Delay Membrane Repolarization and Induce Bradyarrhythmias in the Rat. *PLoS One*. 2014;9(7). doi:10.1371/journal.pone.0101545.
32. Thompson LC, Sheehan NL, Walters DM, Lust RM, Brown JM, Wingard CJ. Airway Exposure to Modified Multi-Walled Carbon Nanotubes Perturbs Cardiovascular Adenosinergic Signaling in Mice. *Cardiovasc Toxicol*. 2019;19(2):168–177. doi:10.1007/s12012-018-9487-6.
33. Urankar RN, Lust RM, Mann E et al. Expansion of Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury After Instillation of Three Forms of Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Part Fibre Toxicol*. 2012;9(1):1–16. doi:10.1186/1743-8977-9-38.
34. Christophersen DV, Jacobsen NR, Andersen MHG et al. Cardiovascular Health Effects of Oral and Pulmonary Exposure to Multi-Walled Carbon Nanotubes in ApoE-Deficient Mice. *Toxicology*. 2016;371:29–40. doi:10.1016/j.tox.2016.10.003.
35. Xu YY, Yang J, Shen T et al. Intravenous Administration of Multi-Walled Carbon Nanotubes Affects the Formation of Atherosclerosis in Sprague-Dawley Rats. *J Occup Health*. 2012;54(5):361–369. doi:10.1539/JOH.12-0019-OA.
36. Suzuki Y, Tada-Oikawa S, Hayashi Y et al. Single- and Double-Walled Carbon Nanotubes Enhance Atherosclerogenesis by Promoting Monocyte Adhesion to Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cell Dysfunction. *Part Fibre Toxicol*. 2016;13(1):1–12. doi:10.1186/S12989-016-0166-0.
37. Davis G, Lucero J, Fellers C, McDonald JD, Lund AK. The Effects of Subacute Inhaled Multi-Walled Carbon Nanotube Exposure on Signaling Pathways Associated with Cholesterol Transport and Inflammatory Markers in the Vasculature of Wild-Type Mice. *Toxicol Lett*. 2018;296:48–56. doi:10.1016/J.TOXLET.2018.08.004.
38. Mandler WK, Nurkiewicz TR, Porter DW, Kelley EE, Olfert IM. Microvascular Dysfunction Following Multiwalled Carbon Nanotube Exposure Is Mediated by Thrombospondin-1 Receptor CD47. *Toxicol Sci*. 2018;165(1):90–99. doi:10.1093/toxsci/kfy120.
39. Schubauer-Berigan MK, Dahm MM, Erdely A et al. Association of Pulmonary, Cardiovascular, and Hematologic Metrics With Carbon Nanotube and Nanofiber Exposure Among U.S. Workers: A Cross-Sectional Study. *Part Fibre Toxicol*. 2018;15(1):1–14. doi:10.1186/s12989-018-0258-0.
40. Kuijpers E, Pronk A, Kleemann R et al. Cardiovascular Effects Among Workers Exposed to Multiwalled Carbon Nanotubes. *Occup Environ Med*. 2018;75(5):351–358. doi:10.1136/oemed-2017-104796.
41. Beard JD, Erdely A, Dahm MM et al. Carbon Nanotube and Nanofiber Exposure and Sputum and Blood Biomarkers of Early Effect Among U.S. Workers. *Environ Int*. 2018;116:214–228. doi:10.1016/j.envint.2018.04.004.

5 GASTROINTESTINÁLNÍ TOXICITA A HEPATOTOXICITA

Gastrointestinální trakt (GIT) představuje pro CNM významný interakční kompartment. Nanočástice do něho vstupují cestou kontaminované potravy, nápojů a léků nebo enterohepatálním oběhem. GIT je složen z mnoha různých tkání s různou vnímavostí k expozici CNM. Lokální interakce nanočástic s buňkami GIT jsou ovlivňovány (omezovány) systémem bariér, tvořených střevním hlenem, střevním mikrobiomem a imunitním systémem. Nanočástice ale mohou tyto bariéry narušovat, snižovat jejich účinnost a dostávat se tak do přímého kontaktu s epiteliálními buňkami. Výsledkem interakcí je pak snížení míry buněčné proliferace a regenerace epitelu, zvýšená střevní propustnost a nárůst souvisejících zdravotních obtíží.¹

Interakce mezi GIT a CNM vedou k ovlivňování jak stavu GIT, tak i struktury CNM. Nanočástice jsou v GIT vystaveny účinkům mnoha faktorů (včetně trávicích enzymů a extrémně nízkého pH v žaludku), což může mít za následek jejich částečnou nebo úplnou degradaci či přeměnu. Příklad toho ukazuje např. práce autorů Masyutina et al., kteří vystavili mnohovrstevné uhlíkové nanotrubičky (MWCNT) účinkům směsi kyseliny chlorovodíkové (pH = 1) a žaludečních šťáv (pH = 2–3). Expozice vedla k částečné degradaci MWCNT.² K jiným výsledkům ale došli Guarnieri et al., kteří studovali biologické interakce grafenu a oxidu grafenu (GO) po simulované orální ingestii. V tomto experimentu degradace nanočástic pozorována nebyla.³ Zajímavý jev prezentovali Lu et al., jejichž experiment se zabýval degradací vícevrstvého grafenu (FLG) na značený $^{14}\text{CO}_2$. Nanočástice (FLG) při tomto experimentu pronikaly do erytrocytů, které byly následně v játrech fagocytovány Kupfferovými buňkami. Erytrofagocytóza zvýšila intracelulární koncentraci železa a iniciovala tak Fentonovu reakci, při které vznikají hydroxylové radikály. Tyto reaktivní intermediáty následně interagovaly s FLG a způsobily jeho degradaci.⁴ V játrech tedy nedochází jen k možné degradaci CNM, ale CNM mohou jaterní tkáň závažně poškodit.

Játra reprezentují hlavní detoxikační orgán systému a narušení jejich funkcí je pro organismus zatěžujícím, život ohrožujícím stavem. CNM vstupují do jater cestou cévního zásobení a následně dochází k jejich exkreci, degradaci nebo kumulaci. Mezi klasická centra kumulace patří rezidentní makrofágy (Kupfferovy buňky), endotel sinusoidů, stelární buňky a hepatocyty.⁵ Vlivem interakcí s CNM může docházet k závažnému poškození struktury těchto buněk či jejich funkcí. Následné spuštění apoptotických mechanismů pak vede k jejich zániku. Z rozpadlých buněčných struktur jsou přitom uvolňovány nanočástice s možností opětovné fagocytózy.^{6,7} V úvahu přichází i transport těchto nanočástic z jater (přes hepatobiliární systém) do střeva.^{8,9}

Je nutné doplnit, že částice, které v GIT nepodléhají degradaci, mohou dlouhodobě perzistovat ve tkáních a indukovat zde řadu nežádoucích účinků, včetně zánětu, oxidačního stresu a poškození mikrobiomu.

5.1 IN VITRO STUDIE

In vitro studie gastrointestinální toxicity a hepatotoxicity CNM jsou prováděny na buněčných liniích ze tkání GIT a jater. Výsledky naznačují, že řada nanočástic (MWCNT, SWCNT, GO) může poškozovat morfologii a funkce buněk GIT. Byl popsán nárůst oxidačního stresu, indukce zánětlivé odpovědi a zánik CNM exponovaných buněk. Některé ze studií, které toxicitu potvrzují, nyní představíme.

Ku příkladu Tirumala Kodavanti a Michael Hughes testovali účinky MWCNT (nemodifikovaných, hydroxylovaných a karboxylovaných) na IEC-6 buňky (buňky tenkého střeva potkana; 0,3–300 µg/ml / 24 h). Autoři uvádějí, že pouze MWCNT kratší než 8 nm (v dávce 300 µg/ml) snížily u 50 % exponovaných buněk jejich životaschopnost (cestou indukce buněčné smrti).¹⁰

V jiném experimentu byly buňky lidského kolorektálního adenokarcinomu s epiteliální morfologií (HT29) exponovány GO v dávkách 10–250 µg/ml po dobu 24, 48 nebo 72 hodin. Polovina maximální inhibiční koncentrace (IC₅₀) dosahovala pro všechny expoziční doby hodnoty 50 µg/ml. Tato koncentrace výrazně ovlivňovala buněčnou morfologii, konkrétně indukovala zrání buněk, degradaci cytoplazmy, poškození jádra (včetně změn na DNA) a zvýšení permeability buněčné membrány.¹¹

Další často používanou buněčnou linií představují imortalizované lidské buňky kolorektálního adenokarcinomu (Caco-2). Ve snaze modelovat vliv CNM na bariérové funkce střeva, exponovali autoři Domenech et al. buněčnou kokulturu Caco-2/HT29 grafenem a GO (0,5, 15 a 50 µg/ml / 24 h). Testované nanočástice neměnily integritu ani permeabilitu střevního monolayeru a nezvyšovaly úroveň oxidačního stresu. Nicméně byly pozorovány funkční změny buněk, konkrétně v bioadhezi a biodistribuci, a bylo rovněž pozorováno poškození DNA.¹² Cebadero-Domínguez et al. testovali vliv GO a rGO (31, 63, 125 a 250 µg/ml / 4, 8, 12, 24 h) na samotnou linii Caco-2. Viabilitu buněk významně snižoval GO. Oba typy grafenu pak zvyšovaly úroveň oxidačního stresu (ROS) a indukovaly depleci hladiny antioxidantního glutathionu.¹³ Feng et al. exponovali Caco-2 a epitelioidní buněčné kultury z tenkého střeva potkana (IEC-6) GO o koncentracích 3, 40, 50 µg/ml. Po expozici autoři našli zvýšené hladiny ROS, zvýšenou aktivitu NADPH-oxidázy, zvýšenou permeabilitu mitochondriálních membrán a zvýšené hladiny cytochromu C. Všechny uvedené změny vedly k iniciaci odpovídajících apoptotických dějů.¹⁴ Garriga et al. exponovali Caco-2 buňky uhlíkovým nanorohům (CNH), uhlíkovým nanotrubicím (CNT), uhlíkovým destičkám (CNP), GO, rGO a nanodiamantům (ND) po dobu 24 a 72 hodin. Všechny testované CNM indukovaly snížení viability (v nejvyšší míře CNH a CNP) a kromě ND zvyšovaly hladiny ROS (v nejvyšší míře CNH a CNP).¹⁵ Gao et al. se zaměřili na testování cytotoxicity GO vůči NCM460 (epitelové buňky tlustého střeva). Po expozici byla zjištěna indukce zánětlivé odpovědi, dysfunkce lyzozomů (snížení schopnost degradovat sekvestrovaný materiál vlivem snížené acidity) a kumulace autofagozomů. Uvedené znaky jsou typické pro stárnoucí buňky. Lze se tedy domnívat, že GO urychluje biologické stárnutí organismu.¹⁶

Vedle studií zaměřených na přímou toxicitu CNM byly prováděny i studie orientované na indukci změn buněčného transkriptomu a proteomu. Například autoři Tilton et al. sledovali změny exprese vybraných ukazatelů Caco2/TH29-MTX buněk po expozici MWCNT o koncentracích 10 nebo 100 $\mu\text{g/ml}$ / 1–24 h. Vyšší koncentrace MWCNT významně snižovala viabilitu buněk a měnila exprese 47 genů a 197 proteinů. Jednalo se o geny a proteiny zapojené do buněčného přežití, zvýšení proliferace, snížení úrovně apoptózy, reparace DNA a o geny zapojené do signalizace IL-6.¹⁷ Rovněž výsledky studie Lai et al. potvrzují modifikační vliv CNM na genovou expresi. V tomto experimentu byly buňky Caco-2 exponovány karboxylovaným SWCNT a MWCNT a MWCNT funkcionalizovaným polyvinylpyrrolidinem (MWCNT-PVP). Všechny testované CNM ovlivňovaly expresi celkem 428 proteinů. Byla pozorována zvýšená exprese proteinů z histonové rodiny (H2AFJ, H2AFV, H2AFX), a naopak snížená exprese proteinů spojených s ribozomy (EIF3C/Eucaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit C/F). Nebyl pozorován přímý toxický efekt, nicméně změny v expresi proteinů zcela jednoznačně indikovaly narušení buněčných funkcí a kanonických cest. Karboxylované MWCNT zasahovaly do uhlovodíkového metabolismu a metabolismu inositolu, snižovaly produkci energetických substrátů, glykolýzu i glukoneogenezi a ovlivňovaly signalizaci cyklin-dependentní kinázy 5. MWCNT-PVPV zvyšovaly posttranslační modifikaci a folding proteinů a mTOR (savčí serin/threoninová kináza) signalizaci. Jejich nižší dávky ovlivňovaly mechanismy apoptózy, snižovaly aktin-cytoskeletovou signalizaci, lipidový metabolismus a produkci energetických substrátů. Karboxylované SWCNT zvyšovaly aktivitu buněčného cyklu a redukovaly mTOR signalizaci.¹⁸ Z uvedeného je zřejmé, že CNM mohou významně zasahovat do buněčných funkcí a zvyšovat riziko maligní transformace buněk.

Gastrointestinální toxicita se netýká pouze buněk GIT, ale také střevní mikrobioty, která hraje důležitou roli v ochraně a stabilitě integrity střevní sliznice, moduluje aktivitu imunitního systému a metabolismus živin a produkuje mnoho substrátů, které ovlivňují CNS a mají antibakteriální a imunomodulační účinky. Narušení složení mikrobioty je rizikovým faktorem pro vznik mnoha nemocí, včetně střevních zánětů a nádorových onemocnění GIT.¹⁹ Velmi zajímavou práci v této oblasti publikovali Lahiani et al. Ve své studii exponovali kultury komenzálních bakterií *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum* a *Escherichia coli* suspenzi grafenu o koncentracích 1, 10 a 100 $\mu\text{g/ml}$ / 3, 6 a 24 h. Nejvyšší expozice měla ve všech sledovaných časech za následek významné pomnožení *Lactobacillus acidophilus*, zatímco u *Bifidobacterium longum* vykazovala tento účinek naopak expozice nejnižší. Kultura *Escherichia coli* byla grafenem ovlivněna minimálně. V druhé části studie byly suspenze grafenu exponovány čerstvé vzorky potkaní stolice (ve stejných koncentracích a po stejnou dobu jako v první části studie). Expozice byla prováděna za účelem zhodnocení změn širokého spektra mikrobiální populace, vyvolaných grafenem. Během prvních tří hodin autoři zjistili významné zvýšení počtu aerobních i anaerobních bakterií, vyjádřené jako počty CFU (*colony-forming unit*; kolonie tvořící jednotku). Celodenní expozice (24 h) vedla k významnému snížení počtu aerobních bakterií (počty CFU anaerobních bakterií zůstaly nezměněny). Z analýzy dat vyplývá, že doba expozice, stejně jako koncentrace grafenu, ovlivňují početnost bakteriální populace. Významné změny byly zjištěny celkově u patnácti taxonomických skupin.²⁰

Negativní vliv na mikrobiom byl potvrzen také v případě GO. Couvillion et al. použili dávky 25 mg/l a 250 mg/l na modelech jednotlivých částí trávicí soustavy (ústní, žaludeční, tenkého a tlustého střeva). Nižší dávka snížila počty bakterií kmene *Bacteroidota* a zvýšila

poměr *Firmicutes/Bacteroidota*. To bylo spojeno se snížením produkce bakteriálních substrátů, jakou jsou např. mastné kyseliny s krátkým řetězcem a kyselina gama-aminomáselná. Vyšší dávka dále alterovala mikrobiom.²¹

Autoři Chen et al. zkoumali míru antibakteriálních účinků čistých i funkcionalizovaných MWCNT a SWCNT. Testy byly prováděny na kulturách *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus aureus*. Nejvýraznější antibakteriální účinek byl zjištěn u SWCNT. Nanotrubice narušovaly peptidoglykanovou bakteriální stěnu, což vedlo k destrukci bakterií a uvolňování intracelulárních i jaderných komponent.²² Výsledky zmíněných studií dokazují, že CNM mohou zasahovat do složení střevní mikrobioty a vyvolávat dysbiózu.

Hepatotoxicita CNM bývá studována také na kultuře HepG2 buněk (buňky hepatocelulárního karcinomu). Loutfy et al. exponovali HepG2 buňky suspenzi GO. Při expozici 400 µg/ml / 24 h byly zjištěny významné morfologické změny a narušování buněčného cyklu. Po internalizaci GO docházelo k narušování a fragmentaci organel a k prostupu GO do mitochondrií a jádra. Bylo detekováno poškození DNA. Cytotoxicita GO byla testována v dávkách 200–1000 µg/ml / 48 h. Koncentrace 200 µg snížila viabilitu buněk zhruba na polovinu, k dalšímu poklesu (se zvyšujícími se koncentracemi) však již nedošlo. Při analýze změn exprese apoptotických genů byla zjištěna významně zvýšená hladina mRNA proapoptického proteinu Bax.²³

Judit Kalman, Fernando Torrent a José Navas vystavili izolované hepatocyty *Oncorhynchus mykiss* (pstruh duhový) působení dvou typů GO a uhlíkovým nanovláknům (CNF) s tubulárním tvarem (0–80 µg GO1 / ml, 0–128 µg GO2 / ml, 0–40 µg CNF / ml / 24 a 72 h) v prostředí fetálního bovinního séra (FBS) a v prostředí bez něho. V přítomnosti FBS zasahovaly GO do metabolických aktivit buňky a narušovaly integritu buněčných membrán (v případě CNF byla míra těchto účinků významně nižší). Nepřítomnost FBS dále snižovala životaschopnost buněk. Stojí za povšimnutí, že autoři nepozorovali poškození lysozomálních funkcí, indukci tvorby ROS či změny aktivity 7-ethoxyresorufin-O-deethylázy. Intracelulární příjem CNM byl pozorován pouze u CNF ve variantě inkubace bez FBS. Výsledky potvrzují roli sérových proteinů pro hodnocení environmentálních rizik CNM.²⁴

Autoři Uribe-Calderon et al. zjišťovali hepatotoxicitu „čistých“ a oxidovaných MWCNT (oxidace HNO₃, HNO₃ + H₂O₂, HNO₃ + H₂SO₄) v dávkách 10–50 µg/ml / 24 h. Testování bylo prováděno na kultuře buněk HepG2. Po expozici oxidovaným formám MWCNT bylo pozorováno významné snížení viability buněk (nejvíce viabilitu snižovala forma MWCNT-HNO₃ + H₂SO₄). Rovněž bylo pozorováno poškození DNA při dávce 50 µg/ml / 24 h (nejvyšší genotoxický účinek byl nalezen u „čistých“ MWCNT).²⁵

Toxický efekt nanočástic nemusí být vyvolán jen přímým poškozením, ale rovněž také zásahem do metabolismu buňky. Například Zhao et al. zjistili, že „čistá“ a karboxylovaná forma MWCNT podporuje vznik jaterní steatózy (kumulaci lipidů v jaterních buňkách). Ve své práci uvádějí, že u buněk HepG2 vedla internalizace nanočástic k destabilizaci lysozomů, k endoplazmaticko-retikulárnímu stresu a ke zvýšení produkce ROS. Byla zjištěna zvýšená lipofagie, kumulace lipidů v buňkách a zvýšená exprese *PLIN2* a *BECN1* (genů souvisejících s lipofagií).²⁶ Steatóza je spojena s indukci zánětu a fibrotických změn v jaterní tkáni a představuje významný rizikový faktor pro onemocnění jater. Piret et al. inkubovali buňky HepG2 s MWCNT (100 µg/ml / 24 h). Byla nalezena zvýšená exprese mRNA pro IL-7, CCR7 a endotelin 1, což naznačuje, že MWCNT mají přímou prozánětlivou aktivitu.²⁷

Výsledky většiny studií naznačují, že CNM mají potenciál poškozovat trávicí systém, jeho strukturu i funkce. Mohou měnit morfologii buněk, poškozovat orgány (včetně jícna a DNA), zvyšovat oxidační stres, indukovat zánět a buněčné stárnutí, narušovat bariérové funkce a měnit složení mikrobioty. Vždy záleží na typu nanočástic a často také na době expozice.

5.2 IN VIVO STUDIE

Studie *in vivo* popisují postexpoziční poškození střevní sliznice s nekrózami a narušením permeability, zánětlivé změny tkání a změny v jejich transkriptomu. Jejich výsledky tedy jsou v souladu s *in vitro* studiemi.

Například autoři Masyutin et al. zjistili, že orální expozice myši dávce 30 mg MWCNT / kg po dobu 30 dní vedla k poškození sliznice tenkého střeva, které bylo provázeno nekrotickými změnami střevních klků. Kumulace MWCNT ve střevě pozorována nebyla a vedle penetrace do systémové cirkulace byla majoritní cestou eliminace ze střeva stolice. Uvedené nálezy naznačují, že v horní části trávicího traktu nedochází k úplné degradaci MWCNT.²

Předmětem studie Fua et al. byly dlouhodobé účinky GO na kojící myši. Nálezy popisují poškození sliznice žaludku a lačnicku a zvýšené hodnoty jaterních enzymů alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST). Ve střevě nedocházelo k tvorbě GO aglomerátů, což mělo za následek vyšší adhezenci GO na střevní epitel a jeho translokaci do systémové cirkulace. Autoři sledovali také vliv expozice matek na kojená mláďata. Mláďata exponovaná GO v mateřském mléce (a po jedenácti dnech suspenzi GO v pitné vodě) vykazovala opožděný vývoj. Každý den laktace docházelo k výraznějším změnám v délce jejich ocasu a v tělesné váze (v porovnání s kontrolami). U mláďat byly pozorovány histologické a funkční změny v duodenu a v játrech (duodenální hyperplazie, otok a vakuolizace a hypertrofie hepatocytů). Z výsledků je zřejmé, že GO proniká do mateřského mléka a ovlivňuje vývoj potomků, včetně jejich trávicí soustavy.²⁸ Podobný účinek GO byl zjištěn i při expozici potkanů. Již zmiňovaní autoři Feng et al. exponovali potkany GO (40 mg/kg) denně po dobu 9 dní. Vzorky střevní sliznice potkanů nesly známky poškození mikrostruktury střeva, apoptózy a vykazovaly zvýšenou úroveň oxidačního stresu.¹⁴

Výsledky některých studií naznačují, že GO může narušovat střevní permeabilitu. Ve studii Wua et al. byly *Caenorhabditis elegans* (hádátka obecná) akutně (24 hodin) a dlouhodobě (od larvy do dospělce) exponovány suspenzi GO (0,5–100 mg GO / ml). Expozice způsobila poškození střeva se ztrátou mikrokloků a nárůst hladiny oxidačního stresu, což narušilo permeabilitu a ovlivnilo délku defekačního cyklu. Defekační cyklus se prodloužil u prolongované expozice v závislosti na podané dávce. Z výsledků plyne, že GO narušuje jak strukturu, tak i funkci střeva.²⁹ Podobné výsledky získali také autoři Chen et al. z experimentu na myších, exponovaných SWCNT (dávky 0,05, 0,5 a 2,5 mg/kg/den) po dobu 7 dní. SWCNT indukovaly zánětlivou odpověď, doprovázenou nárůstem hladin prozánětlivých cytokinů IL-1 β , IL-6 a TNF- α a zvýšenou střevní permeabilitou. Byly rovněž zjištěny změny složení střevního mikrobiomu. SWCNT způsobily posun od *Firmicutes* k *Bacteroidetes* a zvýšily počty bakterií podporujících zánětlivé pochody ve střevě *Alistipes uncultured bacterium* a *Lachnospiraceae bacterium A4*. Je zřejmé, že poškození střeva SWCNT je spojeno s interakcí SWCNT s bakteriemi střevního traktu a s následným spuštěním reakcí „metabolického zánětu“.³⁰

Změny ve složení mikrobioty, popisované v podkapitole *in vitro* studií, byly pozorovány také v některých *in vivo* studiích. Například Zheng et al. exponovali sladkovodní ryby *Danio rerio* (zebrafish, dánio pruhované) grafenu, GO a rGO po dobu 21 dní. Přítomnost CNM zvyšovala ve střevech počty rodů kmene *Fusobacteria* a rody *Cetobacterium* a *Lactobacillus*. Zároveň poklesl počet zástupců kmene *Firmicutes* a rodu *Pseudomonas* ze skupiny *Gammaproteobacteria*. Vzorky střevní tkáň vykazovaly známky zvýšené úrovně oxidačního stresu a poškození buněk (vakuolizace, vyšší počty pohárkových buněk a narušení mezibuněčných spojů).³¹

Nutno doplnit, že CNM mohou, vedle přímého poškození střeva, indukovat také exacerbaci již existujícího střevního onemocnění. V experimentu na myších s kolitidou podávali Gao et al. po dobu 8 dní GO v dávce 60 mg/kg. Expozice GO posílila zánětlivou aktivitu ve střevě (zvýšila infiltraci střeva zánětlivými buňkami) a touto cestou významně zhoršila klinický průběh kolitidy.¹⁶

Řada *in vivo* studií byla věnována hepatotoxicitě CNM. Například Ji et al. exponovali myši MWCNT funkcionalizovaným (oxidovaným) kyselinou (O-MWCNT) a MWCNT dispergovaným Tweenem-80 (T-MWCNT) po dobu 15 a 60 dnů. Obě expozice měly za následek závažné poškození jater (záněty, nekrózy, poškození mitochondrií a buněčnou lýzu). Pozorována byla rovněž zvýšená exprese GPCR (*G protein-coupled receptors*), genů podílejících se na syntéze cholesterolu a patřících do metabolických cest enzymu p450 (vyšší míru poškození indukovaly T-MWCNT).³² Poškození jater potvrdili také Adedara et al., kteří intraperitoneálně exponovali potkany nízkým dávkám MWCNT. Poškození jater se manifestovalo zvýšením sérových hladin AST, ALT, alkalické fosfatázy (ALP) a γ -glutamyltransferázy (GGT). Rovněž bylo pozorováno snížení aktivit vybraných antioxidačních enzymů (superoxiddismutázy a glutathion-S-transferázy). Přítomnost oxidačního stresu potvrdila zvýšená míra peroxidace lipidů. Autoři se domnívají, že poškození jater je možné přičítat indukci zánětu se zvýšenými hladinami prozánětlivých cytokinů a enzymů (IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX2 a iNOS).³³

Poškození hepatocytů (a celé jaterní tkáň) CNM by nemělo být spojováno pouze s nárůstem hladiny oxidačního stresu a s rozvojem zánětu. CNM mají potenciál měnit i metabolické funkce hepatocytů. V *in vitro* studiích bylo ukázáno, že CNM indukují kumulaci lipidů v hepatocytech a mohou stát za rozvojem hepatosteatózy. Xu et al. ověřovali tento jev také v experimentech *in vivo*, ve kterých potkanům s navozenou nealkoholickou hepatosteatózou aplikovali intravenózně MWCNT (50, 100, 200 μ g/kg). Aplikace významně zhoršila stav jater, při kterém došlo k rozvoji chronické hepatitidy, doprovázené oxidačním stresem, kumulací lipidů v játrech a deplecí glutathionu.³⁴

Výše uvedené studie (zaměřené na toxicitu CNM vůči střevu) naznačují, že CNM neovlivňují pouze rodičovský organismus, ale i vývoj jejich potomků. Ve studii autorů Zhanga et al. byly myší samci i samice intratracheálně exponovány MWCNT (15 mg/kg / 1 \times týdně po dobu 13 týdnů) a byl hodnocen vliv této expozice na jaterní lipidový metabolismus jejich potomků. Mláďata myší, která byla exponována MWCNT, vykazovala (v porovnání s kontrolami) významně nižší váhu, histologické změny na jaterním parenchymu a zvýšenou expresi genů, které se podílejí na syntéze lipidů v játrech (posledně uvedený nález vede ke kumulaci tuků a k narušení jaterních funkcí).³⁵

Hepatotoxické účinky byly prokázány i u SWCNT. Principi et al. popisují kumulaci a persistenci SWCNT v jaterní tkáni po jejich intravenózní aplikaci myším (0,16, 1,6 nebo 6,4 mg/kg). Agregáty CNM byly v tkáni detekovatelné již za 24 hodin po expozici a maximální kumulace bylo dosaženo po třech týdnech. Agregáty se nacházely v cytoplasmě i v extracelulární matrix. Jejich nejvýraznější kumulace byla zjištěna v blízkosti Kupfferových

buněk, což naznačuje, že SWCNT mohou být těmito buňkami fagocytovány. Zvýšená aktivity rezidentních imunitních a jaterních buněk vedla k rozvoji zánětu, infiltraci jaterní tkáně periferními imunitními buňkami a k poškození hepatocytů (důkazem poškození byly zvýšené sérové hladiny AST, ALT a bilirubinu). V průběhu následujících tří týdnů hladiny AST a ALT postupně klesaly, ale hodnoty bilirubinu byly zvýšené minimálně čtyři měsíce po aplikaci nejvyšší dávky.³⁶

Zdá se, že hepatotoxický potenciál mají i CNM odvozené od grafenu. Ve studii Zhanga et al., provedené na potkanech, byly intravenózně aplikovány tři formy nanočástic GO (malé GO 50–200 nm, střední GO 200–500 nm a velké GO 500–2000 nm) v dávce 5 mg/kg. Všechny tři formy GO indukovaly expresi hepatocytárního IL-6 a zvyšovaly hladinu oxidačního stresu (nejvýraznější změny byly pozorovány u velké formy GO). Kromě hepatocytů aktivoval GO také makrofágy, což zvýšilo produkci prozánětlivých cytokinů IL-1 β a TNF- α .³⁷ K podobným závěrům došli i další dva kolektivy. Anita Patlolla, Jonathan Randolph a Paul Tchounwou exponovali pět dní orálně potkany GO v dávkách 20 a 40 mg/kg/den. Za 24 hodin od poslední dávky odebrali vzorky krve a jater. Byla zjištěna zvýšená úroveň oxidačního stresu a na dávce závislá funkční a morfologická poškození. Druhá skupina vědců uvedla, že expozice GO (0,4, 2,0 a 10,0 mg/kg / 15 dávek v průběhu 30 dní) významně zvýšila míru oxidačního stresu a míru poškození jater, což bylo doprovázené významným nárůstem hladin jaterních enzymů AST, ALT a ALP.^{38,39}

Funkční a morfologické změny jaterní tkáně bývají provázány také změnami v transkriptomu. Poulsen et al. ve své studii vystavili myši intratracheální expozici GO a rGO (v dávkách 18, 54 a 162 μ g/myš). Z výsledků vyplývá, že exprese genů v jaterní tkáni byla významněji ovlivňována expozicí GO. Vyšší dávky GO i rGO aktivovaly geny, které jsou součástí signálních drah pro regulaci syntézy lipidů a homeostázy (včetně homeostázy cholesterolu). Změny v expresi nukleárních receptorů transkripčních faktorů LXR/RXR napovídají, že vlivem expozice došlo ke zvýšení metabolismu a biosyntézy cholesterolu, zatímco míra lipogeneze a transportu cholesterolu byly omezeny.⁴⁰

Vedle prokazatelné střevní a jaterní toxicity některých CNM je na druhou stranu nutno zmínit také jejich protektivní účinky, reprezentované především zástupci z řady fullerenu. Organová toxicita fullerenu je nejen velmi nízká až zanedbatelná, ale naopak existují důkazy o tom, že expozice fullerenu podporuje regeneraci a normální fyziologický stav tkání (včetně tkání střev a jater). Ve studii autorů Takahashi et al. byli potkani orálně exponováni fullerenem (C₆₀) v dávkách 1, 10, 100 a 1000 mg/kg/den po dobu 29 dní. V následujících 14 dnech nebyly u žádné z dávek pozorovány patologické organové změny a nebyla pozorována ani organová kumulace. Jedinou pozorovatelnou změnou byl nevýznamný nárůst hmotnosti jater. Zvířata exponovaná nejvyšší dávkou měla černou stolici a stopy fullerenu byly nalezeny v žaludku a v tlustém střevě.⁴¹ Protektivní účinek fullerenu (C₆₀) popsali například Elshater et al. V jejich studii byl potkanům podáván hepatotoxický cyklofosfamid, přičemž jedna ze skupin dostávala navíc také fulleren C₆₀ (4 mg/kg/denně po dobu 10 dní). U těchto potkanů (ve srovnání s potkany, kteří dostávali pouze cyklofosfamid) došlo k normalizaci krevního obrazu (erytrocytů, trombocytů i leukocytů), neklesla hladina hemoglobinu a byly nalezeny nižší hladiny ALT, AST, ALP a oxidačního stresu.⁴²

Z dalších živočišných druhů, které byly využity k monitorování účinků CNM, je možné zmínit například kachnu domácí. Al-Badri et al. se pokusili o odhad hepatotoxických účinků v oblasti, jejíž prostředí bylo kontaminováno CNM. Zde žijící kachny domácí tak byly kontinuálně vystaveny expozici ultrajemných sazí (*carbon black*) a MWCNT. Z výsledků vyplývá,

že játra kachen vykazovala zřetelné známky poškození. Došlo k dilataci sinusoidů, kongesci a k zánětu. Autoři se domnívají, že k poškození jater může docházet i u ostatních zde žijících živočichů, včetně exponovaných osob.⁴³ Vzhledem k tomu, že se CNM mohou dostávat i do vodního prostředí, jsou významné studie s vodními živočichy. V jedné studii Chernick et al. testovali toxicitu MWCNT na rybách *Oryzias latipes* (medaka japonská). Ryby byly exponovány orálně v sedmi dávkách během 16 dní. Mezi nálezy patří především poškození jater a žlučových cest. Histologická analýza odhalila otoky drsného endoplazmatického retikula, zvýšenou lysozomální aktivitu hepatocytů a otoky v intrahepatických žlučových cestách.⁴⁴

5.3 ZÁVĚR

Gastrointestinální trakt je jednou se vstupních bran CNM do organismu, kam mohou pronikat s potravou, tekutinami, léky atd. Skrze něj pak mohou přestupovat do tkání a krevního oběhu, kde, jak jsme již popsali, mohou působit i toxicky. Toxicita byla prokázána také vůči buňkám gastrointestinálního traktu, a to jak *in vitro*, tak *in vivo*. Jak se ukazuje, toxicky působí hlavně MWCNT, SWCNT, grafen, GO a rGO. Mohou poškodit nejen střevní sliznici, ale také játra. Často se jedná o poškození zprostředkované indukci chronického zánětu a oxidačního stresu. Alarmující je, že některé studie dokládají také mezigenerační toxicitu.

5.4 LITERATURA

1. Sohal IS, O'Fallon KS, Gaines P, Demokritou P, Bello D. Ingested Engineered Nanomaterials: State of Science in Nanotoxicity Testing and Future Research Needs. *Part Fibre Toxicol.* 2018;15(1):1–31. doi:10.1186/S12989-018-0265-1.
2. Masyutin A, Erokhina M, Sychevskaya K et al. Multi-Walled Carbon Nanotubes: Biodegradation by Gastric Agents in Vitro and Effect on Murine Intestinal System. *MS&E.* 2015;98(1):012008. doi:10.1088/1757-899X/98/1/012008.
3. Guarnieri D, Sánchez-Moreno P, Del Rio Castillo AE et al. Biotransformation and Biological Interaction of Graphene and Graphene Oxide During Simulated Oral Ingestion. *Small.* 2018;14(24):1800227. doi:10.1002/sml.201800227.
4. Lu K, Dong S, Xia T, Mao L. Kupffer Cells Degrade 14C-Labeled Few-Layer Graphene to 14CO₂ in Liver Through Erythrophagocytosis. *ACS Nano.* 2021;15(1):396–409. doi:10.1021/acsnano.0c07452.
5. Rana SVS. A Comprehensive Assessment of Hepatotoxicity Induced by Engineered Nanoparticles: A Review. *J Toxicol Risk Assess.* 2020;6(2):035. doi:10.23937/2572-4061.1510035.
6. 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.
7. Zhang YN, Poon W, Tavares AJ, McGilvray ID, Chan WCW. Nanoparticle–Liver Interactions: Cellular Uptake and Hepatobiliary Elimination. *J Control Release.* 2016;240:332–348. doi:10.1016/J.JCONREL.2016.01.020.
8. Bartucci R, Paramanandana A, Boersma YL, Olinga P, Salvati A. Comparative Study of Nanoparticle Uptake and Impact in Murine Lung, Liver and Kidney Tissue Slices. *Nanotoxicology.* 2020;14(6):847–865. doi:10.1080/17435390.2020.1771785.
9. Bartneck M, Warzecha KT, Tacke F. Therapeutic Targeting of Liver Inflammation and Fibrosis by Nanomedicine. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2014;3(6):364–376. doi:10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.02.

10. Kodavanti T, Tennant A, Hughes M. Toxicity of Multi-walled Carbon Nanotubes in Rat and Human Intestinal Cell Models. Presented at: Society of Toxicology Annual Meeting; March 15–19, 2020; Anaheim, CA. Poster. doi:10.23645/epacomptox.19104815.
11. Heshmati M, Hajibabae S, Barikrow N. Genotoxicity and Cytotoxicity Assessment of Graphene Oxide Nanosheets on HT29 Cells. *J Kermanshah Univ Med Sci.* 2018;22(1): e69641. doi:10.5812/jkums.69641.
12. Domenech J, Hernández A, Demir E, Marcos R, Cortés C. Interactions of Graphene Oxide and Graphene Nanoplatelets with the In Vitro Caco-2/HT29 Model of Intestinal Barrier. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–15. doi:10.1038/s41598-020-59755-0.
13. Cebadero-Domínguez O, Ferrández-Gómez B, Sánchez-Ballester S, Moreno J, Jos A, Cameán AM. In Vitro Toxicity Evaluation of Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide on Caco-2 Cells. *Toxicol Rep.* 2022;9:1130–1138. doi:10.1016/J.TOXREP.2022.05.010.
14. Feng W, Wang J, Li B et al. Graphene Oxide Leads to Mitochondrial-Dependent Apoptosis by Activating ROS-p53-mPTP Pathway in Intestinal Cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2022;146:106206. doi:10.1016/J.BIOCEL.2022.106206.
15. Garriga R, Herrero-Contiente T, Palos M et al. Toxicity of Carbon Nanomaterials and Their Potential Application as Drug Delivery Systems: In Vitro Studies in Caco-2 and MCF-7 Cell Lines. *Nanomaterials.* 2020;10(8):1–21. doi:10.3390/nano10081617.
16. Gao Y, Xu A, Shen Q, Xie Y, Liu S, Wang X. Graphene Oxide Aggravated Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis Through Intestinal Epithelial Cells Autophagy Dysfunction. *J Toxicol Sci.* 2021;46(1):43–55. doi:10.2131/jts.46.43.
17. Tilton SC, Karin NJ, Tolic A et al. Three Human Cell Types Respond to Multi-Walled Carbon Nanotubes and Titanium Dioxide Nanobelts with Cell-Specific Transcriptomic and Proteomic Expression Patterns. *Nanotoxicology.* 2014;8(5):533–548. doi:10.3109/17435390.2013.803624.
18. Lai X, Yost BLB, Clack JW et al. Protein Expression Profiles of Intestinal Epithelial Co-Cultures: Effect of Functionalised Carbon Nanotube Exposure. *Int J Biomed Nanoscience Nanotechnol.* 2013;3(1-2):127–162. doi:10.1504/ijbnn.2013.054508.
19. 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.
20. 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.
21. Couvillion SP, Danczak RE, Cao X et al. Graphene Oxide Exposure Alters Gut Microbial Community Composition and Metabolism in an In Vitro Human Model. *NanoImpact.* 2023;30:100463. doi:10.1016/J.IMPACT.2023.100463.
22. 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/sml.201202792.
23. Loutfy SA, Salaheldin TA, Ramadan MA, Farroh KY, Abdallah ZF, Youssef T. Synthesis, Characterization and Cytotoxic Evaluation of Graphene Oxide Nanosheets: In Vitro Liver Cancer Model. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(4):955. doi:10.22034/APJCP.2017.18.4.955.
24. Kalman J, Torrent F, Navas JM. Cytotoxicity of Three Graphene-Related Materials in Rainbow Trout Primary Hepatocytes Is Not Associated to Cellular Internalization. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2022;231:113227. doi:10.1016/j.ecoenv.2022.113227.
25. Uribe-Calderon JA, Poot-Bote CG, Cervantes-Uc JM, Pacheco-Pantoja EL, Echevarría-Machado I, Rodríguez-Fuentes N. Physicochemical and Biological Characterization of Oxidized Multi-Walled Carbon Nanotubes on HepG2 Liver Cells. *J Nanopart Res.* 2022;24(7):1–19. doi:10.1007/s11051-022-05489-1.

26. Zhao C, Zhou Y, Liu L et al. Lipid Accumulation in Multi-Walled Carbon Nanotube-Exposed HepG2 Cells: Possible Role of Lipophagy Pathway. *Food Chem Toxicol.* 2018;121:65–71. doi:10.1016/J.FCT.2018.08.033.
27. Piret JP, Vankoningsloo S, Noël F et al. Inflammation Response at the Transcriptional Level of HepG2 Cells Induced by Multi-Walled Carbon Nanotubes. *J Phys Conf Ser.* 2011;304:012040. doi:10.1088/1742-6596/304/1/012040
28. 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
29. Wu Q, Yin L, Li X, Tang M, Zhang T, Wang D. Contributions of Altered Permeability of Intestinal Barrier and Defecation Behavior to Toxicity Formation From Graphene Oxide in Nematode *Caenorhabditis Elegans*. *Nanoscale.* 2013;5(20):9934–9943. doi:10.1039/c3nr02084c
30. Chen H, Zhao R, Wang B et al. Acute Oral Administration of Single-Walled Carbon Nanotubes Increases Intestinal Permeability and Inflammatory Responses: Association With the Changes in Gut Microbiota in Mice. *Adv Healthc Mater.* 2018;7(13):1701313. doi:10.1002/ADHM.201701313
31. Zheng M, Lu J, Lin G, Su H, Sun J, Luan T. Dysbiosis of Gut Microbiota by Dietary Exposure of Three Graphene-Family Materials in Zebrafish (*Danio Rerio*). *Environ Pollut.* 2019;254:112969. doi:10.1016/j.envpol.2019.112969
32. Ji Z, Zhang D, Li L et al. The Hepatotoxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes in Mice. *Nanotechnology.* 2009;20(44):445101. doi:10.1088/0957-4484/20/44/445101
33. Adedara IA, Anao OO, Forcados GE et al. Low Doses of Multi-Walled Carbon Nanotubes Elicit Hepatotoxicity in Rats With Markers of Oxidative Stress and Induction of Pro-Inflammatory Cytokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;503(4):3167–3173. doi:10.1016/j.bbrc.2018.08.112
34. Xu YY, Ge J, Zhang MH et al. Intravenous Administration of Multiwalled Carbon Nanotubes Aggravates High-Fat Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis in Sprague Dawley Rats. *Int J Toxicol.* 2016;35(6):634–643. doi:10.1177/1091581816653363
35. Zhang HY, Chen RL, Shao Y, Wang HL, Liu ZG. Effects of Exposure of Adult Mice to Multi-Walled Carbon Nanotubes on the Liver Lipid Metabolism of Their Offspring. *Toxicol Res.* 2018;7(5):809–816. doi:10.1039/c8tx00032h
36. Principi E, Girardello R, Bruno A et al. Systemic Distribution of Single-Walled Carbon Nanotubes in a Novel Model: Alteration of Biochemical Parameters, Metabolic Functions, Liver Accumulation, and Inflammation In Vivo. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:4299–4316. doi:10.2147/IJN.S109950
37. Zhang Y, Ma C, Wang Z et al. Large-Sized Graphene Oxide Synergistically Enhances Parenchymal Hepatocyte IL-6 Expression Monitored by Dynamic Imaging. *Nanoscale.* 2020;12(15):8147–8158. doi:10.1039/C9NR10713D
38. Patlolla AK, Rondalphi J, Tchounwou PB. Biochemical and Histopathological Evaluation of Graphene Oxide in Sprague-Dawley Rats. *Austin J Environ Toxicol.* 2017;3(1):1021.
39. Nirmal NK, Awasthi KK, John PJ. Hepatotoxicity of Graphene Oxide in Wistar Rats. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020;28(34):46367–46376. doi:10.1007/S11356-020-09953-0
40. Poulsen SS, Bengtson S, Williams A et al. A Transcriptomic Overview of Lung and Liver Changes One Day After Pulmonary Exposure to Graphene and Graphene Oxide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2021;410:115343. doi:10.1016/j.taap.2020.115343
41. Takahashi M, Kato H, Doi Y et al. Sub-Acute Oral Toxicity Study With Fullerene C60 in Rats. *J Toxicol Sci.* 2012;37(2):353–361. doi:10.2131/jts.37.353
42. Elshater AEA, Haridy MAM, Salman MMA, Fayyad AS, Hammad S. Fullerene C60 Nanoparticles Ameliorated Cyclophosphamide-Induced Acute Hepatotoxicity in Rats. *Biomed Pharmacother.* 2018;97:53–59. doi:10.1016/j.biopha.2017.10.134

43. Al-Badri AM, Bargooth AF, Al-Jebori JG, Zegyer EAK. Identification of Carbon Nanotube Particles in Liver Tissue and Its Effects on Apoptosis of Birds Exposed to Air Pollution. *Vet World*. 2019;12(9):1372–1377. doi:10.14202/vetworld.2019.1372-1377
44. Chernick M, Kennedy A, Thomas T et al. Impacts of Ingested MWCNT-Embedded Nanocomposites in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Nanotoxicology*. 2021;15(10):1403–1422. doi:10.1080/17435390.2022.2028919

6 KOŽNÍ A OČNÍ TOXICITA

Kůže je největším a nejkompexnějším orgánem lidského těla s mnoha funkcemi. Tvoří fyzikální bariéru mezi vnějším a vnitřním prostředím a chrání organismus před chemickými, fyzikálními a mikrobiálními vlivy. Je zapojená do řady fyziologických procesů, které zahrnují termoregulaci, čítí, imunologickou surveillance, kontrolu ztráty tekutin a depozici tuků a vody. Skládá se z několika vrstev, mezi něž patří epidermis (vrchní část kůže, již kryje stratum corneum), dermis, kožní adnexa (mazové a potní žlázy a vlasové folikuly) a podkoží, ve kterém se nacházejí keratinocyty, fibroblasty, Langerhansovy buňky, buňky imunitního systému, melanocyty a Merkelovy buňky.¹

Nanočástice reagují s vrchní vrstvou pokožky (epidermis), primárně se stratem corneum. To je složeno z mrtvých, plochých, terminálně diferencovaných keratinocytů (korneocytů) a extracelulární matrix, která obsahuje lipidy. Povrch strata corneum je osídlen kožním mikrobiomem, který spolu s epidermis vytváří její „kyselý plášť“ jako ochranu před útoky patogenů a pomáhá zachovávat její přirozené prostředí. Mikrobiom také interaguje s imunitním systémem, podporuje jeho funkce a brání přemnožení oportunních patogenů na povrchu kůže.^{2,3} Hlubší vrstvy epidermis jsou tvořeny korneocyty a keratinocyty, které jsou propojené těsnými mezibuněčnými spoji. Pevnost spojů (a tedy i epitelu) se dynamicky mění v závislosti na působení externích faktorů, stimulů a fyziologických potřeb organismu. Díky tomu se mění permeabilita kůže, přestup iontů, proteinů, ale také penetrace xenobiotik či migrace imunitních buněk.⁴

Transdermální přestup nanočástic do organismu je modifikován jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Cesty vstupu lze v prvním přiblížení rozdělit na cesty paracelulární, intercelulární a transcelulární. Dalšími cestami pak může být průnik přes vlasové folikuly a potní a mazové žlázy.⁵⁻⁷ Nanočástice penetrují do nižších vrstev pokožky, kde vyvolávají různé typy reakcí, mezi něž řadíme iritaci, kontaktní kopřivku, kontaktní dermatitidu a fotosensitivizaci. Současně nanočástice pronikají do systémové cirkulace a následně do orgánů a tkání.⁸

Při hodnocení vlivu vnější expozice je nutno zmínit také oko, které je velmi citlivé k vnějším faktorům. Nanočástice mohou dráždit jak povrch oka, tak i retinální buňky, ke kterým se dostávají jinou než topickou cestou (například inhalací nebo ze systémové cirkulace po perorální expozici). Oční toxicita tedy bude následně zmíněna společně s toxicitou kožní.⁹

6.1 IN VITRO STUDIE

In vitro studie dermální toxicity jsou zaměřeny na interakce uhlíkových nanočástic s jednotlivými vrstvami pokožky a s očními kompartmenty. Výsledky naznačují, že uhlíkové nanočástice mohou zvyšovat oxidační stres, vyvolávat zánětlivou odpověď, poškozovat buňky a způsobovat jejich smrt.¹⁰ V následujícím textu se zaměříme na vliv CNM na různé typy buněk, které se nacházejí v pokožce. Jako poslední zmíníme toxicitu CNM vůči oku.

Vnějším vlivům jsou nejvíce vystaveny keratinocyty, které představují hlavní buněčnou linii pro *in vitro* testování dermatotoxicity. Ku příkladu Frontiñán-Rubio et al. provedli dvě studie zaměřené na hodnocení dermatotoxicity vybraných uhlíkových nanomateriálů (CNM). V první studii ověřovali vliv oxidu grafenu (GO) a vícevrstvého grafenu (FLG) na metabolismus a funkce lidských immortalizovaných keratinocytů (HaCaT). Nízké koncentrace GO i FLG (5 µg/ml / 7 dní) měnily metabolický profil buněk. GO zvyšovala produkci alaninu, pyruvátu, glycerofosfocholinu a uridinofosfátu, zatímco přítomnost FLG vedla ke zvýšení hladin fumarátu, glycerofosfocholinu a ke snížení hladin pyruvátu, fosfokreatinu a fosfocholinu. Oba typy nanočástic redukovaly hladinu glukózy. Při podrobnější analýze autoři zjistili, že nanočástice zasahují do metabolických cest, které jsou kritické pro buněčnou viabilitu a mobilitu. Mezi alterovanými cestami byla syntéza proteinů, Krebsův cyklus, cyklus močovin, recyklování amonia a metabolismus methioninu. Snížení hladiny glukózy bylo spojené s nadprodukcí volných kyslíkových radikálů (ROS), zvýšením hladiny volného cytosolového Ca²⁺, apoptózou a nekrotizací buněk.¹¹

V druhé studii tiž autoři testovali na keratinocytech HaCaT tři typy grafenových nanomateriálů, FLG a dva typy GO (GO1, GO2). Buňky byly kultivovány se všemi CNM (5 µg/ml) po dobu sedmi nebo třiceti dnů. Experimenty potvrdily, že přítomnost CNM mění metabolom a bioenergetiku buněk, a to zvláště v případech, kdy se buňky nacházely ve stresovém stavu. Byla rovněž zjištěna zvýšená úroveň proliferace a klonogenity buněk (zejména při kultivaci s GO2). Nadměrná míra proliferace může být spojována s vyšším rizikem vzniku a rozvoje karcinogeneze, což potvrdily některé dále uvedené indikátory. Buňky vystavené GO2 se po třiceti dnech kultivace významně zvětšily (stejně jako jejich jádra), rychleji se pohybovaly po dvojrozměrných površích v testu hojení a byla u nich zjištěna kumulace onkometabolitů. Autoři se proto domnívají, že některé typy grafenových nanočástic mohou mít (i při subchronické úrovni expozice) karcinogenní účinky.¹²

Toxicitu grafenu hodnotili také Salesa et al. V experimentu byl použit FLG (2–10 vrstev), který byl aplikován do kultivačních médií HaCaT v dávkách 0–10 µg/ml po dobu 12 a 24 hodin. Proliferační aktivita buněk byla posuzována za 72 a 96 hodin od aplikace. Autoři potvrdili vztah mezi dávkou a mírou toxických účinků (snížováním viability) s prahovou koncentrací 0,5 µg/ml FLG. Zajímavé bylo zjištění, že i podprahové (netoxické) koncentrace FLG 0,005 a 0,01 µg/ml dokázaly po 72 a 96 hodinách významně zvyšovat proliferační aktivitu buněk. Analýza změn v expresi třinácti vybraných genů prokázala zvýšenou expresi u šesti z nich. Jednalo se o SOD1 (superoxiddismutáza), CAT (kataláza), TGFB1 (*transforming growth factor β*), FN1 (fibronektin), CDH1 (kaderin 1) a FBN (fibrilin 1).¹³

Autoři Pelin et al. exponovali buňky HaCaT různým typům GO a FLG po dobu 24 a 72 hodin. Testované nanočástice redukovaly buněčnou viabilitu, alterovaly mitochondriální funkce a poškozovaly plazmatickou membránu. Nejvyšší toxicitu vykazaly nejvíce oxidované GO s největším průměrem. Tyto částice poškozovaly mitochondrie a plazmatickou membránu již při EC₅₀ 5,4 a 2,9 µg/ml (zatímco v případě FLG byly hodnoty EC₅₀ 62,8 a 45,5 µg/ml).¹⁴ Násled-

ná studie stejných autorů potvrdila již získané výsledky, a navíc zjistila, že FLG a GO v dávce 100 $\mu\text{g/ml}$ / 72 h zvyšují depolarizaci mitochondriální membrány a produkci ROS (minimálně o 44 %; významný nárůst produkce ROS byl detekován již při dávce 0,4 $\mu\text{g/ml}$ / 24 h).¹⁵

Buněčné linie HaCaT mohou být ovlivňovány také MWCNT, SWCNT a fullereny. Danielle McShan a Hongtao Yu vystavili buňky HaCaT nepurifikovaným, purifikovaným a karboxylovaným MWCNT (20 $\mu\text{g/ml}$) po dobu 0,5 a 24 hodin. Bylo nalezeno nevýznamné snížení viability buněk a nevýznamné poškození DNA, které zřejmě souviselo s významným nárůstem úrovně oxidačního stresu.¹⁶ Brian Palmer, Sarah Phelan-Dickenson a Lisa DeLouise testovali nekarboxylované a karboxylované MWCNT (HaCaT; expozice 0–5 $\mu\text{g/ml}$ po dobu 3 a 24 hodin). MWCNT s vysokou mírou karboxylace významně snižovaly viabilitu buněk a navozovaly buněčnou smrt, zatímco nekarboxylované MWCNT významně zvyšovaly oxidační stres. Výsledky tak naznačují, že MWCNT indukují buněčnou smrt nezávisle na míře oxidačního stresu.¹⁷

Obdobně na strukturu HaCaT působí i SWCNT. Autoři Manna et al. uvádějí, že SWCNT jsou schopny redukovat viabilitu buněk i na velmi nízké expoziční hladině (0,1 $\mu\text{g/ml}$ / 72 h) a dále ji snižovat se zvyšující se dávkou. Přítomnost SWCNT vede k aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B, který kontroluje expresi mnoha prozánětlivých cytokinů, jako jsou IL-8, IL-1, IL-6 a TNF α (přímá indukce zánětu).¹⁸ Ve studii autorů Onga et al. snižovaly SWCNT (12,5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) buněčnou viabilitu, omezovaly růst a proliferaci buněk a inhibovaly signalizaci Hsp90. Analýza genové exprese prokázala sníženou expresi Hsp90 vlivem SWCNT a narušení proteinové homeostázy v buňce. Porucha vede k progresi buněčného stárnutí (Hsp90 funguje jako chaperon podílející se na „refoldingu“ proteinů).¹⁹

K dalším uhlíkovým nanočásticím, které byly testovány na buněčných liniích HaCaT, patří fullereny a jejich deriváty. Saathoff et al. vystavili buňky HaCaT třem typům fullerenu, $\text{C}_{60}(\text{OH})_{20}$, $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ a $\text{C}_{60}(\text{OH})_{32}$, v dávkách 0,0005–42,5 $\mu\text{g/ml}$ / 24 a 48 h. Snížení viability autoři pozorovali pouze u buněk vystavených nejvyšší dávce $\text{C}_{60}(\text{OH})_{32}$. Fullerenoly $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ a $\text{C}_{60}(\text{OH})_{32}$ snižovaly (v nejvyšších dávkách) expresi IL-8, avšak $\text{C}_{60}(\text{OH})_{32}$ v dávce 0,34 $\mu\text{g/ml}$ / 24 h produkci IL-8 naopak zvyšoval. Autoři uvádějí, že v průběhu experimentu docházelo k paracelulární i intracelulární agregaci/aglomeraci. Fullerenol $\text{C}_{60}(\text{OH})_{20}$ aglomeroval v cytoplazmatických vakuolách, zatímco aglomeráty fullerenu $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ byly detekovány uvnitř buněk fokálně přichycené k buněčné membráně. Fullerenol $\text{C}_{60}(\text{OH})_{32}$ vytvářel menší agregáty uvnitř buněk a vykazoval menší interakce s membránami. Výsledky naznačují dávkovou závislost toxicity fullerenu a její úzkou vazbu na míru hydroxylace molekulárních struktur.²⁰

Fibroblasty jsou základní buňky vazivové tkáně, rozptýlené v různých částech těla. Hrají důležitou roli v epidermální proliferaci, regeneraci a tvorbě extracelulární matrix. Liao et al. exponovali lidské dermální fibroblasty (NHDF) grafenu a GO (50 $\mu\text{g/ml}$ / 24 h). Výsledkem bylo významné snížení buněčné viability, zvýšení hladiny oxidačního stresu a narušení mitochondriální aktivity.²¹ K podobným výsledkům došli i autoři de Godoy et al., kteří kultivovali myši kožní fibroblasty s MWCNT funkcionalizovanými tetraetylenpentaminem (MWCNT-TEPA; 1, 50, 250, 500 a 1000 mg/ml / 24 h). MWCNT-TEPA významně snižovaly viabilitu buněk, na druhou stranu exprese volných radikálů a prozánětlivého cytokinu TNF- α významně vzrostly. Vyšší dávky MWCNT-TEPA způsobovaly závažnější buněčnou poškození.²² K podobným závěrům došli i Anita Patlolla, Brionna Knighten a Paul Tchounwou, kteří sledovali vliv MWCNT na NHDF. Toxický účinek byl závislý na dávce, přičemž vyšší koncentrace poškozovaly DNA a aktivovaly intracelulární cesty vedoucí k apoptóze. Oba uvedené

jevy vedly k významnému poklesu buněčné viability.²³ Autoři Tian et al. porovnávali vliv různých typů CNM na NHDF. V rozsáhlé studii exponovali tyto buňky SWCNT, MWCNT, sazim (*carbon black*), grafitu a aktivnímu uhlíku v široké škále koncentrací po dobu 1 až 5 dní. Nejvyšší pokles viability buněk byl zjištěn v případě expozice SWCNT. Vedle snížení viability nanočástice alterovaly rovněž buněčnou morfologii se změnou tvaru a narušením adhezivity. Míra toxického účinku byla závislá na dávce a na čase.²⁴

Vedle toxických účinků CNM je nutné zmínit i jejich pozitivní vlivy. Ve studii Jennifer Mytych, Macieje Wnuka a Sureshe Rattana bylo prokázáno, že fibroblasty z kůže lidského obličejce (FSF1) po expozici ND (dávky do 0,5 µg/ml) snáze proliferovaly a měly vyšší hojivou kapacitu a metabolickou aktivitu. ND rovněž vyvolávaly buněčný stres se zvýšenou expresí hemoxydogenázy, sirtuinu 1 a DNA metyltransferázy. Ve výsledku tedy došlo k prodloužení doby přežití fibroblastů a ke zlepšení jejich funkcí.²⁵ Odborná literatura uvádí, že i aplikace dvojrozměrných grafenových struktur mohou vést ke zvýšení proliferace a zlepšení funkcí lidských fibroblastů (k vyšší efektivitě hojení). Safina et al. připravili filmy z grafenu a GO, které osadili NHDF. Komplex potencoval růst a bioaktivitu buněk a významně posiloval jejich regenerační schopnost.²⁶

Vedle keratinocytů a kožních fibroblastů byly v některých *in vitro* studiích použity i modely lidské epidermis nebo přímo vzorky lidské kůže. Například autoři Silva et al. hodnotili vliv GO na kožní permeabilitu. V jejich experimentu byly použity vzorky lidské kůže o tloušťce 0,8 mm. Nejvyšší míra penetrace byla zjištěna při koncentraci 1000 µg GO / ml disperze. Nižší koncentrace sice penetrovaly rychleji, nicméně konečný celkový objem GO v pokožce byl nižší. Dermální penetrace CNM je využívána u fototerapie. Uhlíkové nanočástice v kůži absorbují záření blízké infračervenému pásmu, což má za následek nárůst lokální teploty a zvýšení účinnosti terapie.²⁷

Autoři Fusco et al. studovali intenzitu dráždivých účinků CNM na kůži. V experimentu použili SkinEthic™ model rekonstruované lidské epidermis (RhE), na jehož povrch aplikovali FLG, FLG funkcionalizované dodecylsíránem sodným a dodecylbenzensulfonátem sodným, GO, rGO a grafen po dobu 42 minut. Znamky iritace byly zjištěny pouze u funkcionalizovaných FLG. Došlo ke ztrátě denzity ve stratu corneum a stratu granulosum a fragmentaci keratinocytových jader stratum spinosum a stratum basale. GO indukoval pouze mírné poškození strata corneum. Všechny použité nanočástice kromě grafenu formovaly malá depozita ve stratu corneum a velké agregáty na povrchu epidermis. Autoři sledovali také hladinu zástupce skupiny alarminů IL-1α. K zvýšení jeho hladiny došlo pouze u funkcionalizovaných FLG. Zdá se tedy, že z testované skupiny CNM je za kožní iritanty možné považovat pouze funkcionalizované FLG.²⁸

Dermální expozice bývá spojena i s expozicí oka. Autoři Yan et al. použili pro hodnocení toxicity CNM pro oko retinální pigmentový epitel (RPE). Epitelové buňky byly exponovány MWCNT, plazmou modifikovanými MWCNT, hydroxylovanými MWCNT a karboxylovanými MWCNT (5–100 mg/ml / 72 h). Nejvyšší koncentrace všech CNM způsobovaly významné snížení viability buněk, uvolňování laktátdehydrogenázy a zesílenou produkci volných radikálů (byly nalezeny apoptotické buňky). Nejvyšší míra oční toxicity byla zaznamenána u nemodifikovaných MWCNT. Karboxylovaná forma MWCNT se jevila jako biokompatibilní.²⁹ Ou et al. exponovali ARPE-19 (imortalizované lidské retinální buňky) GO a rGO (10–200 µg/ml / 6–72 h). Vedle nárůstu hladiny oxidačního stresu způsobovaly nanočástice také snížení viability a poškození DNA. Částice rGO vykazovaly vyšší míru genotoxicity než částice GO.³⁰

Wu et al. zkoumali toxicitu GO vůči lidským epitelovým buňkám rohovky (hCorEC) a lidským epitelovým spojivkovým buňkám (hConEC). Dávky GO 12,5–100 µg/ml nevykázaly během akutní dvouhodinové expozice známky toxicity vůči hCorEC ani vůči hConEC. Celodenní (24hodinová) expozice obou buněčných linií GO však významně zvýšila produkci volných kyslíkových radikálů, což mělo za následek spuštění apoptotických mechanismů.³¹ Ve studii An et al. byly kryší rohovkové epitelové buňky (RCEC) vystaveny působení GO a rGO (5–50 µg/ml / 24, 48 a 72 h). Částice GO, v závislosti na čase a dávce, výrazně snižovaly viabilitu buněk. Byl nalezen zvýšený výskyt apoptózy a nekrózy a docházelo i k narušování buněčného cyklu. Obecně, částice GO vykazovaly vyšší míru toxicitu než částice rGO.³²

Obdobně jako u dermálních expozic, i u expozic oka je nutné zmínit některé pozitivní účinky CNM. Bylo například prokázáno, že uhlíkové nanočástice podporují regeneraci buněk oka, konkrétně jejich růst a diferenciaci. Zambrano-Andazol et al. studovali *in vitro* interakce membrány z rGO s vybranými buněčnými liniemi oka (buňkami pigmentového epitelu lidské sítnice, lidskými rohovkovými epitelovými buňkami CHCE-T, primárními rohovkovými keratinocyty a primárními lidskými rohovkovými limbálními buňkami). Výsledkem byla nízká úroveň genotoxicity a významná indukce dělení a migrace buněk. Experiment *in vivo*, který byl proveden po *in vitro* studii, potvrdil regenerační potenciál rGO membrány.³³

6.2 IN VIVO STUDIE

Také v *in vivo* studiích byla sledována kožní a oční iritace a senzibilace po topické aplikaci CNM. Výsledky jsou v porovnání s výsledky *in vitro* studií komplexnější a poskytují validnější údaje o potenciální rizikovosti CNM pro člověka.

Například Ema et al. zaměřili výzkum na dermální senzibilaci a oční iritaci po aplikaci SWCNT-N (Nikkiso) a SWCNT-SG (*super-growth*) a MWCNT N a M (Mitsui) u králíků a morčat. Doba sledování byla 24 a 48 hodin od aplikace 0,1 % SWCNT-N, 0,5 % SWCNT-SG, 0,25 % MWCNT-N a 1 % MWNT-M do konjunktiválního vaku. Po 24 hodinách se u tří králíků po aplikaci N-MWCNT objevila mírná konjunktivální hyperémie, která však do 48 hodin vymizela. Kožní iritace byla testována pomocí náplastí s nanočásticemi a změny byly hodnoceny za 1, 24, 48 a 72 hodin od jejich odstranění. Byla pozorována mírná hyperémie u tří králíků exponovaných N-MWCNT. Iritace kůže, obdobně jako oční iritace, vymizela do 48 hodin po sejmutí náplastí. U morčat k senzibilizaci kůže nedošlo vůbec. Z tohoto pohledu lze testované nanočástice charakterizovat jako slabé iritanty a senzibilizanty.³⁴ Experimenty autorů Kim et al. byly zaměřeny na senzibilizaci kůže myší plátky grafenu. Ani nejvyšší koncentrace suspenze grafenu neměly za následek senzibilaci pokožky.³⁵ Podobné výsledky získali Park et al., kteří aplikovali MWCNT (1,000 µg/ml) na zdravou a poškozenou (abrazí) pokožku králíků. Po 24 ani 48 hodinách od aplikace nebyly na pokožce zjištěny známky poškození (edém nebo hyperémie).³⁶ Ani Balakrishna Murthy, Sairam Kishore a Surekha Paneerselvam neuvádí nálezy známek toxického působení MWCNT na kůži a oko potkanů, králíků a morčat.³⁷

Vedle SWCNT a MWCNT byly studovány i dermální toxicity fullerenu. Experiment Xin Xia, Nancy Monteiro-Riviere a Jima Riviereho byl zaměřen na dermální absorpci fullerenu C₆₀. Pokožka odstavených selat byla exponována po dobu čtyř dnů fullerenu (200 µl nebo 500 µg/ml / 24 h) v toluenu, cyklohexanu, chloroformu a v minerálním oleji. Exponovaná pokožka byla přelepena páskou a byly odebrány vzorky pro histologickou analýzu.

Nanočástice C_{60} v toluenu, cyklohexanu a chloroformu penetrovaly přes stratum corneum a dosahovaly viabilní epidermis. Nejhlubší penetrace byla pro C_{60} zjištěna v chloroformu, nejnižší, téměř nulovou penetraci vykázal C_{60} v minerálním oleji.³⁸ Ema et al. testovali na králících a morčatech kožní iritaci (50 mg C_{60}), kožní senzibilizaci (40 mg C_{60}) a oční iritaci (100 mg C_{60}) fullerenu C_{60} . Z výsledků vyplývá, že nebyla pozorována žádná dermální reakce. V případě aplikace do oka byla zjištěna mírná hyperémie, která zcela vymizela do 24 hodin.³⁹ Ve studii autorů Kata et al. byly účinky fullerenu C_{60} (v kosmetickém produktu proti vráskám) testovány na dobrovolnících. Studie se účastnilo 23 žen, které používaly krém s fullerenem C_{60} a skvalenem dvakrát denně (pouze na jednu polovinu obličeje) po dobu osmi týdnů (na druhou polovinu obličeje nanášely krém bez fullerenu). Krém s fullerenem C_{60} nevyvolal žádnou závažnější (toxickou) reakci, naopak bylo pozorováno zlepšení kvality pokožky a snížení hloubky vrásek.⁴⁰ K podobným závěrům došla i studie autorů Miljkovice et al., kteří aplikovali ve skupině 38 dobrovolníků tělové mléko a krém na ruce s přísadkou hyper-harmonizovaného vodního komplexu hydroxylovaného fullerenu C_{60} (3HFWC). Během čtyřtýdenní (každodenní) aplikace došlo ke zlepšení kvality pokožky a nárůstu množství kolagenu v ní.⁴¹ Souhrnně řečeno, fulleren C_{60} je v kůži biologicky aktivní, podporuje tvorbu kolagenu a nevykazuje známky dermatotoxicity.

Protektivní vliv na kůži mají pravděpodobně i nanodiamanty (ND). V experimentu autorů Wua et al. byly dvě skupiny myši exponovány UVB záření, přičemž u jedné z nich byla před ozářením provedena topická aplikace ND. U této skupiny bylo po ozáření zjištěno (na rozdíl od skupiny bez aplikace ND) pouze velmi mírné poškození kůže. Částice ND nevykazovaly v experimentu žádné známky dermatotoxicity.⁴²

Některé *in vivo* experimenty byly zaměřené čistě na oční toxicitu. Například již zmiňovaní Wu et al. aplikovali po dobu pěti dnů potkanům do spojivkového vaku 50 nebo 100 $\mu\text{g/ml}$ GO. Částice GO indukovaly reverzibilní zarudnutí spojivky a poškození rohovkového epitelu. Jednorázové podání způsobovalo jen mírné obtíže, avšak opakovaná aplikace již patologické procesy v hlubších vrstvách oka vyvolala.³¹ Autoři Yan et al. aplikovali do jednoho oka králíků intravitreální injekci GO (0,1, 0,2 nebo 0,3 mg); do druhého oka byl aplikován solný roztok. V oku s GO nedošlo ke zvýšení nitroočního tlaku, narušení zraku či změnám na elektoretinogramu. Histologická analýza odhalila, že v oku s aplikací GO perzistovalo po ukončení experimentu ještě menší množství GO, k poškození sítnice však podle autorů nedošlo.⁴³ An et al. aplikovali po dobu 7 dní do pravého oka myši suspenzi GO nebo rGO. Při koncentracích 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$ GO byla detekována korneální opacita. U nižší koncentrace (25 $\mu\text{g/ml}$ GO) opacita zjištěna nebyla, nicméně prodloužená doba expozice (10 dní) již opacitu vyvolala. Expozice částicím rGO byla bez biologické odezvy. Histologická analýza prokázala narušení rohovky (s přítomností prozánětlivých buněk) u tkání oka vystavených GO. Částice GO indukovaly neovaskularizaci duhovky, zvyšovaly koncentrace prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-6 a IL-8 a koncentraci malondialdehydu (ukazatele oxidačního stresu). Výsledky naznačují přítomnost oční toxicity u GO, zatímco rGO vykazuje spíše biokompatibilitu.³²

6.3 ZÁVĚR

Pokožka je největším orgánem, který je v neustálém kontaktu s vnějším prostředím. Ačkoli funguje jako ochrana a bariéra před průnikem nežádoucích látek do organismu, není nepoškoditelná a její poškození může také zhoršit její ochranné funkce. Studie ohledně dermatotoxicity

přinášejí nekonzistentní závěry. Není tedy možné říci, zda a jak toxické CNM k pokožce jsou. Podobné je to s vystavením oka CNM. Toxicita je úzce limitována jen na některé zástupce CNM. Na druhou stranu se však potvrdily i ochranné účinky CNM. Mnohé z nich (například scaffolds či krycí materiály s nanočásticemi) významně podporují diferenciaci a proliferaci buněk (včetně keratinocytů a kožních fibroblastů) a zvyšují neoangiogenezi, čímž pomáhají při hojení akutních i chronických ran. Nelze rovněž opomenout výrazné protiiinfekční účinky, jež mohou zabránit infikování rány. Pro zvýšení úrovně biokompatibility je možné CNM relativně snadno funkcionalizovat.⁴⁴

6.4 LITERATURA

1. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. The Dynamic Anatomy and Patterning of Skin. *Exp Dermatol*. 2016;25(2):92–98. doi:10.1111/exd.12832.
2. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The Human Skin Microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(3):143–155. doi:10.1038/nrmicro.2017.157.
3. Murphrey MB, Miao JH, Zito PM. Histology, Stratum Corneum. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2020. Treasure Island, FL.
4. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M et al. External Antigen Uptake by Langerhans Cells With Reorganization of Epidermal Tight Junction Barriers. *J Exp Med*. 2009;206(13):2937–2946. doi:10.1084/jem.20091527.
5. Baroli B, Ennas MG, Loffredo F, Isola M, Pinna R, López-Quintela MA. Penetration of Metallic Nanoparticles in Human Full-Thickness Skin. *J Invest Dermatol*. 2007;127(7):1701–1712. doi:10.1038/sj.jid.5700733.
6. Sznitowska M, Janicki S, Williams AC. Intracellular or Intercellular Localization of the Polar Pathway of Penetration Across Stratum Corneum. *J Pharm Sci*. 1998;87(9):1109–1114. doi:10.1021/js980018w.
7. Lademann J, Richter H, Meinke MC et al. Drug Delivery With Topically Applied Nanoparticles: Science Fiction or Reality? *Skin Pharmacol Physiol*. 2013;26(4–6):227–233. doi:10.1159/000351940.
8. Monteiro-Riviere NA, Inman AO. Challenges for Assessing Carbon Nanomaterial Toxicity to the Skin. *Carbon N Y*. 2006;44(6):1070–1078. doi:10.1016/j.carbon.2005.11.004.
9. Zhu S, Gong L, Li Y, Xu H, Gu Z, Zhao Y. Safety Assessment of Nanomaterials to Eyes: An Important but Neglected Issue. *Adv Sci*. 2019;6(16):1802289. doi:10.1002/advs.201802289.
10. Dalla Colletta A, Pelin M, Sosa S, Fusco L, Prato M, Tubaro A. Carbon-Based Nanomaterials and Skin: An Overview. *Carbon N Y*. 2022;196:683–698. doi:10.1016/J.CARBON.2022.05.036.
11. Frontiñán-Rubio J, Victoria Gómez M, Martín C, González-Domínguez JM, Durán-Prado M, Vázquez E. Differential Effects of Graphene Materials on the Metabolism and Function of Human Skin Cells. *Nanoscale*. 2018;10(24):11604–11615. doi:10.1039/c8nr00897c.
12. Frontiñán-Rubio J, Llanos-González E, González VJ, Vázquez E, Durán-Prado M. Subchronic Graphene Exposure Reshapes Skin Cell Metabolism. *J Proteome Res*. 2022;21(7):1675–1685. doi:10.1021/ACS.JPROTEOME.2C00064.
13. Salesa B, Tuñón-Molina A, Cano-Vicent A, Assis M, Andrés J, Serrano-Aroca Á. Graphene Nanoplatelets: In Vivo and In Vitro Toxicity, Cell Proliferative Activity, and Cell Gene Expression. *Appl Sci*. 2022;12(2):720. doi:10.3390/APP12020720.
14. Pelin M, Fusco L, León V et al. Differential Cytotoxic Effects of Graphene and Graphene Oxide on Skin Keratinocytes. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–12. doi:10.1038/srep40572.
15. Pelin M, Fusco L, Martín C et al. Graphene and Graphene Oxide Induce ROS Production in Human HaCaT Skin Keratinocytes: The Role of Xanthine Oxidase and NADH Dehydrogenase. *Nanoscale*. 2018;10(25):11820–11830. doi:10.1039/c8nr02933d.

16. McShan D, Yu H. DNA Damage in Human Skin Keratinocytes Caused by Multiwalled Carbon Nanotubes With Carboxylate Functionalization. *Toxicol Ind Health*. 2014;30(6):489–498. doi:10.1177/0748233712459914.
17. Palmer BC, Phelan-Dickenson SJ, Delouise LA. Multi-Walled Carbon Nanotube Oxidation Dependent Keratinocyte Cytotoxicity and Skin Inflammation. *Part Fibre Toxicol*. 2019;16(1):1–15. doi:10.1186/s12989-018-0285-x.
18. Manna SK, Sarkar S, Barr J et al. Single-Walled Carbon Nanotube Induces Oxidative Stress and Activates Nuclear Transcription Factor- κ B in Human Keratinocytes. *Nano Lett*. 2005;5(9):1676–1684. doi:10.1021/nl0507966.
19. Ong LC, Tan YF, Tan BS et al. Single-Walled Carbon Nanotubes (SWCNTs) Inhibit Heat Shock Protein 90 (HSP90) Signaling in Human Lung Fibroblasts and Keratinocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2017;329:347–357. doi:10.1016/j.taap.2017.06.024.
20. Saathoff JG, Inman AO, Xia XR, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. In Vitro Toxicity Assessment of Three Hydroxylated Fullerenes in Human Skin Cells. *Toxicol Vitro*. 2011;25(8):2105–2112. doi:10.1016/j.tiv.2011.09.013.
21. Liao KH, Lin YS, MacOsko CW, Haynes CL. Cytotoxicity of Graphene Oxide and Graphene in Human Erythrocytes and Skin Fibroblasts. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2011;3(7):2607–2615. doi:10.1021/am200428v.
22. de Godoy KF, de Almeida Rodolpho JM, Brassolatti P et al. New Multi-Walled Carbon Nanotube of Industrial Interest Induce Cell Death in Murine Fibroblast Cells. *Toxicol Mech Methods*. 2021;31(7):517–530. doi:10.1080/15376516.2021.1930311.
23. Patlolla A, Knighten B, Tchounwou P. Multi-Walled Carbon Nanotubes Induce Cytotoxicity, Genotoxicity and Apoptosis in Normal Human Dermal Fibroblast Cells. *Ethn Dis*. 2010;20(1 Suppl 1): 65–72.
24. Tian F, Cui D, Schwarz H, Estrada GG, Kobayashi H. Cytotoxicity of Single-Wall Carbon Nanotubes on Human Fibroblasts. *Toxicol Vitro*. 2006;20(7):1202–1212. doi:10.1016/j.tiv.2006.03.008.
25. Mytych J, Wnuk M, Rattan SIS. Low Doses of Nanodiamonds and Silica Nanoparticles Have Beneficial Hormetic Effects in Normal Human Skin Fibroblasts in Culture. *Chemosphere*. 2016;148: 307–315. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.01.045.
26. Safina I, Bourdo SE, Algazali KM et al. Graphene-Based 2D Constructs for Enhanced Fibroblast Support. *PLoS One*. 2020;15(5). doi:10.1371/journal.pone.0232670.
27. Silva FALS, Costa-Almeida R, Timochenco L et al. Graphene Oxide Topical Administration: Skin Permeability Studies. *Materials*. 2021;14(11):2810. doi:10.3390/ma14112810.
28. Fusco L, Garrido M, Martín C et al. Skin Irritation Potential of Graphene-Based Materials Using a Non-Animal Test. *Nanoscale*. 2020;12(2):610–622. doi:10.1039/c9nr06815e.
29. Yan L, Li GX, Zhang S et al. Cytotoxicity and Genotoxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes With Human Ocular Cells. *Chin Sci Bull*. 2013;58(19):2347–2352. doi:10.1007/s11434-013-5800-8.
30. Ou L, Lv X, Wu Z et al. Oxygen Content-Related DNA Damage of Graphene Oxide on Human Retinal Pigment Epithelium Cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2021;32(2):1–9. doi:10.1007/S10856-021-06491-0.
31. Wu W, Yan L, Wu Q et al. Evaluation of the Toxicity of Graphene Oxide Exposure to the Eye. *Nanotoxicology*. 2016;10(9):1329–1340. doi:10.1080/17435390.2016.1210692.
32. An W, Zhang Y, Zhang X et al. Ocular Toxicity of Reduced Graphene Oxide or Graphene Oxide Exposure in Mouse Eyes. *Exp Eye Res*. 2018;174:59–69. doi:10.1016/j.exer.2018.05.024.
33. Zambrano-Andazol I, Vázquez N, Chacón M et al. Reduced Graphene Oxide Membranes in Ocular Regenerative Medicine. *Mater Sci Eng C*. 2020;114:111075. doi:10.1016/j.msec.2020.111075.
34. Ema M, Matsuda A, Kobayashi N, Naya M, Nakanishi J. Evaluation of Dermal and Eye Irritation and Skin Sensitization Due to Carbon Nanotubes. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2011;61(3):276–281. doi:10.1016/j.yrtph.2011.08.007.

35. Kim SH, Hong SH, Lee JH et al. Skin Sensitization Evaluation of Carbon-Based Graphene Nanoplatelets. *Toxics*. 2021;9(3):62. doi:10.3390/TOXICS9030062.
36. Park YH, Jeong SH, Lee EY et al. Assessment of Dermal Irritation Potential of MWCNT. *Toxicol Environ Health Sci*. 2010;2(2):115–118. doi:10.1007/BF03216492.
37. Murthy PB, Kishore AS, Surekha P. Acute Toxicological Effects of Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNT). In: *Carbon Nanotubes – Growth and Applications*. IntechOpen; 2011. doi:10.5772/18984.
38. Xia XR, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE. Skin Penetration and Kinetics of Pristine Fullerenes (C60) Topically Exposed in Industrial Organic Solvents. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;242(1):29–37. doi:10.1016/j.taap.2009.09.011.
39. Ema M, Matsuda A, Kobayashi N, Naya M, Nakanishi J. Dermal and Ocular Irritation and Skin Sensitization Studies of Fullerene C60 Nanoparticles. *Cutan Ocul Toxicol*. 2013;32(2):128–134. doi:10.3109/15569527.2012.727937.
40. Kato S, Taira H, Aoshima H, Saitoh Y, Miwa N. Clinical Evaluation of Fullerene-C 60 Dissolved in Squalane for Anti-Wrinkle Cosmetics. *J Nanosci Nanotechnol*. 2010;10(10):6769–6774. doi:10.1166/jnn.2010.3053.
41. Miljkovic S, Jeftic B, Sarac D, Matovic V, Slavkovic M, Koruga D. Influence of Hyper-Harmonized Fullerene Water Complex on Collagen Quality and Skin Function. *J Cosmet Dermatol*. 2020;19(2):494–501. doi:10.1111/JOCD.12999.
42. Wu MS, Sun DS, Lin YC et al. Nanodiamonds Protect Skin From Ultraviolet B-Induced Damage in Mice. *J Nanobiotechnology*. 2015;13:35. doi:10.1186/s12951-015-0094-4.
43. Yan L, Wang Y, Xu X et al. Can Graphene Oxide Cause Damage to Eyesight? *Chem Res Toxicol*. 2012;25(6):1265–1270. doi:10.1021/tx300129f.
44. Chauhan N, Saxena K, Jain U. Carbon-Based Nanomaterials in Wound Care Management: A New and Pristine Strategy. *Biomed Mater Devices*. 2023;1:108–121. doi:10.1007/s44174-022-00030-3.

7 TOXICITA VŮČI MOČOVÉMU ÚSTROJÍ

Uhlíkové nanomateriály (CNM) vstupují do živých systémů většinou inhalačně, perorálně nebo transdermálně. V případech terapeutického použití přichází v úvahu i vstup intravenózní. Z místa vstupu jsou CNM translokovány do systémové cirkulace a následně distribuovány do cílových tkání, kde interagují s bio(makro)molekulami. V dalších krocích dochází k jejich krátkodobé či dlouhodobé depozici, biotransformaci a eliminaci.¹

Vylučovací soustava zajišťuje vylučování odpadních látek z těla, je součástí detoxikačních mechanismů, udržuje vodní a elektrolytovou rovnováhu, hodnotu pH a hodnoty krevního tlaku a podílí se na hormonální expresi. U člověka patří ke klíčovým složkám vylučovací soustavy ledviny, močovody, močový měchýř a močová trubice. Poškození vylučovací soustavy je spojeno s řadou patologií, které se manifestují jak na tkáních vylučovací soustavy samotné, tak i na celém organismu. Proces odstraňování xenobiotik (včetně nanočástic) vylučovací soustavou zahrnuje glomerulární filtraci, tubulární resorpci, sekreci a urinární exkreci. Xenobiotika při tomto procesu mohou poškozovat nefrony, tubulární systém i dolní cesty močové.¹ Mezi hlavní mechanismy poškození bývá řazen oxidační stres (produkce volných radikálů a reaktivních intermediátů), indukce mitochondriálního a endoplazmaticko-retikulárního stresu a indukce zánětu.²

7.1 IN VITRO STUDIE

In vitro studie nefrotoxicity jsou prováděny na buňkách vylučovacího ústrojí, nejčastěji na liniích odvozených od tkání ledvin. Výsledky některých studií představíme v následujícím textu.

Ku příkladu Yu et al. provedli studii na HEK-293T (lidské embryonální ledvinné buňky), které exponovali uhlíkovým nanotrubicím (CNT) funkcionalizovaným polyetylenglykolem (PEG; expoziční koncentrace 100–200 µg/ml; expoziční doba 24, 48 a 72 h). Byla pozorována lýza buněk, nekróza a snížení počtu buněk v kultuře. Vyšší dávky způsobovaly (vedle přímého poškození) i morfologické změny.³

Autoři Reddy et al. hodnotili toxicitu dvou typů různě dlouhých mnohvrstevných uhlíkových nanotrubic (MWCNT; 60–80 nm a 90–150 nm; koncentrace 3 a 300 µg/ml; 48 h) vůči buněčné linii HEK-293T. Autoři uvádějí nálezy dávkově závislého snížení viability buněk a koncentrací glutathionu, který působí antioxidačně. Naopak vzrostla míra poškození buněčných membrán, hladin laktátdehydrogenázy a prozánětlivého cytokinu IL-8. Vyšší toxicitu

vykazovaly MWCNT o délce 60–80 nm. Výsledky tedy svědčí pro přítomnost oxidačního stresu, smrti buněk a indukci zánětu.⁴

Toxicitu dvou typů MWCNT s rozdílnou délkou testovali i Kermanizadeh et al. Jako expoziční objekt byla použita buněčná linie HK-2 (dospělé lidské buňky proximální tubulárního epitelu). Celodenní (24h) expozice oběma typům MWCNT zvyšovala expresi volných kyslíkových radikálů (ROS) a hladiny prozánětlivých cytokinů IL-6 a IL-8 podobně jako v předchozí studii.⁵

Barillet et al. testovali několik druhů CNM (včetně MWCNT) na řadě buněčných linií, mezi kterými byla i linie reprezentující ledvinovou tkáň NKR-52E (kryší epitelové buňky ledvin). Expozice dávkám 0,25–100 µg (kultivace 1 až 72 hodin) narušovaly buněčnou integritu, zvyšovaly expresi ROS a indukovaly buněčnou smrt. Genotoxická analýza (kometový test) odhalila zvýšený výskyt zlomů DNA řetězců.⁶

Autoři Blazer-Yost et al. testovali toxicitu fullerenu (C_{60}), jednovrstvých uhlíkových nanotrubic (SWCNT) a MWCNT na buněčné linii kortikálních sběrných kanálků myších ledvin (*mouse kidney cortical collecting duct cell line*, mpkCCD_{c14}). Po dvoudenní expozici byla zjištěna snížená transepitelová elektrická rezistence, což indikovalo narušení integrity a buněčné viability jednovrstvé buněčné kultury. Velmi zajímavým způsobem byla narušena rovněž exprese řady proteinů. Autoři popsali, že dávka 0,004 µg C_{60} /cm² ovlivnila expresi 61 proteinů (u 34 došlo ke zvýšení exprese a u 27 ke snížení exprese). Jednalo se hlavně o proteiny zapojené do buněčné smrti, produkce energie, vzniku nádorů, tj. i proteinů ovlivňujících buněčný růst, proliferaci a buněčný cyklus. Je zajímavé, že vyšší dávky měly nižší dopady na expresi proteinů. Pokud se podíváme na SWCNT a MWCNT, tak i zde došlo ke změnám v expresi proteinů. K nejvýraznějším změnám opět došlo v případě nejnižší dávky, tj. 0,004 µg/cm². Tato dávka SWCNT zvýšila expresi 57 proteinů a snížila expresi 59 proteinů, v případě MWCNT to bylo zvýšení exprese 45 a snížení exprese 60 proteinů. Opět se jednalo hlavně o proteiny zapojené do základních funkcí buněk jako v případě C_{60} . Navíc autoři zaznamenali také snížení exprese ribozomálních a histonových proteinů. Z uvedeného je zřejmé, že různé druhy CNM indukují různé buněčné odpovědi a že v charakteru tohoto procesu hraje významnou roli expoziční koncentrace.⁷

Je známo, že biologickou aktivitu CNM mohou snižovat či zvyšovat jejich povrchové modifikace/funkcionalizace. Autoři Johnson-Lyles et al. exponovali LLC-PK1 (prasečí buňky proximálního ledvinného tubulu) hydroxylovanému fullerenu (fullerenolu) v dávkách 0,6–60 mM po dobu 24 nebo 48 hodin. Expozice fullerenolu indukovala buněčnou smrt a ztrátu mitochondriálního membránového potenciálu. Byl narušen cytoskeleton, došlo ke kumulaci autofagozomových vakuol a k depleci ATP. Zajímavé je, že navzdory poškození mitochondriálních struktur nebyla pozorována zvýšená hladina volných kyslíkových radikálů (ROS).⁸

7.2 IN VIVO STUDIE

In vivo studie nefrotoxicity jsou prováděny nejčastěji na hlodavcích. Z testovaných CNM jednoznačně převažuje grafen a jeho deriváty (například oxid grafenu; GO). Patlolla et al. testovali nefrotoxické účinky GO na potkanech (5 dní; orální expozice; dávky 0, 10, 20 a 40 mg/kg). Expozice zvyšovala aktivitu superoxiddismutázy, katalázy a glutathionperoxidázy a poškozovala funkce ledvin. Byl zaznamenán nárůst hladiny sérového kreatininu,

hladiny BUN (*blood urea nitrogen*) a hladiny oxidačního stresu, přestože se aktivita anti-oxidačních enzymů zvýšila. Histologická analýza potvrdila poškození ledvinových tkání. Dávka 10 mg/kg způsobovala dilataci tubulů a renální tubulární separaci; dávka 20 mg/kg vyvolávala tubulární nekrózu, dezintegraci tubulů, degeneraci hematopoetické tkáně a eozinofilní exsudát a dávka 40 mg/kg měla za následek závažnější formy všech dříve zmíněných patologií. Všechny pozorované změny byly závislé na dávkách.⁹

Na rozdíl od výše popsanych výsledků však skupina jiných autorů (Karsh et al.) v *in vivo* experimentu přítomnost nefrotoxických účinků GO nezjistila. Tito autoři aplikovali potkanům po dobu jednoho týdne intraperitoneálně GO v denní dávce 1 mg/kg.¹⁰ Zjištěnou neshodu by bylo možné přisuzovat rozdílné formě expozice a výrazně rozdílným expozičním dávkám, neboť Patlolla et al. podávali dávky 10–40 mg/kg.

Ve experimentech byla pochopitelně věnována pozornost i vlivu povrchové modifikace/funkcionalizace CNM na jejich biologickou aktivitu. Například Jasim et al. sledovali distribuci GO funkcionalizovaného kyselinou 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctovou (GO-DOTA značený radioaktivním indiem). Po intravenózní aplikaci (50 µg) myším byl GO-DOTA detekován v moči, v močovém měchýři, ve slinivce a v játrech.¹¹

S ohledem na pozitivní nálezy *in vitro* experimentů byla potenciální nefrotoxicita uhlíkových nanotrubic (CNT) testována rovněž i v experimentech *in vivo*. Například Lacerda et al. aplikovali myším intravenózně nefunkcionalizované a funkcionalizované MWCNT (funkcionalizace amoniakem a karboxylovými skupinami; dávka 200 µg). Po 24 hodinách od aplikace byly myším odebrány vzorky ledvin, jater, sleziny a plic. Z nálezů vyplývá, že čím vyšší byl stupeň funkcionalizace, tím menší byla jejich akumulace ve tkáních. Nefunkcionalizované MWCNT se akumulovaly téměř výhradně v plicích a játrech (ne v ledvinách). Vybrané indikátory analýz séra a moči neindikovaly fyziologické abnormality u žádného z odebraných orgánů. Autoři se domnívají, že kritickým faktorem, vedoucím k menší akumulaci CNT ve tkáních a k normální tkáňové fyziologii, je stupeň funkcionalizace, a nikoli povaha funkčních skupin.¹²

K opačným závěrům došli Maha Gazia a Mohammed El-Magd, kteří známky nefrotoxicity MWCNT popsali. V jejich experimentu byly potkanům intratracheálně podány nefunkcionalizované a funkcionalizované MWCNT (amylované a obalené polyethylenglykolem – pegylované; dávka 1 mg/kg). Nefunkcionalizované a amylované MWCNT způsobovaly prakticky stejnou formu poškození ledvinové tkáně, která měla za následek snížení ledvinových funkcí. V histologických preparátech byly patrné kolabované nebo edematózní hemoragické glomeruly, poškozené mezangiální a endotelové buňky a mnoho apoptotických buněk. V krvi byly nalezeny zvýšené hladiny močoviny a kreatininu. Příčinu poškození autoři připisují zvýšené hladině oxidačního stresu, která indukovala zánětlivou odpověď a apoptózu. Přítomnost zánětu byla potvrzena nárůstem hladiny prozánětlivého IL-1β a zvýšenou aktivitou kaspázy 3. V případě pegylovaných MWCNT výše uvedená poškození a změny pozorovány nebyly.¹³

Nefrotoxické účinky CNT popisují rovněž Zahra Matouri a Ali Noori, kteří intraperitoneálně aplikovali potkanům MWCNT, funkcionalizované karboxylovými skupinami (dávky 2,5, 5, 10 a 20 mg/kg). Po jednom dni od aplikace byla u dávek 2,5 a 5 mg/kg nalezena snížená hladina sérové kyseliny močové. Po dvaceti dnech od aplikace byly u všech dávek zjištěny snížené hladiny sérové kyseliny močové a močoviny. Snížené hladiny kreatininu byly nalezeny pouze u dávek 5 a 10 mg/kg. Histologická analýza prokázala poškození ledvinové tkáně. Zajímavý byl nález ložisek hyalinu podobné substance, která vznikla (pravděpodobně) v důsledku zvýšené aktivity eozinofilů a dalších zánětlivých buněk (bazofilů a neutrofilů).

V kůře a dřeni ledvin došlo vlivem expozice ke glomerulární degeneraci, dilataci Bowmanova pouzdra a degeneraci stěny proximálních tubulů. Poškození tkáně bylo závislé na dávce.¹⁴

Závěrem nutno zmínit i pozitivní účinky CNM na orgány vylučovací soustavy. Autoři Leporatti et al. popisují ve svém přehledovém článku antibakteriální aktivitu nanodiamantů při léčbě bakteriálních cystitid (vyvolaných například bakteriemi *Escherichia coli*), které jsou častou komplikací nádorových onemocnění močového měchýře. U pacientů s touto diagnózou je nutné infekci řešit, nicméně bývá problém s použitím stávající farmakologické léčby. Autoři se domnívají, že antibakteriální aktivitu nanodiamantů by bylo možné využít i u rezistentních bakteriálních druhů.¹⁵

7.3 ZÁVĚR

Studií, které se zabývají nefrotoxicitou není mnoho a závěry nejsou jednotné a jednoznačné, podobně jako tomu bylo v případě kožní a oční toxicity. Pokud vycházíme z principu předběžné opatrnosti a existují studie, které jistou míru toxicity prokázaly, je nutné s touto toxicitou počítat, obzvláště když právě močový systém může být jednou z eliminačních cest CNM.

7.4 LITERATURA

1. Iavicoli I, Fontana L, Nordberg G. The Effects of Nanoparticles on the Renal System. *Crit Rev Toxicol*. 2016;46(6):490–560. doi:10.1080/10408444.2016.1181047.
2. Zhao H, Li L, Zhan H, Chu Y, Sun B. Mechanistic Understanding of the Engineered Nanomaterial-Induced Toxicity on Kidney. *J Nanomater*. 2019;2019(1):2954853. doi:10.1155/2019/2954853.
3. Yu SP, Su XD, Du JL et al. The Cytotoxicity of Water-Soluble Carbon Nanotubes on Human Embryonic Kidney and Liver Cancer Cells. *New Carbon Mater*. 2018;33(1):36–45. doi:10.1016/S1872-5805(18)60325-7.
4. Reddy ARN, Reddy YN, Krishna DR, Himabindu V. Multi Wall Carbon Nanotubes Induce Oxidative Stress and Cytotoxicity in Human Embryonic Kidney (HEK293) Cells. *Toxicology*. 2010;272(1–3): 11–16. doi:10.1016/J.TOX.2010.03.017.
5. Kermanizadeh A, Vranic S, Boland S et al. An In Vitro Assessment of Panel of Engineered Nanomaterials Using a Human Renal Cell Line: Cytotoxicity, Pro-Inflammatory Response, Oxidative Stress and Genotoxicity. *BMC Nephrol*. 2013;14(1):96. doi:10.1186/1471-2369-14-96.
6. Barillet S, Simon-Deckers A, Herlin-Boime N et al. Toxicological Consequences of TiO₂, SiC Nanoparticles and Multi-Walled Carbon Nanotubes Exposure in Several Mammalian Cell Types: An In Vitro Study. *J Nanopart Res*. 2010;12(1):61–73. doi:10.1007/s11051-009-9694-y.
7. Blazer-Yost BL, Banga A, Amos A et al. Effect of Carbon Nanoparticles on Renal Epithelial Cell Structure, Barrier Function, and Protein Expression. *Nanotoxicology*. 2011;5(3):354–371. doi:10.3109/17435390.2010.514076.
8. Johnson-Lyles DN, Peiffley K, Lockett S et al. Fullerenol Cytotoxicity in Kidney Cells Is Associated With Cytoskeleton Disruption, Autophagic Vacuole Accumulation, and Mitochondrial Dysfunction. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;248(3):249–258. doi:10.1016/j.taap.2010.08.008.
9. Patlolla AK, Randolph J, Kumari SA, Tchounwou PB. Toxicity Evaluation of Graphene Oxide in Kidneys of Sprague-Dawley Rats. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13(4):380. doi:10.3390/ijerph13040380.
10. Karsh EH, Kadhim RJ, Jabir MS. Effect of Graphene Oxide and Gold Nanoparticles on Kidney Parameters of Male Mice. *AIP Conf Proc*. 2020;2213:020145-1–020145-6. doi:10.1063/5.0000167.

11. Jasim DA, Ménard-Moyon C, Bégin D, Bianco A, Kostarelos K. Tissue Distribution and Urinary Excretion of Intravenously Administered Chemically Functionalized Graphene Oxide Sheets. *Chem Sci*. 2015;6(7):3952–3964. doi:10.1039/C5SC00114E.
12. Lacerda L, Ali-Boucetta H, Herrero MA et al. Tissue Histology and Physiology Following Intravenous Administration of Different Types of Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes. *Nanomedicine*. 2008;3(2):149–161. doi:10.2217/17435889.3.2.149.
13. Abu Gazia M, El-Magd MA. Effect of Pristine and Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes on Rat Renal Cortex. *Acta Histochem*. 2019;121(2):207–217. doi:10.1016/j.acthis.2018.12.005.
14. Poormohammad Matouri Z, Noori A. Effect of Multi-Wall Carbon Nanotubes Toxicity on Kidney Function and Tissue in Rats. *J Gorgan Univ Med Sci*. 2018;20(1):22–28.
15. Leporatti S, Carbone M, Zupančič D, Veranič P. Nanodiamonds as Possible Tools for Improved Management of Bladder Cancer and Bacterial Cystitis. *Int J Mol Sci*. 2022;23(15):8183. doi:10.3390/IJMS23158183.

8 NEUROTOXICITA

Uhlíkové nanomateriály (CNM) mohou pronikat i do centrální nervové soustavy (CNS). Hlavními penetračními cestami jsou systémová cirkulace a horní cesty dýchací (primárně nosní dutina). Translokace přes hematoencefalickou bariéru (HEB) je významně ovlivňována fyzikálně-chemickými vlastnostmi CNM a jejich funkcionalizací. Přes tuto bariéru, která má za fyziologických podmínek velmi malou permeabilitu, prostupují snadněji velmi malé hydrofobní CNM. V HEB mohou CNM indukovat zánětlivou odpověď, poškozovat endotel a zvyšovat její permeabilitu, a to zejména v těch oblastech, kde je HEB více fenestrována a osídlená perivaskulárními mikroglie (tyto buňky po stimulaci CNM produkují prozánětlivé cytokiny). Uhlíkové nanočástice mohou také narušovat mezibuněčné spoje a prostupovat do CNS paracelulárně. Mezi další translokační cesty lze zařadit endocytózu a penetraci CNM do buněk bez narušení integrity jejich buněčné membrány (transcelulární transport). Po průniku CNM do CNS může docházet k jejich kumulaci v různých mozkových kompartmentech. Variabilita míry kumulace (podle kompartmentů) je přitom opět významně ovlivňována fyzikálně-chemickými vlastnostmi a funkcionalizací CNM.¹⁻³

V případech, kdy CNM vstupují do CNS cestou přes horní cesty dýchací (nosní dutinu), musí nejdříve překonat bariéru mukociliárního systému, transcelulárně nebo paracelulárně přestoupit přes vrstvu slizničních buněk a pomocí vazby na receptor penetrovat do neuronů v nosní sliznici. Podél axonů pak CNM prostupují (transcelulárně nebo extracelulárně) z čichového a/nebo trojklanného nervu až do CNS, kde vlivem CNM dochází k nežádoucím reakcím a k poškozování nervové tkáně.⁴⁻⁶ Dostupné literární zdroje dokládají, že CNM mohou indukovat neurozánětlivou odpověď a zvyšovat hladinu oxidačního stresu. Oba uvedené děje mají přímou vazbu na neurodegenerativní procesy, spojené s narušováním kognitivních a paměťových funkcí. Nutno však doplnit, že některé CNM naopak oxidační stres snižují, redukuje produkci amyloidu a podporují neurogenezi.⁷

8.1 IN VITRO STUDIE

Výsledky *in vitro* studií dokládají prozánětlivý charakter expozice CNM, nárůst hladiny volných kyslíkových radikálů (ROS), snížení viability buněk a indukci apoptózy. Některé druhy CNM sice nevykazují přímou toxicitu, nicméně mohou významně zasahovat do fyziologických pochodů v buňkách a narušit jejich funkce.

Wang et al. prezentovali studie, ve kterých vystavili buněčnou kulturu PC12 (buňky feochromocytomu) expozici nefunkcionalizovaným jednovrstvým uhlíkovým nanotrubicím (SWCNT). SWCNT zvyšovaly (v závislosti na dávce a době inkubace; 0–400 µg/ml / 24–48 h) míru oxidačního stresu (produkce volných kyslíkových radikálů; ROS), což se projevilo výrazným poklesem hodnot glutathionu a aktivity glutathionperoxidázy a superoxididismuzázy, poškozením buněčné membrány, redukcí membránového potenciálu mitochondrií a snížením buněčné viability.^{8,9} K podobným výsledkům došli i Vaniyamparambath Vijayalaxmi, Bindu Sadanandan a Anjanapura Raghu, kteří exponovali buněčnou kulturu LN18 (lidské neurony) nefunkcionalizovaným a karboxylovaným SWCNT (5, 10, 20, 40 µg/ml / 0–48 h). Oba typy SWCNT při expoziční koncentraci 40 µg/ml významně zvyšovaly produkci ROS (po dobu 6 hodin) a hladinu malondialdehydu (po dobu 24 a 47 hodin).¹⁰ Neurotoxicitu prokázali rovněž autoři Visalli et al., kteří srovnávali účinky nefunkcionalizovaných a karboxylovaných mnohovrstvých nanotrubic (MWCNT) na buněčnou kulturu SH-SY5 (lidské linie neuroblastomu). Buňky byly exponovány koncentracím 12,5 a 25 µg/ml po dobu až 24 hodin. V závislosti na koncentraci a čase bylo zjištěno poškození DNA, snížení buněčné viability, zvýšení produkce ROS a zvýšení exprese prozánětlivých cytokinů TNF α , IL-1 β a IL-6. Vyšší míru toxicity vykazovaly nefunkcionalizované MWCNT, funkcionalizace může negativní vliv MWCNT zmírnit.¹¹

Bussy et al. porovnali neurotoxicitu čtyř forem MWCNT (bez funkcionalizace a funkcionalizované ox-MWNT, ox-MWNTNH₃⁺ a MWNT-NH₃⁺; koncentrace 5–50 µg/ml). Exponovány byly primární neurální a gliové buňky izolované z fetálního krysího frontálního kortexu a ze striata. Žádná z testovaných forem MWCNT nevykazovala účinky na neurony obou částí CNS a na gliové buňky z frontální oblasti. V případě gliových buněk ze striata byla zjištěna snížená buněčná viabilita (snížení závislé na dávce). V komplexní gliové kultuře (v níž byly zastoupeny také mikroglie a astrocyty) došlo vlivem expozice k aktivaci mikroglíí (zvýšení exprese CD11b/c), které efektivněji pohlcovaly všechny formy MWCNT a produkovaly vyšší množství oxidu dusnatého než astrocyty. Nejvyšší produkce oxidu dusnatého byla zjištěna po expozici ox-MWNTNH₃⁺.¹² Při zmínce o mikroglíích by neměla být opomenuta studie autorů Li et al., ve které expozice jednovrstvým nanorohům (CNH) inhibovala proliferaci a indukovala apoptózu u kultury myších mikroglíí.¹³ Také autoři Villegas et al. popsali interferenci MWCNT s funkcemi mikroglíí. Interference měla za následek omezení jejich fagocytární aktivity a migrace.¹⁴ Inhibiční vliv MWCNT na funkce mikroglíí může mít ve výsledku pozitivní charakter, protože mikroglie patří k buňkám, které jsou zodpovědné za záněty a poškození CNS.

Proběhlo též mnoho experimentů s dalšími CNM. Studie autorů Larner et al. byla zaměřena na testování potenciálního neurotoxického vlivu několika druhů CNM na buněčnou kulturu PC-12. Buněčná linie PC-12 je odvozená z feochromocytomu dřeně nadledvin potkanů: po ošetření nervovým růstovým faktorem se buňky PC-12 přestanou množit a podstoupí konečnou diferenciaci a tím je vytvořen vhodný modelový systém pro studium diferenciaci nervových buněk. Ve studii byly testovány SWCNT (10–100 µg/ml), fulleren (C₆₀; 100 µg/ml) a nanosaze (*nano carbon black*; nano-CB; 10–100 µg/ml). Vyšší koncentrace CNM zvyšovaly tvorbu štěpných produktů α -II-spektrinu (ukazatele narušení buněčného cytoskeletu a buněčné smrti) a indukovaly kontrakce buněčné membrány a tvorbu vakuol v cytosolu. Diferencované buňky byly v porovnání s nediferencovanými obecně vnímavější k cytotoxickému (neurotoxickému) účinku testovaných CNM.¹⁵ Pokud se jedná o nano-CB, nabízí se zmínit ještě práci Jianga et al., v níž expozice buněčné linie PC-12 nano-CB (dávky 0,6 až 6 µg/cm² / 24 hodin)

vedla ke zvýšení produkce ROS, k nárůstu endoplazmaticko-retikulárního stresu a ke snížení aktivit antioxidantních enzymů superoxiddismutázy a glutathionperoxidázy.¹⁶

Velmi často zkoumaným materiálem z pohledu toxicity je grafen a od něj odvozené materiály, čemuž se věnovaly následující příspěvky. Ku příkladu autoři Bramini et al. inkubovali primární astrocyty s vícevrstevným grafenem (FLG) a oxidem grafenu (GO) o koncentracích 1 a 10 µg/ml (24–72 hodin nebo 7 dní). Expozice uvedeným CNM nesnižovala buněčnou viabilitu či proliferaci, měla však za následek narušení metabolismu cholesterolu. To se projevilo nárůstem jeho množství v membráně. Také byly pozorovány změny koncentrací intracelulárního vápníku, vedoucí k narušování vzniku spontánních či evokovaných signálů. V reálné situaci může tento jev ovlivňovat fyziologické interakce mezi astrocyty a neurony.¹⁷

Astrocyty a GO použili ve své studii také autoři Rudnytska et al. Byly hodnoceny změny v genové expresi astrocytů (mRNA NAMPT, TSPAN13, BCAR3, BRCA1, PTGS2, P4HA1, P4HA2, miRNA96-5p a miRNA145-5p) po vystavení koncentracím 1 a 4 ng GO/ml po dobu 24 hodin. Autoři uvádějí, že expozice způsobovala deregulaci exprese vybraných genů; suprimovala expresi NAMPT, BCAR3 a TSPAN13, a naopak indukovala expresi BRCA1, PTGS2, P4HA1 a P4HA2. Bylo rovněž pozorováno snížení exprese vybraných miRNA. Z výsledků je zřejmé, že GO zasahuje do exprese astrocytárních genů a může tak ovlivňovat funkce astrocytů.¹⁸ Chiacchiaretta et al. inkubovali primární myši astrocyty s grafenem a s GO (10 µg/ml / 24 nebo 72 hodin, po dobu 7 dní). Expozice oběma uvedeným CNM vedla k buněčné internalizaci nanočástic s následnými morfologickými změnami a přestavbami cytoskeletu. Významnější změny indukoval GO, který hyperpolarizoval klidový membránový potenciál a zvyšoval vodivost, expresi Kir4.1 (*glial ATP-dependent inwardly rectifying potassium channel*) a „uptake“ glutamátu, což mělo významný vliv na fyziologické funkce astrocytů a na jejich interakce s ostatními nervovými buňkami.¹⁹

Zajímavé jsou výsledky *in vitro* studií s využitím organoidů. Organoid je miniaturizovaná a zjednodušená verze orgánu (forma *in vitro*), která vykazuje realistickou mikroanatomii. Bývá odvozen z tkáňových buněk, embryonálních kmenových buněk nebo indukovaných pluripotentních kmenových buněk. Autoři Liu et al. exponovali trojrozměrný organoid mozku GO (50 µg/ml). Expozice působila cytotoxicky, ale nezvyšovala produkci toxického superoxidového iontu. Pomocí RNA sekvenování bylo zjištěno, že expozice GO zvýšila expresi 80 genů a snížila expresi 121 genů. Vzhledem ke skutečnosti, že se ve většině případů jednalo o geny související s fyziologií metabolických cest (včetně lipidového metabolismu), vedl uvedený scénář rovněž k narušení lipidomu.²⁰

Výše uvedené studie ve většině případů potvrzují cytotoxický účinek CNM. Ten sice může nervovou soustavu poškozovat, na druhou stranu by mohl být využit při léčbě nádorových a neurodegenerativních onemocnění CNS. V kapitole „Biomedicínské využití uhlíkových nanomateriálů“ byly uvedeny příklady transportu léčiv (pomocí CNM) do specifických tělních kompartmentů. Tímto postupem lze zvyšovat efektivitu podané dávky a omezovat nežádoucí systémové účinky. Z pohledu nádorových onemocnění CNS se jako vhodný kandidát na nosiče léčiv jeví MWCNT, které po funkcionalizaci snadno penetrují přes HEB.

Navzdory mnoha pokrokům v diagnostice mozkových nádorů zatím neexistuje účinná léčba glioblastomu. Zdá se, že použití MWCNT by při řešení tohoto problému mohlo významně pomoci. Například autoři Romano-Feinholz et al. exponovali potkaní astrocyty a buňky gliomu RG2 temozolimidu v kombinaci s nefunkcionalizovaným (nedopovaným) MWCNT a dusíkem dopovanými MWCN o koncentracích 10–100 µg/ml. U nádorových buněk působily všechny MWCNT jako velmi silné adjuvans a podpořily účinnost temozolimidu.

Z výsledků vyplývá, že míra buněčné smrti byla při expozici kombinaci dusíkem dopovaných MWCN a temozolimidu dvojnásobně vyšší než při expozici nedopovanými MWCNT a temozolimidem.²¹ V jiných dvou studiích bylo zjištěno, že expozice grafenu (20–200 µg/ml a 5–100 µg/ml) zvyšuje produkci ROS, snižuje viabilitu a indukuje apoptózu u U87 a U118 glioblastomových buněk.^{22,23}

Martínez-Herrera et al. studovali účinnost fullerenu při inhibici agregace amyloidu β , který vytváří plaky spojované s iniciací a progresí Alzheimerovy nemoci. Modifikované fullereny (multiadukty s 4 až 6 diethylmalonyly) modulovaly produkci amyloidových fibril a agregátů (bez projevů cytotoxicity vůči nervovým buňkám) a snižovaly hladinu oxidačního stresu. Výsledky naznačují, že modifikovaný fullerene by mohl najít využití v léčbě Alzheimerovy nemoci.²⁴

Vedle využití CNM v oblasti léčby nádorových a neurodegenerativních onemocnění CNS je nutno zmínit také možnost jejich využití v oblasti regenerace nervové tkáně. Studie v odborné literatuře dokladují, že použití scaffoldů z grafenu, GO či MWCNT podporuje diferenciaci kmenových buněk do nervových buněk, posiluje jejich proliferaci, růst axonů, formování synapsí a přenos signálů.^{25,26}

8.2 IN VIVO STUDIE

Výsledky *in vivo* studií (zaměřených na účinky CNM) jsou ve většině případů ve shodě s výsledky studií *in vitro*. Byla potvrzena vývojová neurotoxicita (více v kapitole „Reprodukční a vývojová toxicita“), narušování HEB (zvýšení její permeability), nárůst hladiny ROS a indukce a zesílení zánětové reakce.

Autorské kolektivy Maria Aragon a Ekateriny Mostovenko například popsaly zvýšenou permeabilitu HEB u experimentálních zvířat exponovaných MWCNT. V obou těchto studiích byly myši vystaveny expozici MWCNT (orofaryngeální aspirace, 10 nebo 40 µg/zvíře). V první zmíněné studii byla po čtyřech hodinách od aplikace MWCNT pozorována zánětlivá reakce, která se podílela na zvyšování permeability HEB a indukci reaktivní astrocytózy. V séru byly zjištěny zvýšené hodnoty trombospodinu 1. Vyšší dávky MWCNT vedly ke tvorbě „astrogliálních jizev“ v CNS a aktivaci mikroglíí. Autoři druhé studie zkoumali navíc i peptidom mozkomíšního moku a séra. Vlivem expozice MWCNT se významně měnily koncentrace peptidů zapojených do fibrinolýzy (fibrinopeptid A) a souvisejících s poškozením HEB (homeobox protein A4) a se zánětem v CNS (transmembránový protein 131L). Ve všech případech se jednalo o ukazatele aktivace astrocytů a mikroglíí a ukazatele neurodegenerativních procesů a nerovnováhy mezi excitací a inhibicí (došlo ke vzniku „hyperexcitovaného fenotypu“). Uvedené změny jsou charakteristické pro raná stadia neurodegenerativních onemocnění.^{27,28}

Autorské kolektivy Aragona i Mostovenko například popsali zvýšenou permeabilitu HEB u experimentálních zvířat exponovaných MWCNT. V obou jejich studiích byly myši vystaveny expozici MWCNT (orofaryngeální aspirace, 10 nebo 40 µg/zvíře). Ve studii Aragonova týmu byla po čtyřech hodinách od aplikace MWCNT pozorována zánětlivá reakce, která se podílela na zvyšování permeability HEB a indukci reaktivní astrocytózy. V séru byly zjištěny zvýšené hodnoty trombospodinu 1. Vyšší dávky MWCNT vedly ke tvorbě „astrogliálních jizev“ v CNS a rekrutování mikroglíí. Tvůrci druhé studie zkoumali navíc i peptidom mozkomíšního moku a séra. Vlivem expozice MWCNT se významně měnily koncentrace peptidů zapojených do fibrinolýzy (fibrinopeptid A) a souvisejících s poškozením HEB (homeobox

protein A4) a se zánětem v CNS (transmembránový protein 131L). Ve všech případech se jednalo o ukazatele aktivace astrocytů a mikroglíí a ukazatele degenerativních procesů a nerovnováhy mezi excitací a inhibicí (došlo ke vzniku „hyperexcitovaného fenotypu“). Uvedené změny jsou charakteristické pro raná stadia neurodegenerativních onemocnění.^{27,28}

Kromě myši se prováděly také studie na potkanech. Autoři Gao et al. aplikovali potkanům po dobu 14 dnů intraperitoneálně MWCNT v dávce 2,5 mg/kg/den a MWCNT s chlorochinem v dávce 20 mg/kg/den. Vlivem obou expozičních dávek došlo u potkanů ke kognitivnímu deficitu a histopatologickým změnám v CNS. Zvýšení autofagické aktivity mikroglíí po expozici MWCNT vedlo ke snížení synapsí, a tedy i funkčním změnám v CNS. Tento jev nebyl pozorován po expozici MWCNT s chlorochinem, který autofagie blokoval.²⁹

Jelikož se CNM mohou kumulovat také ve vodním prostředí, provádí se studie také s vodními organismy. Autoři Deepa et al. zvolili jako modelový objekt kapra obecného. Ryby byly exponovány koncentracím SWCNT 10 a 50 µg/l po dobu 7 dní. Expozice měla za následek indukci antioxidantních enzymů (glutathion-S-transferázy, superoxid dismutázy a katalázy) a narušení mozkových funkcí.²⁴

V průběhu prenatálního vývoje jsou tělní buňky extrémně citlivé na externí a interní faktory (včetně CNM), které touto cestou mohou narušovat vývoj tkání i celého organismu. Některé studie potvrzují, že CNM mohou v prenatálním období ohrožovat i nervovou tkáň. K testování prenatálního rizika expozice CNM bývají často používány zárodky ryby dáňka pruhovaného. Například Manjunatha et al. exponovali zárodky a mladé jedince dáňky pruhovaného grafenu (5–25 µg/l) a GO (0,1–0,4 mg/ml). Vlivem expozice došlo ke kumulaci obou CNM v mozkové tkáni. Byly popsány změny délky axonů, změny v myelinizaci a celkové narušení axonální integrity.³⁰ V experimentu autorů Caa et al. byly zárodky dáňky pruhovaného vystaveny účinkům karboxylovaného GO (10, 50, 100 mg/l). Expozice měla za následek neurologické vývojové defekty spojené se zvýšenou aktivitou acetylcholinesterázy a ATPázy. Došlo k významnému zvýšení hladiny oxidačního stresu a ke změnám exprese genů, které mají důležitou roli v neuro-vývoji (NEUROG1 a GAP43) a ovlivňují produkci neurotransmiterů. Rovněž byly narušeny neurotransmiterové cesty využívající GABA, dopamin a glutamát (došlo ke snížení exprese GLUD1 a GABRA1 a ke zvýšení exprese GAT1 a ABAT). Zajímavou skutečností je, že došlo ke změnám expresí genů, které jsou spojovány s Parkinsonovou nemocí (snížení exprese TH, DCTN1 a DJ1 a zvýšení exprese PINK1). Uvedené změny vedly k výraznému narušení mobility zárodků.³¹

Xiangang Hu, Zhong Wei a Li Mu testovali neurotoxické účinky GO u dospělých jedinců dáňky pruhovaných a jejich potomků, které exponovali koncentracím 0,01–1 µg GO / l vody. Částice GO translokovaly z vody do CNS všech jedinců, což vedlo k významnému poklesu hladiny proteinu Cldn5a, který je klíčovou součástí neuroepitelového bariérového systému. Zatímco u dospělých jedinců nebyly zjištěny známky neurotoxicity, u jejich potomků došlo ke snížení počtu neurodopaminergních neuronů a redukcii acetylcholinesterázové aktivity. Byla též zaznamenána zvýšená hladina endoplazmaticko-retikulárního stresu, zvýšená autofagie a zvýšené hladiny ukazatelů souvisejících se stárnutím (například nárůst β-galaktosidázové aktivity).³² Na rozdíl od výše uvedených Hua, Weie a Mui, kteří známky neurotoxicity u dospělých jedinců dáňky pruhovaného nenalezli, autorský kolektiv Audira et al. tyto účinky popsal. Po subchronické expozici (14 dnů) grafenu (0,1 a 0,5 ppm) a GO (0,1 a 1 ppm) došlo v CNS k nárůstu produkce ROS, k narušení lokomoční aktivity a k narušení schopnosti vyhýbat se predátorům. Expozice grafenu navíc snižovala koncentrace serotoninu, acetylcholinu, dopaminu a kortizolu.³³

Prenatální neurotoxicita CNM byla testována také na savcích. Atsuto Onoda, Ken Takeda a Masakazu Umezawa aplikovali gravidním myším intranazálně (na nosní sliznici) CB v dávkách 2,9, 15 a 73 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a sledovali vliv této expozice na vývoj kortexu mláďat. Z výsledků vyplývá, že v kortexu a v oblastech okolo cév v CNS došlo k nárůstu exprese GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) a akvaporinu 4. Změna v expresi korespondovala s analogickou expresí u starších zvířat. Souběžně byly pozorovány změny expresí mRNA spojených s angiogenezí, buněčnou migrací, proliferací, chemotaxí a produkcí růstových faktorů. Je zřejmé, že vystavení matky CB zvyšuje riziko nástupu neurodegenerativních onemocnění u potomků.³⁴

V novější studii stejných autorů byla popsána rovněž vývojová neurotoxicita CB a mechanismus, který je pravděpodobně zodpovědný za poškození. Vystavení mateřského organismu CB vedlo ke zvýšení endoplazmaticko-retikulárního stresu a kumulaci defektních a poškozených proteinů u potomků. Nejvyšší míra stresu byla zachycena v perivaskulárních makrofázích a astrocytech.³⁵

Funkcionalizace CNM může výrazně měnit vlastnosti těchto materiálů, a to včetně jejich toxicity vůči tkáním, včetně nervového systému. Toxicita může být omezena, či naopak potencionována. Autoři Altwajri et al. exponovali myši účinkům GO funkcionalizovaného polyethylenglykolem (GO-PEG). Látka byla aplikována intravenózně do ocasní žíly v dávce 5 mg/kg. Po jedné a dvou hodinách od aplikace byla zjištěna fragmentace DNA (jedno- i dvouřetězcové zlomy), nicméně, po 4 hodinách byla DNA již reparována. Histopatologické vyšetření exponovaných zvířat (po 1 a 2 hodinách od aplikace) odhalilo apoptózy a léze v CNS. Po 4 hodinách byl také patrný zánět a chromatolýza. Z výsledků je zřejmé, že GO-PEG mohou vyvolávat poškození CNS podobně, jako to vidíme u nefunkcionalizovaných GO.³⁶

Závěrem ještě zmíníme neurotoxicitu fullerenu (C_{60}) a nanodiamantů (ND). Neurotoxicitu C_{60} studovali například Kreamer et al. V experimentu použili C_{60} o dvou různých průměrech (≤ 200 a ≤ 450 nm), který injikovali potkanům přímo do hipokampu. Expozice oběma fullerenu vedla k narušení prostorové paměti, snížení BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) a k nárůstu oxidačního stresu. Vyšší míra toxických účinků byla pozorována u C_{60} o průměru ≤ 450 nm.³⁷ Autoři Khosravi et al. exponovali myši inhalačně ND (3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 3 hodiny denně, 5 dní v týdnu po dobu 30 dní). Podané ND se kumulovaly v plicích, srdci a mozku. Ve všech uvedených tkáních byla zjištěna zvýšená míra oxidačního stresu, narušení mitochondriálních membrán a snížená hladina glutathionu.³⁸

Závěrem nutno zmínit i některé pozitivní účinky CNM na CNS. Například autoři Soligo et al. popsali experiment, ve kterém MWCNT, intranazálně podané potkanům, pronikaly do různých oblastí mozku (bulbus olfactorius, striatum, oblast septa, talamus, hypotalamus a hipokampus) a zvyšovaly produkci neurálního růstového faktoru, což posilovalo regenerační procesy v CNS.³⁹

8.3 ZÁVĚR

Centrální nervová soustava je pro nás lidi naprosto kruciólní. Její poškození spojené s poruchou mozkových funkcí nám výrazně snižuje kvalitu života. Je proto důležité sledovat neurotoxicitu CNM. Výsledky studií, které proběhly *in vitro* i *in vivo*, naznačují, že některé typy CNM mají potenciál poškozovat CNS. Jako u ostatních orgánových systému je poškození CNS spojené hlavně s indukci chronického poškozujícího zánětu a oxidačním stresem. Ve studiích *in vivo* bylo skutečně zachyceno snížení mozkových funkcí u zvířat vystavených

CNM. Musíme ovšem zmínit i fakt, že výsledky nejsou zcela jednoznačné a existují i studie, které prokazují opak. Některé CNM mohou dokonce působit protizánětlivě, snižovat oxidační stres a podporovat regeneraci CNS. Je tedy potřeba provést další studie, které by naše znalosti dále rozšířily.

8.4 LITERATURA

1. Kafa H, Wang JTW, Rubio N et al. Translocation of LRP1 Targeted Carbon Nanotubes of Different Diameters Across the Blood–Brain Barrier In Vitro and In Vivo. *J Control Release*. 2016;225:217. doi:10.1016/J.JCONREL.2016.01.031.
2. Wang JTW, Rubio N, Kafa H et al. Kinetics of Functionalised Carbon Nanotube Distribution in Mouse Brain After Systemic Injection: Spatial to Ultra-Structural Analyses. *J Control Release*. 2016;224:22. doi:10.1016/J.JCONREL.2015.12.039.
3. Gonzalez-Carter D, Goode AE, Kiryushko D et al. Quantification of Blood-Brain Barrier Transport and Neuronal Toxicity of Unlabelled Multiwalled Carbon Nanotubes as a Function of Surface Charge. *Nanoscale*. 2019;11(45):22054–22069. doi:10.1039/c9nr02866h.
4. Newman L, Rodrigues AF, Jasim DA et al. Nose-to-Brain Translocation and Cerebral Biodegradation of Thin Graphene Oxide Nanosheets. *Cell Rep Phys Sci*. 2020;1(9):100176. doi:10.1016/j.xcrp.2020.100176.
5. Crowe TP, Greenlee MHW, Kanthasamy AG, Hsu WH. Mechanism of Intranasal Drug Delivery Directly to the Brain. *Life Sci*. 2018;195:44–52. doi:10.1016/j.lfs.2017.12.025.
6. Selvaraj K, Gowthamarajan K, Karri VVSR. Nose to Brain Transport Pathways An Overview: Potential of Nanostructured Lipid Carriers in Nose to Brain Targeting. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46(8):2088–2095. doi:10.1080/21691401.2017.1420073.
7. Redondo-Gómez C, Leandro-Mora R, Blanch-Bermúdez D et al. Recent Advances in Carbon Nanotubes for Nervous Tissue Regeneration. *Adv Polym Technol*. 2020;2020:1–16. doi:10.1155/2020/6861205.
8. Wang J, Sun P, Bao Y, Liu J, An L. Cytotoxicity of Single-Walled Carbon Nanotubes on PC12 Cells. *Toxicol Vitro*. 2011;25(1):242–250. doi:10.1016/j.tiv.2010.11.010.
9. Wang J, Sun P, Bao Y et al. Vitamin E Renders Protection to PC12 Cells Against Oxidative Damage and Apoptosis Induced by Single-Walled Carbon Nanotubes. *Toxicol Vitro*. 2012;26(1):32–41. doi:10.1016/J.TIV.2011.10.004.
10. Vijayalakshmi V, Sadanandan B, Venkataramanaiah Raghu A. Single Walled Carbon Nanotubes in High Concentrations is Cytotoxic to the Human Neuronal Cell LN18. *Results Chem*. 2022;4:100484. doi:10.1016/J.RECHEM.2022.100484.
11. Visalli G, Currò M, Iannazzo D et al. In Vitro Assessment of Neurotoxicity and Neuroinflammation of Homemade MWCNTs. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017;56:121–128. doi:10.1016/J.ETAP.2017.09.005.
12. Bussy C, Al-Jamal KT, Boczkowski J et al. Microglia Determine Brain Region-Specific Neurotoxic Responses to Chemically Functionalized Carbon Nanotubes. *ACS Nano*. 2015;9(8):7815–7830. doi:10.1021/ACS.NANO.5B02358.
13. Li L, Zhang J, Yang Y et al. Single-Wall Carbon Nanohorns Inhibited Activation of Microglia Induced by Lipopolysaccharide Through Blocking of Sirt3. *Nanoscale Res Lett*. 2013;8(1):1–13. doi:10.1186/1556-276X-8-100.
14. Villegas JC, Álvarez-Montes L, Rodríguez-Fernández L, González J, Valiente R, Fanarraga ML. Multiwalled Carbon Nanotubes Hinder Microglia Function Interfering With Cell Migration and Phagocytosis. *Adv Healthc Mater*. 2014;3(3):424–432. doi:10.1002/adhm.201300178.

15. Lerner SF, Wang J, Goodman J, O'Donoghue Altman MB, Xin M, Wang KKW. In Vitro Neurotoxicity Resulting From Exposure of Cultured Neural Cells to Several Types of Nanoparticles. *J Cell Death*. 2017;10:1179670717694523. doi:10.1177/1179670717694523.
16. Jiang L, Wang T, Xue J, Yu P, Zhang J, Wang J. Nanosized Carbon Black Exposure Induces Neural Injury: Effects on Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases and Endoplasmic Reticulum Stress. *J Appl Toxicol*. 2019;39(8):1108–1117. doi:10.1002/jat.3796.
17. Bramini M, Chiacchiaretta M, Armirotti A et al. An Increase in Membrane Cholesterol by Graphene Oxide Disrupts Calcium Homeostasis in Primary Astrocytes. *Small*. 2019;15(15):1900147. doi:10.1002/smll.201900147.
18. Rudnytska OV, Kulish YV, Khita OO et al. Exposure to Nanographene Oxide Induces Gene Expression Dysregulation in Normal Human Astrocytes. *Endocr Regul*. 2022;56(3):216–226. doi:10.2478/ENR-2022-0023.
19. Chiacchiaretta M, Bramini M, Rocchi A et al. Graphene Oxide Upregulates the Homeostatic Functions of Primary Astrocytes and Modulates Astrocyte-to-Neuron Communication. *Nano Lett*. 2018;18(9):5827–5838. doi:10.1021/acs.nanolett.8b02487.
20. Liu X, Yang C, Chen P, Zhang L, Cao Y. The Uses of Transcriptomics and Lipidomics Indicated That Direct Contact With Graphene Oxide Altered Lipid Homeostasis Through ER Stress in 3D Human Brain Organoids. *Sci Total Environ*. 2022;849:157815. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2022.157815.
21. Romano-Feinholz S, Salazar-Ramiro A, Muñoz-Sandoval E et al. Cytotoxicity Induced by Carbon Nanotubes in Experimental Malignant Glioma. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:6005–6026. doi:10.2147/IJN.S139004.
22. Jaworski S, Strojny B, Sawosz E et al. Degradation of Mitochondria and Oxidative Stress as the Main Mechanism of Toxicity of Pristine Graphene on U87 Glioblastoma Cells and Tumors and HS-5 Cells. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3). doi:10.3390/ijms20030650.
23. Jaworski S, Sawosz E, Grodzik M et al. In Vitro Evaluation of the Effects of Graphene Platelets on Glioblastoma Multiforme Cells. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:413–420. doi:10.2147/IJN.S39456.
24. Deepa S, Mamta SK, Anitha A et al. Exposure of Carbon Nanotubes Affects Testis and Brain of Common Carp. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2022;95:103957. doi:10.1016/j.etap.2022.103957.
25. Qian Y, Wang X, Song J et al. Preclinical Assessment on Neuronal Regeneration in the Injury-Related Microenvironment of Graphene-Based Scaffolds. *npj Regen Med*. 2021;6:31. doi:10.1038/s41536-021-00142-2.
26. Redondo-Gómez C, Leandro-Mora R, Blanch-Bermúdez D et al. Recent Advances in Carbon Nanotubes for Nervous Tissue Regeneration. *Adv Polym Technol*. 2020;2020:6861205. doi:10.1155/2020/6861205.
27. Aragon MJ, Topper L, Tyler CR et al. Serum-Borne Bioactivity Caused by Pulmonary Multiwalled Carbon Nanotubes Induces Neuroinflammation via Blood-Brain Barrier Impairment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(10): E1968–E1976. doi:10.1073/pnas.1616070114.
28. Mostovenko E, Saunders S, Muldoon PP et al. Carbon Nanotube Exposure Triggers a Cerebral Peptidomic Response: Barrier Compromise, Neuroinflammation, and a Hyperexcited State. *Toxicol Sci*. 2021;182(1):107–119. doi:10.1093/toxsci/kfab042.
29. Gao J, Zhang X, Yu M, Ren G, Yang Z. Cognitive Deficits Induced by Multi-Walled Carbon Nanotubes via the Autophagic Pathway. *Toxicology*. 2015;337:21–29. doi:10.1016/j.tox.2015.08.011.
30. Manjunatha B, Seo E, Park SH et al. Pristine Graphene and Graphene Oxide Induce Multi-Organ Defects in Zebrafish (Danio Rerio) Larvae/Juvenile: An In Vivo Study. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2021;28(26):34664–34675. doi:10.1007/s11356-021-13058-7.
31. 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.
32. Hu X, Wei Z, Mu L. Graphene Oxide Nanosheets at Trace Concentrations Elicit Neurotoxicity in the Offspring of Zebrafish. *Carbon*. 2017;117:182–191. doi:10.1016/J.CARBON.2017.02.092.

33. Audira G, Lee JS, Siregar P et al. Comparison of the Chronic Toxicities of Graphene and Graphene Oxide Toward Adult Zebrafish by Using Biochemical and Phenomic Approaches. *Environ Pollut.* 2021;278:116907. doi:10.1016/j.envpol.2021.116907.
34. Onoda A, Takeda K, Umezawa M. Dose-Dependent Induction of Astrocyte Activation and Reactive Astrogliosis in Mouse Brain Following Maternal Exposure to Carbon Black Nanoparticle. *Part Fibre Toxicol.* 2017;14:4. doi:10.1186/s12989-017-0184-6.
35. Onoda A, Kawasaki T, Tsukiyama K, Takeda K, Umezawa M. Carbon Nanoparticles Induce Endoplasmic Reticulum Stress Around Blood Vessels With Accumulation of Misfolded Proteins in the Developing Brain of Offspring. *Sci Rep.* 2020;10:10028. doi:10.1038/s41598-020-66744-w.
36. Altwaijry N, Ain QT, Alnuwaysir H, Alamro A, Alghamdi A, Haq SH. A Time-Course Evaluation of DNA Damage and Neurotoxicity Induced by PEGylated Graphene Oxide Nanoparticle in Swiss Albino Mice. *J Biomed Nanotechnol.* 2022;18(4):1180–1186. doi:10.1166/JBN.2022.3306.
37. Kraemer ÂB, Parfitt GM, Acosta D da S et al. Fullerene (C60) Particle Size Implications in Neurotoxicity Following Infusion Into the Hippocampi of Wistar Rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2018;338:197–203. doi:10.1016/J.TAAP.2017.11.022.
38. Khosravi Y, Salimi A, Pourahmad J, Naserzadeh P, Seydi E. Inhalation Exposure of Nano Diamond Induced Oxidative Stress in Lung, Heart and Brain. *Xenobiotica.* 2018;48(8):860–866. doi:10.1080/00498254.2017.1367974.
39. Soligo M, Felsani FM, Da Ros T et al. Distribution in the Brain and Possible Neuroprotective Effects of Intranasally Delivered Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Nanoscale Adv.* 2021;3(2):418–431. doi:10.1039/d0na00869a.

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 nejrůznější 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 chemická 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 utlmit 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 zbařený 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 nanovlákna 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 funkci 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 induktořových 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 myšního 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 Dellingera et al., jež zkoumala vliv fullerenu na revmatoidní artritidu v myším 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 myší 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 Tosic 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 myších 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 peroxinitriem 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 reagenciemi.

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/acs.nano.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, Olagnier 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/sml.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/sml.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.

10 GENOTOXICITA

Genotoxicita je definována jako poškození genetického materiálu v důsledku působení vnějších i vnitřních faktorů, které vede k narušení stability DNA a RNA, indukuje zlomy řetězců DNA/RNA, tvorbu DNA aduktů, mikrojader a křížových vazeb, genové mutace, chromozomální aberace a interferuje s mechanismy reparace DNA. Z odborné literatury vyplývá, že uhlíkové nanomateriály (CNM) genotoxickým potenciálem disponovat mohou.¹

Poškození DNA (genotoxický účinek) může být vyvoláno přímými či nepřímými mechanismy. Za přímé mechanismy jsou považovány situace, kdy CNM pronikají až do buněčného jádra a interagují přímo s DNA nebo s proteiny asociovanými s DNA. Tyto mechanismy vedou k fyzickému poškození genetického materiálu a/nebo intranukleární agregaci proteinů, což má za následek inhibici transkripce, replikace a buněčné proliferace, stejně jako nestabilitu genomu, vznik zlomů DNA a chromozomů a zvýšení rychlosti vzniku mutací. Nepřímé mechanismy zahrnují poškození DNA, ke kterému dochází bez přímé fyzické interakce s CNM. Mezi tyto děje jsou řazeny interakce s dělicím aparátem a centrozomy a indukce buněčných odpovědí (oxidačního stresu, aberantních signalizačních reakcí, deregulace buněčného cyklu, disrupce mitochondrií a zánětu).²⁻⁴

Účinky CNM jsou obecně ovlivňovány laterálním rozměrem, počtem vrstev, tvrdostí, hydrofobicitou a povrchovou funkcionalizací. Tyto vlastnosti reprezentují klíčové faktory, které předurčují osud CNM v buňce i v celém organismu (včetně projevů genotoxicity). Například grafen s malým laterálním rozměrem má větší genotoxický potenciál ve srovnání s grafenem s velkým laterálním rozměrem. Důvodem je jeho schopnost účinně pronikat přes buněčnou membránu do intracelulárního prostoru. Zde se hromadí v cytosolu a v blízkosti jádra, proniká jadernou membránou a interaguje přímo s DNA. Grafen s velkým laterálním rozměrem způsobuje oproti tomu poškození DNA nepřímým mechanismem, zejména cestou indukce tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS).^{5,6}

Poškození genetického materiálu buňky vnějšími a vnitřními faktory je spojeno se zvýšeným rizikem vzniku nádorových či chronických zánětlivých onemocnění a předčasným úmrtím.⁷ Mezi nejčastěji používané metody pro hodnocení genotoxického potenciálu chemických a fyzikálních faktorů patří bakteriální Amesův test, test detekce zlomů řetězců DNA (kometový test), test fosforylovaného histonu H2AX (γ H2AX) a cytogenetické testy (micronucleus test a test chromozomálních aberací).^{8,9}

10.1 IN VITRO STUDIE

Dosud nejvíce studovanými CNM jsou mnohovrstvé uhlíkové nanotrubičky (MWCNT). Tyto nanomateriály mohou poškozovat DNA jak přímo (tvorbou chromosomálních zlomů), tak i nepřímo (zvýšenou produkcí ROS nebo ovlivňováním buněčného dělení cestou narušování funkce centrozomů a tvorbou mono- nebo polypolárních centrozomů). MWCNT mají strukturní podobnost s mikrotubuly a mohou interferovat s procesy, v nichž se mikrotubuly uplatňují, což vede následně k narušení mitózy.^{10,11} Nanotrubičky MWCNT-7 byly označeny jako možný lidský karcinogen (skupina 2B dle klasifikace International Agency for Research on Cancer; IARC). Zpráva poradní skupiny pro doporučené priority pro IARC monografie (Report of the Advisory Group to Recommended Priorities for the IARC Monographs) pro období 2020–2024 zdůrazňuje potřebu zkoumat toxicitu, a zejména genotoxicitu MWCNT.^{12,13}

Pro studium genotoxických účinků MWCNT jsou používány zvířecí i lidské buněčné linie, s preferencí buněčných linií odvozených od tkání respiračního traktu (inhalace je předpokládanou majoritní cestou expozice). Například autoři Fraser et al. hodnotili genotoxicitu sedmi typů MWCNT a dvou typů uhlíkových nanovláken (CNF). Expovali buňky BEAS-2B (*bronchial epithelial cells*; epitelální buněčná linie, která byla izolována z normálního lidského bronchiálního epitelu) CNM v různých koncentracích po dobu 24 hodin. Z výsledků vyplývá, že nejvyšší koncentrace (24 µg/ml) MWCNT-4, MWCNT-7 a CNF1-2 vyvolaly zvýšenou produkci ROS. Poškození genetického materiálu bylo hodnoceno testem detekce mikrojadra a imunodetekcí γ -H2AX. Všechny testované CNM zvyšovaly počty mikrojadra (kromě nízké dávky MWCNT-2). Fosforylace H2AX a přítomnost γ -H2AX měly stejnou distribuci jako výsledky testu detekce mikrojadra.⁶

Autoři Catalan et al. porovnávali genotoxický účinek rovných a stočených MWCNT na buněčnou linii BEAS-2B. Zatímco rovné MWCNT indukovaly přerušeni kontinuity řetězce DNA již při nízkých dávkách (5 a 10 µg/cm²), v případě stočených MWCNT musela být k vyvolání stejného účinku použita dávka řádově vyšší (200 µg/cm²). Autoři nepozorovali zvýšený vznik mikrojadra.¹⁴

Lidské plicní epitelální buňky BEAS-2 a SAEC (*small airway epithelial cells*; malé epitelální buňky dýchacích cest) byly použity i v experimentu Siegristema et al., kteří je exponovali různým dávkám MWCNT-7, MWCNT-HT a MWCNT-ND. Všechny testované MWCNT propustovaly až do buněčného jádra (zejména MWCNT-7) a negativně ovlivňovaly mitózu (indukcí změn morfologie dělicího vřeténka a indukci fragmentace centrozomů). Nejvyšší dávky měly za následek významný nárůst počtu aneuploidií.¹⁵ Jiná studie (Lucas et al.) popsala, že expozice buněk BEAS-2B MWCNT po dobu 72 hodin významně zvýšila produkci ROS, vedla k profibrotickému epitelálně-mezenchymálnímu přechodu buněk a k tvorbě fosforylovaného histonu H2AX, který odráží přítomnost zlomů DNA řetězců.¹⁶

Ventura et al. použili při testování genotoxicity MWCNT-7 alveolární epitelální buňky A549 bez kokultivace (nebo s kokultivací) s makrofágy THP-1. Expozice samotným MWCNT-7 neindukovala tvorbu mikrojadra v A549 buňkách v monokultuře, avšak v kokultuře s THP-1 makrofágy se počet dvojjaderných buněk s mikrojádem významně zvýšil. Účinek byl pozorován u nejnižších dávek MWCNT-7. Zajímavé také bylo, že v monokultuře A549 buněk dávka 50 µg/cm² MWCNT-7 vyvolala významný nárůst dlouhých a tenkých nukleoplazmatických můstků.¹⁷ Autoři Di Ianni et al. exponovali epitelální buňky A549 a THP-1 makrofágy sedmi typům MWCNT, které se lišily svou délkou, průměrem a funkcionalizací.

Test detekce zlomů řetězců DNA (kometový test) prokázal, že všechny testované MWCNT způsobovaly poškození DNA v makrofázích THP-1, zatímco buňky A549 byly odolnější a poškození DNA bylo pozorováno pouze u expozice krátkým MWCNT.¹⁸ Oxidační poškození DNA a tvorba mikrojader v A549 buňkách po expozici MWCNT byly hodnoceny také Katoem et al. Expozice MWCNT zvýšila (v závislosti na dávce) počty mikrojader i hladiny oxidovaných zbytků DNA (8-oxo-2'-deoxyguanosine; 8-oxo-dG).¹⁹

Borghini et al. studovali vliv expozice MWCNT na reparaci poškození DNA, vyvolaného oxidačním poškozením (stresem). V experimentu byly použity MWCNT-7 a A549 buňky. Oxidační poškození DNA bylo vyvoláno kultivací buněk s H₂O₂ a KBrO₃. Z výsledků plyne, že expozice MWCNT-7 sice zlepšovala reparační aktivitu buněk, avšak bylo rovněž pozorováno (na dávce nezávislé) zkracování telomer.²⁰ Lidská bronchiální epiteliální buněčná linie (16HBE) a THP-1 monocyty byly vystaveny expozici MWCNT a jednovrstvým uhlíkovým nanotubicím (SWCNT) ve studii Ōnera et al. Podle výsledků testu detekce zlomů řetězců DNA (kometový test) oba typy CNM indukovaly oxidační buněčné poškození a zvyšovaly počty zlomů DNA řetězců. Kromě toho MWCNT v 16HBE a SWCNT v THP-1 indukovaly tvorbu mikrojader.²¹

Nutno zdůraznit, že MWCNT mohou poškozovat (vedle tkání dýchacího systému) i buňky dalších tkání. Například Kermanizadeh et al. sledovali genotoxické účinky MWCNT na buňky lidského hepatocelulárního karcinomu C3A. V jejich experimentu i nízké koncentrace MWCNT zvyšovaly hladiny ROS a rozsah poškození DNA vykazoval dávkovou závislost.²² Další vědecký kolektiv (Guo et al.) exponoval endoteliální buňky lidské pupečnickové žíly (HUVEC) MWCNT. CNM byly v buňkách snadno internalizovány a v závislosti na dávce spouštěly apoptózu a tvorbu ROS a H2AX ložisek. Výsledky naznačují, že MWCNT mohou poškozovat endotelové buňky a představují tak rizikový faktor pro vznik a rozvoj kardiovaskulárních onemocnění.²³ Podobné výsledky prezentovala i autorská skupina Longa et al. Expozice MWCNT indukovala tvorbu ROS a působila cytotoxicky. Autoři zdůrazňují vliv délky MWCNT na intenzitu toxických projevů.²⁴

Z výše uvedeného vyplývá, že značné množství studií potvrdilo genotoxický potenciál MWCNT. V odborné literatuře lze však najít i studie, které tyto účinky zpochybňují. Například autoři Ema et al. studovali genotoxicitu dvou typů CNM (N-MWCNT, průměr 44 nm / BET povrch 69 m²/g a MWCNT-7, průměr 70 nm / BET povrch 23 m²/g). Pro důkaz genotoxických účinků byly použity test bakteriálních reverzních mutací a test chromozomálních aberací. Z výsledků vyplývá, že žádný z testovaných MWCNT nevykazoval mutagenitu u testu bakteriálních reverzních mutací (*Salmonella typhimurium* a *Escherichia coli*) a nevyšoval ani hladinu strukturálních chromozomálních aberací (byl pozorován pouze nevýznamný nárůst počtu numerických aberací).²⁵ V souvislosti s těmito odlišnými výsledky je nutno zmínit morfológickou odlišnost bakteriálních a savčích/lidských buněk, zejména přítomnost silné buněčné stěny bakteriálních buněk, která omezuje prostup řady látek do intracelulárního prostoru.

Dalším zajímavým členem skupiny nanotubic s genotoxickým potenciálem jsou jednovrstvé uhlíkové nanotrubice (SWCNT).

Intenzitu penetrace SWCNT do buněk (a potažmo jejich případnou genotoxicitu) determinuje délka trubic, povrchové funkční skupiny a povrchový náboj.²⁶ Například Cveticanin et al. uvádějí, že SWCNT funkcionalizované amidy penetrují přes buněčné membrány normálních lidských fibroblastů a lymfocytů intenzivněji než jejich nefunkcionalizované varianty. To může být důvodem jejich vyššího genotoxického potenciálu (ve srovnání s nefunkcionalizovanými SWCNT).²⁷

K podobným výsledkům dospěli i Jiang et al., kteří zjistili, že funkcionalizace karboxylovými a hydroxylovými skupinami zvyšuje genotoxicitu SWCNT. Karboxylované SWCNT vyvolaly rozsáhlejší poškození DNA (a její degradaci) než SWCNT hydroxylované.²⁶

Yao et al. potvrdili, že SWCNT interagují přímo s DNA a že kratší SWCNT disponují vyšším genotoxickým potenciálem.²⁸ Autoři Sargent et al. detekovali SWCNT přímo v jádře buněk a prokázali asociaci SWCNT s chromatinem a s mitotickým a buněčným tubulinem. Přítomnost SWCNT v jádře vyvolala fragmentaci centrozomů, tvorbu mnohočetných pólů mitotického vřeténka, anafázické můstky a aneuploidie buněk. SWCNT vážně ovlivnily transkripci a replikaci DNA a chromozomální stabilitu.²⁹ Další studie (Sargent et al.) popsala nejen poškození DNA, ale také zvýšenou proliferaci buněk v kultuře.³⁰ Jiný vědecký kolektiv (Pacurari et al.) našel (po expozici SWCNT) zvýšenou produkci ROS a poškození DNA v normálních a maligních mezotelových buňkách.³¹

Předmětem velkého zájmu odborné veřejnosti jsou také grafen a materiály na jeho bázi. Grafen může interagovat s odhalenou DNA prostřednictvím „pí vrstvení“ báze-grafen, hydrofobními nebo van der Wallsovými interakcemi, vodíkovými vazbami nebo elektrostatickými interakcemi. Výsledkem interakcí je poškození DNA, narušení transkripce nebo replikace a blokování syntézy specifických proteinů.^{32,33}

Autoři Burgum et al. exponovali (24 hodin) buňky 16HBE vícevrstvému grafenu (FLG) a jeho funkcionalizovaným formám (aminovými nebo karboxylovými skupinami). Z výsledků vyplývá, že FLG a FLG funkcionalizovaný aminovou skupinou vykazovaly vyšší míru genotoxicity než FLG funkcionalizovaný karboxylovou skupinou. Byla pozorována indukce oxidačního stresu a tvorba mikrojader.³⁴ Autoři Chatterjee et al. testovali genotoxický potenciál jednovrstvého grafenu oxidu (SLGO), několikavrstvého grafenu oxidu (FLGO), grafenových nanodestiček (GNP) a karboxylovaných a aminovaných GNP na buněčné línii BEAS-2B. Jednodenní expozice uvedeným nanočásticím poškozovala DNA a narušovala její reparaci. Intenzitu poškození lze vyjádřit ve škále GNP a karboxylované GNP > aminované GNP a FLGO > SLGO.³⁵

Wang et al. ve své studii potvrdili genotoxický účinek oxidu grafenu (GO) na lidské plicní fibroblasty (HLF). Expozice vedla k mitochondriální dysfunkci, zvýšení produkce ROS a zvýšení počtu apoptotických buněk. Dokonce i nejnižší koncentrace (1 µg/ml po dobu 24 hodin) byla schopna vyvolat tvorbu zlomů DNA řetězce (kometový test). Funkcionalizace polyethylen glykolem měla za následek významné snížení genotoxického potenciálu GO.³⁶

De Marzi et al. exponovali buněčnou linii A549, buněčnou linii lidského kolorektálního adenokarcinomu (CaCo2) a buněčnou linii epitelálních buněk ledviny z afrického kočkodana zeleného (Vero) substancím nano GO a mikro GO po dobu 24 hodin a sledovali frekvenci výskytu zlomů řetězců DNA (kometový test). V případě expozice nano GO byla zjištěna masivní genotoxická odpověď u všech použitých linií (A549, CaCo2 i Vero), s procentem DNA v ohonu komety v rozmezí od 60 do 80 %. Hodnoty procent DNA v ohonu komety nebyly závislé na použitých dávkách.³⁷

Autoři Di Ianni et al. testovali genotoxicitu GO a redukováného GO (rGO) na buněčné línii A549 buňkách a na kultuře THP-1 makrofágů. Z výsledků plyne, že GO i rGO vyvolávaly zánětlivou odpověď u linie A549 buněk (ne však u THP-1). Genotoxické účinky expozice obou CNM se naproti tomu výrazněji projeví u kultury THP-1 makrofágů.³⁸ Kulturu THP-1 monocytů použili také autoři Málková et al. k hodnocení genotoxicity dvou typů grafenových plátek. Přítomnost obou typů grafenu zvyšovala (v závislosti na dávce) poškození DNA, které

se projevilo zvýšením počtu mikrojader, jaderných pupenů a nukleoplazmatických můstků ve dvojjaderných buňkách.⁴

Výsledky studií genotoxického potenciálu fullerenu jsou zatím bohužel poměrně nekonzistentní. Například dva autorské kolektivy (Zhao et al.; Firdaus et al.) prokázaly interakce fullerenu C₆₀, C₂₀ a C₁₈₀ s DNA. V jejich experimentu fullereny vytvářely vazby s nukleotidy a deformovaly strukturu DNA.^{39,40} Také autoři Ershova et al., kteří hodnotili genotoxický potenciál rozpustného fullerenu C₆₀ v lidských embryonálních plicních fibroblastech, uvádějí časově závislý nárůst hladiny ROS a zvýšení počtu zlomů DNA řetězců. Autoři se domnívají, že fulleren by mohl vyvolávat vznik plicní fibrózy *in vivo*.⁴¹ V rozporu s těmito výsledky jiné studie uvádějí, že fullereny mohou působit jako antioxidanty a snižovat toxicitu chemických látek. Například Fayza et al. a Gudkov et al. popisují genoprotektivní aktivitu fullerenu. Expozice těmto CNM snižovala (cestou redukce oxidačního stresu) toxicitu některých léků a chemických látek a omezovala míru poškození DNA, vyvolaného ROS.^{42,43}

Významnými představiteli CNM jsou nanodiamanty, které však nejsou ve studiích často používány.

Autoři Xing et al. exponovali embryonální kmenové buňky redukováným a oxidovaným nanodiamantům (ND). Z výsledků vyplývá, že oxidovaná forma ND vyvolávala vyšší míru poškození DNA než forma redukována (indukovala vyšší expresi proteinů nezbytných pro reparaci DNA). Rozsah poškození DNA vyvolaný expozicí ND byl významně nižší než rozsah poškození vyvolaný expozicí MWCNT.⁴⁴ Autoři Dworak et al. exponovali lidské periferní lymfocyty suspenzi ND. I nejnižší expoziční koncentrace (1 μg ND/ml) indukovala produkci ROS, zvyšovala počet zlomů řetězců DNA a vyvolávala změny stability chromatinu. Vyšší expoziční koncentrace vedly k tvorbě mikrojader.⁴⁵

10.2 IN VIVO STUDIE

Obdobně jako v *in vitro* studiích také v *in vivo* experimentech byla značná pozornost věnována MWCNT. Například autoři Catalan et al. popsali nález zvýšeného počtu zlomů DNA řetězce v plicích a v bronchoalveolární laváži (BAL) myši exponovaných 24 hodin stočeným nebo rovným MWCNT.¹⁴ K podobným výsledkům dospěli i Di Ianni et al. V jejich studii byly myši intratracheálně exponovány NM-403 (krátké a tenké MWCNT) a NRCWE-006 (dlouhé a silné MWCNT). Po 24 hodinách od aplikace bylo v obou případech zjištěno významné poškození DNA plicní tkáň a buněk z BAL.¹⁸ Také ve studii Poulsen et al. indukovala intratracheální expozice malým stočeným MWCNT a velkým silným MWCNT (u myši po 24 hodinách) zlomy DNA v buňkách z BAL a ve vzorcích plicní tkáň. Po 28 dnech od expozice byly detekovány fibrotické změny plicní tkáň. Tyto změny byly výraznější u myši exponovaných velkým MWCNT.⁴⁶

Knudsen et al. exponoval intratracheálně myši samice 11 typům MWCNT a po jednom roce od expozice hodnotili histologické změny ve vzorcích jejich plic, jater a sleziny. Z nálezů vyplývá, že krátké a tenké MWCNT tvořily přetrvávající aglomeráty v plicní tkáni, zatímco tlustší a delší MWCNT se vyskytovaly jako jednotlivá vlákna. Přítomnost MWCNT neindukovala plicní fibrózu ani nádory plic nebo pleury. Ve vzorcích jater myši exponovaných tenkým a stočeným MWCNT byl detekován zvýšený počet zlomů řetězců DNA.⁴⁷ Genotoxický potenciál MWCNT potvrdil také další tým (Muller et al.). V experimentu na potkanech sledovali počet mikrojader v pneumocytech typu II po intratracheální aplikaci 0,5 a 2,0 mg

MWCNT (po 3 dnech od aplikace). Byl nalezen dávkově závislý nárůst poškození DNA; vyšší aplikovaná dávka vedla k dvojnásobnému nárůstu počtu pneumocytů typu II s mikrojádrem.⁴⁸

I další *in vivo* studie (autorská skupina Snegin et al.) potvrdila genotoxické účinky MWCNT. Po subchronické perorální expozici 0,5 mg MWCNT (opakovaná aplikace po dobu 21 dnů) byla analyzována tkáň jater, semenných tubulů, tlustého střeva, mozku, ledvin, plic, buněk kostní dřeně a leukocyty periferní krve. Ve všech typech tkání autoři našli zvýšenou míru poškození jaderné DNA (kometový test). V této studii byla hodnocena rovněž akutní genotoxicita po jednorázovém perorálním podání 2,5 a 5,0 mg MWCNT. I nižší dávka (2,5 mg) vyvolala po 24 hodinách od aplikace poškození DNA ve tkáních tlustého střeva, ledvin, plic a v leukocytech.⁴⁹

Ani značné množství dat potvrzujících přítomnost genotoxického potenciálu MWCNT však neumožňuje vytvořit k této problematice konzistentnější závěry. Příčinou je existence studií, jejichž výsledky jsou v rozporu s výsledky studií předcházejících. Například Hadrup et al. exponovali intratracheálně myši MWCNT (54 µg/myš) a následně analyzovali vzorky BAL (po 24 hodinách) pomocí testu detekce zlomů řetězců DNA (kometový test). Tato studie negativní vliv MWCNT na integritu DNA nepotvrdila.⁵⁰ Podobné (negativní) nálezy prezentovali i autoři Pothmann et al. Expozice potkanů MWCNT Graphistrength© C100 (inhalace pouze nosem) po dobu 90 dní (6 h / den / 5 dnů v týdnu) neměla v jejich experimentu vliv na počty zlomů řetězců DNA v buňkách získaných z tkání plic, jater a ledvin. Rovněž tak nebyl ovlivněn počet mikrojader v polychromatických erytrocytech exponovaných potkanů.⁵¹

Vedle MWCNT byla pozornost výzkumných týmů pochopitelně věnována i dalším formám CNM. Například El-Yamany et al. zkoumali genotoxický potenciál opakované intraperitoneální aplikace GO myším (aplikace jednou týdně). Po 7, 28 a 56 dnech byl proveden test chromozomálních aberací a test detekce zlomů řetězců DNA (kometový test) v buňkách kostní dřeně a buňkách tkání respiračního traktu. Autoři prezentovali nálezy zvýšeného počtu strukturních chromozomálních aberací v kostní dřeni a nárůst úrovně oxidačního stresu v plicní tkáni (změny vykazovaly závislost na dávce).⁵² V další studii (Mohamed et al.) byly myši exponovány perorálně GO. Expozice vedla k masivnímu nárůstu počtu mikrojader a poškození DNA v buňkách kostní dřeně. GO také indukoval histologické léze s nekrotizací, apoptózou a zánětem ve tkáních jater a mozku.⁵³ Genotoxické účinky GO prezentovali rovněž Liu et al. V jejich studii byla myším opakovaně intravenózně aplikována dávka 1,0, 2,0 a 4,0 mg GO/kg po dobu pěti po sobě jdoucích dnů. Dávka 4,0 mg/kg vyvolala tvorbu mikrojader v polychromních erytrocytech. Autoři se domnívají, že genotoxický a mutagenní potenciál GO je srovnatelný s potenciálem cyklofosfamidů.⁵⁴

Ve výše uvedeném textu, který se týká výsledků studií *in vitro*, jsme ukázali, že fullereny mohou působit jak genotoxicky, tak i genoprotektivně. Podobně nekonzistentní výsledky jsou zatím bohužel i u studií *in vivo*. Například Nechat Sumi a Kumari Chitra exponovali sladkovodní ryby *Anabas testudineus* fullerenu C₆₀ (5,0 a 10,0 mg/l) a následně provedli test detekce mikrojader a test detekce zlomů řetězců DNA (kometový test). Expozice fullerenu indukovala tvorbu mikrojader a zlomů řetězců DNA v erytrocytech, žábřácích a jaterních buňkách.⁵⁵ Oproti tomu ve studii autorů Ema et al. intratracheální podávání fullerenu C₆₀ (jednorázově 0,5 a 2,5 mg/kg; opakovaně 0,1 a 0,5 mg/kg jednou týdně po dobu pěti týdnů) nevedlo u potkaních samců k nárůstu míry poškození DNA v plicní tkáni.⁵⁶ Je ale nutné poznamenat, že celková dávka podaná v této studii byla nižší než dávka ve studii předchozí (Sumi a Chitra). Totsuka et al. hodnotili genotoxické účinky intratracheální aplikace fullerenu (C₆₀), sazi (*carbon black*) a kaolinu na organismus C57BL/6J myši a *gpt* delta transgenických myši. Myši

byly exponovány jednou nebo opakovaně (0,2 mg/myš). Intenzita poškození DNA v plicních buňkách klesala v řadě C₆₀ > saze > kaolin a byla celkově 2–3krát vyšší než ve skupině kontrolních myší. U *gtp* delta transgenických myší expozice C₆₀ významně zvýšila frekvenci mutací DNA.⁵⁷

10.3 ZÁVĚR

Genotoxické látky poškozují genetickou informaci buňky, což může mít závažný dopad nejen na buňku samotnou, ale na celý organismus. Poškození genetické informace je mimo jiné spojené s mutacemi a také s vyšším rizikem rozvoje nádorových onemocnění a v případě, že k poškození dochází v zárodečných buňkách, je možné přenést poškození i na další generace. *In vitro* i *in vivo* studie zaměřené na genotoxicitu ukazují, že některé CNM pravděpodobně mají genotoxický potenciál, tj. indukují genomové změny. Jedná se o závažná zjištění, která nelze brát na lehkou váhu a je nezbytné se této problematice dále věnovat.

10.4 LITERATURA

1. Kohl Y, Rundén-Pran E, Mariussen E et al. Genotoxicity of Nanomaterials: Advanced In Vitro Models and High Throughput Methods for Human Hazard Assessment—A Review. *Nanomaterials*. 2020;10(10):1–25. doi:10.3390/NANO10101911.
2. Samadian H, Salami MS, Jaymand M et al. Genotoxicity Assessment of Carbon-Based Nanomaterials; Have Their Unique Physicochemical Properties Made Them Double-Edged Swords? *Mutat Res Mutat Res*. 2020;783:108296. doi:10.1016/J.MRREV.2020.108296.
3. Burgum MJ, Clift MJD, Evans SJ et al. Few-Layer Graphene Induces Both Primary and Secondary Genotoxicity in Epithelial Barrier Models In Vitro. *J Nanobiotechnology*. 2021;19(1):24. doi:10.1186/S12951-021-00769-9.
4. Malkova A, Svadlakova T, Singh A et al. In Vitro Assessment of the Genotoxic Potential of Pristine Graphene Platelets. *Nanomater*. 2021;11(9):2210. doi:10.3390/NANO11092210.
5. Svadlakova T, Hubatka F, Knotigova PT 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.
6. Fraser K, Kodali V, Yanamala N et al. Physicochemical Characterization and Genotoxicity of the Broad Class of Carbon Nanotubes and Nanofibers Used or Produced in U.S. Facilities. *Part Fibre Toxicol*. 2020;17(1):1–26. doi:10.1186/S12989-020-00392-W.
7. Kidane D, Chae WJ, Czochor J et al. Interplay Between DNA Repair and Inflammation, and the Link to Cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014;49(2):116. doi:10.3109/10409238.2013.875514.
8. Barroso SI, Aguilera A. Detection of DNA Double-Strand Breaks by γ -H2AX Immunodetection. *Methods Mol Biol*. 2021;2153:1–8. doi:10.1007/978-1-0716-0644-5_1.
9. Turkez H, Arslan ME, Ozdemir O. Genotoxicity Testing: Progress and Prospects for the Next Decade. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2017;13(10):1089–1098. doi:10.1080/17425255.2017.1375097.
10. Rodriguez-Fernandez L, Valiente R, Gonzalez J, Villegas JC, Fanarraga ML. Multiwalled Carbon Nanotubes Display Microtubule Biomimetic Properties In Vivo, Enhancing Microtubule Assembly and Stabilization. *ACS Nano*. 2012;6(8):6614–6625. doi:10.1021/nn302222m.
11. Nagai H, Okazaki Y, Chew SH et al. Diameter and Rigidity of Multiwalled Carbon Nanotubes Are Critical Factors in Mesothelial Injury and Carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(49):E1330–E1338. doi:10.1073/pnas.1110013108.

12. Grosse Y, Loomis D, Guyton KZ et al. Carcinogenicity of Fluoro-Edenite, Silicon Carbide Fibres and Whiskers, and Carbon Nanotubes. *Lancet Oncol.* 2014;15(13):1427–1428. doi:10.1016/S1470-2045(14)71109-X.
13. World Health Organization (WHO). IARC Publications Website - IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. Published 2019. Accessed February 19, 2022. https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans?sort_by=year_desc&limit=20&page=7.
14. Catalan J, Siivola KM, Nymark P et al. In Vitro and In Vivo Genotoxic Effects of Straight Versus Tangled Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Nanotoxicology.* 2016;10(6):794–806. doi:10.3109/17435390.2015.1132345.
15. Siegrist KJ, Reynolds SH, Porter DW et al. Mitsui-7, Heat-Treated, and Nitrogen-Doped Multi-Walled Carbon Nanotubes Elicit Genotoxicity in Human Lung Epithelial Cells. *Part Fibre Toxicol.* 2019;16(1):1–19. doi:10.1186/S12989-019-0318-0.
16. Lucas JH, Wang Q, Muthumalage T, Rahman I. Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) Cause Cellular Senescence in TGF- β Stimulated Lung Epithelial Cells. *Toxics.* 2021;9(6):144. doi:10.3390/TOXICS9060144.
17. Ventura C, Pereira JFS, Matos P et al. Cytotoxicity and Genotoxicity of MWCNT-7 and Crocidolite: Assessment in Alveolar Epithelial Cells Versus Their Coculture with Monocyte-Derived Macrophages. *Nanotoxicology.* 2020;14(4):479–503. doi:10.1080/17435390.2019.1695975.
18. Di Ianni E, Erdem JS, Møller P et al. In Vitro-In Vivo Correlations of Pulmonary Inflammogenicity and Genotoxicity of MWCNT. *Part Fibre Toxicol.* 2021;18(1):1–16. doi:10.1186/s12989-021-00413-2.
19. Kato T, Totsuka Y, Ishino K et al. Genotoxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes in Both In Vitro and In Vivo Assay Systems. *Nanotoxicology.* 2013;7(4):452–461. doi:10.3109/17435390.2012.674571.
20. Borghini A, Roursgaard M, Andreassi MG, Kermanizadeh A, Møller P. Repair Activity of Oxidatively Damaged DNA and Telomere Length in Human Lung Epithelial Cells After Exposure to Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Mutagenesis.* 2017;32(1):173–180. doi:10.1093/mutage/gew036.
21. Öner D, Ghosh M, Putzeys E, Godderis L, Hoet P. The Assessment of Asbestos and Carbon Nanotubes Induced Genotoxic Effects. *Front Genet.* Conference Abstract: ICAW 2015 – 11th International Comet Assay Workshop. 2015. doi:10.3389/conf.fgene.2015.01.00075.
22. Kermanizadeh A, Gaiser BK, Hutchison GR, Stone V. An In Vitro Liver Model - Assessing Oxidative Stress and Genotoxicity Following Exposure of Hepatocytes to a Panel of Engineered Nanomaterials. *Part Fibre Toxicol.* 2012;9(1):1–13. doi:10.1186/1743-8977-9-28.
23. Guo YY, Zhang J, Zheng YF, Yang J, Zhu XQ. Cytotoxic and Genotoxic Effects of Multi-Wall Carbon Nanotubes on Human Umbilical Vein Endothelial Cells In Vitro. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 2011;721(2):184–191. doi:10.1016/J.MRGENTOX.2011.01.014.
24. Long J, Xiao Y, Liu L, Cao Y. The Adverse Vascular Effects of Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) to Human Vein Endothelial Cells (HUVECs) In Vitro: Role of Length of MWCNTs. *J Nanobiotechnology.* 2017;15(1):80. doi:10.1186/s12951-017-0318-x.
25. Ema M, Imamura T, Suzuki H, Kobayashi N, Naya M, Nakanishi J. Evaluation of Genotoxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes in a Battery of In Vitro and In Vivo Assays. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2012;63(2):188–195. doi:10.1016/j.yrtph.2012.03.014.
26. Jiang T, Amadei CA, Gou N et al. Toxicity of Single-Walled Carbon Nanotubes (SWCNTs): Effect of Lengths, Functional Groups and Electronic Structures Revealed by a Quantitative Toxicogenomics Assay. *Environ Sci Nano.* 2020;7(5):1348–1364. doi:10.1039/D0EN00230E.
27. Cveticanin J, Joksic G, Leskovic A, Petrovic S, Sobot AV, Neskovic O. Using Carbon Nanotubes to Induce Micronuclei and Double Strand Breaks of the DNA in Human Cells. *Nanotechnology.* 2009;21(1):015102. doi:10.1088/0957-4484/21/1/015102.

28. Yao C, Carlisi C, Li Y, Chen D, Ding J, Feng YL. Interaction Potency of Single-Walled Carbon Nanotubes with DNAs: A Novel Assay for Assessment of Hazard Risk. *PLoS One*. 2016;11(12):e0167796. doi:10.1371/journal.pone.0167796.
29. Sargent LM, Shvedova AA, Hubbs AF et al. Induction of Aneuploidy by Single-Walled Carbon Nanotubes. *Environ Mol Mutagen*. 2009;50(8):708–717. doi:10.1002/EM.20529.
30. Sargent LM, Hubbs AF, Young SH et al. Single-Walled Carbon Nanotube-Induced Mitotic Disruption. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2012;745(1–2):28–37. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.11.017.
31. Pacurari M, Yin XJ, Zhao J et al. Raw Single-Wall Carbon Nanotubes Induce Oxidative Stress and Activate MAPKs, AP-1, NF- κ B, and Akt in Normal and Malignant Human Mesothelial Cells. *Environ Health Perspect*. 2008;116(9):1211–1217. doi:10.1289/ehp.10924.
32. Samadian H, Salami MS, Jaymand M et al. Genotoxicity Assessment of Carbon-Based Nanomaterials; Have Their Unique Physicochemical Properties Made Them Double-Edged Swords? *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2020;783:108296. doi:10.1016/j.mrrev.2020.108296.
33. Akca S, Foroughi A, Frochtzvajg D, Postma HWC. Competing Interactions in DNA Assembly on Graphene. *PLoS One*. 2011;6(4):e18442. doi:10.1371/journal.pone.0018442.
34. Burgum MJ, Clift MJD, Evans SJ et al. In Vitro Primary-Indirect Genotoxicity in Bronchial Epithelial Cells Promoted by Industrially Relevant Few-Layer Graphene. *Small*. 2021;17(15):2002551. doi:10.1002/SMLL.202002551.
35. Chatterjee N, Yang JS, Choi J. Differential Genotoxic and Epigenotoxic Effects of Graphene Family Nanomaterials (GFNs) in Human Bronchial Epithelial Cells. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 2016;798–799:1–10. doi:10.1016/J.MRGENTOX.2016.01.006.
36. Wang A, Pu K, Dong B et al. Role of Surface Charge and Oxidative Stress in Cytotoxicity and Genotoxicity of Graphene Oxide Towards Human Lung Fibroblast Cells. *J Appl Toxicol*. 2013;33(10):1156–1164. doi:10.1002/JAT.2877.
37. De Marzi L, Ottaviano L, Perrozzi F et al. Flake Size-Dependent Cyto and Genotoxic Evaluation of Graphene Oxide on In Vitro A549, CaCo2 and Vero Cell Lines. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2014;28(2):281–289.
38. Di Ianni E, Møller P, Vogel UB, Jacobsen NR. Pro-Inflammatory Response and Genotoxicity Caused by Clay and Graphene Nanomaterials in A549 and THP-1 Cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2021;872:503405. doi:10.1016/j.mrgentox.2021.503405.
39. Zhao X, Striolo A, Cummings PT. C60 Binds to and Deforms Nucleotides. *Biophys J*. 2005;89(6):3856–3862. doi:10.1529/biophysj.105.064410.
40. Firdaus S, Lohani M, Dhasmana A, Haneef M. Interaction Pattern of Fullerene Family with Different Forms of DNA. *Int J Sci Eng Res*. 2015;6(3):1536–1541.
41. Ershova ES, Sergeeva VA, Chausheva AI et al. Toxic and DNA Damaging Effects of a Functionalized Fullerene in Human Embryonic Lung Fibroblasts. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2016;805:46–57. doi:10.1016/j.mrgentox.2016.05.004.
42. Gudkov SV, Guryev EL, Gapeyev AB et al. Unmodified Hydrated C60 Fullerene Molecules Exhibit Antioxidant Properties, Prevent Damage to DNA and Proteins Induced by Reactive Oxygen Species and Protect Mice Against Injuries Caused by Radiation-Induced Oxidative Stress. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2019;15(1):37–46. doi:10.1016/J.NANO.2018.09.001.
43. Aly FM, Othman A, Haridy MAM. Protective Effects of Fullerene C60 Nanoparticles and Virgin Olive Oil Against Genotoxicity Induced by Cyclophosphamide in Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018(1):1261356. doi:10.1155/2018/1261356.
44. Xing Y, Xiong W, Zhu L, O'Sawa E, Hussin S, Dai L. DNA Damage in Embryonic Stem Cells Caused by Nanodiamonds. *ACS Nano*. 2011;5(3):2376–2384. doi:10.1021/nn200279k.
45. Dworak N, Wnuk M, Zebrowski J, Bartosz G, Lewinska A. Genotoxic and Mutagenic Activity of Diamond Nanoparticles in Human Peripheral Lymphocytes In Vitro. *Carbon N Y*. 2014;68:763–776. doi:10.1016/j.carbon.2013.11.067.

46. Poulsen SS, Saber AT, Williams A et al. MWCNTs of Different Physicochemical Properties Cause Similar Inflammatory Responses, but Differences in Transcriptional and Histological Markers of Fibrosis in Mouse Lungs. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015;284(1):16–32. doi:10.1016/J.TAAP.2014.12.011.
47. Knudsen KB, Berthing T, Jackson P et al. Physicochemical Predictors of Multi-Walled Carbon Nanotube–Induced Pulmonary Histopathology and Toxicity One Year After Pulmonary Deposition of 11 Different Multi-Walled Carbon Nanotubes in Mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2019;124(2):211–227. doi:10.1111/bcpt.13119.
48. Muller J, Decordier I, Hoet PH et al. Clastogenic and Aneugenic Effects of Multi-Wall Carbon Nanotubes in Epithelial Cells. *Carcinogenesis*. 2008;29(2):427–433. doi:10.1093/CARCIN/BGM243.
49. Snegin E, Gusev A, Snegina E, Barkhatov A, Vasyukova I, Artemchuk O. Genotoxicity Evaluation of Multiwalled Carbon Nanotubes: In Vivo Studies in Mice. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*. 2020; 433:012010. doi:10.1088/1755-1315/433/1/012010.
50. Hadrup N, Bengtson S, Jacobsen NR et al. Influence of Dispersion Medium on Nanomaterial-Induced Pulmonary Inflammation and DNA Strand Breaks: Investigation of Carbon Black, Carbon Nanotubes and Three Titanium Dioxide Nanoparticles. *Mutagenesis*. 2017;32(6):581–597. doi:10.1093/mutage/gex042.
51. Pothmann D, Simar S, Schuler D et al. Lung Inflammation and Lack of Genotoxicity in the Comet and Micronucleus Assays of Industrial Multiwalled Carbon Nanotubes Graphistrength C100 After a 90-Day Nose-Only Inhalation Exposure of Rats. *Part Fibre Toxicol*. 2015;12:21. doi:10.1186/S12989-015-0096-2.
52. El-Yamany NA, Mohamed FF, Salaheldin TA, Tohamy AA, Abd El-Mohsen WN, Amin AS. Graphene Oxide Nanosheets Induced Genotoxicity and Pulmonary Injury in Mice. *Exp Toxicol Pathol*. 2017;69(6):383–392. doi:10.1016/J.ETP.2017.03.002.
53. Mohamed HRH, Welson M, Yaseen AE, El-Ghor A. Induction of Chromosomal and DNA Damage and Histological Alterations by Graphene Oxide Nanoparticles in Swiss Mice. *Drug Chem Toxicol*. 2021;44(6):631–641. doi:10.1080/01480545.2019.1643876.
54. Liu Y, Luo Y, Wu J et al. Graphene Oxide Can Induce In Vitro and In Vivo Mutagenesis. *Sci Rep*. 2013;3:3469. doi:10.1038/srep03469.
55. Sumi N, Chitra KC. Cytogenotoxic Effects of Fullerene C60 in the Freshwater Teleostean Fish, *Anabas testudineus* (Bloch, 1792). *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2019;847:503104. doi:10.1016/j.mrgentox.2019.503104.
56. Ema M, Tanaka J, Kobayashi N et al. Genotoxicity Evaluation of Fullerene C60 Nanoparticles in a Comet Assay Using Lung Cells of Intratracheally Instilled Rats. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2012; 62(3):419–424. doi:10.1016/j.yrtph.2012.01.003.
57. Totsuka Y, Higuchi T, Imai T et al. Genotoxicity of Nano/Microparticles in In Vitro Micronuclei, In Vivo Comet and Mutation Assay Systems. *Part Fibre Toxicol*. 2009;6(1):23. doi:10.1186/1743-8977-6-23.

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 superoxidodismutázy).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 koncentrací (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 přinášejí 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 fullerenu (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 oocyty 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 expozic 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 expozice 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 ocase 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 exponováni 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 žábřonozky 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 (Jurgelènè 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. Szmidi 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.

PRAKTICKÁ ČÁST

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.

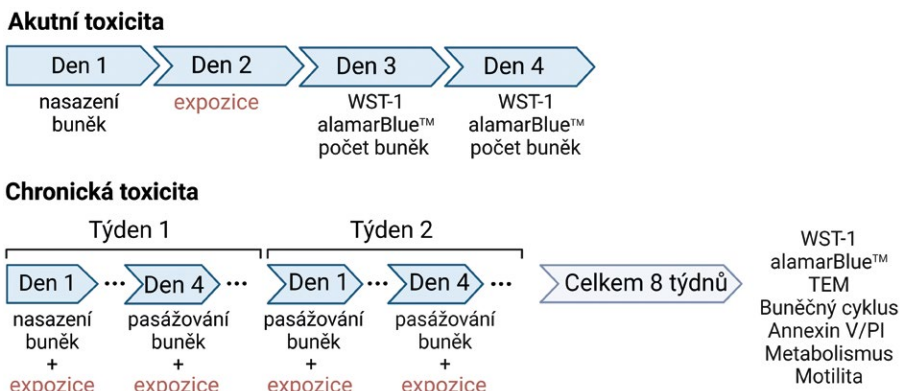
12.2 CÍLE

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).



Obrázek 4. Schéma expozice buněk A549

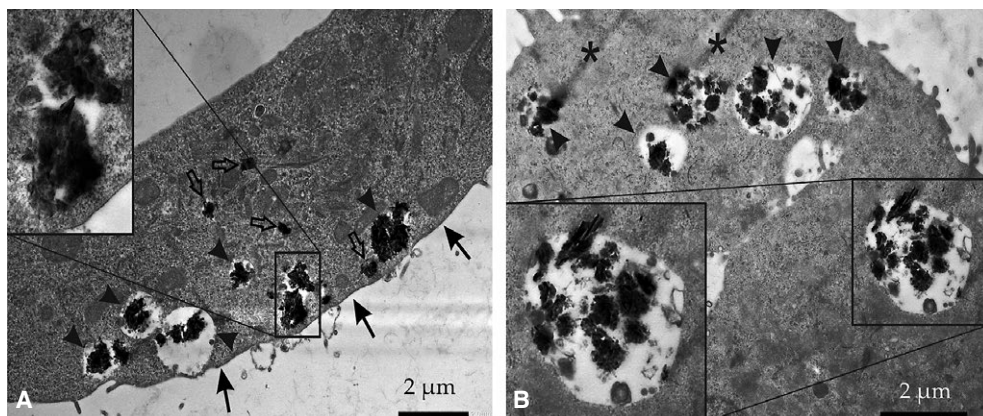
12.4 VÝSLEDKY

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

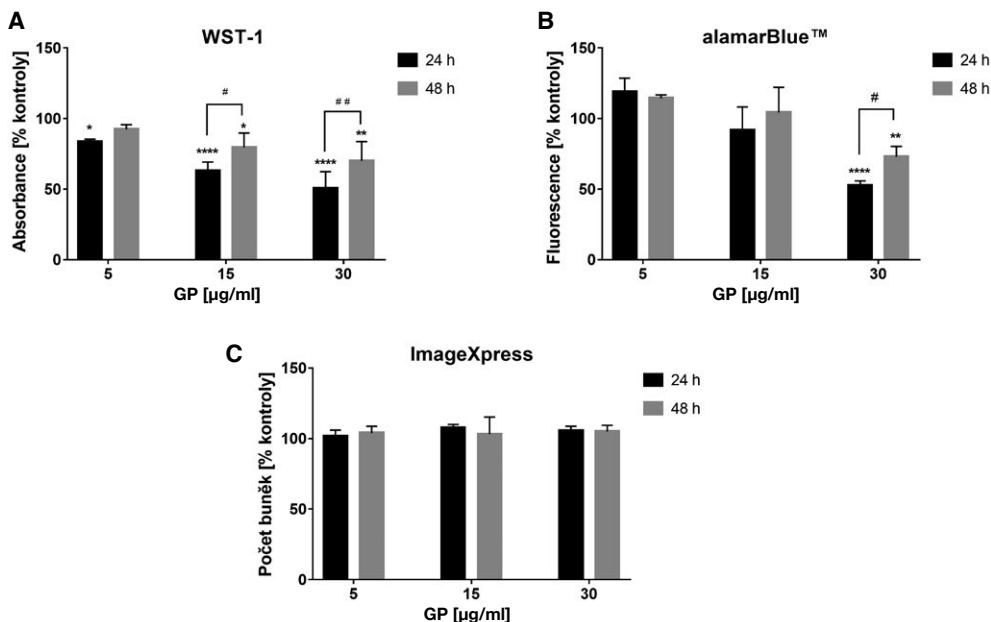
Akutní cytotoxicita GP vůči buňkám linie A549 (vliv na buněčnou viabilitu za 24 a 48 hodin) byla hodnocena pomocí testů WST-1 a alamarBlue™. Oba testy potvrdily významné



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).

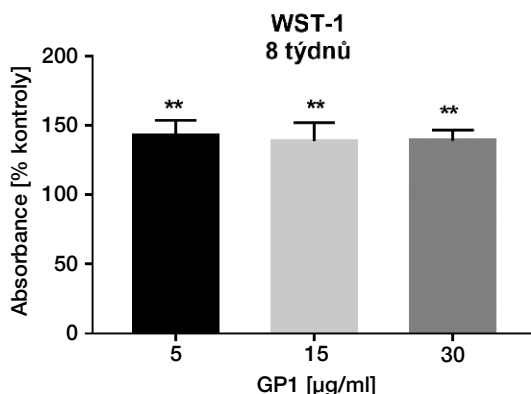


Obrázek 6. Akutní cytotoxicita GP vůči buňkám linie A549

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)

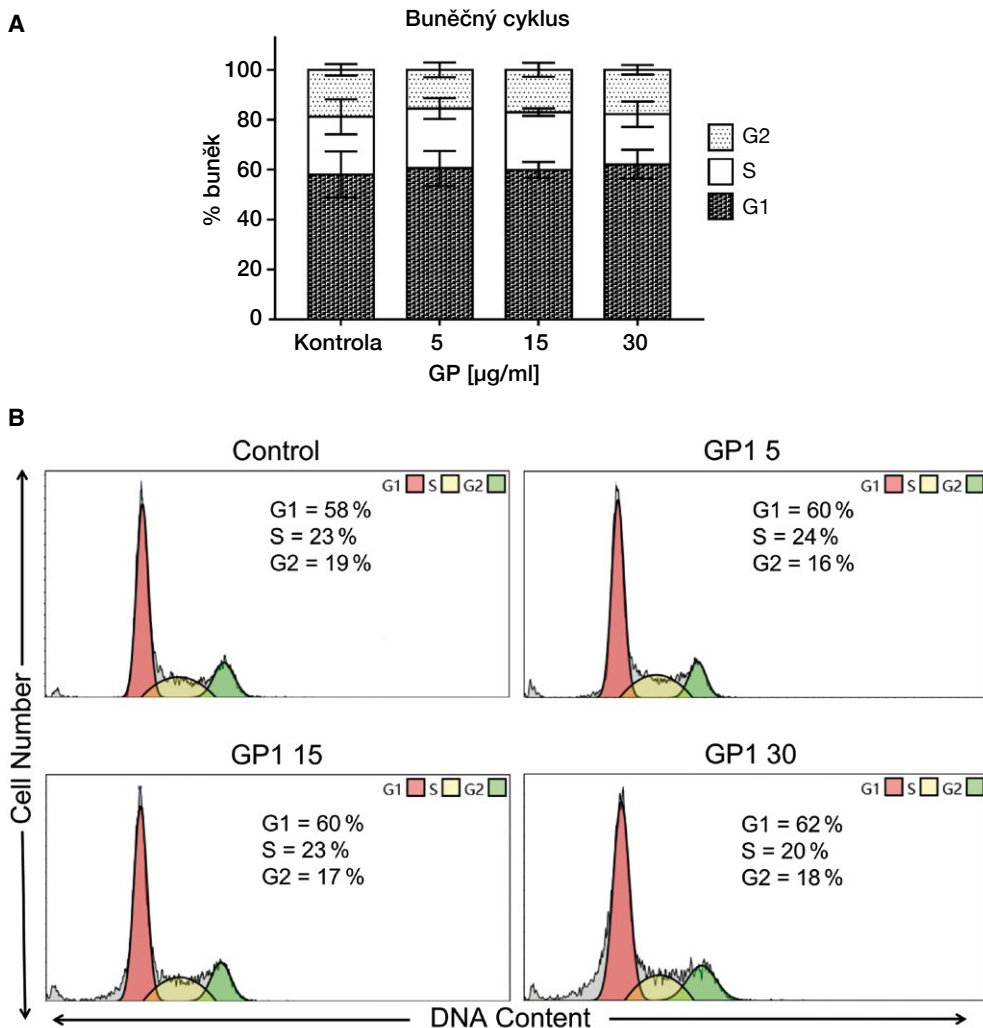
Expozice	Mrtvé buňky
Kontrola	0,97 \pm 0,20 %
GP (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	6,67 \pm 0,98 %
GP (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	7,55 \pm 0,10 %
GP (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	7,90 \pm 2,15 %

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

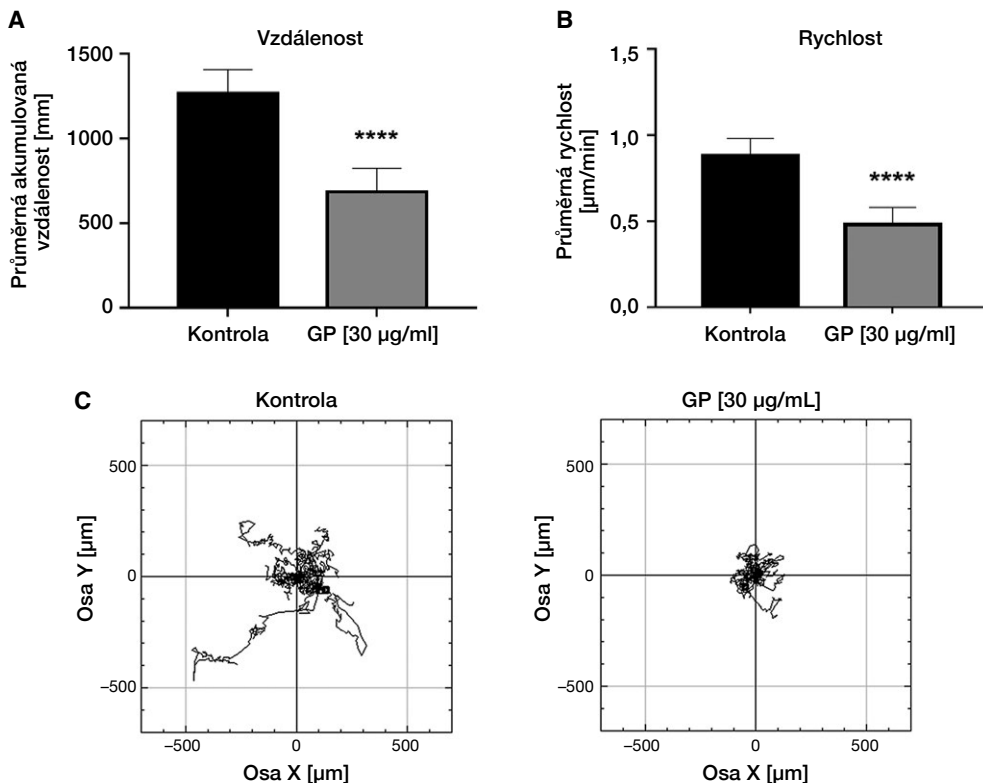
Důležitým ukazatelem expozice buněk xenobiotiky je změna jejich motility. Jak vyplynulo z 24hodinových sledování, buňky linie A549 exponované GP vykazovaly menší pohyblivost při hodnocení spontánní motility (Obrázek 9) i chemotaktické migrace (Obrázek 10) (ve srovnání s kontrolou). Je zajímavé, že u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

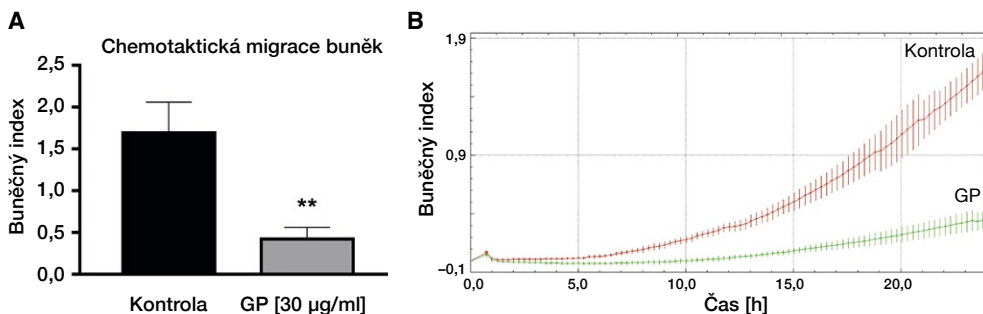
Poznámka: (A) Distribuce fází buněčného cyklu (průměr ± SD, n = 3). (B) Repräsentativní histogramy analýzy buněčného cyklu z jednoho ze tří nezávislých experimentů. G1 fáze červené píky, S-fáze žlutá plocha pod křivkou, G2 fáze zelené píky. Statistická významnost byla hodnocena Studentovým t-testem.

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 SHRNUÍ

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.

13 CYTOTOXICKÝ EFEKT GRAFENU ZÁVISLÝ NA DÁVCE A ČASU V POKUSECH *IN VITRO* A *IN VIVO* (PAEC BUŇKY, C57BL/6 MYŠI)

Následující text představuje komentář ke studii Bavorova H, Svadlakova T, Fiala Z, Pisal R, Mokry J. The Dose- and Time-Dependent Cytotoxic Effect of Graphene Nanoplatelets: In Vitro and In Vivo Study. *Nanomaterials*. 2022; 12(12):1978. <https://doi.org/10.3390/nano12121978>. Metodiky jsou podrobně popsány v příloze.

13.1 ÚVOD

Nanomateriály si získávají stále větší pozornost nejen vědců, ale i veřejnosti. Jejich produkce a používání však může za jistých okolností představovat riziko pro životní prostředí, rostliny i živočichy, včetně člověka. To je dáno snadných průnikem do organismu, a hlavně možností kumulovat se ve tkáních. Doba této depozice je determinována jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi, funkcionalizací povrchu a charakterem interakcí s biomolekulami.¹

Mezi uhlíkovými materiály patří k nejznámějším grafen a jeho deriváty. Vzhledem k jeho vysoké využitelnosti v mnoha oborech, včetně medicíny, je nezbytné získat přesná data o jeho potenciální toxicitě.^{2,3} Údaje o (ne)bezpečnosti grafenu jsou zatím poměrně omezené a pocházejí z velké části z výsledků akutních nebo subakutních forem expozice v experimentech *in vitro*.

13.2 CÍLE

Cílem prezentované studie bylo (1) *in vitro* testování cytotoxického (antiproliferativního) potenciálu grafenových plátek (GP) vůči myším primárním alveolárním epitelovým buňkám a (2) histopatologická analýza *in vivo* experimentu: sledování morfologických změn tkání vybraných orgánů (plic, srdce, žaludku, tenkého střeva, jater a ledvin) a sledování distribuce a kumulace nanočástic v organismu po perorální a intratracheální (akutní i chronické) expozici myši grafenovým nanoplátkům.

13.3 MATERIÁL A METODIKA

13.3.1 Příprava suspenze GP

GP byly získány od firmy PlasmaChem GmbH (velikost plátek do 2 mm, tloušťka 1–4 nm). Pro experimenty byly GP suspendovány v 0,02% cholátu sodném a sonikovány po dobu 30 minut. Zásobní roztok o koncentraci 250 mg GP / ml suspenze byl následně ředěn na pracovní koncentrace (5–100 mg/ml).

13.3.2 Kultivace myších primárních alveolárních epitelových buněk (PAEC)

Buněčná kultura PAEC byla získána od firmy Cell Biologics (izolace z myši kmene C57Bl/6). Kultivace byla prováděna ve specifickém kultivačním médiu s obsahem růstových faktorů (0,01% insulin-transferrin-selen a 0,01% EGF), 1% L-glutaminem, 1% antibiotiky a 10% FBS při 37 °C a 5 % CO₂.

13.3.3 Analýza cytotoxického účinku GP

Buňky PAEC byly kultivovány na 96jamkové destičce po dobu 24 hodin a poté exponovány GP o koncentracích 5–100 mg/ml po dobu 24 nebo 48 hodin. Analýza cytotoxického účinku byla prováděna pomocí LDH CyQUANT a WST-1 testu. Absorbance měřena na přístroji ELISA analyzer SUNRISE Xfluor 4 při vlnové délce 490 nm.

13.3.4 Buněčná analýza ve skutečném čase (real-time)

Buňky PAEC byly exponovány GP o koncentracích 5–100 mg/ml po dobu 24 nebo 48 hodin. Poté byla v reálném čase sledována změna hodnoty „cell index“, který zahrnoval změny adheze, proliferace, viability a morfologie.

13.3.5 Histopatologická analýza v *in vivo* experimentu

Studie *in vivo* byla provedena na dospělých myších samcích kmene C57Bl/6 (stáří 8–12 týdnů). Myši byly rozděleny do 8 skupin po 6–9 zvířatech (Tabulka 2). Expozice GP o koncentracích 5 nebo 50 mg/ml byla provedena perorálně (PO) nebo intratracheálně (IT). Ve skupinách 1A, 1B, 2A, 2B (akutní expozice) byl GP myším podán jednorázově, ve skupinách 1C a 2C byl podáván denně po dobu 21 dnů (chronická expozice). Skupiny 1D a 2D byly skupinami kontrolními, ve kterých byly myši exponovány pouze cholátu sodnému.

Po 1, 7 a 21 dnech od jednorázové aplikace a po 21 dnech opakované expozice byly myši usmrčeny a byl proveden odběr vybraných orgánů (žaludku, tenkého střeva, jater a ledvin). Následně byly zhotoveny histologické preparáty orgánových tkání a provedena jejich histopatologická analýza (morfologické změny, distribuce a kumulace GP).

Tabulka 2. Struktura studie

Skupina	Místo vstupu	Dávkování GP	Počet zvířat	Doba
1A	IT	5 µg/ml	9	1, 7, 21 dní od aplikace
1B	IT	50 µg/ml	9	1, 7, 21 dní od aplikace
1C	IT	50 µg/ml	6	21 dní (denně)
1D	IT	0 µg/ml	9	1, 7, 21 dní od aplikace
2A	PO	5 µg/ml	9	1, 7, 21 dní od aplikace
2B	PO	50 µg/ml	9	1, 7, 21 dní od aplikace
2C	PO	50 µg/ml	6	21 dní (denně)
2D	PO	0 µg/ml	9	1, 7, 21 dní od aplikace

13.3.6 Statistická analýza

Výsledky byly vyjádřeny jako aritmetické průměry se směrodatnou odchylkou (normalizace ke kontrolám). Pro analýzu byl použit Shapiro-Wilk test, ANOVA test a Dunnettův test (SW GraphPad Prism). Statistická významnost byla vyjádřena pomocí ukazatele p.

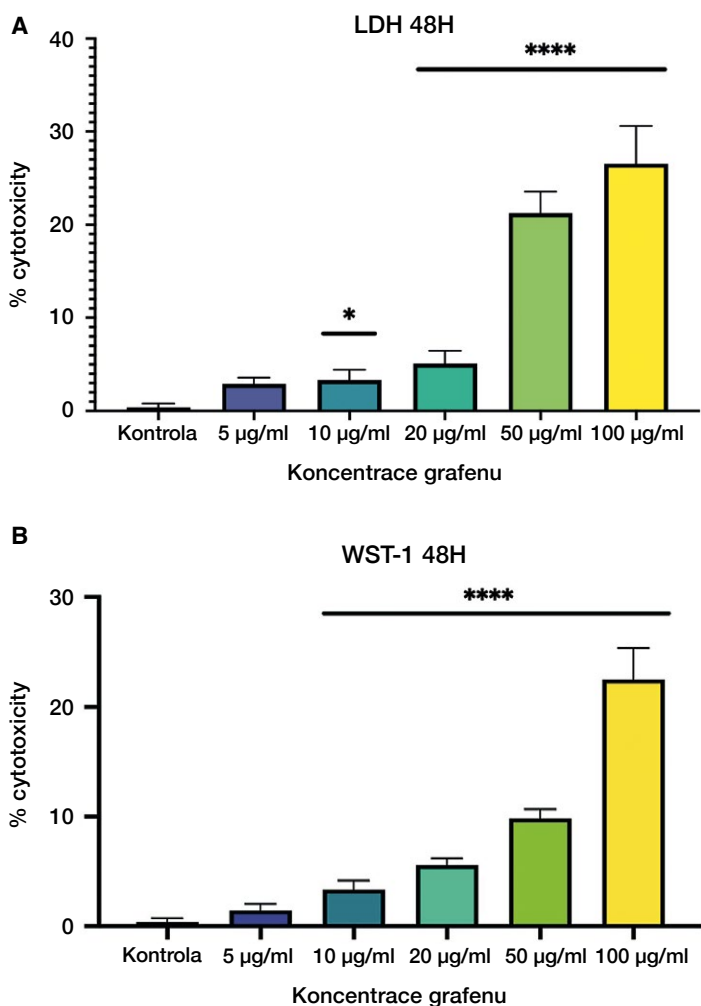
13.4 VÝSLEDKY

13.4.1 Analýza cytotoxického účinku GP

Analýza cytotoxického účinku GP vůči buněčné linii PAEC byla prováděna pomocí LDH testu a WST-1 testu. Oba testy prokázaly významný cytotoxický účinek expozice v situacích, kdy byly buňky exponovány koncentracím vyšším než 50 µg/ml po dobu 48 hodin (GP narušovaly integritu buněčných membrán). Buněčná populace měla při tomto expozičním scénáři viabilitu sníženu o více než 20 % (Obrázek 11). Výsledky jsou v souladu s údaji ostatních autorů.^{4,5}

13.4.2 Real-time buněčná analýza

Výsledky analýzy potvrdily cytotoxický (antiproliferativní) vliv expozice GP na buněčnou linii PAEC v situacích, kdy byly buňky exponovány koncentracím 50–100 µg/ml po dobu delší než 24 hodin. Hodnota „cell indexu“ nevykazovala významné změny zhruba 24 hodin po expozici GP, což naznačuje vytvoření buněčného monolayeru a vzájemných mezibuněčných vazeb (Obrázek 12). Nicméně, delší doba expozice v kombinaci s vyšší expoziční koncentrací vedla k postupnému snižování hodnoty „cell indexu“, což pravděpodobně reflektovalo přítomnost oxidačního stresu. Podobné výsledky byly popsány i v jiných studiích.^{6,7}

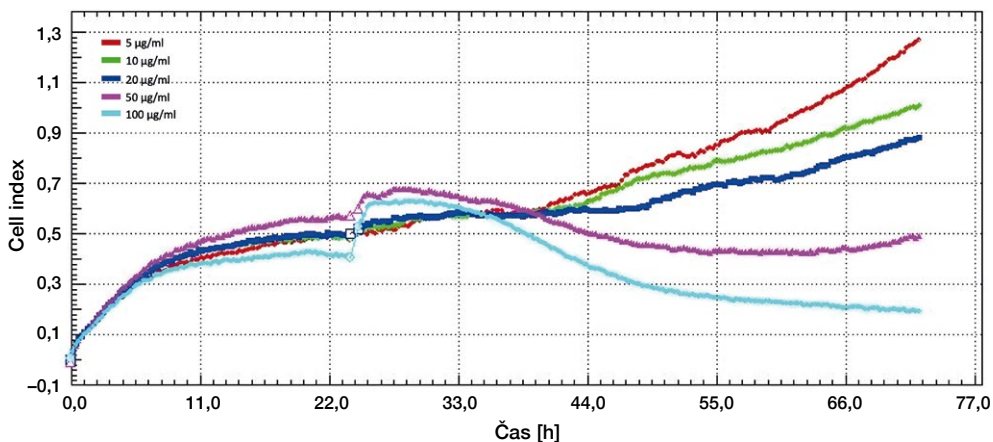


Obrázky 11. Cytotoxický vliv expozice GP na buněčnou linii PAEC

Poznámka: Výsledky testů LDH a WST-1; * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

13.4.3 Histopatologická analýza v *in vivo* experimentu

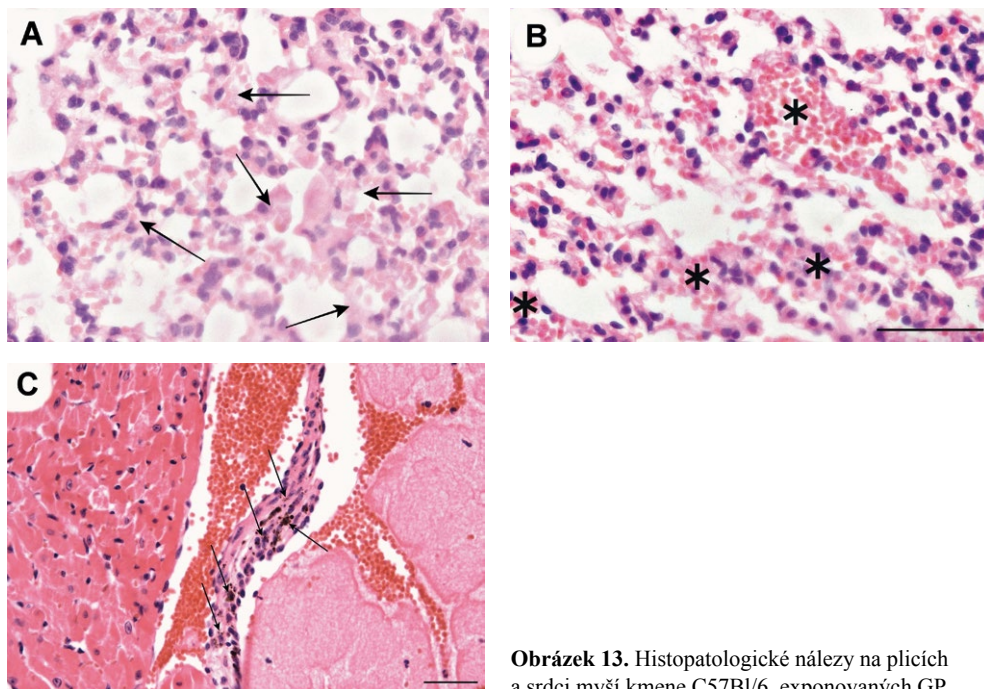
Studie *in vivo* simulovala dvě nejčastější cesty vstupu nanomateriálů do organismu. Histopatologická analýza po intratracheální expozici myši GP potvrdila závěry testů cytotoxicity. Jednorázová (akutní) expozice GP se na vnitřní struktuře tkání neprojevila. Při opakované (chronické) expozici GP došlo ke změně morfologie plicní tkáně ve smyslu až trojnásobného ztlustění stěn alveolárních sept (Obrázek 13A) a k vyplavení erytrocytů do intersticia plic (Obrázek 13B). Endokard myšního srdce obsahoval rezidua grafenových nanočástic (Obrázek 13C), nicméně stěna myokardu morfologické změny nevykazovala.



Obrázek 12. Cytotoxický vliv expozice GP na buněčnou linii PAEC

Poznámka: Výsledky real-time buněčné analýzy.

Akutní ani chronická perorální expozice GP nevyvolala žádné patologické změny v morfologii odebraných orgánů (žaludek, tenké střevo, játra a ledviny). Důvodem mohly být nízké expoziční koncentrace GP a schopnost trávicího a močového systému účinně eliminovat GP (obecně nanomateriály) z organismu. Na rozdíl od studie Fua et al. jsme kumulaci GP ve tkáních zkoumaných orgánů neprokázali.⁸



Obrázek 13. Histopatologické nálezy na plicích a srdci myši kmene C57Bl/6, exponovaných GP

13.5 SHRnutí

Hlavními cíli bylo zhodnocení cytotoxického vlivu expozice GP na linii alveolárních epitelových buněk PAEC a histopatologická analýza orgánů zvířete po intratracheální a perorální (akutní i chronické) expozici GP.

Výsledky testů LDH a WST-1 potvrdily přítomnost na dávce (koncentraci a době expozice) závislých cytotoxických účinků. Pravděpodobná příčina cytotoxicity spočívá ve fyzikálních vlastnostech GP (především ve tvaru částic). Částice mohou narušovat celistvost buněčné membrány a uvolňovat cytoplazmu do okolí buňky. Je velmi pravděpodobné, že GP ve vyšších koncentracích (50–100 µg/ml) indukovaly v buněčném médiu tvorbu volných kyslíkových radikálů/intermediátů (ROS), které jsou zodpovědné za elevaci hladin oxidačního stresu. Oxidační stres může způsobovat změny buněčné morfologie a/nebo adhezi. Tyto faktory byly sledovány v reálném čase pomocí xCELLigence (změny „cell indexu“), která doplnila (a potvrdila) závěry testů cytotoxicity.

Volba buněčné linie PAEC reflektovala skutečnost, že respirační trakt je nejvýznamnější cestou vstupu GP do organismu. Nepotvrdili jsme kumulaci GP v respiračním traktu, ale pozorovali jsme významné ztlustění alveolárních sept. To naznačuje přítomnost zánětlivé reakce, vyvolané chronickou expozicí GP. Nenalezli jsme známky hypertrofie či zánětu myokardu, které jsou popisovány v odborné literatuře. Zjištěna byla pouze lokální kumulace GP v endokardu.

Akutní ani chronická perorální expozice nevyvolaly patologické změny v morfologii odebraných orgánů. Důvodem mohly být nízké expoziční koncentrace GP, které ještě nepřetížily kapacitu trávicího a močového systému eliminovat částice z organismu.

13.6 LITERATURA

1. Martín C, Kostarelos K, Prato M, Bianco A. Biocompatibility and Biodegradability of 2D Materials: Graphene and Beyond. *Chemical Communications*. 2019;55(39):5540–5546. doi:10.1039/c9cc01205b.
2. Thapa RJ, Ku SK, Choi HG, Yong CS, Byeon JH, Kim JO. Vibrating Droplet Generation to Assemble Zwitterion-Coated Gold-Graphene Oxide Stealth Nanovesicles for Effective Pancreatic Cancer Chemo-Phototherapy. *Nanoscale*. 2018;10(4):1742–1749. doi:10.1039/c7nr07603g.
3. Bullock CJ, Bussy C. Biocompatibility Considerations in the Design of Graphene Biomedical Materials. *Advanced Materials Interfaces*. 2019;6(11):1900229. doi:10.1002/admi.201900229.
4. Chang Y, Yang ST, Liu JH et al. In Vitro Toxicity Evaluation of Graphene Oxide on A549 Cells. *Toxicol Lett*. 2011;200(3):201–210. doi:10.1016/j.toxlet.2010.11.016.
5. Wang K, Ruan J, Song H et al. Biocompatibility of Graphene Oxide. *Nanoscale Res Lett*. 2011;6(1):8. doi:10.1007/s11671-010-9751-6.
6. Kvakova M, Stroffekova K, Stofilova J et al. Toxicological Evaluation of Fluorescent 11-Mercaptoundecanoic Gold Nanoclusters as Promising Label-Free Bioimaging Probes in Different Cancer Cell Lines. *Toxicol In Vitro*. 2021;73:105140. doi:10.1016/j.tiv.2021.105140.
7. González-Ballesteros N, Diego-González L, Lastra-Valdor M et al. Saccorhiza Polyschides Used to Synthesize Gold and Silver Nanoparticles with Enhanced Antiproliferative and Immunostimulant Activity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;123:111960. doi:10.1016/j.msec.2021.111960.
8. Fu C, Liu T, Li L et al. 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.

14 VLIV UHLÍKOVÝCH NANOMATERIÁLŮ NA AKTIVITU IMUNITNÍCH BUNĚK (LIDSKÉ THP-1, LIDSKÉ MONOCYTY Z PERIFERNÍ KRVE)

Následující text představuje komentář ke studiím: 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.

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.

Vybrané metodiky jsou podrobně popsány v příloze.

14.1 ÚVOD

Klíčovým faktorem v hodnocení bezpečnosti nanočástic a nanomateriálů (NM) je jejich interakce se složkami imunitního systému a následně schopnost vyvolat či modulovat zánětlivou odpověď. V případě uhlíkových nanomateriálů (C-BNM) jsou takto dlouhodobě sledovány zejména uhlíkové nanotrubičky (CNT). Studie ukazují, že hlavním zdrojem cytotoxického poškození způsobeného přítomností jak jednovrstvých SWCNT, tak i vícevrstvých MWNT je jejich specifický tvar.¹ Spolu s dalšími nezanedbatelnými faktory, jako jsou např. velikost a funkcionalizace, působí prozánětlivě na základě mechanického poškození či vyvolání oxidačního stresu.¹⁻³ Podobný efekt bývá pozorován u grafenu a grafen oxidu (GO), avšak z důvodu existence velkého počtu derivátů jsou stran uhlíkových nanomateriálů jako celku dostupné pouze omezené informace.⁴ Příkladem jsou nemodifikované grafenové plátky (GP), které mimo jiné vznikají jako meziprodukt během přípravy a zpracování grafenu či GO. Dosavadní studie ukazují, že GP o průměru do 25 μm se mohou po vdechnutí dostat až do alveolů, kde setrvávají v mezibuněčných prostorech, případně jsou pohlceny alveolárními makrofágy.⁵ Malé procento přecházející do krevního oběhu pak interaguje s dalšími složkami přirozené imunity, např. monocyty a neutrofilů.⁶ Nabízí se tedy otázka, zda přetrvávající přítomnost těchto relativně odolných materiálů v profesionálních fagocytech, zejména monocyto-makrofágovém systému, vyvolává podobnou odpověď jako zmíněné CNT, případně indukuje funkční změny (modulace) v jejich fyziologické reaktivitě.

14.2 CÍLE

Cílem těchto dvou na sebe navazujících studií bylo *in vitro* porovnání prozánětlivého potenciálu vícevrstvých MWCNT a dvou různých typů GP. Byla sledována (1) postexpoziční aktivace inflamazomu NLRP3 (*nod-like receptor* obsahující doménu vázající pyrin) a (2) byly hodnoceny modulace vyvolané intracelulární perzistencí těchto NM. Pro obě studie byly vybrány lidské THP-1/THP1-null buňky a lidské monocyty z periferní krve, jako reprezentativní modely kanonické a alternativní aktivace NLRP3 a zástupci monocyto-makrofágového systému.

14.3 MATERIÁL A METODIKA

14.3.1 Testované NM

Prvním krokem studií byla komplexní fyzikálně-chemická charakterizace všech používaných C-BNM. Konkrétně se jednalo o nemodifikované GP2 darované centrem CRANN (The Centre for Research on Adaptive Nanostructures and Nanodevices, Trinity College Dublin, Irsko), komerčně dostupné nemodifikované GP1 (PL-P-G750, PlasmaChem, GmbH, Německo) a nemodifikované MWCNT (659258; Merck, Německo). Detailní charakterizace zahrnovala Ramanovu spektroskopii, rentgenovou spektroskopii a termogravimetrickou analýzu. Pro stabilizaci ve vodném roztoku byl použit cholát sodný v koncentraci 0,02 %. Morfologie a stabilita v suspenzi byla ověřena hodnocením hydrodynamického průměru (H_D) pomocí dynamického rozptylu světla (DLS), dále ζ -potenciálu a pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Nepřítomnost biologické kontaminace byla ověřována využitím komerčně dostupných reportérových buněčných esejí.

14.3.2 Analýza viability buněk

Kultivace buněk probíhala vždy v plném kultivačním médiu RPMI 1640 s 10 % séra (u monocytů bylo použito autologní sérum) za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO₂). Pro ověření viability byly buňky THP-1 před vlastním testováním 72 hodin diferencovány na THP-1 makrofágy pomocí PMA (Merck, Německo). Základní doba expozice THP-1 makrofágů i primárních monocytů C-BNM činila 24 a 48 hodin. Vlastní analýza zahrnovala stanovení uvolněné laktátdehydrogenázy z poškozených buněk (LDH) a detekci mitochondriálního potenciálu pomocí tetramethylrhodaminu. V supernatantech byly též stanoveny hladiny IL-6, TNF- α a IL-10 pomocí sendvičové ELISA metody. Intracelulární lokalizace C-BNM byla hodnocena pomocí TEM.

14.3.3 Analýza aktivity NLRP3

K hodnocení kanonické aktivace NLRP3 byly použity geneticky modifikované linie THP-1 od firmy Invivogen, konkrétně THP1-null (pozitivní kontrola aktivace inflamazomu NLRP3), THP1-defNLRP3 a THP1-defASC (negativní kontroly aktivace inflamazomu NLRP3) dle

protokolu výrobce. V rámci stanovení mechanismu aktivace byla provedena detekce uvolněného katepsinu B pomocí konfokální mikroskopie. Pro hodnocení alternativní aktivace byly izolovány lidské primární monocyty. Ve všech případech byla aktivita NLRP3 stanovena na základě produkce IL-1 β .

14.3.4 Analýza modulace

Modulační účinky koncentrací NM bez zjevné toxicity byly hodnoceny na lidských primárních monocytech. Po úvodních 24 hodinách expozice byly nepohlcené NM vymyty a buňky následně byly: a) 24 hodin stimulovány vybranými teplem usmrcenými (*heat-killed*; HK) bakteriemi, v odebraných supernatantech byly stanoveny hladiny IL-6, TNF- α a IL-10 pomocí sendvičové ELISA metody, b) 3 hodiny inkubovány s fluorescenčně značenými *Escherichia coli*, kdy byla sledována fagocytární aktivita pomocí holotomografické mikroskopie a průtokové cytometrie, c) ponechány 7 dní spontánně diferencovat v novém plném médiu bez další stimulace. Výsledné makrofágy byly hodnoceny pomocí optické mikroskopie a průtokové cytometrie. Jako negativní kontrola sloužily ve všech případech buňky bez úvodní stimulace NM.

14.3.5 Statistika

Výsledky obou studií vycházely minimálně ze tří nezávislých měření provedených v duplikátech nebo tripplikátech. Hodnocení probíhalo pomocí programu GraphPad PrismTM. Na základě Shapiro-Wilkova testu normality byla provedena buď parametrická nebo neparametrická analýza rozptylu (ANOVA) následovaná Dunnettovým nebo Kruskal-Wallisovým post hoc testem. Při mnohonásobném porovnání byla uplatněna Bonferroniho korekce. V případě testování modulace produkce cytokinů byly výsledky hodnoceny odděleně pomocí párového t-testu, nebo párového Wilcoxonova testu. Statistická významnost byla určena na základě p-hodnot, kdy * p < 0,05; ** p < 0,01; a *** p < 0,001.

14.4 VÝSLEDKY

14.4.1 Charakteristika C-BNM

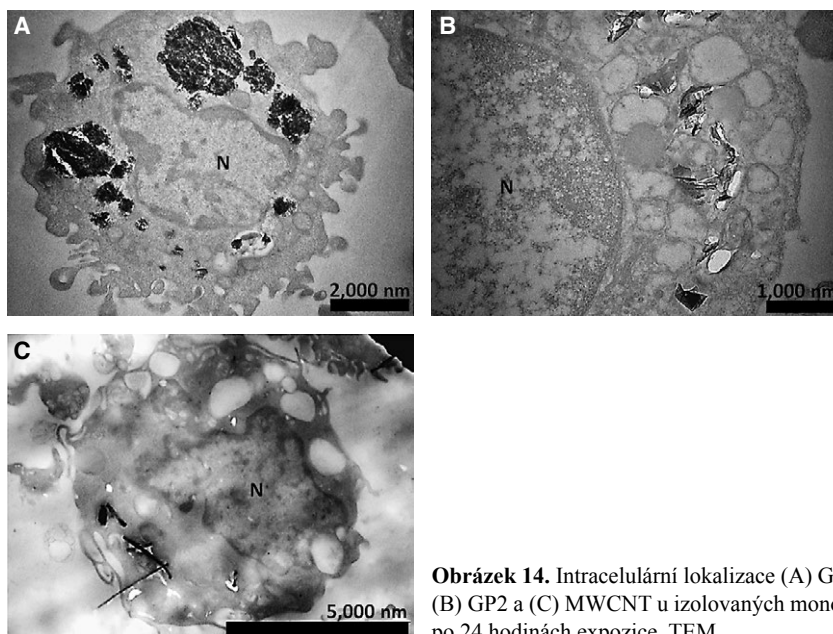
Vzhledem k hydrofobnímu charakteru C-BNM bylo nutné ke stabilizaci zásobní suspenze využít biokompatibilní detergent. V našem případě byl zvolen cholát sodný ve finální koncentraci 0,02 %. Naměřené hodnoty H_D a ζ -potenciálu (Tabulka 3) potvrdily stabilitu suspenze v rozsahu potřebném pro provedení experimentů. Spolu s využitím TEM byla prokázána značná heterogenita jednotlivých částic a přítomnost menších agregátů. Změna ζ -potenciálu po převedení do kultivačního média potvrdila vznik biokorony při zachování homogenity suspenze.

Tabulka 3. Základní charakteristiky C-BNM v suspenzi ředěné v milliQ vodě a v kultivačním médiu

	milliQ voda			Kultivační médium (10% FBS _{LE})		
	H _D (nm)	PdI	ζ-potenciál (mV)	D _H (nm)	PdI	ζ-potenciál (mV)
GP1	179 ± 103	0,188	-42,5 ± 6,9	208 ± 103	0,203	-8,52 ± 15,3
GP2	332 ± 85	0,293	-34,7 ± 7,0	359 ± 123	0,226	-10,8 ± 12,3
MWCNT	–	–	-39,1 ± 6,7	–	–	-13,1 ± 12,0

14.4.2 Viabilita

Úvodní mikroskopické pozorování neukázalo výraznější změny naznačující vyšší úmrtnost u žádného z testovaných modelů. Absence toxicity byla následně potvrzena pomocí LDH. V případě obou GP nedocházelo k významnému poškození v celém koncentračním rozsahu (5–60 µg/ml) ani po 72 hodinách inkubace. Úvodní výsledky byly v souladu se závěry několika *in vivo* studií, které rovněž pozorovaly minimální toxicitu nemodifikovaných GP po plicní expozici u potkanů.^{5,6} V případě MWCNT byla zaznamenána nízká toxicita (~10 %, $p < 0,001$) u nejvyšší koncentrace (60 µg/ml) a pouze u primárních monocytů. Měření intenzity fluorescence tetramethylrhodaminu naznačily pokles mitochondriální kapacity, nicméně k výraznému poškození mitochondrií nedocházelo. Pokles fluorescence byl vyhodnocen jako interference C-BNM, kdy docházelo k jejímu „zhášení“. Fotografie z TEM (Obrázek 14) potvrdily, že po internalizaci se GP nacházejí primárně v uzavřených endozomech, a to jak u THP-1 makrofágů, tak i monocytů. Volná distribuce MWCNT naznačila potenciální intracelulární poškození. Žádné z testovaných C-BNM se nenacházely v jádře.

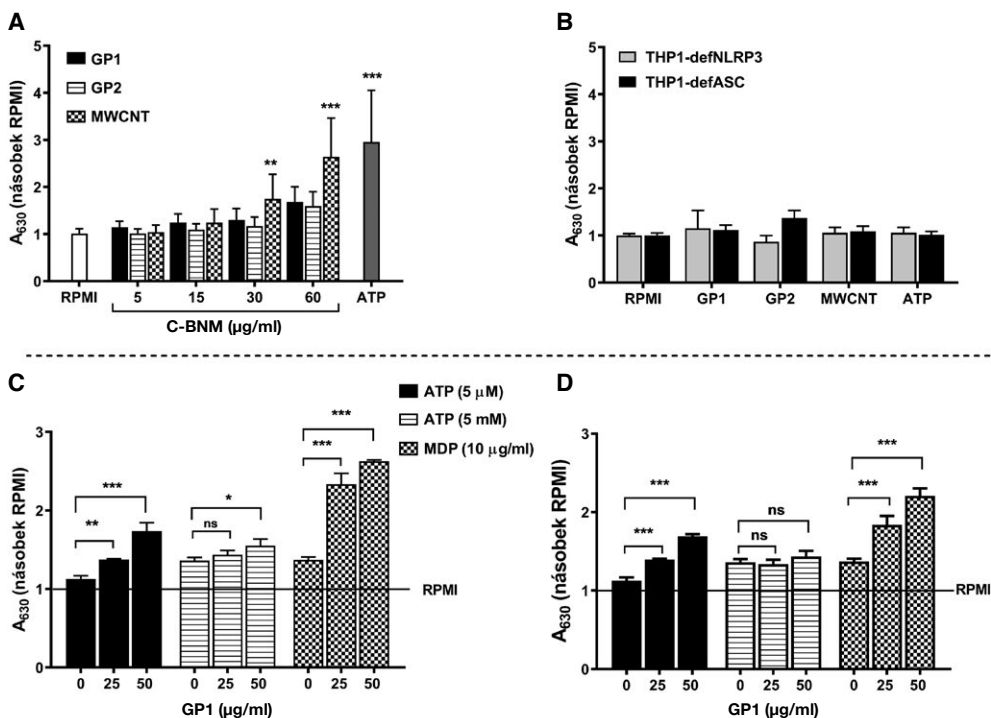


Obrázek 14. Intracelulární lokalizace (A) GP1, (B) GP2 a (C) MWCNT u izolovaných monocytů po 24 hodinách expozice, TEM

14.4.3 Aktivita NLRP3

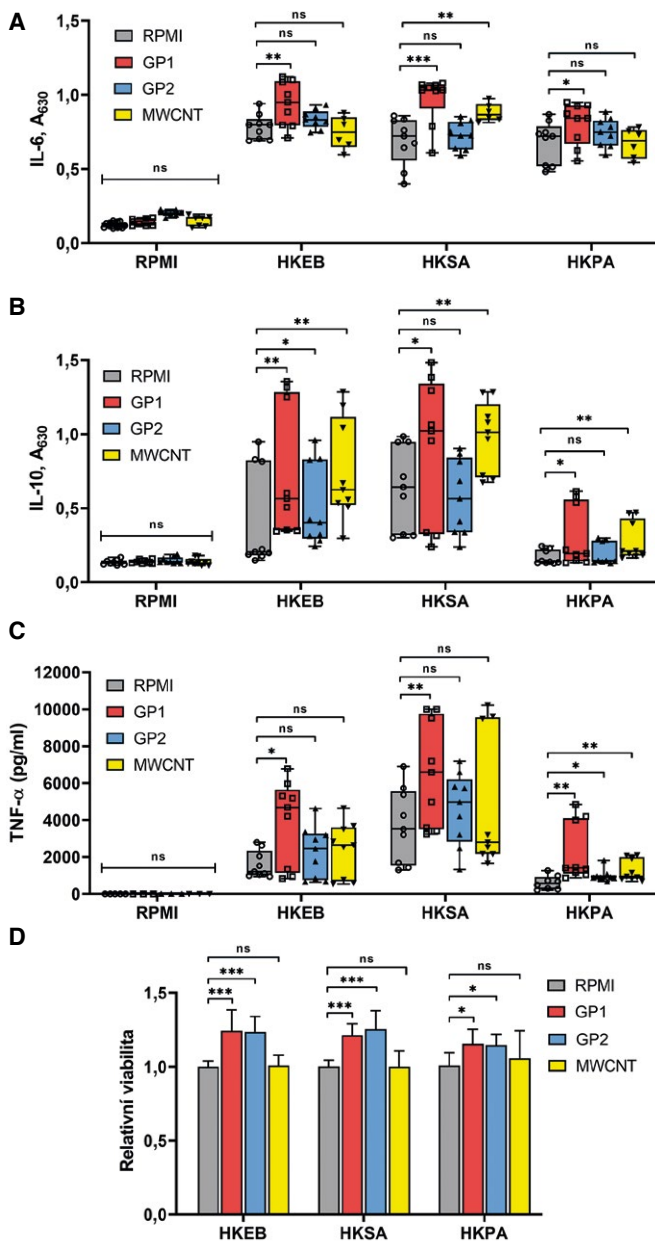
Statisticky významná a na koncentraci závislá produkce IL-1 β ($p < 0,001$) byla u modelů kanonické i alternativní aktivace potvrzena pouze pro MWCNT (Obrázek 15A), což korespondovalo s pozorováním intracelulární distribuce (Obrázek 14). K ověření mechanismu kanonické aktivace NLRP3, jakožto „senzoru“ intracelulárního poškození, byla zvolena detekce uvolnění katepsinu B z lysozomů. Katepsin B bývá často detekovaným ukazatelem v souvislosti s imunotoxickým působením řady NM, včetně CNT.⁷⁻⁹ V souladu s předchozími výsledky byl katepsin B ve zvýšené míře detekován pouze u buněk exponovaných MWCNT, a poškození lysozomů způsobené MWCNT tedy bylo vyhodnoceno jako primární zdroj aktivace NLRP3.¹⁰

Specifita NLRP3 byla ověřena absencí produkce IL-1 β po expozici C-BNM kontrolním buňkám THP1-defNLRP3 a THP1-defASC (Obrázek 15B) a pomocí využití specifického inhibitoru MCC950 u primárních monocytů. Případná inhibice NLRP3 u GP byla vyloučena



Obrázek 15. Produkce IL-1 β u (A) THP1-null a (B) THP1-defNLRP3/ASC po expozici GP1, GP2 a MWCNT

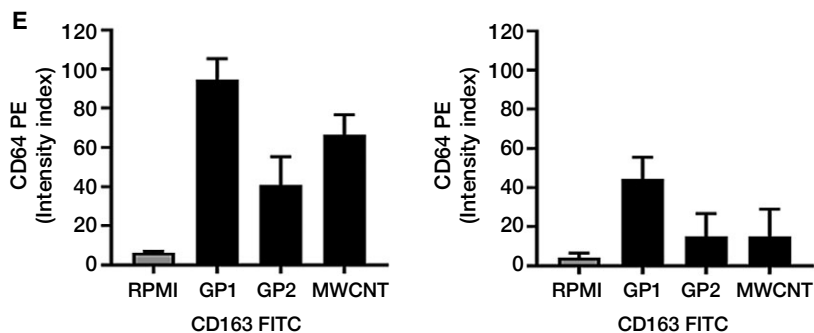
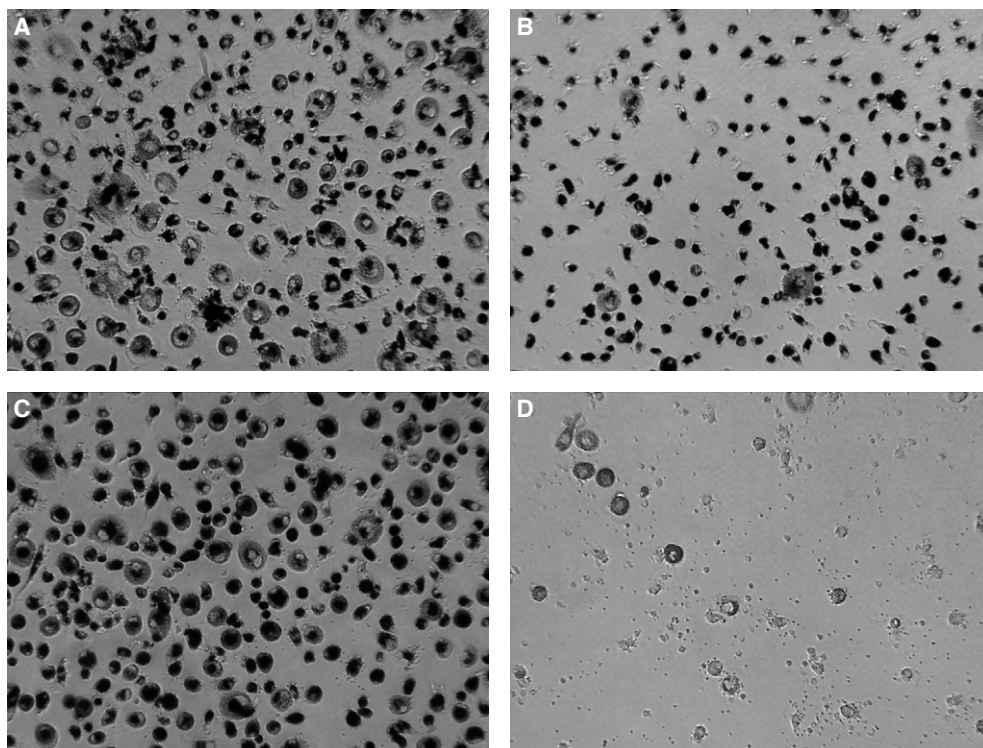
Poznámka: Data jsou prezentována jako podíl produkce IL-1 β u exponovaných buněk a neexponované kontroly (RPMI) a zobrazena jako průměr \pm standardní odchylka; ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$ zdůrazňují statistickou významnost ve srovnání s neexponovanou kontrolou; (C, D) produkce IL-1 β u THP1-null po expozici MDP, ATP, GP1 a GP2; ** $p < 0,05$, * $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$ zdůrazňují statistickou významnost ve srovnání samotné stimulace pomocí ATP/MDP (0) a kombinace s GP (25, 50). Data jsou prezentována jako podíl produkce IL-1 β u exponovaných buněk a neexponované kontroly (RPMI) a zobrazena jako průměr \pm standardní odchylka.



Obrázek 16. Produkce (A) IL-6, (B) IL-10, (C) TNF- α u izolovaných monocytů stimulovaných GP (60 μ g/ml), MWCNT (30 μ g/ml) a bakteriemi HKEB, HKSA a HKPA (1×10^7)

Poznámka: Data jsou prezentována jako krabicový graf od minima do maxima se všemi body. Hodnoty *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ a * $p < 0,05$ značí statistickou významnost ve srovnání s odpovídající kontrolou (RPMI); (D) viabilita izolovaných monocytů stimulovaných GP (60 μ g/ml), MWCNT (30 μ g/ml) a bakteriemi HKEB, HKSA a HKPA (1×10^7). Data jsou prezentována jako podíl měřeného LDH exponovaných buněk a související kontroly (RPMI) a zobrazena jako průměr \pm standardní odchylka, *** $p < 0,001$ a * $p < 0,05$ značí statistickou významnost ve srovnání s odpovídající kontrolou (RPMI – bakterie).

kokultivací GP s muramyl dipeptidem (MDP, 10 $\mu\text{g/ml}$) a ATP (5 mM, 5 μM), kdy naopak docházelo ke kumulativní reakci a násobnému zvýšení produkce IL-1 β ve srovnání se samotným MDP ($p < 0,001$) a ATP ($p < 0,001$). V tomto případě se mohlo jednat o efekt „trojského koně“ pozorovaného i u jiných NM, kdy zvýšenou endocytózou GP mohlo dojít ke zvýšenému pohlcení i uvedených kostimulantů, a tedy k jejich zvýšené nabídce příslušným receptorům.¹¹ Přítomnost GP vyvolala rovněž intracelulární změny, které ve výsledku mohly přispět ke konečnému součtu signálů a následně výrazné produkci IL-1 β (Obrázek 15C, D).



Obrázek 17. Morfologie diferencovaných makrofágů po 7denní kultivaci, (A) GP1, (B) GP2, (C) MWCNT, (D) nestimulovaná kontrola, zvětšení 20krát; (E) MFI exprese CD64 a CD163 ($n = 2$), RPMI – kontrola

14.4.4 Modulace

Ani u THP-1 makrofágů, ani u primárních monocytů žádný z testovaných C-BNM nestimuloval produkci IL-6, IL-10 a TNF- α . Nicméně předchozí výsledky kokultivace GP s MDP ukázaly na možný modulační vliv na přirozenou reaktivitu buněk, tedy nepřímý prozánětlivý potenciál. Ten byl následně potvrzen pozitivní modulací primárních monocytů formou zvýšení jejich cytokinové odpovědi na běžné patogeny (*Escherichia coli* sérotyp 0111:B4, HKEB; *Staphylococcus aureus*, HKSA a *Pseudomonas aeruginosa* HKPA) (Obrázek 16). V paralelním experimentu (bez bakteriální stimulace) bylo u monocytů, které pohltily C-BNM, pozorováno i lepší přežití a výraznější diferenciaci (Obrázek 17). S tím zřejmě souvisela i „zvýšená“ míra fagocytózy. Ta ovšem mohla nastat i v důsledku většího počtu fagocytujících buněk (nebylo možné ověřit, zda jednotlivé buňky fagocytují více, či méně). Vzhledem k rozdílným výsledkům mezi jednotlivými C-BNM byl vliv fagocytózy na vyšší produkci cytokinů vyloučen.

Zatímco všechny C-BNM měly pozitivní vliv na přežití a celkovou fagocytární aktivitu, produkce cytokinů se výrazně lišila. To naznačuje, že dominantní vliv na výslednou reaktivitu buněk mají fyzikálně-chemické vlastnosti daných C-BNM (hlavně tvar a velikost). Tyto změny by však také mohly souviset s tvorbou přirozené imunitní paměti (v poslední době často diskutovaný fenomén), při které dochází u monocytů k metabolickým změnám vedoucích ke změně reaktivity vůči opakovaným stimulům.¹² Tento efekt byl pozorován např. u působení nemodifikovaného grafenu na makrofágy odvozené z kostní dřevě.¹³ Mohlo by se však také jednat o navození autofagie, která je u monocytů nezbytná k jejich přežití a diferenciaci a v případě C-BNM byla mnohokrát potvrzena.^{14–16}

14.5 SHRNUÍ

V rámci výše uvedených studií byl sledován prozánětlivý účinek nemodifikovaných C-BNM na monocyto-makrofágový systém, jakožto klíčový efektor v procesu zpracování a eliminace NM v organismu. V prvé řadě bylo potvrzeno esenciální postavení inflamazomu NLRP3 a tvorba IL-1 β při hodnocení přímého prozánětlivého účinku. Výhodou NLRP3 a IL-1 β je mimo jiné i reaktivita na buněčné poškození ve formě „sterilních“ podnětů, ke kterým u NM často dochází. Naproti tomu „klasické“ prozánětlivé cytokiny (např. IL-6), které jsou spojovány převážně s mikrobiální stimulací, nemusí být vždy přítomny (např. v situaci bez výrazného oxidačního stresu). Poukazují spíše na přítomnost kontaminace.

Výsledky rovněž ukázaly, že nemodifikované GP (přestože nepůsobily cytotoxicky a přímo prozánětlivé) ovlivnily základní imunitní funkce. Z uvedeného vyplývá, že NM, které se na první pohled jeví jako biokompatibilní, mohou ve skutečnosti působit imunotoxicky. Z toho důvodu je nutné do testování zahrnout i tzv. funkční testy, které hodnotí změny ve fyziologické reaktivitě.

14.6 LITERATURA

1. Møller P, Christophersen DV, Jensen DM et al. Role of Oxidative Stress in Carbon Nanotube-Generated Health Effects. *Arch Toxicol*. 2014;88(11):1939–1964. doi:10.1007/s00204-014-1356-x.
2. Ghanbari F, Nasarzadeh P, Seydi E et al. Mitochondrial Oxidative Stress and Dysfunction Induced by Single- and Multiwall Carbon Nanotubes: A Comparative Study. *J Biomed Mater Res A*. 2017;105(7):2047–2055. doi:10.1002/jbm.a.36063.
3. Duke KS, Bonner JC. Mechanisms of Carbon Nanotube-Induced Pulmonary Fibrosis: A Physicochemical Characteristic Perspective. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2018;10(3):e1498. doi:10.1002/wnan.1498.
4. 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.
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:10.3109/17435390.2015.1133865.
6. Mao L, Hu M, Pan B et al. Biodistribution and Toxicity of Radio-Labeled Few Layer Graphene in Mice After Intratracheal Instillation. *Part Fibre Toxicol*. 2016;13:7. doi:10.1186/s12989-016-0120-1.
7. Sun B, Wang X, Ji Z et al. NLRP3 Inflammasome Activation Induced by Engineered Nanomaterials. *Small*. 2013;9(9–10):1595–1607. doi:10.1002/sml.201201962.
8. 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.201402859.
9. Knötigová 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.9b00225.
10. He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci*. 2016;41(12):1012–1021. doi:10.1016/j.tibs.2016.09.002.
11. Bianchi MG, Allegri M, Costa AL et al. Titanium Dioxide Nanoparticles Enhance Macrophage Activation by LPS Through a TLR4-Dependent Intracellular Pathway. *Toxicology Research*. 2015;4(2):385–398. doi:10.1039/c4tx00193a.
12. 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.
13. Lebre F, Boland JB, Gouveia P et al. Pristine Graphene Induces Innate Immune Training. *Nanoscale*. 2020;12(20):11192–11200. doi:10.1039/c9nr09661b.
14. 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.
15. Zhang Y, Morgan MJ, Chen K et al. Induction of Autophagy Is Essential for Monocyte-Macrophage Differentiation. *Blood*. 2012;119(12):2895–2905. doi:10.1182/blood-2011-08-372383.
16. Di Cristo L, Mc Carthy S, Paton K et al. Interplay Between Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Autophagy in Unfunctionalised Few-Layer Graphene-Exposed Macrophages. *2D Materials*. 2018;5(4):045033. doi:10.1088/2053-1583/aadf45.

15 GENOTOXICKÝ POTENCIÁL GRAFENU V POKUSECH *IN VITRO* (THP-1 BUŇKY)

Komentář k publikaci Malkova A, Svadlakova T, Singh A et al. In Vitro Assessment of the Genotoxic Potential of Pristine Graphene Platelets. *Nanomaterials*. 2021,11(9),2210. <https://doi.org/10.3390/nano11092210>.

Metodiky jsou podrobně popsány v příloze.

15.1 ÚVOD

Grafen je dvojrozměrný nanomateriál (NM), jehož atomová struktura má charakter medové plástve. Vykazuje výjimečné technologické vlastnosti, ke kterým patří pružnost, mechanická odolnost a síla, vysoká tepelná odolnost, elektrická vodivost a velký povrch se schopností vázat různé molekuly.^{1,2} Má široké využití, včetně biomedicínských aplikací. Příkladem mohou být antibakteriální a antivirové aplikace, onkologická terapie, doprava léčiv do specifických tělních kompartmentů, fototerapeutická terapie a tkáňové inženýrství.² Potenciální zdravotní (ne)bezpečnost grafenu je determinována jeho fyzikálně-chemickými vlastnostmi, metodami syntézy, disperzním a oxidačním stavem, formou expozice a velikostí dávky.^{2,3}

Krevní komponenty přicházejí během expozice do kontaktu jak s xenobiotiky (v daném případě s NM), tak i s buňkami ovlivněných tkání. Představují tak vhodný „nástroj“ pro hodnocení zdravotních rizik chemických látek.¹ Leukocyty se nacházejí v přední linii obrany organismu proti patogenům a cizorodým materiálům a jsou spoluzodpovědné za jejich eliminaci.¹ Z uvedených důvodů byla pro *in vitro* hodnocení toxicity grafenu použita lidská buněčná linie odvozená od buněk akutní monocytární leukémie (THP-1 buněčná linie).⁴

15.2 CÍLE

Cílem prezentované *in vitro* studie bylo získání nových dat o cytotoxickém, cytostatickém, genotoxickém a imunotoxickém potenciálu dvou typů nefunkcionalizovaných grafenových pláteků. Pro studii byly jako reprezentativní modely použity neaktivované (suspenní) THP-1 buňky.

15.3 MATERIÁL A METODIKY

15.3.1 Testované NM

Ve studii byly testovány dva typy nefunkcionalizovaných grafenových plátků (GP1 a GP2) v práškové podobě. GP1 byl komerčním produktem firmy PlasmaChem GmbH (No. PL-P-G750, Berlín). GP2 byl připravený v centru CRANN (Centre for Research on Adaptive Nanostructures and Nanodevices, Trinity College, Dublin). Detailní informace o přípravě suspenze, jejím testování na přítomnost endotoxinu a vlastnostech obou typů GP lze nalézt v publikacích Švadlákové et al. a Málkové et al.^{5,6} Základní charakteristiky jsou stručně shrnuty v Tabulce 4. Tloušťka obou GP byla do 4 nm.

Tabulka 4. Základní charakteristiky GP v suspenzích s milliQ vodou a v RPMI

Nanomateriál	Velikost částic (nm)	PdI	Průměrný ζ -potenciál (voda; mV)	Průměrný ζ -potenciál (RPMI; mV)
GP1	179,0 ± 103,0	0,188	≤ -50,0	≤ -9,0
GP2	332,0 ± 85,0	0,293	≤ -47,0	≤ -11,0

15.3.2 Expozice lidské THP-1 buněčné linie GP

Lidská THP-1 buněčná linie byla zakoupena od ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures; Salisbury, Spojené království). Buňky byly inkubovány v kontrolované atmosféře (37 °C, 5 % CO₂) v kultivačním médiu skládajícím se z RPMI 1640 média bez fenolové červeně (Corning, New York, USA), 10 % tepelně inaktivovaného fetálního bovinního séra, 2 mM GlutaMAX, 1 mM pyruvátu sodného (vše od Life Technologies, Carlsbad, USA), 10 mM HEPES; 0,05 mM 2-merkaptoetanolu, penicilinu (100 U/ml) a streptomycinu (100 µg/ml) (vše od Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Expozice buněčných kultur cholátovým suspenzím GP1 a GP2 (koncentrace 60, 30 a 5 µg/ml) a pozitivním a negativním kontrolám trvala čtyřicet hodin, což odpovídá přibližně 1,5násobku délky buněčného cyklu.

15.3.3 Testování cytotoxicity

K hodnocení cytotoxického potenciálu (buněčné viability) dvou typů GP vůči THP-1 buněčné linii byl použit test WST-1 (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche, Basel, Švýcarsko), LDH test (CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay, Invitrogen, Carlsbad, USA) a test membránové integrity prostřednictvím mikroskopické analýzy s použitím trypanové modři (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA).

15.3.4 Testování oxidačního stresu

Pro hodnocení míry oxidačního stresu, indukovaného expozicí THP-1 buněčné linie GP1 a GP2, byla měřena hladina glutathionu v buněčných lysátech (*Glutathione Colorimetric Detection Kit*, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA).

15.3.5 Testování cytostatického a genotoxického potenciálu

K testování cytostatického a genotoxického potenciálu dvou typů GP vůči THP-1 buněčné linii byl použit mikronukleus test s blokadí cytokineze (*cytokinesis block micronucleus test*, CBMN test). Pomocí mikroskopické analýzy (400násobné zvětšení) byl hodnocen ukazatel cytostatického potenciálu (*cytokinesis-block proliferation index*, CBPI) a s ním spojený odhad procenta cytostázy (% cytostasis), replikační index (RI), index dělení jader (*nuclear division index*, NDI) a ukazatele poškození DNA (počet binukleárních buněk [BNC] s mikrojádroem [MN], s jaderným pupenem [NBUD] a s nukleoplasmatickým můstkem [NPB] na 1000 BNC).

15.3.6 Testování imunotoxického potenciálu

Pro testování imunotoxického potenciálu dvou typů GP vůči THP-1 buněčné linii bylo použito měření hladin interleukinů IL-6 a IL-10 v buněčném supernatantu (reportérové HEK-Blue™ buňky; Invivogen, San Diego, USA) a měření hladiny tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF- α ; ELISA kit, Human TNF- α Quantikine ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, USA).

15.3.7 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí SW GraphPad Prism™, verze 8.2.1 329 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Výsledky byly prezentovány jako aritmetické průměry se směrodatnou odchylkou a byly normalizovány ke kontrole. Za statisticky signifikantní byly považovány rozdíly dosahující $p < 0,05$. Dle Shapiro-Wilkova testu normality byla následně použita parametrická nebo neparametrická analýza rozptylu (ANOVA) následována Dunnettého testem nebo Kruskal-Wallisovým testem.

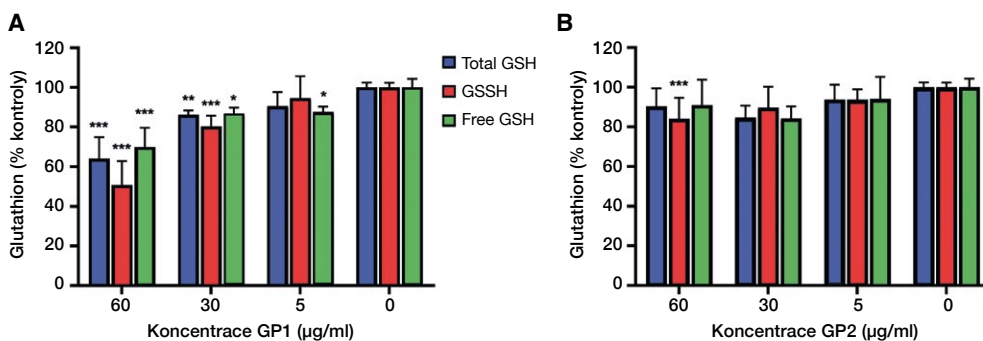
15.4 VÝSLEDKY A DISKUSE

15.4.1 Cytotoxicita

Byla zjištěna interference mezi GP1 a GP2 a testem cytotoxicity WST-1 (ve smyslu falešné positivity). Z tohoto důvodu nebyly výsledky testu zahrnuty do celkového hodnocení cytotoxicity. Vliv expozice GP1 i GP2 na hladinu extracelulární LDH byl nevýznamný (test byl z důvodu prevence interferencí modifikován). Rovněž při testu membránové integrity s použitím trypanové modři (mikroskopická analýza) nebyl zjištěn významný nárůst počtu poškozených buněk či změny celkového počtu buněk. Hodnocení viability bylo provedeno manuálně. Přístrojový odečet buněk může být zatížen chybou v situacích, kdy jsou agregáty GP přístrojem považovány za buňky.⁷ Viabilita buněk nebyla ovlivněna přidávkem cytochalasinu B.

15.4.2 Oxidační stres

Po expozici GP1 byl pozorován významný (na koncentraci závislý) pokles hladin oxidovaného, volného i celkového glutathionu (Obrázek 18a) prakticky u všech expozičních koncentrací. Pokles neodpovídá obranné reakci buněk proti oxidačnímu stresu. Domníváme se, že pokles byl způsoben zvýšenou spotřebou GSH při reparaci poškozené DNA (viz výsledky CBMN testu). Domněnku podporuje absence zánětlivé reakce, která bývá oxidačním stresem indukována. V případě GP2 došlo k významnému poklesu hladiny oxidovaného glutathionu po expozici nejvyšší koncentraci 60 $\mu\text{g/ml}$ (Obrázek 18b). Odlišné chování GP1 a GP2 by bylo možné vysvětlovat na bázi rozdílné struktury a souvisejících fyzikálně-chemických vlastností.



Obrázky 18. Koncentrace glutathionu v lyzátech buněčné linie THP-1 po expozici GP1 a GP2

Poznámka: (A) Koncentrace celkového glutathionu (Total GSH), oxidovaného glutathionu (GSSH) a volného glutathionu (Free GSH) po expozici GP1; (B) koncentrace celkového glutathionu (Total GSH), oxidovaného glutathionu (GSSH) a volného glutathionu (Free GSH) po expozici GP2. Data jsou prezentována jako procento (%) neexponované kontroly (0 $\mu\text{g/ml}$) a zobrazeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$,

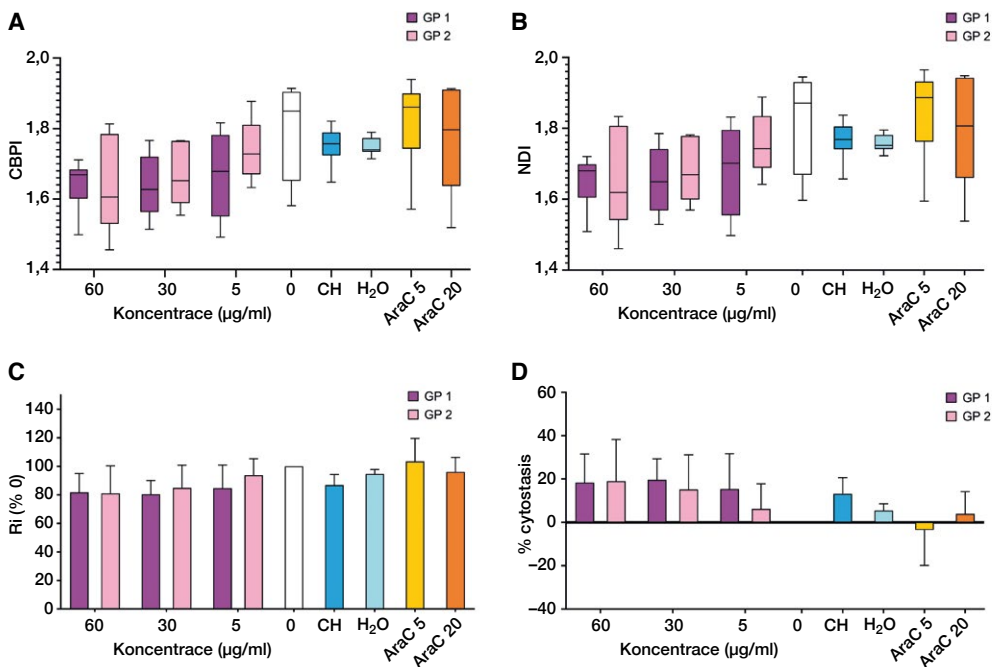
*** $p < 0,001$.

15.4.3 Cytostatický potenciál

Po expozici GP1 i GP2 byl pozorován nevýznamný (na koncentraci závislý) pokles parametrů proliferační aktivity CBPI, NDI a RI a nárůst procenta cytostázy (Obrázek 19). Za indikátor cytotoxického potenciálu je považován pokles viability buněk pod 80 %.⁸ V našich experimentech dosahovala míra cytostázy (u nejvyšších expozičních koncentrací) maximálně 20 %. Údaje naznačují, že testované koncentrace daných GP jsou bez významného cytotoxického potenciálu.

15.4.4 Genotoxický potenciál

Po expozici GP1 i GP2 byl pozorován významný (na koncentraci závislý) nárůst poškození DNA, reprezentovaný nárůstem počtu BNC s MN, NBU i NPB na 1000 BNC (Obrázek 20). LOGEL (*lowest observed genotoxic effect level*) se v případě GP1 pohyboval okolo 5 $\mu\text{g/ml}$, v případě GP2 okolo 30 $\mu\text{g/ml}$. Mezi pravděpodobné mechanismy poškození

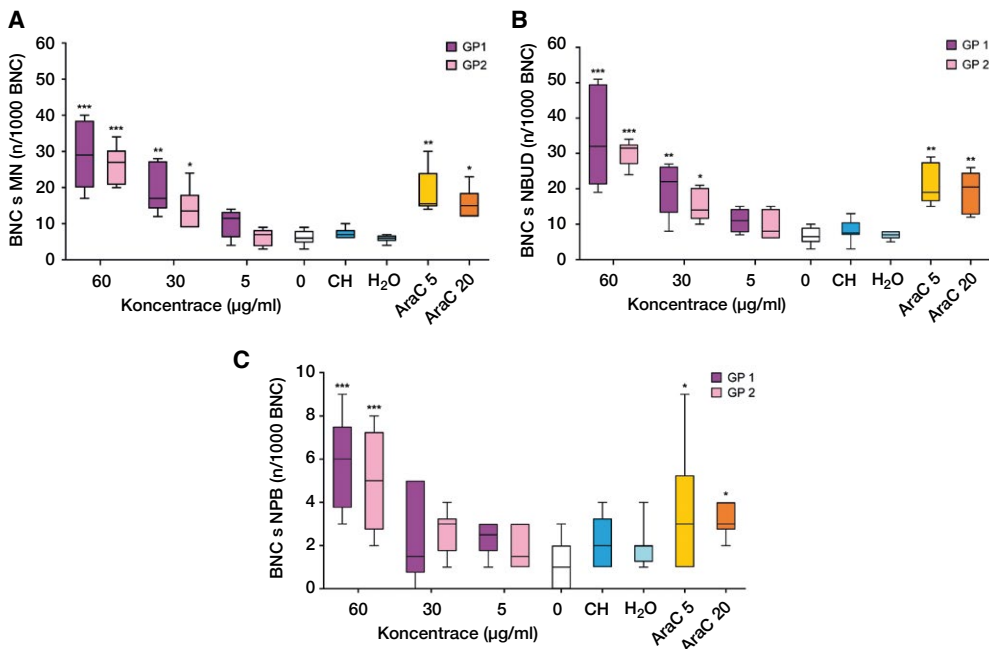


Obrázek 19. Proliferační potenciál buněčné linie THP-1 po expozici GP1 a GP2 (CBMN test)
Poznámka: (A) Cytokinesis-block proliferation index (CBPI); (B) index dělení jader (nuclear division index, NDI); (C) replikační index (RI); (D) odhad procenta cytostázy (% cytostasis). Data jsou prezentovaná krabicovými grafy s mediánem a interkvartilovým rozpětím či jako procento (%) neexponované kontroly (0 µg/ml) a zobrazeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. CH – cholát sodný (v koncentraci odpovídající jeho koncentraci v 60 µg/ml GP); H₂O – podíl vody odpovídající jejímu podílu v 60 µg/ml GP; AraC 5 či 20 – cytosin arabinosid (pozitivní kontrola v koncentraci 5 či 20 ng/ml).

DNA lze zařadit přímou interakci mezi odhalenou DNA během dělení jádra (buňky) a/nebo mechanický vliv GP na cytoskelet buňky vedoucí k narušení funkce mitotického aparátu. Expozice GP1 (menší částice) vedla k nevýznamně vyššímu výskytu BNC s MN, NBUD i NPB v porovnání s expozicí GP2 (větší částice). Lze proto předpokládat, že pozorovaný genotoxický potenciál je závislý jak na expoziční koncentraci, tak do určité míry i na velikosti částic.

15.4.5 Imunotoxický potenciál (zánětlivá odpověď)

Po expozici GP1 i GP2 nebyla pozorována zvýšená exkrece prozánětlivých (IL-6, TNF- α) nebo protizánětlivých (IL-10) cytokinů. Tyto výsledky naznačují nízký až zanedbatelný potenciál obou typů GP k vyvolání imunitní reakce či oxidačního stresu. Zároveň potvrzují nepřítomnost mikrobiální kontaminace na povrchu částic. Výsledky tak naznačují možnou hemokompatibilitu nefunkcionalizovaných GP vůči buňkám linie THP-1.^{9,10}



Obrázek 20. Poškození DNA buněk linie THP-1 po expozici GP1 a GP2 (CBMN test)

Poznámka: (A) Dvojjaderná buňka s mikrojádrem (BNC s MN); (B) dvojjaderná buňka s jaderným pupenem (BNC s NBUD); (C) dvojjaderná buňka s nukleoplasmatickým můstkem (BNC s NPB). Data jsou prezentovaná krabicovými grafy s mediánem a interkvartilovým rozpětím. CH – cholát sodný (v koncentraci odpovídající jeho koncentraci v 60 µg/ml GP); H₂O – voda (podíl odpovídající jejímu podílu v 60 µg/ml GP); AraC 5 či 20 – cytosin arabinosid (pozitivní kontrola v koncentraci 5 či 20 ng/ml); * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

15.5 SHRNU TÍ

Po čtyřicetihodinové expozici buněk linie THP-1 cholátovým suspenzím dvou typů nefunkcionalizovaných grafenových plátků (GP) nebylo zjištěno významné poškození buněčné membrány, významný pokles viability buněk či významná indukce oxidačního stresu. Byl zaznamenán pouze nevýznamný, koncentračně závislý pokles proliferačního potenciálu buněk. Na druhou stranu byl zjištěn významný, koncentračně a „velikostně“ závislý nárůst poškození DNA, způsobený pravděpodobně přímou interakcí GP s odhalenou DNA během buněčného dělení a/nebo přímou interakcí GP s cytoskeletem a mitotickým aparátem buněk. Nezaznamenali jsme významné změny v expresi cytokinů (IL-6, IL-10 a TNF-α), které by naznačovaly kontaminaci povrchů testovaných GP či indukci zánětlivé imunitní odpovědi.

15.6 LITERATURA

1. Fadeel B, Bussy C, Merino S, Vázquez E, Flahaut E, Mouchet F, Evariste L 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.

2. Yao J, Wang H, Chen M et al. Recent Advances in Graphene-Based Nanomaterials: Properties, Toxicity and Applications in Chemistry, Biology and Medicine. *Microchim Acta*. 2019;186:395. doi:10.1007/s00604-019-3458-x.
3. Liao C, Li Y, Tjong SC. Graphene Nanomaterials: Synthesis, Biocompatibility, and Cytotoxicity. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):3564. doi:10.3390/ijms19113564.
4. Gurunathan S, Kang MH, Jeyaraj M, Kim JH. Differential Immunomodulatory Effect of Graphene Oxide and Vanillin-Functionalized Graphene Oxide Nanoparticles in Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line (THP-1). *Int J Mol Sci*. 2019;20(2):247. doi:10.3390/ijms20020247.
5. 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.
6. Malkova A, Svadlakova T, Singh A et al. In Vitro Assessment of the Genotoxic Potential of Pristine Graphene Platelets. *Nanomaterials*. 2021;11(9):2210. doi:10.3390/nano11092210.
7. Guadagnini R, Halamoda Kenzaoui B, Walker L et al. Toxicity Screenings of Nanomaterials: Challenges Due to Interference with Assay Processes and Components of Classic In Vitro Tests. *Nanotoxicology*. 2015;9(sup 1):1324. doi:10.3109/17435390.2013.829590.
8. Burgum MJ, Clift MJD, Evans SJ et al. Few-Layer Graphene Induces Both Primary and Secondary Genotoxicity in Epithelial Barrier Models In Vitro. *J Nanobiotechnology*. 2021;19(1):24. doi:10.1186/s12951-021-00769-9.
9. 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:10.3109/17435390.2015.1133865.
10. 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.

PŘÍLOHA: SOUBOR OPTIMALIZOVANÝCH METODIK PRO TESTOVÁNÍ CYTOTOXICITY, GENOTOXICITY A IMUNOTOXICITY NANOČÁSTIC

Laboratorní výstupy projektu NanoBio (ERDF projekt „Posilování mezioborové spolupráce ve výzkumu nanomateriálů a jejich účinků na živé organismy“; CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007421; OP VVV; ITI Hradecko-pardubické aglomerace; 2018–2022)

METODIKY ÚSTAVU LÉKAŘSKÉ BIOLOGIE A GENETIKY

Lékařská fakulta v Hradci Králové

TEST METABOLICKÉ AKTIVITY ALAMARBLUE (TEST CYTOTOXICITY)

Teoretický základ metodiky

AlamarBlue je netoxický roztok, oxidačně redukční indikátor na bázi resazurinu, který je živými buňkami metabolizován na fluorescenční resorufin, který lze fluorescenčně kvantifikovat při emisní vlnové délce 590 nm (excitace 530–560 nm). Množství naměřené fluorescence je přímo úměrné aktivitě dehydrogenáz, které jsou typické pro živé buňky.

Podrobnější popis metodiky

Kultivace:

Buňky se kultivují v α MEM bez fenolové červeně s 10% FSB, 1% antibiotiky (penicilinem, streptomycinem), 10mM Hepes, 1mM pyruvátém sodným a 2mM L-glutaminem. Buňky se nasadí do 96jamkových destiček v koncentraci 5000–10 000 buněk na jednu jamku, vždy s prvním sloupcem jamek bez buněk (blank) a inkubují se přes noc. Po 24 hodinách se médium vymění za médium s nanomateriálem (NM), a to vždy 100 μ l/jamku. Inkubace s NM trvá dle potřeby 1–72 hodin.¹

Roztoky: zásobní roztok alamarBlue: Termofischer Scientific DAL1100

Postup:

- 1) Přidejte 11 μ l roztoku alamarBlue do každé jamky (lze použít i druhou variantu, kdy je po inkubaci s NM veškeré médium z jamek odsáto, eventuálně jsou jamky 1 \times propláchnuty PBS bez iontů a jsou nahrazeny novým médiem alamarBlue v poměru 1:10).
- 2) Proměřte fluorescenci v čase 0 h ex. 560 nm / em. 590 nm.
- 3) Inkubujte 1 nebo 2 hodiny v termostatu 37 °C, 5 % CO₂.
- 4) Změřte fluorescenci.
- 5) Nejprve vypočítejte rozdíl absorbancí v čase 1 h (eventuálně 2 h) a 0 h. Od naměřených absorbancí odečtěte blank. Naměřené hodnoty lze vyjádřit jako % kontroly.

Použitelnost metodiky pro testování NM

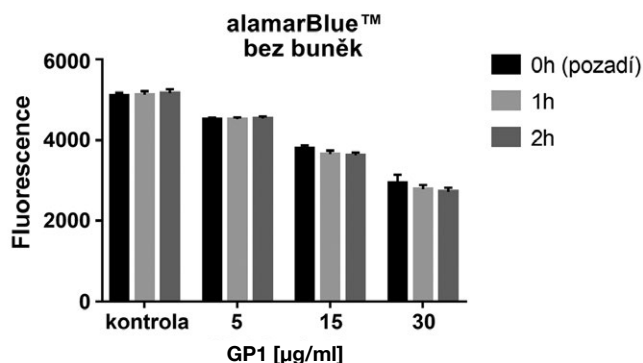
Metoda je rychlá, citlivá, ale je nutno počítat s možností zhašení fluorescence, která by však, pokud se vhodně změní v čase 0 h jako pozadí, neměla významně ovlivnit výsledné sledování cytotoxicity NM.

Souhrn nejzajímavějších výsledků

Z důvodu potřeby ověřit možnost ovlivnění pozadí při měření fluorescence jsme testovali grafen GP1 (Plasmachem). Grafen byl inkubován pouze s roztokem alamarBlue po metabolické aktivaci bez buněk po dobu 1 a 2 hodin v koncentracích (5, 15 a 30 $\mu\text{g/ml}$). Se zvyšující se koncentrací GP1 se snižuje výsledná fluorescence (zhašení). Ke snížení dojde hned po přidání alamarBlue, proto je možné čas 0 h v případě testování cytotoxicity v buněčném systému použít jako pozadí, od kterého se bude sledovat nárůst fluorescence způsobený metabolickou činností buněk. Přesto musíme počítat s mírným poklesem fluorescence v průběhu měření (Tabulka 5). Tento pokles bude falešně snižovat výsledné hodnoty testu cytotoxicity. Tomuto poklesu lze částečně předejít, když bude po přidání roztoku alamarBlue následovat pětiminutová pauza, a teprve poté bude měřen čas 0 h (Obrázek 21). Interference grafenu byla publikována v práci Šestákové et al.²

Tabulka 5. Hodnoty z grafu vyjádřeny v procentech čase 0 h – GP1

Doba inkubace	K	5 $\mu\text{g/ml}$	15 $\mu\text{g/ml}$	30 $\mu\text{g/ml}$
0 h	100,0	100,0	100,0	100,0
1 h	100,5	100,0	96,4	94,3
2 h	101,3	100,4	95,6	92,5



Obrázek 21. Interference grafenu s fluorescencí metody alamarBlue v acelulární pokusu, kde byly testovány příslušné koncentrace grafenu.

TEST ZÁCHYTU NEUTRÁLNÍ ČERVENĚ (NEUTRAL RED UPTAKE – NRU; TEST CYTOTOXICITY)

Teoretický základ metodiky

Princip metody je založen na schopnosti živých buněk hromadit neutrální červeně v lysozomech. Příjem neutrální červeně (supravitální barvivo) (3-amino-7-dimethylamino-2-methylfenidát hydrochlorid – cat. no. N2889, Merck) buňkami do lysozomů závisí na schopnosti buňky tvořit ATP a vytvářet pH gradient. Při fyziologickém pH prochází neutrální červeně plazmatickou membránou mechanismem difuze. V případě, že je buňka mrtvá, dochází k vyplavení barviva. Živé buňky vychytávají barvivo do lysozomů, jsou lyzovány a uvolněné barvivo je měřeno pomocí spektrometrie (absorbance při vlnové délce 540 nm).

Podrobnější popis metodiky

Kultivace:

Buňky se kultivují v α MEM bez fenolové červeně s 10% FSB, 1% antibiotiky (penicilinem, streptomycinem), 10mM Hepes, 1mM pyruvátém sodným a 2mM L-glutaminem. Buňky se nasadí do 96jamkových destiček v koncentraci 5 000–10 000 buněk na jamku, vždy s prvním sloupcem jamek bez buněk (blank), a inkubují se přes noc. Po 24 hodinách se médium vymění za médium s NM (vždy 100 μ l/jamku). Inkubace s NM trvá dle potřeby 1–72 hodin.

Roztoky:

- Fixační roztok: 1 g / 100ml CaCl_2 v 0,5% formaldehydu
- Lyzační roztok: 1% CH_3COOH v 50% EtOH
- Zásobní roztok: neutrální červeně (0,33 % – 3,3 g/l)
- Pracovní roztok neutrální červeně (80 μ g/ml v médiu)

Postup:

1. Odsajte 100 μ l média z jamek.
2. Přidejte 100 μ l roztoku neutrální červeně (80 μ g/ml) do každé jamky (konečná koncentrace neutrální červeně je 40 μ g/ml).
3. Inkubujte 3 hodiny v termostatu 37 °C, 5 % CO_2 .
4. Vše odsajte a přidejte 100 μ l fixačního roztoku.
- 5) Inkubujte 15 minut při pokojové teplotě.
6. Opláchněte buňky dvakrát 100 μ l PBS bez iontů.
7. Přidejte 200 μ l lyzačního roztoku.
8. Inkubujte 15 minut při pokojové teplotě.
9. Destičky protřepávejte na třepáče dalších 15 minut.
10. Změřte destičku fotometrem SPEKTRAFuor Plus, Tecan (Salzburg, Rakousko) při 540 nm.

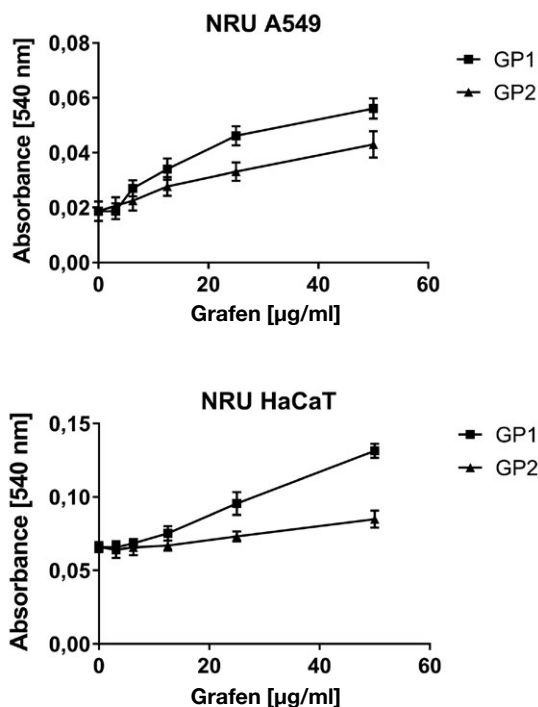
Od naměřených absorbancí odečtete blank. Naměřené hodnoty testovaných látek vyjádřete jako % kontroly

Použitelnost metodiky pro testování NM

Metoda záchytu neutrální červeně je založena na schopnosti buněk přijímat neutrální červeně. V případech, kdy jsou buňky aktivovány k vyšší absorpci, může docházet k falešně pozitivním výsledkům. Některé NM tuto aktivaci indukují, a proto nepovažujeme metodu NRU za zcela spolehlivou pro testování jejich cytotoxicity.

Souhrn nejzajímavějších výsledků

Metodou NRU byly na dvou buněčných liniích testovány dva druhy grafenu (GP1, Plasma-chem, a GP2, Trinity College, Dublin). Buňky byly exponovány grafenům po dobu 24 hodin. Jak vyplývá z výsledků (Obrázek 22), vyšší koncentrace grafenů měly za následek zvýšení hladin absorbance (více než 200 % hodnoty kontrol). V případě toxicity by absorbance měla klesat, v případě biokompatibility stagnovat. Zdá se tedy, že NRU není vhodná metoda pro testování grafenových nanočástic. Za pozornost stojí rozdíly v hodnotách absorbance mezi oběma grafeny, které mají identické chemické složení, ale jiné fyzikální charakteristiky.



Obrázek 22. Test záchytu neutrální červeně (NRU) po inkubaci dvou buněčných linií A549 a HaCaT s dvěma typy grafenů (GP1 a GP2)

POČÍTÁNÍ BUNĚK POMOCÍ OBRAZOVÉHO CYTOMETRU METODOU BARVENÍ JADER DAPI (TEST CYTOTOXICITY)

Teoretický základ metodiky

Prosté počítání buněk představuje jednoduchý způsob, jak kvantifikovat cytotoxicitu. U většiny jaderných buněk lze předpokládat přímou úměru: kolik jader, tolik buněk. Jádra fixovaných buněk lze barvit fluorescenčním barvivem 4',6-diamidin-2-fenylindolem (DAPI). Fluorochrom DAPI se váže do dvojřetězce DNA v oblasti AT bázi a po navázání se intenzita jeho fluorescence zvýší přibližně dvacetkrát. V testu je sledována fluorescence při emisním maximu 461 nm (excitační maximum 358 nm).

Podrobnější popis metodiky

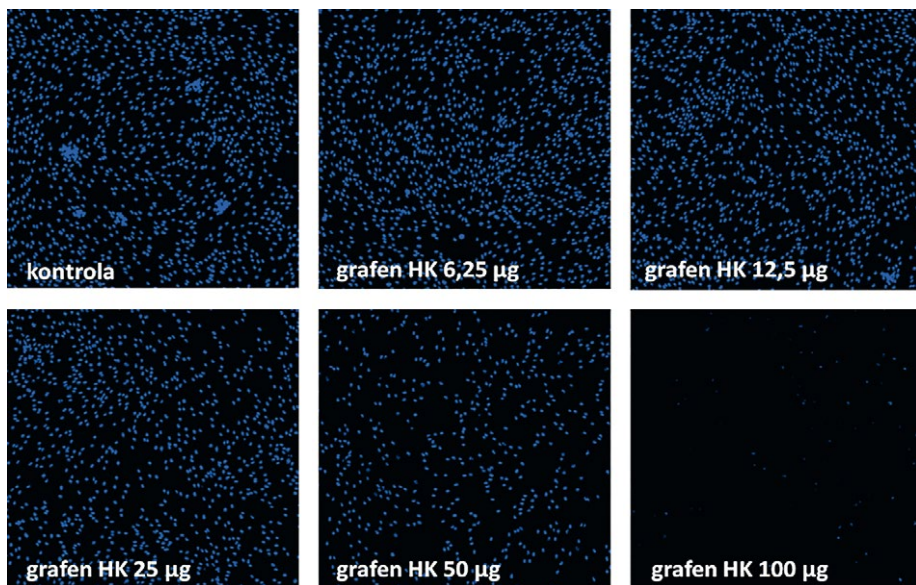
Zásobní roztok DAPI Sigma D9542: 1 mg / 1 ml redestilované vody

Postup:

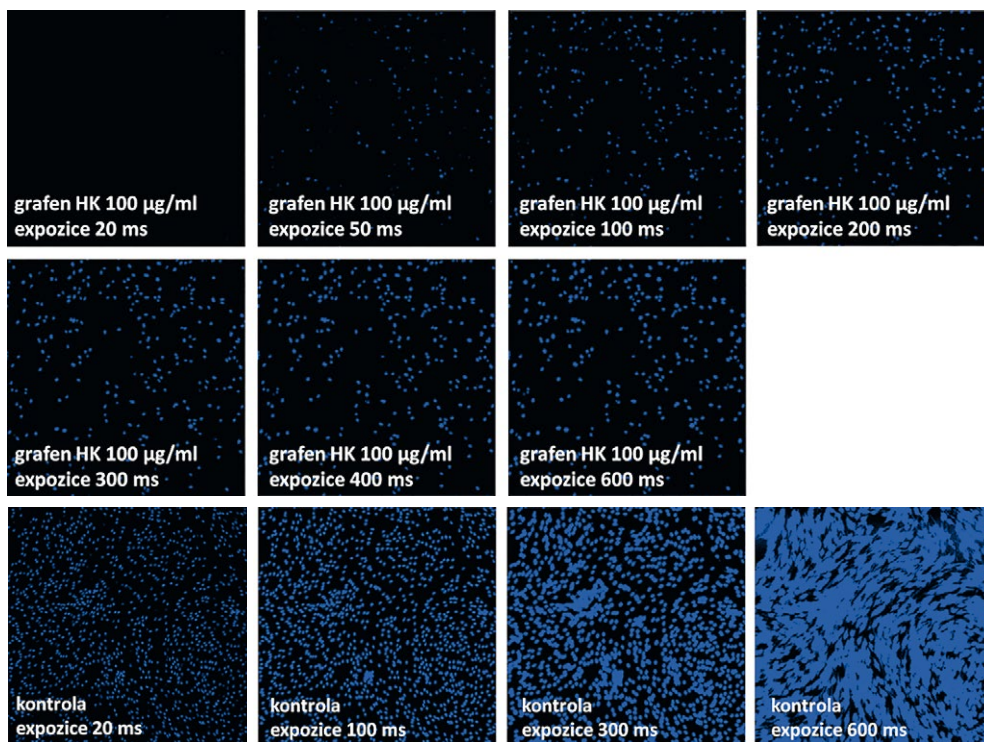
1. Po inkubaci s NM 1x propláchněte v PBS bez iontů (200 ul/jamku).
2. Fixujte 5 minut 70% ethanolem (100 ul/jamku) nebo 15 minut při $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ice-cold methanol): typické pro imunofluorescenci (<http://www.cellsignal.com/learn-and-support/protocols/protocol-if-methanol-fixation>).
3. Vyklepněte, nechte odpařit nebo 1x propláchněte PBS + 100 ul PBS a uložte do chladničky.
4. Barvení DAPI (1000× ředěný zásobní roztok v redestilované vodě; 5 minut; 100 ul/jamku) proveďte optimálně v ten samý den jako měření fluorescence.
5. Vyklepněte a dvakrát propláchněte v PBS bez iontů (200 ul/jamku).
6. Změřte fluorescence na přístroji ImageXpress.
7. Vyhodnoťte počty jader a vztáhněte na kontrolní počty.

Použitelnost metodiky pro testování NM

Barvení jader DAPI představuje přímou metodu měření cytotoxicity, při které nedochází k zatížení výsledků falešným zvyšováním hodnot, jako tomu může být u testů založených na metabolické přeměně substrátů. Počty buněk lze stanovit různými způsoby: trypanovou modří, počítáním v Bürkerově komůrce anebo využitím vysokokapacitního zobrazovacího cytometru. Počítání v komůrce je časově náročné a test trypanové modří nemusí být vždy vhodný (například buňky s akumulovaným grafenem jsou při optickém stanovení touto metodou obtížně rozlišitelné). V případě zobrazovacího cytometru musí být brána v úvahu možnost stínění (nebo zhášení) fluorescence testovaným NM. Při testování grafenu byly vhodné koncentrace pro testování cytotoxicity do 30 $\mu\text{g/ml}$. Při automatickém snímání nelze parametry nastavit tak, aby bylo možno pořídit snímky všech jamek. Při expozici nastavené na kontroly jsou jamky s vyšší vrstvou grafenu tmavé, pokud se expozice nastaví podle nich, jsou zase zvýšeně exponované kontroly. Proto je nutno hledat kompromisní expozici pro zachycení většiny jamek (Obrázek 23).



Obrázek 23. Expozice 50 ms nastavená podle kontroly při rostoucí koncentraci grafenu



Obrázek 24. Grafen (100 µg/ml) při zvyšující se úrovni expoziční (stejně snímané pole)

Souhrn nejzajímavějších výsledků

Byla provedena kultivace lidských dermálních fibroblastů (HDF) s grafenem o koncentracích 6,25, 12,5, 25, 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$ po dobu 48 hodin. Po expozici grafenem byla obarvena jádra DAPI dle výše uvedeného protokolu a byly sledovány změny fluorescence v závislosti na rostoucích koncentracích grafenu (Obrázek 23) a změny fluorescence v závislosti na rostoucí expozici při stejné koncentraci grafenu 100 $\mu\text{g/ml}$ (Obrázek 24).

Při expozici vhodné pro grafen se vysoce exponovaná jádra u kontrol slévají a analýza obrazu je nerozlišuje. Jednotlivé koncentrace lze snímat zvlášť při různých expozicích a také analyzovat po každé expozici zvlášť. Tento postup není vhodný pro automatické odečítání. Metoda je použitelná pro nižší koncentrace NM a pro materiály, které opticky nestíní.

DLOUHODOBÉ SLEDOVÁNÍ BUNĚČNÉ PROLIFERACE POMOCÍ KUMULOVANÉHO POČTU POPULAČNÍCH ZDVOJENÍ (TEST CYTOTOXICITY)

Teoretický základ metodiky

Kumulovaný počet populačních zdvojení (*population doubling level*; PDL) vyjadřuje násobky zdvojení populace buněk od času izolace (případně od jiného definovaného časového bodu v historii buněčné linie). Tento ukazatel se běžně používá při sledování stáří primárních buněčných linií, lze jej však také využít pro měření poklesu proliferace v rámci cytotoxických a genotoxických studií.

Podrobnější popis metodiky

PDL se počítá podle následujícího vzorce:

$$\text{PDL}_{(n)} = 3.32 (\log C_f - \log C_i) + \text{PDL}_{(n-1)}$$

$\text{PDL}_{(n)}$ = hodnota PDL na konci n-té pasáže

$\log C_f$ = počet buněk sklizených na konci n-té pasáže

$\log C_i$ = počáteční počet buněk nasazených na začátku n-té pasáže

$\text{PDL}_{(n-1)}$ = hodnota PDL vypočítaná v minulé pasáži

Konečná hodnota PDL po poslední pasáži je tedy součtem všech hodnot dosažených v průběhu kultivace buněčné linie po celkovou definovanou dobu. V praxi se PDL stanoví následujícím způsobem:

Buňky jsou pravidelně pasážovány v souladu s jejich požadavky. Během každé pasáže se do kultivačních nádob nasazuje konstantní počet (C_i) buněk. Po období exponenciálního růstu jsou buňky sklizeny, spočítány, je zjištěna konečná dosažená koncentrace buněk v rámci pasáže (C_f) a vypočítá se PDL.

Poznámka: Počáteční hustotu nasazení buněk (C_i) a interval pasážování kultury je třeba předem optimalizovat pro daný typ buněk a kultivačních podmínek. Buňky je třeba sklízet ještě v období exponenciálního růstu, před dosažením konflurence.

Stanovení PDL u linie normálních dermálních fibroblastů během chronické expozice grafenovým nanočásticím

Buňky a materiál:

Lidské dermální neonatální fibroblasty (HDFn) byly zakoupeny od firmy ThermoFisher Scientific (cat. no. C0045C). Byly kultivovány v médiu Human Fibroblast Expansion Basal Medium (ThermoFisher Scientific, cat. no. M106500) s přidavkem směsi růstových faktorů Low Serum Growth Supplement (LSGS, ThermoFisher Scientific, cat. no. S00310), podle doporučení dodavatele. Pro experiment byly využity buňky od 5. pasáže.

Grafenové nanočástice označené jako GP1 byly zakoupeny od firmy PlasmaChem GmbH (Berlín, Německo, cat. no. PL-P-G750), grafenové nanočástice označené jako GP2 byly darovány institutem CRANN (Trinity College, Dublin, Irsko). Zásobní roztok byl připraven o koncentraci 250 $\mu\text{g/ml}$ grafenových nanočástic v 0,02% vodném roztoku cholátu sodného, sonikován a skladován při pokojové teplotě (Svadlakova et al.).³

Počítací komůrka BLAUBRAND® Neubauer Improved Counting Chamber (cat. no. BR717805), roztok Trypsin-EDTA (cat. no. 59417C) a trypsin-neutralizační roztok (Trypsin Neutralizing Solution, cat. no. C-41120) byly zakoupeny od firmy Merck.

Postup:

1. V pondělí jsme nasadili buňky do 25 cm^2 kultivační lahve. Počáteční koncentrace byla 1×10^5 buněk na lahev, v 10 ml kultivačního média.
2. Ve středu jsme médium vyměnili za 10 ml čerstvého média v případě kontrolních vzorků, nebo za 10 ml kultivačního média obsahujícího 10 $\mu\text{g/ml}$ GP1 nebo GP2. Všechny varianty jsme testovali v triplicátech.
3. Buňky jsme nechali proliferovat do příštího pondělí.
4. V pondělí, týden po nasazení, jsme buňky sklídili:
 - a. Slili jsme médium a buňky opláchli 2 ml fosfátového pufru PBS (37 °C).
 - b. Opláchli jsme buňky 2 ml roztoku Trypsin-EDTA a umístili do inkubátoru (37 °C, 5 % CO_2) na 3 minuty.
 - c. Uvolněné buňky jsme opatrně resuspendovali ve 3 ml trypsin-neutralizačního roztoku přenesli do 50 ml centrifugační zkumavky.
 - d. Buňky jsme centrifugovali 5 minut při 500 rpm, poté jsme slili trypsin-neutralizační roztok a buněčnou peletu jsme resuspendovali ve 3 ml kultivačního média.

Poznámka: Kultivační médium doporučené pro kultivaci HDFn obsahuje pouze 2 % séra, proto je potřeba používat trypsin-neutralizační roztok ke včasné inaktivaci trypsinu, aby nedošlo k poškození buněk. V případě, že médium obsahuje dostatečné množství séra, je možné v kroku 4c resuspendovat buňky přímo v čerstvém kultivačním médiu. Je třeba se řídit doporučením dodavatele buněčné linie, případně vlastními zkušenostmi s daným typem buněk.

5. Do každé poloviny počítací komůrky jsme pipetovali 10 μl výsledné buněčné suspenze a spočítali počet buněk v 1 ml suspenze.
6. Spočítali jsme celkový počet buněk ve 3 ml suspenze a získali tak hodnotu C_f .
7. Stanovili jsme hodnotu PDL podle výše uvedeného vzorce.
8. Buněčnou suspenzi obsahující 1×10^5 buněk jsme přenesli do nové kultivační lahve a doplnili jsme kultivační médium na celkem 10 ml.

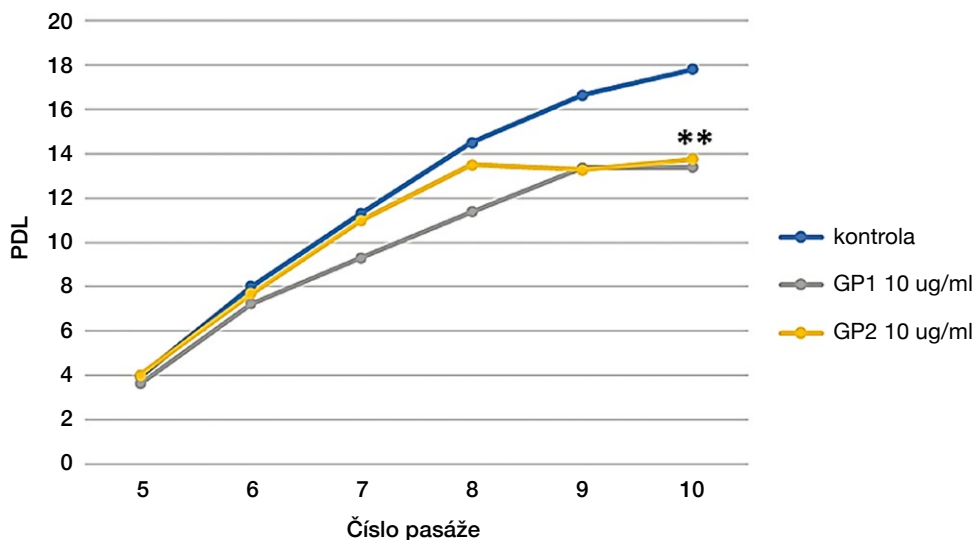
9. Kultivační lahve jsme umístili do inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂).
10. Kroky 4–9 jsme opakovali po dobu 6 týdnů.
11. Po uplynutí této doby jsme získali konečnou hodnotu PDL.
12. Rozdíl v konečné hodnotě PDL mezi ovlivněnými a kontrolními vzorky byl hodnocen v programu GraphPad Prism 7.0 za použití nepárového t-testu.

Použitelnost metodiky pro testování NM

Primární buněčné linie (například normální fibroblasty) jsou geneticky stabilní a uchovávají si své vlastnosti po mnoho pasáží. Zhruba po 60–70 populačních zdvojeních (počítáno od izolace primokultury) vstupují do stavu senescence (stárnutí), kdy dále přežívají, ale již neproliferují a vykazují typický (se senescencí asociovaný) fenotyp. Výzkumník má tak k dispozici řadu týdnů pro provedení (sub)chronického experimentu. Navíc je možné monitorovat buňky až do stadia senescence a zkoumat vliv testovaných látek na její nástup a na změny charakteristického buněčného fenotypu.

Výhodou metody je její jednoduchost. Počítání buněk v počítací komůrce je ekonomicky nenáročný a přitom velice přesný způsob monitorování buněčné proliferace. Nevýhodou je pracnost a časová náročnost. Komůrku lze nahradit automatickým počítačem buněk, je však vždy nutno ověřit, zda tento postup poskytuje validní výsledky i při nízkých koncentracích buněk.

Určitou nevýhodou metody je nutnost větších objemů testovaných NM. Další problém představuje klesající míra proliferace během experimentu, což má za následek pokles počtu



Obrázek 25. Vývoj kumulativního počtu populačních zdvojení (PDL) během chronické expozice normálních kožních fibroblastů nanočásticím grafenu

Poznámka: Směrodatné odchylky byly v grafu pro přehlednost vynechány – nedosáhly 7 % průměrné hodnoty PDL vypočítané ze tří měření. Statisticky významný rozdíl v konečné hodnotě PDL u obou ovlivněných vzorků oproti kontrole, nepárový t-test, ** statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolou, $p < 0,05$.

buněk pro nasazení do následných pasáží. Pokud by tedy byl experiment zakončen například testy genové exprese, je nutno včas rozdělit kultivace do paralelních vzorků. To dále zvyšuje nároky na množství testovaného materiálu a na časovou náročnost experimentů.

Považujeme za nutné upozornit na skutečnost, že chronické expozice NM mohou vykazovat toxické účinky i v koncentracích, které se v krátkodobých experimentech jeví jako netoxické (biokompatibilní). Při hodnocení rizika je proto naprosto nezbytné věnovat pozornost (vedle výsledků *in vitro* testů akutní a subakutní toxicity) rovněž výsledkům testů subchronické a chronické toxicity.

Souhrn nejzajímavějších výsledků

Grafenové nanočástice obou typů během šestitýdenní chronické expozice významně snížily proliferaci buněk stanovenou jako kumulativní počet populačních zdvojení (Obrázek 25). Výsledky byly publikovány v práci Šestákové et al.²

TEST METABOLICKÉ AKTIVITY WST-1 (TEST CYTOTOXICITY)

Teoretický základ metodiky

Stabilní tetrazoliová sůl WST-1 je komplexním buněčným mechanismem štěpena na rozpustný formazan, který se vyskytuje primárně na buněčném povrchu. Uvedená bioredukce je do značné míry závislá na glykolytické produkci NAD(P)H v životaschopných buňkách. Množství vytvořeného formazanového barviva koreluje s počtem metabolicky aktivních buněk v kultuře.

Podrobnější popis metodiky

Kultivace:

Buňky se kultivují v α MEM bez fenolové červeně s 10% FSB, 1% antibiotiky (penicilinem, streptomycinem), 10mM Hepes, 1mM pyruvátem sodným a 2mM L-glutaminem. Poté se nasadí do 96jamkových destiček v koncentracích 5000–10 000 buněk na jamku (vždy s prvním sloupcem jamek bez buněk; blank) a nechají se inkubovat přes noc. Po 24 hodinách se médium vymění za médium s NM (100 μ l/jamku) a následuje inkubace po dobu 1–72 hodin.

Zásobní roztok WST: Roche 1 644 807

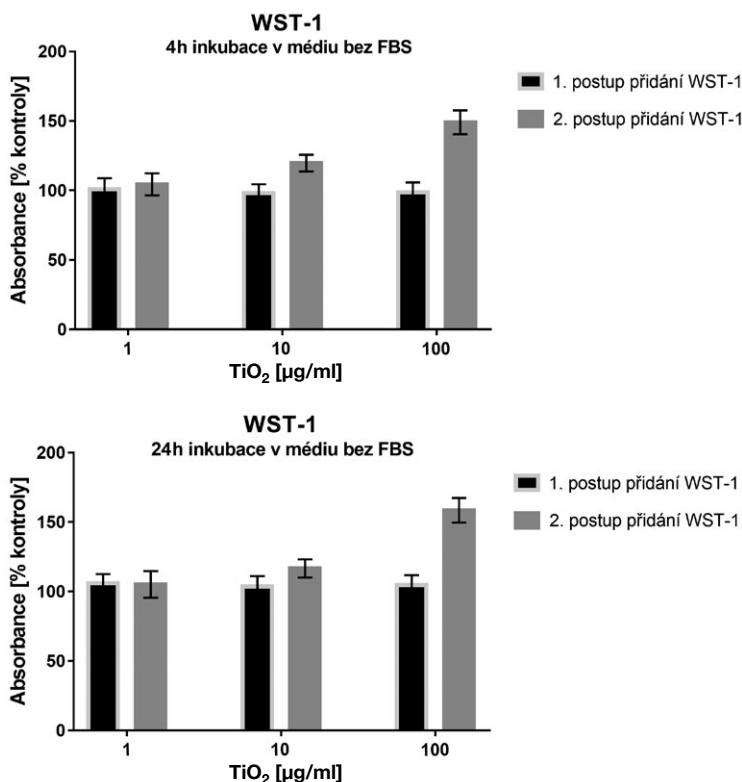
1. Přidejte 5 μ l roztoku WST-1 do každé jamky (postup 1). Lze použít i alternativní postup, kdy po inkubaci s NM je veškeré médium z jamek odsáto a nahrazeno novým médiem s WST-1 v poměru 1:20 (postup 2).
2. Proměřte absorbanci v čase 0 h při 450/650 nm (650 nm – referenční vlnová délka).
3. Inkubujte 1 nebo 2 hodiny v termostatu 37 °C, 5 % CO₂.
4. Nejprve vypočítejte rozdíl absorbancí v čase 1 h (eventuelně 2 h) a 0 h. Od naměřených absorbancí odečtěte blank. Naměřené hodnoty lze vyjádřit jako % kontroly.

Použitelnost metodiky pro testování nanočástic

Metoda je rychlá a reprodukovatelná. Je ale nutno zvážit, jakou variantu přidavku WST-1 provést (zda přidat pouze 5 μl do jamky s testovaným NM nebo vyměnit celý obsah média v jamce). S tím souvisí i složení média, konkrétně přítomnost FBS (fetálního bovinního séra), viz dále. U druhého postupu sice předpokládáme vyšší zátěž buněk, ale zároveň dochází k odstranění testovaného materiálu, který může interferovat s měřením absorbance (jak tomu je například u grafenu). Některé metodiky používají ke kultivaci médium bez FBS. Jedním z důvodů je tvorba proteinové korony na povrchu částic, která následně ovlivňuje jejich biologické interakce. Na druhou stranu je FBS důležité pro vlastní kultivaci buněk a zároveň zlepšuje disperzi NM v médiu.

Souhrn nejzajímavějších výsledků

Byly porovnány oba výše uvedené postupy provedení metody WST-1, lišící se způsobem přidání substrátu. V experimentu byl kultivován NM oxid titaničitý (TiO_2 ; Plasmachem) o koncentracích 1, 10 a 100 $\mu\text{g/ml}$ s buněčnou linií A549 (5 000 bb/ml) v médiu bez FBS. Inkubace trvala 4 a 24 hodin (Obrázek 26; Tabulka 6). Zjistili jsme, že při použití druhého



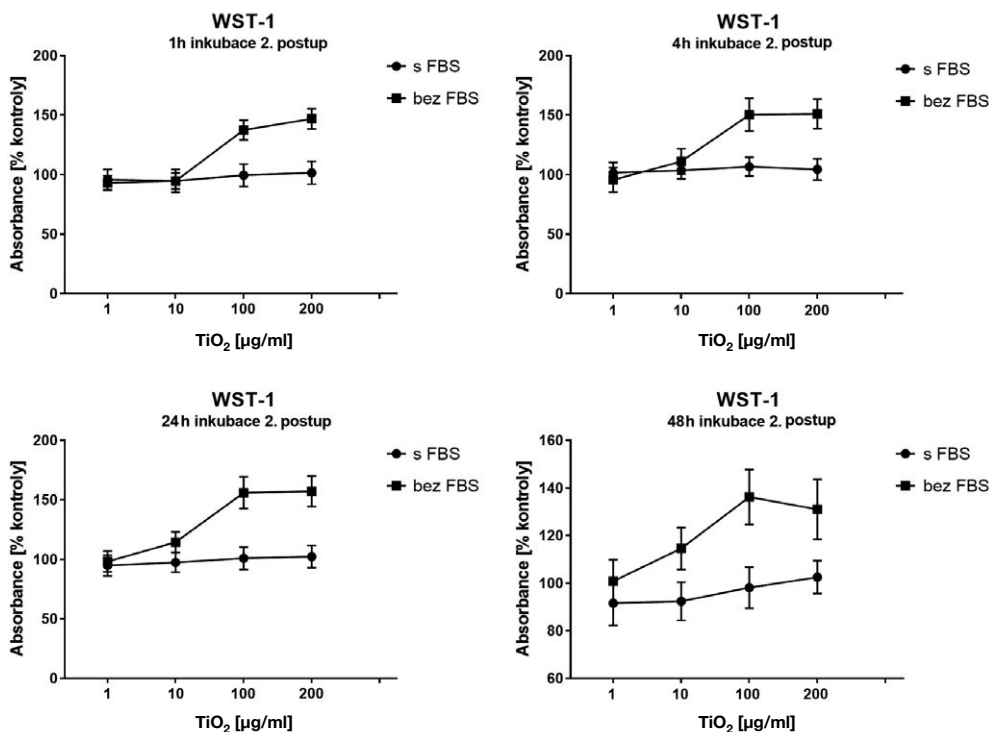
Obrázek 26. Porovnání dvou postupů provedení WST-1 při 4hodinové a 24hodinové inkubaci

postupu (výměna celého obsahu jamky za médium se substrátem) dochází v médiu bez FBS ke zvyšování metabolické aktivity buněk. Z této skutečnosti lze usuzovat zátěž buněk médiem bez FBS a rovněž tak i výměnou média při provedení testu WST-1.

Tabulka 6. Hodnoty z obrázku 6 vyjádřeny v procentech kontroly (expozice TiO₂)

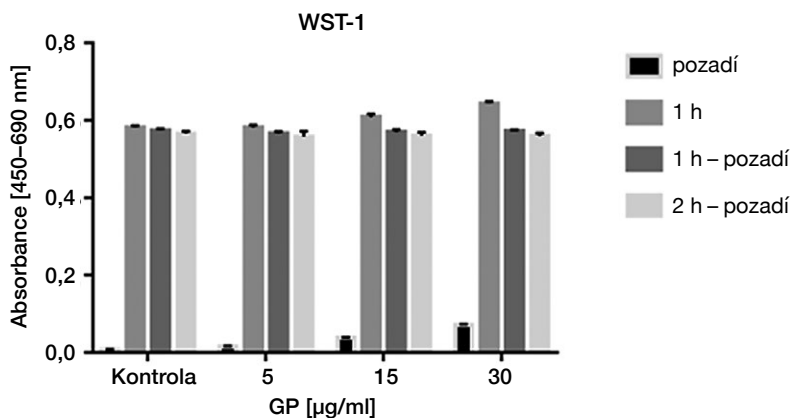
Koncentrace TiO ₂ (µg/ml)	4 h		24 h	
	první postup	druhý postup	první postup	druhý postup
0 (K)	100,0	100,0	100,0	100,0
1	101,0	104,5	105,9	105,2
10	98,0	119,7	103,6	116,7
100	98,6	149,1	104,7	158,5

V dalším kroku byl také studován vliv složení použitého média (s FBS a bez FBS) na výsledky WST-1. V experimentu byl kultivován TiO₂ (koncentrace 1, 10, 100 a 200 µg/ml) s buněčnou linií A549 (5 000 buněk/ml) v médiu s přítomností a bez přítomnosti FBS (1, 4, 24 a 48 hodin). WST-1 byl prováděn druhým postupem (Obrázek 27). Jak vyplývá z výsledků, test prováděný bez přítomnosti FBS vedl k významným změnám metabolické aktivity buněk (v porovnání s kontrolou). Podrobněji je tato problematika popsána v článku Jany Báčové et al.⁴



Obrázek 27. Kultivace A549 s TiO₂ v rozdílném médiu (s a bez FBS) při použití druhého postupu WST-1

Významnou roli při měření absorbance mají hodnoty absorbančního pozadí. Z tohoto důvodu byl u metody WST-1 posuzován vliv přítomnosti grafenu (GP1) na hladinu absorbančního pozadí metody WST-1. Grafen byl inkubován pouze s roztokem WST-1 po metabolické aktivaci bez buněk po dobu 1 a 2 hodin v koncentracích 5, 15 a 30 $\mu\text{g/ml}$ (Obrázek 28; Tabulka 7). Nejdříve byla změřena hodnota absorbance samotné suspenze grafenu bez substrátu a byly sledovány její změny v čase (1–2 hodiny). Z výsledků vyplývá, že grafen vykazuje (v závislosti na koncentraci) určitou hodnotu pozadí, nicméně tato hodnota je pro danou koncentraci stabilní a lze ji odečítat od hodnot absorbance naměřených hodnot vzorků.⁵



Obrázek 28. Vliv přítomnosti grafenu (GP1) a doby kultivace na hladinu absorbance (metoda WST-1, experiment bez buněk)

Tabulka 7. Hodnoty z obrázku 8 vyjádřeny v procentech kontroly (expozice GP1)

Doba inkubace	K	5 $\mu\text{g/ml}$	15 $\mu\text{g/ml}$	30 $\mu\text{g/ml}$
1 h	100	100,6	104,6	110,6
1 h – pozadí	100	99,1	99,2	99,7
2 h – pozadí	100	98,7	99,2	99,0

LITERATURA

- Greenwood SK, Hill RB, Sun JT et al. Population Doubling: A Simple and More Accurate Estimation of Cell Growth Suppression in the In Vitro Assay for Chromosomal Aberrations That Reduces Irrelevant Positive Results. *Environ Mol Mutagen.* 2004;43(1):36–44. doi:10.1002/em.10207.
- 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. doi:10.3390/nano12122074.
- 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.

4. Bacova J, Knotek P, Kopecka K et al. Evaluating the Use of TiO₂ Nanoparticles for Toxicity Testing in Pulmonary A549 Cells. *Int J Nanomedicine*. 2022;17:4211–4225. doi:10.2147/IJN.S374955.
5. Schröterová L, Šestáková B, Rudolf E et al. Testování biokompatibility NMsů-Grafen. In: *XXX. Xenobiochemnické Sympózium – Sborník*. Pezinok, Slovakia; 15.–17. květen, 2019:40.

METODIKY ÚSTAVU HISTOLOGIE A EMBRYOLOGIE VE SPOLUPRÁCI S ÚSTAVEM LÉKAŘSKÉ BIOFYZIKY (Lékařská fakulta v Hradci Králové)

LDH TEST (TEST CYTOTOXICITY)

Teoretický základ metodiky

LDH test je kolorimetrickou metodou, kterou lze kvantitativně analyzovat buněčnou cytotoxicitu. Její princip je založen na měření množství extracelulární laktátdehydrogenázy (LDH). Tento enzym je přítomen v široké škále savčích buněk a konkrétně je lokalizován v buněčném cytosolu. Extracelulární výskyt LDH je spojován s narušením integrity buněčné membrány, a proto se tato metoda používá pro kvantifikaci buněčné viability. Uvolněná LDH je konvertována na pyruvát prostřednictvím NAD^+ redukce na NADH, která je následně redukována na tetrazoliovou sůl, jejíž množství koreluje s množstvím LDH uniklého v kultivačním médiu. LDH test bývá poměrně často používán pro stanovení vlivu exogenních či endogenních agens na buněčnou populaci.

Podrobnější popis metodiky

Postup CyQUANT™ LDH (ThermoFisher) cytotoxické analýzy pro zjištění vlivu grafenu na adherentní linii myoblastů C2C12

1. Nasaďte C2C12 myoblasty na 96jamkovou destičku ($0,5 - 2 \times 10^4$ buněk/jamka) ve 100 ml bezfenolového kultivačního média (DMEM, 10% FBS, 1% ATB). Bezfenolové médium snižuje falešnou pozitivitu výsledku. Množství buněk na jamku je nutno volit dle konkrétní buněčné linie (příliš vysoká koncentrace buněk se může projevat falešnou pozitivitou ve smyslu vyšší cytotoxicity). Výrobce také doporučuje používat tuto esej s buňkami, které byly kultivovány v přítomnosti séra. Při kultivaci buněk v podmínkách bez séra může docházet k uvolňování endogenní LDH do média, což s sebou přináší riziko falešně pozitivních výsledků. Na destičce je nutné vyčlenit dvě skupiny buněk, které slouží jako kontrola: spontánní LDH reakce (SLR) a maximální LDH aktivita (MLA).
2. Inkubujte buňky po dobu 24 hodin při 37 °C a 5 % CO_2 .
3. Odsajte kultivační médium tak, aby nebyla porušena adheze monovrstva buněk a následně přidejte grafen suspendovaný v požadované koncentraci (5–100 mg/ml; triplikát) v bezfenolovém kultivačním médiu. Inkubujte následujících 24–48 hodin.

4. Do jamek, kde je triplikát pro SLR, aplikujte 10 ml sterilní, ultračisté vody. Do jamek s MLA aplikujte 10 ml lyzačního pufru (10×). Obě reagentie inkubujte 45 minut při 37 °C a 5 % CO₂.
5. Odsajte 50 ml média z každé jamky, přeneste do jiné 96jamkové destičky (i SLR, MLA) a přidejte 50 ml reakční směsi. Reakční směs obsahuje „substrate mix“ a „assay buffer“ (600 ml) a vystačí přibližně na dvě 96jamkové destičky. Tato směs vydrží při –20 °C přibližně 3–4 týdny. Centrifugační zkumavku s tímto mixem je potřeba chránit před světlem (zabalení do alobalu).
6. Inkubujte buňky s reakční směsí po dobu 30 minut při laboratorní teplotě bez dosahu světla (zabalte do alobalu).
7. Přidejte 50 ml „stop solution“.
8. Míchejte po dobu 1 minuty na vortexu.
9. Změřte absorbanci při 490 nm na spektrofotometru; referenční vlnová délka by neměla být vyšší než 680 nm.
10. Výpočet pro stanovení cytotoxicity: $\frac{\text{absorbance ošetřených buněk} - \text{SLR}}{\text{MLA-SLR}} \times 100$. Takto vychází cytotoxicita v procentech.

Použitelnost metodiky pro testování NM a souhrn nejzajímavějších výsledků

LDH analýza je poměrně často využívanou metodou pro stanovení míry cytotoxicity buněčných populací vyvolané prostřednictvím NM. Její výhodou je sensitivita, která je vyšší než u původně užívaných metod podobného principu (XTT, MTT). Také je stabilnější a rychlejší než zmíněné MTT nebo XTT.¹ Tato metoda není náročná na přístrojové vybavení a ve standardně vybavené laboratoři ji lze snadno použít. S výhodou je možné provést jak LDH, tak WST-1 analýzu najednou. U LDH testu se spotřebovává pouze část ovlivněného kultivačního média, naproti tomu u WST-1 se používají ovlivněné buňky. Tímto způsobem se ušetří čas pro analýzu obou metod, sníží se počet buněk a výsledky obou metod je možné srovnat a vyhodnotit.

Nevýhodou použití této metody může být užití bezfenolového média, které může způsobovat falešnou pozitivitu (je zde tedy vhodná vyšší investice v podobě specifického typu kultivačního média). Navíc je nutné počítat s kultivací buněk v kultivačním médiu s obsahem séra, což může být problém u buněčných linií, které se standardně kultivují v prostředí bez séra. Toto jsme řešili u embryonálních kmenových buněk, které se začínají diferencovat v přítomnosti séra v kultivačním médiu.² Nicméně existují varianty séra, které nezpůsobují diferenciaci buněk. Jejich pořizovací cena je však mnohonásobně vyšší než u běžných kultivačních médií.

LDH analýza byla použita pro kvantitativní stanovení cytotoxicity tří typů NM (dva druhy grafenu a oxid titaničitý) vůči různým buněčným populacím (C2C12 myoblastům, myším embryonálním fibroblastům, plicním alveolárním epitelovým buňkám a embryonálním kmenovým buňkám). Byla zjištěna koncentrační i časová závislost cytotoxicity u grafenů, nikoliv však u oxidu titaničitého. Podobné výsledky byly popsány i v publikacích Liho et al. a Zhanga et al.^{3,4}

MTT TEST (TEST CYTOTOXICITY)

Teoretický základ metodiky

MTT test je kolorimetrickou metodou, kterou lze kvantitativně analyzovat buněčnou viabilitu, proliferaci a cytotoxicitu. Metoda je založena na hodnocení metabolické aktivity zkoumaných buněk. Během analýzy dochází (působením mitochondriálních dehydrogenáz) ke konverzi ve vodě rozpustného MTT (3-/4,5-dimethylthiazol-2-yl/-2,5-difenyltetrazolium bromidu) na nerozpustný formazan. Schopnost přeměny MTT na formazan je vázána na metabolicky aktivní buňky; čím více metabolicky aktivních buněk kultura obsahuje, tím větší množství formazanu vzniká. Krystaly formazanu jsou následně rozpuštěny v DMSO (dimethylsulfoxidu) a roztok je proměřován pomocí spektrofotometru.

Podrobnější popis metodiky

Postup MTT (SigmaAldrich) cytotoxické analýzy pro zjištění vlivu grafenu na adherentní linii myoblastů C2C12.

1. Nasadíte C2C12 myoblasty na 96jamkovou destičku ($0,5 - 2 \times 10^4$ buněk/jamku), 100 ml kultivačního média (DMEM, 10% FBS, 1% ATB).
2. Inkubujte buňky po dobu 24 hodin při 37°C a 5 % CO_2 .
3. Odsajte médium tak, aby nebyla porušena adheřovaná monovrstva buněk, a následně přidejte grafen, suspendovaný v požadované koncentraci (5–100 mg/ml; triplikát) v kultivačním médiu. Inkubujte následujících 24–48 hodin.
4. Do každé jamky pipetujte 100 ml zásobního MTT roztoku (1 g tetrazoliové soli MTT + 200 ml PBS pufru). Hotový MTT roztok je přefiltrován a uchovává se (v objemech po 10 ml) v mrazicím boxu při -20°C ; takto připravený roztok je možné skladovat po dobu 6 měsíců.
5. Inkubujte MTT roztok s buňkami po dobu 4 hodin při 37°C a 5 % CO_2 .
6. Odeberte médium a přidejte 100 ml DMSO (rozpuštění formazanových krystalů).
7. Míchejte po dobu 10 minut na vortexu.
8. Na spektrofotometru změřte absorbanci při 490 nm; referenční vlnová délka by neměla být vyšší než 680 nm.

Použitelnost metodiky pro testování NM a souhrn nejzajímavějších výsledků

MTT analýza je poměrně často využívanou metodou kvantifikace buněčné viability. Jedná se o rychlou, jednoduchou a přístrojově nenáročnou metodu. Nevýhodou MTT testu je nízká stabilita formazanové soli a možnost interferencí v případě přítomnosti metabolicky vysoce aktivních buněk. Tyto buňky disponují vyšším množstvím mitochondrií a z toho plyne vyšší kapacita přeměny MTT na formazan. Uvedený jev zvyšuje riziko falešně pozitivních výsledků. Navíc u buněk podléhajících apoptóze dochází k redukci MTT z důvodu intaktních mitochondrií, což se opět může odrážet na kvalitě výsledků.⁵ Tyto důvody vedou k postupnému nahrazování MTT analýzy metodami s vyšší sensitivitou (např. WST-1 a LDH).

MTT analýza byla zpočátku zařazena do našich experimentů s expozicemi NM (analýzy buněčné viability kmenových buněk). Po zjištění nižší míry validity výsledků (v porovnání se stabilnějšími a citlivějšími metodami jako bylo LDH nebo WST-1) bylo od používání této metody upuštěno.

GENOVÁ KVANTIFIKACE PROSTŘEDNICTVÍM RT-QPCR (REAL-TIME QPCR)

Teoretický základ metodiky

Informace nutné pro tvorbu funkčních proteinů jsou přenášeny z DNA na RNA a dále do procesu jejich strukturování a produkce (transkripce, translace, genová exprese). Metoda genové kvantifikace je založena na stanovení množství RNA. Protože RNA nemůže být stanovována přímo, je nutné ji nejdříve transformovat (pomocí reverzní transkriptázy) do formy, která se nazývá komplementární DNA (cDNA). Ta je následně amplifikována prostřednictvím genově specifických „primerů“ za přítomnosti interkalačních barviv (SYBR green) nebo hybridizačních sond (Taqman). Hladina fluorescenčního signálu potom koreluje s mírou genové exprese. Metody genové kvantifikace jsou využívány pro rychlé stanovení míry genové exprese. Množství RNA je stanovováno pomocí předem charakterizovaných „housekeeping“ genů, které tvoří vnitřní standard pro normalizaci hladiny genové exprese cílového genu. Real-time qPCR je výkonné a citlivé zařízení pro studium malých změn genové exprese.

Podrobnější popis metodiky

Izolace RNA

1. Proveďte lýzu buněk prostřednictvím 500 μ l TRI Reagent (kombinace fenolu a guanidin isothiokyanátu).
2. K lyzovanému vzorku přidejte 500 μ l čistého etanolu (bez přítomnosti nukleáz).
3. Směs přeneste na „silica spin column“ (zde se zachytí vzorek) a po dobu 30 vteřin odstředíte při 16 000 \times g společně s ependorfkou na zachycení odpadu vzorku.
4. Odstraňte ependorfkou s odpadem a opatřte „silica spin column“ novou ependorfkou. Přidat 400 μ l RNA „wash buffer“ do silica spin column“ a po dobu 30 vteřin odstředíte při 16 000 \times g. Přidejte 75 μ l „DNA digestion buffer“ k 5 μ l „DNázy I“; obě reagenty promíchejte a přidejte „do silica spin column“. Natrávení DNA probíhá po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Tento krok odstraňuje genomickou DNA, která by mohla při kvantifikaci vytvářet falešnou pozitivitu.
5. Do „silica spin column“ přidejte 400 μ l „pre-wash buffer“ a po dobu 30 vteřin odstředíte při 16 000 \times g.
6. Odstranit ependorfkou s odpadem a opakovat krok 5.
7. Do „silica spin column“ přidejte 700 μ l „RNA wash bufferu“ a pro kompletní odstranění pufru odstředíte po dobu 2 min při 16 000 \times g. Odstraňte odpadní vzorek a obsah „silica spin column“ přeneste do ependorvky, která je prostá nukleáz.
8. Extrahujte RNA přidáním 50 μ l ultračisté vody (bez přítomností nukleáz) a po dobu 30 vteřin odstředíte při 16 000 \times g.
9. Následuje syntéza cDNA (zbylá RNA je uchovávána při -80 $^{\circ}$ C).

Syntéza cDNA

1. Pro cDNA syntézu použijte 500 ng RNA.
2. RNA rozpusťte v ultračisté vodě (bez přítomnosti nukleáz) na výsledný objem 10 μ l.
3. Komponenty a jejich množství pro syntézu „cDNA enzym mixu“:

Komponenty	Objem pro jednu reakci
10X RT buffer	2,0 μ l
25X dNTP mix (100 mM)	0,8 μ l
10X RT Random primer	2,0 μ l
MultiScribe Reverse transcriptase enzyme	1,0 μ l
Ultračistá voda	4,2 μ l
Celkem	10,0 μ l

4. 10 μ l cDNA mixu přidejte k 10 μ l rozpuštěné RNA.
5. Nastavení pro cDNA syntézu:

Nastavení	Krok 1	Krok 2	Krok 3	Krok 4
Teplota	25 °C	37 °C	85 °C	12 °C
Čas	10 min	120 min	5 min	∞

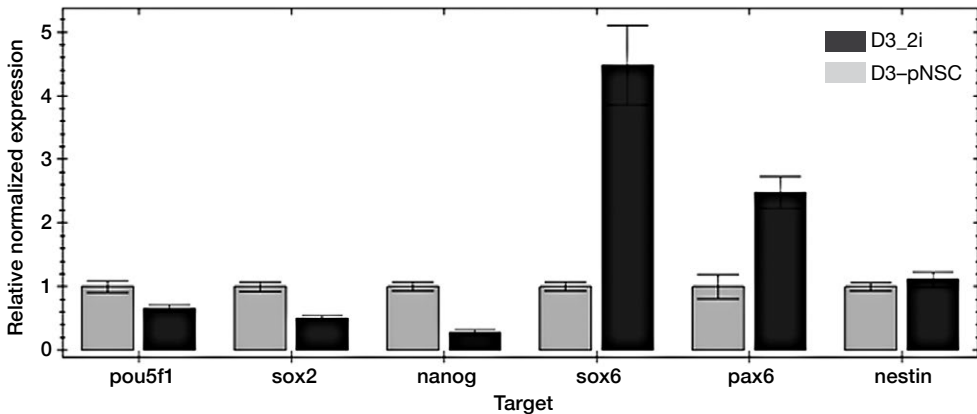
Real-time qPCR

1. Procedura „Real-time qPCR“ byla prováděna pomocí sady firmy Roche (Roche Light-Cycler 480 SYBR Green I master mix) v přítomnosti primeru komplementárního ke zkoumanému genu (koncentrace 400 nM). Celkový objem roztoku byl 15 μ l.
2. Genová exprese je vztažena k referenčnímu genu β -aktinu. Pro kvantifikaci bylo použito 10 ng cDNA (vzorky byly analyzovány v triplicátech).
3. Měření bylo prováděno na přístroji firmy BioRad CFX96 Touch s takto nastavenými parametry:

Nastavení	Krok 1	Krok 2	Krok 3	Krok 4		Krok 5
Teplota	95 °C	95 °C	60 °C	72 °C	Opakování kroku; 40 cyklů	Křivka tání (60 °C až 95 °C)
Čas	5 min	10 s	20 s	30 s (přírůstek)		Kontinuální přírůstek

Použitelnost metodiky pro testování NM a souhrn nejzajímavějších výsledků

Výsledky metody „RT-qPCR“ mohou být ovlivňovány interferencemi NM s komponentami použitými v metodice. To klade velký důraz na průběžné ověřování výsledků. Některé referenční geny se navíc mohou v přítomnosti NM stát nestabilními a volba stabilního referenčního genu se tak stává jedním z klíčových kroků metody.



Obrázek 29. Analýza genové exprese různých buněk linie embryonálních myších buněk (ES) D3 linie
Poznámka: Výsledky prezentují rozdíl v genové expresi diferenciovanych ES D3 buněk a nediferenciovanych ES D3 buněk. β -aktin byl použit jako referenční gen a výsledek je po 6 dnech od začátku buněčné diferenciaci. Data jsou vyjádřena jako průměry se směrodatnou odchylkou.

V našich experimentech jsme prostřednictvím malých molekulárních inhibitorů a LIF izolovali neurální kmenové buňky z myších embryí. Kombinace CHIR99021, XAV939, LDN 193189, SB431542 a LIF indukuje neuroektodermový potenciál v embryonálních kmenových buňkách. Tyto buňky pak exprimují neurogenní markery jako je Sox1 a Pax6, společně s pluripotentními markery Pou5f1, Sox2 a Nanog (Obrázek 29). Uvedené markery by mohly sloužit k analýze změn genové exprese vlivem expozice NM.

XCELLIGENCE (BUNĚČNÁ PROLIFERACE, ADHEZE, VIABILITA, MORFOLOGIE)

Teoretický základ metodiky

Systém xCELLigence firmy Roche je elektronický systém s biosensory, které umožňují v reálném čase sledovat buněčnou proliferaci, adhezi, viabilitu, morfologii a kvantifikovat CI_{50} (*cell index*). Pro sledování tohoto „biologického statusu“ buňky není zapotřebí značení buněk, měří se změna elektrické impedance prostřednictvím zabudovaných mikroelektrod na dně speciálních destiček. Sledování těchto změn v reálném čase je umožněno prostřednictvím softwaru, který uživateli poskytuje možnost analyzovat data v průběhu experimentu. Jakmile buňky přisednou na dno jamek s mikroelektrodami, dojde ke změně CI. Jestliže buňky na dno jamky nepřisednou, je hodnota CI nulová; v případě adheze hodnota CI roste úměrně k množství adherovaných buněk. Do celkové hodnoty CI se promítá rovněž změna buněčného tvaru, viability a proliferace.

Podrobnější popis metodiky

Protokol pro RTCA DP systém xCELLigence pro zjištění vlivu grafenu firmy na adhe- rentní linii myoblastů C2C12

Poznámka: Je nutné dobře promyslet rozložení destičky (layout). Každá destička má 16 jamek, každá pojme až 200 ml kultivačního média s buňkami. Důležité je předem nastavit parametry experimentu (měření všech destiček najednou nebo separátně, počet buněk v jedné jamce, koncentrace NM, čas přidání NM, doba měření a počet sweeps za hodinu/minutu). Důležitá je informace o čase, ve kterém buňky dosáhnou fáze „plató“. V této fázi je vhodné přidávat NM.

1. Nasaďte C2C12 myoblasty na destičku pro RTCA DP systém (100–1500 buněk/jamku) ve 100 ml kultivačního média (DMEM, 10% FBS, 1% ATB).
2. Inkubujte buňky po dobu 24 hodin při 37 °C a 5 % CO₂.
3. Připravte média s různými koncentracemi grafenu (5–100 mg/ml; triplikát). Přidejte 100 ml kultivačního média s grafenovou suspenzí na destičku. Nedoporučujeme zcela odsát původní kultivační médium a přidat nové médium s NM: dochází pak k porušení adheované monovrstvy, což má za následek změnu CI.
4. Inkubujte následujících 24–48 hodin.
5. Vyhodnoťte plot a hodnoty CI.

Použitelnost metodiky pro testování nanočástic a souhrn nejzajímavějších výsledků

Na rozdíl od běžně dostupných testů (WST-1, LDH, XTT a MTT) není xCELLigence rozšířenou metodou pro sledování buněčné proliferace a cytotoxicity. Hlavním důvodem jsou vyšší investice do přístrojového vybavení a do destiček s mikroelektrodami, které lze použít pouze jedenkrát. Na druhou stranu metoda xCELLigence umožňuje zachycování širokého spektra změn v buněčné viabilitě, proliferaci, adhezi a morfologii v reálném čase a není omezena tak jako klasické „end-point“ analýzy.

Sledování viability a adheze buněk metodou xCELLigence jsme použili pro zhodnocení cytotoxického vlivu tří typů NM (dvou druhů grafenu a oxidu titaničitého) na různé buněčné linie (C2C12 myoblasty, plicní alveolární epitelové buňky a embryonální kmenové buňky). Byla zjištěna koncentrační i časová závislost cytotoxicity (snížení viability) u grafenů, nikoliv však u oxidu titaničitého. Monitorování biologického statusu buněk bylo použito i v jiných studiích, které zkoumaly potenciálně toxický vliv NM na buněčné kultury (Kvako-va et al.).⁶

HISTOLOGICKÁ ANALÝZA

Teoretický základ metodiky

Techniky histologické analýzy se používají pro sledování mikroskopické morfologie tkáň a orgánů ve fyziologickém stavu nebo po ovlivnění exogenními či endogenními faktory

(změny prostorového uspořádání). Vzorky orgánu či tkáně mohou být odebrány z živého (biopsie) či neživého (nekropsie) organismu. Zvláštní formou je peroperační biopsie, která se provádí během chirurgického výkonu. Odebraný vzorek je v co nejkratší době fixován (prevence autolytických procesů) a zpracován do podoby zmrazeného řezu. Takto zhotovený řez je připraven k okamžitému vyhodnocení, což umožňuje sdělit operátorovi během výkonu, zda se jedná o vzorek ve fyziologickém či patologickém stavu.

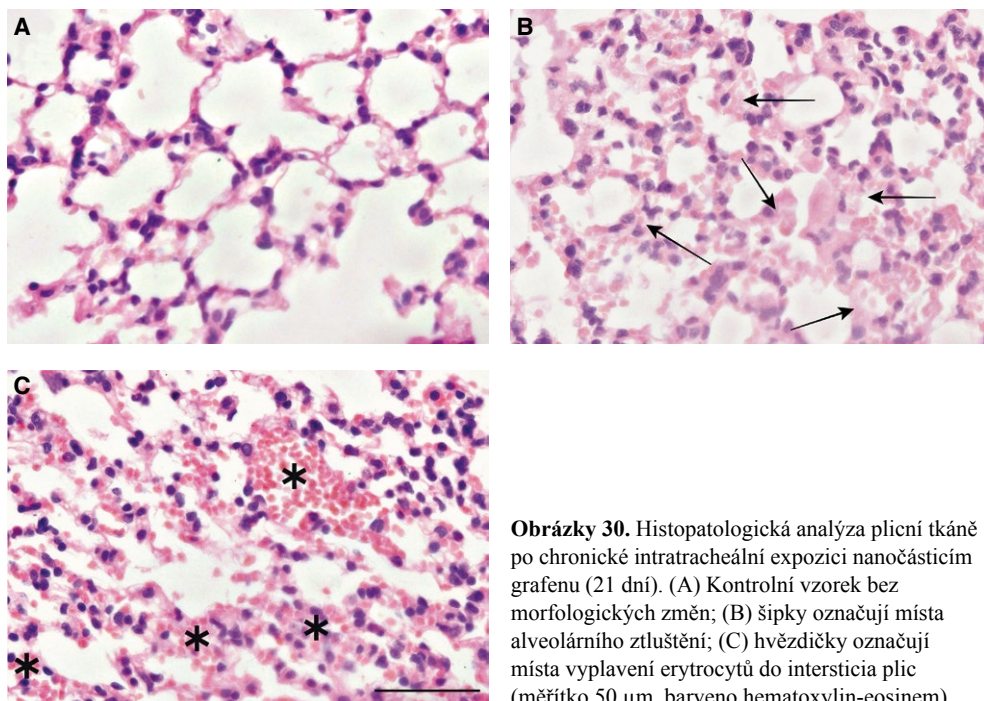
Podrobnější popis metodiky

Postup histologického zpracování orgánů po intratracheální a perorální expozici myši C57Bl/6 nanočásticím grafenu:

1. Po expozici nanočásticím grafenu byly myši usmrceny letální dávkou isofluranu. Následně byly odebrány orgány (plíce, srdce, žaludek, tenké střevo, játra a ledviny).
2. Orgány byly fixovány 10% formalínem (tímto procesem dochází k denaturaci bílkovin, která inhibuje aktivitu autolytických enzymů, jež by v případě aktivace poškodily morfologii orgánu či tkáně) po dobu 3–4 dnů (délka fixace je úměrná velikosti a komplexnosti orgánu).
3. Po fixaci byly orgány dehydratovány vzestupnou alkoholovou řadou (60–100% etanol) a prosyceny xylenem ve tkáňovém automatu (autotechnikonu).
4. Orgány byly zality do roztaveného parafinu. Ztuhnutím vznikl parafinový bloček připravený pro krájení řezů.
5. Z parafinového bločku byly na mikrotomu nakrájeny řezy o tloušťce 5 μm . Řezy byly přeneseny na podložní sklo potažené želatinou, která usnadňuje přilnutí řezu na povrch skla.
6. Před obarvením byly řezy odparafinovány a hydratovány v roztocích Ottix plus (2 \times 7 minut) a Ottix shaper (2 \times 7 minut). Řezy byly opláchnuty destilovanou vodou a obarveny hematoxylinem, který obarvuje bazofilní struktury orgánu (například jádro či drsné endoplazmatické retikulum). V hematoxylinu byly řezy barveny 3–10 minut (délka barvení závisí na čerstvosti a typu hematoxylinu) a poté oplachovány zhruba 10 minut pod tekoucí vodou. Dobarvení eosinofilních struktur (cytoplazmy a mitochondrií) bylo provedeno za použití eosinu; řezy byly barveny po dobu 3–5 minut (doba barvení se odvíjí od čerstvosti eosinu).
7. Obarvené řezy byly dehydratovány v roztocích Ottix shaper a Ottix plus a zamontovány montovacím médiem DPX, které umožňuje dlouhodobé uchovávání histologických preparátů.

Použitelnost metodiky pro testování nanomateriálů (NM) a souhrn nejzajímavějších výsledků

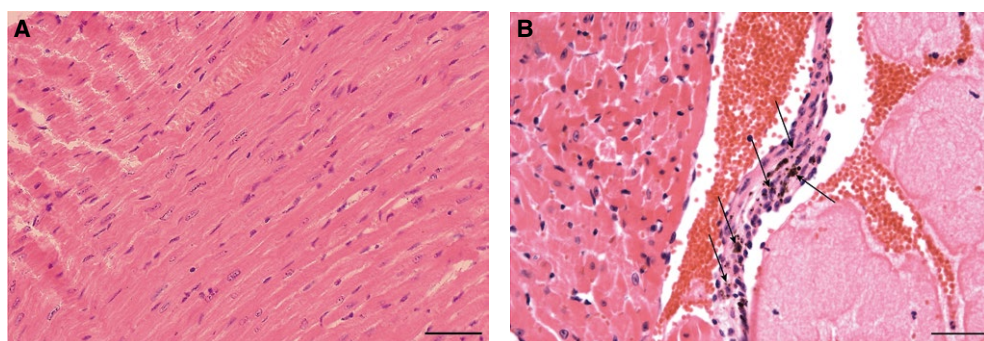
Histologické zpracování je rutinní záležitostí, které je používáno ve všech histologických laboratořích. Metody se liší v roztocích, které jsou používány pro přípravu preparátů. Vedle standardní přípravy obarvených tkáňových řezů lze provést také imunohistochemické detekce antigenů v tkáni.⁷ Výhodou parafinových řezů je možnost dlouhodobého skladování, barvení širokou škálou metod a zachování morfologie orgánů. Při nešetrné fixaci může docházet



Obrázky 30. Histopatologická analýza plicní tkáně po chronické intratracheální expozici nanočásticím grafenu (21 dní). (A) Kontrolní vzorek bez morfologických změn; (B) šipky označují místa alveolárního ztlustění; (C) hvězdičky označují místa vyplavení erytrocytů do intersticia plic (měřítko 50 μm , barveno hematoxylin-eosinem).

k porušení antigenních epitopů, což znesnadňuje imunohistochemickou analýzu. Chyby při alkoholovém odvodnění mohou mít za následek svráštění tkáně a tvorbu artefaktů.

Histologická analýza byla použita pro zhodnocení vlivu intratracheální a perorální expozice nanočásticím grafenu na tkáně myši kmene C57Bl/6. Byly použity dvě expoziční koncentrace (5 a 50 mg/ml) v akutní, subakutní a chronické formě expozice. Orgány byly odebírány po 1, 7 a 21 dnech expozice. Akutní ani subakutní forma expozic (intratracheálních i perorálních) neměla na morfologii orgánů žádný vliv. Vlivem chronické intratracheální expozice



Obrázky 31. Histopatologická analýza srdeční tkáně po chronické intratracheální expozici (21 dní). (A) Kontrolní vzorek bez morfologických změn; (B) šipky označují místa akumulace grafenových nanočástic ve vazivu endokardu (měřítko 50 μm (A) a 20 μm (B), barveno hematoxylin-eosinem).

došlo ke ztluštění alveolárních stěn (zřejmě v důsledku zánětlivé reakce) a k vylití erytrocytů do intersticiální plicní tkáně. V srdci byla zjištěna kumulace malých depozit grafenových částic ve vazivu endokardu (Obrázky 30 a 31). Nepozorovali jsme však kumulaci těchto částic v plicní tkáni, tak jak to uvádějí jiní autoři.^{8,9}

Odborná literatura popisuje změny morfologie orgánů po perorální expozici grafenu.^{10–12} V našem (výše uvedeném) experimentu jsme však žádné orgánové morfologické změny nenašli. Důvodem by mohly být nízké expoziční koncentrace (v našem experimentu), jejichž negativní účinek byl eliminován adaptačními a reparačními mechanismy organismu (přijetí xenobiotika bez vyvolání zánětlivých či morfologických změn).

TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

Teoretický základ metodiky

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) umožňuje vizualizovat NM a identifikovat jejich lokalizaci v buňkách (*in vitro*) nebo ve tkáních laboratorních zvířat (*in vivo*). Po fixaci a zalití biologických vzorků (exponovaných buněk nebo vzorků tkání) do pryskyřice jsou nejdříve připravovány polotenkové řezy, které lze analyzovat ve světelném mikroskopu. Tak lze vyhledat oblasti řezu vhodné pro vyšetření v TEM. Následně jsou zhotovovány ultratenké řezy o tloušťce 50–60 nm. TEM pracuje na principu prozáření ultratenkého řezu svazkem urychlených elektronů. Některé elektrony řezem procházejí bez ovlivnění, u jiných dochází k interakcím s atomy a k jejich rozptylu. Výsledný obraz vzniká na fluorescenčním stínítku. Zvětšení a rozlišení dosahovaná TEM poskytují možnost pozorovat částice o rozměru několika nanometrů.

Podrobnější popis metodiky

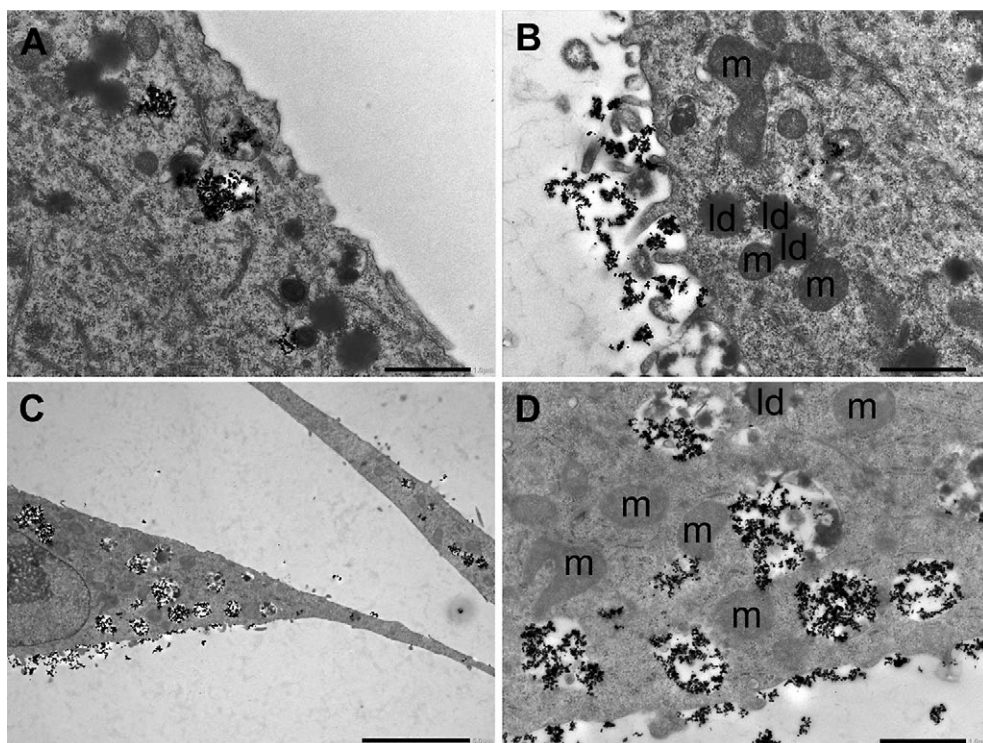
Postup zpracování buněčných kultur a jejich vyšetření v TEM

1. Fixace buněk je prováděna ve dvou krocích. Nejdříve jsou buňky fixovány 3% glutaraldehydem v 0,1 M kakodylátovém pufru (pH 7,2; Sigma) při laboratorní teplotě po dobu 3 hodin. Po oplachu v 0,1 M kakodylátovém pufru jsou buňky „dofixovány“ 1% oxidem osmičelým v 0,1 M kakodylátovém pufru při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny. Následuje intenzivní oplach v 0,1 M kakodylátovém pufru. Fixace buněk se provádí přímo v kultivačních nádobkách.
2. Po fixaci jsou buňky dehydratovány etanolem (vzestupnou řadou 50%, 75%, 96% a 100%) a propylenoxidem a infiltrovány směsí pryskyřic Epon 812 a Durcupan ACM (Sigma). Po infiltraci jsou buňky zality do želatinových kapslí. Pryskyřice se nechá polymerovat po dobu 3 dnů při 60 °C za vzniku bločku.
3. Na ultramikrotomu (Ultrotome Nova, LKB, Švédsko) se z bločků krájí ručně zhotoveným skleněným nožem polotenkové řezy o tloušťce 0,5 nebo 1 μm, které jsou přeneseny na skleněné podložní skličko, obarví se toluidinovou modří a pozorují ve světelném mikroskopu. Na polotenkém řezu se identifikuje oblast vhodná pro vyšetření v transmisním elektronovém mikroskopu. Poté se bloček zmenší (aby se zredukovala plocha řezu), přičemž oblast zájmu zůstává zachovaná.

- Na ultramikrotomu jsou následně z bločku diamantovým nožem krájeny ultratenké řezy o tloušťce 50 až 60 nm. Ty jsou přeneseny na speciální měděné nebo niklové sítky, které jsou potažené „formvarovým“ filmem a „naprášené“ uhlíkem. Pro zvýšení kontrastu se ultratenké řezy dobarvují (kontrastují) uranyl acetátem a citrátem olovnatým.
- Ultratenké řezy jsou analyzovány v TEM JEOL JEM 1400Plus při 120 kV. Výsledné obrázky jsou nasnímány integrovanou 8Mpix CCD kamerou a zpracovány pomocí softwaru TEM Center (Ver. 1.7.3.1537, JEOL, Japonsko).

Použitelnost metodiky pro testování NM

TEM umožňuje identifikaci a charakterizaci tvaru a velikosti NM v buňkách kultivovaných v prostředí *in vitro* nebo ve tkáních exponovaných laboratorních zvířat. TEM je jedinou metodou, která poskytuje přesné informace o nativních (neznačených) NM v buněčných kompartmentech (například v cytosolu, mitochondriích, autofagozomech nebo v jádře). Je velmi vhodná pro elektronodenní anorganické NM, jako je například TiO_2 , nicméně i nanočástice grafenu dosahují dostatečného kontrastu nezbytného k jejich vizualizaci. Obecnými



Obrázky 32. Buňky linie A549 exponované nanočásticím TiO_2 v kulturačním médiu s přidavkem fetálního bovinního séra (A, B) a bez přidavku fetálního bovinního séra (C, D)

Poznámka: mitochondrie (m), tuková kapénka (ld), jádro (n); měřítko A, B, D 1 μm , C 5 μm .

nevýhodami TEM je časová i finanční náročnost a nutnost specializovaného pracoviště s vyskolenými pracovníky.

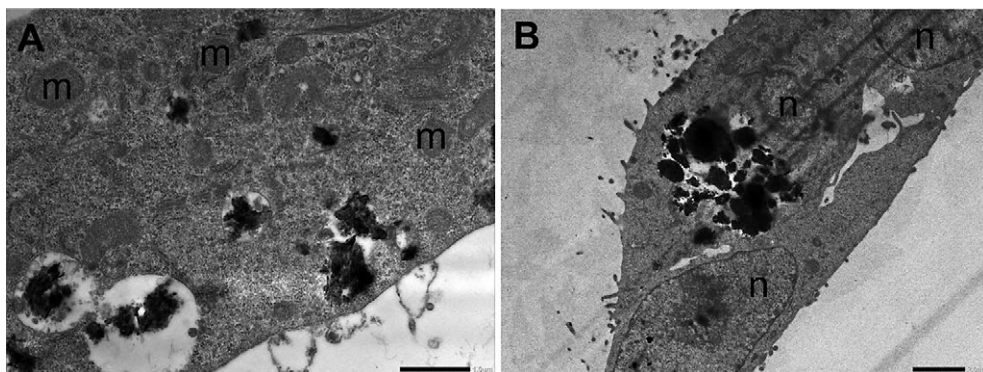
Mezi metodické problémy analýzy biologických vzorků s NM patří (1) používání diamantového nože při krájení ultratenkých řezů a (2) kontrastování ultratenkých řezů. Při krájení ultratenkých řezů biologických vzorků s internalizovanými NM dochází k poškozování ostří diamantového nože. Vzhledem k tomu, že broušení diamantového nože je finančně velmi nákladné, nabízí se alternativa krájení ultratenkých řezů ručně zhotoveným skleněným nožem. Řezy nakrájené skleněným nožem jsou však většinou silnější, což vede ke snížení kvality obrazu.

Kontrastování ultratenkých řezů má někdy za následek tvorbu artefaktů, které mohou být při pozorování v TEM chybně považovány za NM. Identifikace nanočástic TiO_2 je díky jejich charakteristickému tvaru a velikosti jednoznačná i na kontrastovaných ultratenkých řezech. Naproti tomu nanočástice grafenu se v buňkách obvykle částečně shlukují a mohou připomínat výše zmíněné artefakty. Při pochybnostech je možné kontrastování řezů vynechat. Tím sice dojde ke snížení kvality kontrastu obrazu, ale zabrání se chybnému vyhodnocení.

Souhrn nejzajímavějších výsledků

TEM potvrdila internalizaci nanočástic TiO_2 (P25 disperze) buňkami linie A549 po expozici v kultivačním médiu s přidavkem fetálního bovinního séra (Obrázky 32 A, B) a bez přidavku fetálního bovinního séra (Obrázek 32). Nanočástice TiO_2 se vyskytovaly v cytoplazmě buněk, především ve váčcích tvořených biomembránou. Na volném povrchu buněk, který byl v kontaktu s kultivačním médiem, se nacházely štíhlé cytoplazmatické výběžky, v jejichž blízkosti se nanočástice TiO_2 akumulovaly.¹³

TEM potvrdila internalizaci dvou typů nanočástic grafenu (z Trinity College Dublin, Irsko, a od firmy PlasmaChem) buňkami linie A549 po krátkodobé (48 h) i dlouhodobé (osmítýdenní) kultivaci. V experimentu byly použity tři koncentrace grafenu. Většina buněk linie A549, exponovaných nanočásticím grafenu firmy PlasmaChem (o koncentraci 30 $\mu\text{g/ml}$)



Obrázek 33. Buňky linie A549 exponované nanočásticím grafenu (z firmy PlasmaChem) po krátkodobé (A) a dlouhodobé (B) kultivaci

Poznámka: mitochondrie (m), jádro (n); měřítko A 1 μm , B 2 μm .

po dobu 48 hodin, grafenové nanočástice internalizovala. Ve většině případů byly kumulovány v membránových váčcích, menší volné shluky byly pozorovány v cytoplazmě. Váčky s nanočásticemi se vyskytovaly nejčastěji v blízkosti volného povrchu buněk. Po dlouhodobé kultivaci (při zachování shodné koncentrace) se nanočástice grafenu nacházely výhradně v membránových váčcích, které dosahovaly větších rozměrů, než tomu bylo po krátkodobé kultivaci. Tyto váčky se vyskytovaly ve všech oblastech cytoplazmy (Obrázek 33).¹⁴

LITERATURA

1. Wörle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF. Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays. *Nano Lett.* 2006;6(6):1261–1268. doi:10.1021/nl060177c.
2. Balbasi E, Guven G, Terzi Cizmecioğlu N. Mouse Embryonic Stem Cell Culture in Serum-Containing or 2i Conditions. *Methods Mol Biol.* 2022;2520:275–294. doi:10.1007/7651_2021_438.
3. Li Y, Liu Y, Fu Y et al. The Triggering of Apoptosis in Macrophages by Pristine Graphene Through the MAPK and TGF-beta Signaling Pathways. *Biomaterials.* 2012;33(2):402–411. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.091.
4. Zhang Y, Ali SF, Dervishi E et al. Cytotoxicity Effects of Graphene and Single-Wall Carbon Nanotubes in Neural Phaeochromocytoma-Derived PC12 Cells. *ACS Nano.* 2010;4(6):3181–3186. doi:10.1021/nn1007176.
5. Grell E, Ząbek A, Grabowiecka A. Interferences in the Optimization of the MTT Assay for Viability Estimation of *Proteus mirabilis*. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2015;7(4):159–167.
6. Kvakova M, Stroffekova K, Stofilova J et al. Toxicological Evaluation of Fluorescent 11-Mercaptooundecanoic Gold Nanoclusters as Promising Label-Free Bioimaging Probes in Different Cancer Cell Lines. *Toxicol In Vitro.* 2021;73:105140. doi:10.1016/j.tiv.2021.105140.
7. Mokřý J. Versatility of Immunohistochemical Reactions: Comprehensive Survey of Detection Systems. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 1996;39(4):129–140.
8. Gao H, Hammer T, Zhang X et al. Quantifying Respiratory Tract Deposition of Airborne Graphene Nanoplatelets: The Impact of Plate-Like Shape and Folded Structure. *NanoImpact.* 2021;21:100292. doi:10.1016/j.impact.2021.100292.
9. 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:10.3109/17435390.2015.1133865.
10. Chang Y, Yang ST, Liu JH et al. In Vitro Toxicity Evaluation of Graphene Oxide on A549 Cells. *Toxicol Lett.* 2011;200(3):201–210. doi:10.1016/j.toxlet.2010.11.016.
11. Shin JH, Han SG, Kim JK et al. 5-Day Repeated Inhalation and 28-Day Post-Exposure Study of Graphene. *Nanotoxicology.* 2015;9(8):1023–1031. doi:10.3109/17435390.2014.998306.
12. Wang K, Ruan J, Song H et al. Biocompatibility of Graphene Oxide. *Nanoscale Res Lett.* 2011;6(1):8. doi:10.1007/s11671-010-9751-6.
13. Bacova J, Knotek P, Kopecka K et al. Evaluating the Use of TiO₂ Nanoparticles for Toxicity Testing in Pulmonary A549 Cells. *Int J Nanomedicine.* 2022;17:4211–4225. doi:10.2147/IJN.S374955.
14. Šestáková B, Schröterová L, Bezrouk A et al. The Effect of Chronic Exposure of Graphene Nanoplatelets on the Viability and Motility of A549 Cells. *Nanomaterials.* 2022;12(12):2074. doi:10.3390/nano12122074.

METODIKY ÚSTAVU KLINICKÉ IMUNOLOGIE A ALERGOLOGIE

(ÚKIA, Fakultní nemocnice Hradec Králové)

ve spolupráci s Výzkumným ústavem veterinárního
lékařství, v. v. i. (VÚVeL)

PŘÍPRAVA SUSPENZE NANOMATERIÁLŮ PRO TESTOVÁNÍ IMUNOTOXICITY

Před vlastním testováním biologických účinků musí být veškeré nanomateriály (NM) řádně charakterizovány a převedeny do takové suspenze, aby nedocházelo k nadměře agregace a aby samotné suspenzní médium neovlivňovalo viabilitu a aktivační stav modelových buněk. Ideální je suspenze ve vodě nebo v biokompatibilním pufru (např. PBS). V případě hydrofobních NM je nutné přistoupit ke stabilizaci různými detergenty. Vhodné jsou detergenty, které se neváží kovalentně (např. sodná sůl kyseliny cholové), případně proteiny. Je proto důležité, aby příprava suspenze vycházela ze spolupráce s materiálovými fyziky a chemiky, kteří zajišťují správnou fyzikálně-chemickou charakterizaci a hodnocení stability NM a NP v zásobních suspenzích. Detailní postup přípravy a charakterizace nemodifikovaných grafe-nových plátek (GP) a karbonových nanotrubic (MWCNT) lze najít v publikaci Švadlákové et al. z roku 2020.¹

Příklad

Ukázka úvodní optimalizace suspenze nemodifikovaných GP (úvodní měření, porovnání hodnot)

Hodnocení stability suspenze probíhalo na základě hodnot hydrodynamického průměru (*Z-average*), hodnot polydisperzního indexu (Pdl) získaných na základě měření dynamického rozptylu světla DLS a hodnot Zeta-potenciálu (ζ). Výsledky *Z-average* byly porovnávány s transmisí elektronovou mikroskopií (hodnoty získané pomocí DLS v případě planárních částic bývají spíše orientační).

GP1 (Plasmachem):

Velikost (laterální dimenze): $\leq 2 \mu\text{m}$

Tloušťka: 1–4 nm

Přístrojové vybavení: analytické váhy s ionizérem (Ohaus), tyčový sonikátor (QSonica 700/ Bandelin), Zetasizer Nano-Ultra (Malvern Panalytical Ltd)

Příprava (Tabulka 8):

1. Navážení, cca 200 µg /ml 0,25 % cholátu sodného v destilované vodě.
2. Sonikace 30 min, pulzy 1 s on / 1 s off – amplituda 75 %, tyčový sonikátor.
3. Rozdělení do vialek (každá ředěna jiným rozpouštědlem) a měření DLS.

Tabulka 8. Hodnoty Z-average a PdI pro reakční složky suspenze GP

Z-average				
0,25% cholát	186,5_PdI 0,203	–	–	25 °C
Ředěno do:	0 h	20 h	96 h	Teplota m.
voda filtr.	198,4_PdI 0,226	187,7_PdI 0,215	179,4_PdI 0,213	37 °C
10% FBS	264,4_PdI 0,250	247,7_PdI 0,221	210,6_PdI 0,226	37 °C
PBS	239,7_PdI 0,235	1173_PdI 0,529	2602_PdI 0,438	37 °C
RPMI 1640	227,9_PdI 0,214	767,9_PdI 0,422	1125_PdI 0,354	37 °C

Titrace koncentrace cholátu (Tabulka 9):

1. Příprava 250 µg/ml suspenze GP, rozdělení do vialek s rozdílnými koncentracemi cholátu.
2. Sonikace každé vialky 30 min, pulzy 1 s on / 1 s off – amplituda 75 %, tyčový sonikátor.
3. Měření DLS, kontrola pohledem na přítomnost agregátů.

Tabulka 9. Hodnoty Z-average a PdI pro různé koncentrace cholátu

Z-average		
Koncentrace cholátu (%)	0 h	20 h
0,001	-	786,4_PdI 0,936
0,005	205,5_PdI 0,216	215,7_PdI 0,175
0,007	175_PdI 0,102	204,4_PdI 0,257
0,01	184,7_PdI 0,195	187,7_PdI 0,017
0,02	244_PdI 0,006	196_PdI 0,347

Okem pozorovatelné agregáty rychle klesají ke dnu, zejména následující den, proto byla vybrána koncentrace 0,02 %.

Měření ζ-potenciálu (porovnání různých rozpouštědel) (Tabulka 10):

1. Příprava 250 µg/ml suspenze GP v různých detergentech (cholát, triton) nebo ve fosfátu.
2. Sonikace 30 min, pulzy 1 s on / 1 s off – amplituda 75 %, tyčový sonikátor.
3. Měření.

Tabulka 10. Hodnoty ζ -potenciálu v závislosti na rozpouštědle a Z-average

Suspenze GP, 250 $\mu\text{g/ml}$ ve	Z-average (nm)	ζ -potenciál (mV)
H ₂ O bez cholátu	942,5	-31,00
0,25% cholát, dále 5 \times ředění	–	-30,40
0,25% cholát, dále 3 \times centrifugace 20 000 \times g 5min, 5 \times ředění	119,9	-27,30
5mM fosfátu	800,3	-31,90
5mM fosfátu, dále centrifugace 1000 \times g 10 min, supernatant	486,6	-35,80
5mM fosfátu + 0,125 % cholátu, dále 10 \times ředění fosfátem	166,6	-40,70
5mM fosfátu + 0,125 % cholátu, dále ředění kys. pH 2,5	–	-5,49
5mM fosfátu + 0,02% Triton X 100, dále ředění 10 \times fosfátem	320,2	-37,70
0,125% cholát +0,1% BSA, dále centrifugace Air-fuge 3 \times 30 min, peleta	212,5	-33,30
0,02% cholát, dále ředění 2 \times čistým RPMI bez FBS	754,6	-30,30
0,02% cholát, dále ředění 2 \times plným RPMI bez FBS	1012,0	-23,80
ředění 2 \times plným RPMI bez FBS ale s 0,1% BSA	768,1	-23,50
0,02% cholát, dále ředění 2\times plným RPMI + 10% FBS	226,3	-10,80

Suspenze grafenu pro následující testování buněk (Tabulka 11):

1. Příprava 250 μg GP na 1 ml 0,02% cholátu.
2. Sonikace, pulzy 1 s on / 1 s off – amplituda 65 %, tyčový sonikátor.
3. Sterilizace autoklávkem, 121 °C, 20 min (dle měření nemá vliv).
4. Naředění 1:1 s plným RPMI + 10% FBS.
5. Měření.

Tabulka 11. Hodnoty ζ -potenciálu v závislosti na rozpouštědle a Z-average

Suspenze GP	Z-average (nm)	ζ -potenciál (mV)
v 0,02% cholátu, dále 2 \times ředění H ₂ O	175,5	-33,3
v 0,02% cholátu, dále ředění 1:1 pln. RPMI + 10 % FBS	212,8	-9,35
po expozici (50 $\mu\text{g/ml}$)	196,5	-6,95

TESTOVÁNÍ BIOLOGICKÉ KONTAMINACE SUSPENZÍ NM

Hodnocení kontaminace zásobní suspenze NM by mělo předcházet veškerému testování imunotoxicity a obecně toxicity. Přestože suspenze nemusí být nutně kontaminovány celými mikroorganismy, často se na jejich površích nacházejí jejich části, jako je například lipopolysacharid (LPS), který patří mezi nejběžnější kontaminace výzkumných laboratoří. Jeho přítomnost prokazatelně ovlivňuje jak pohlcování nanočástic (například makrofágy), tak i výslednou imunitní odpověď. Logicky tak dochází ke zkrácení a k chybné interpretaci výsledků.

Nejčastěji používaný test na hodnocení přítomnosti LPS je LAL (Limulus Amoebocyte Lysate), který ovšem často s nanomateriály interferuje. LAL test je založen na LPS-indukované koagulační kaskádě vedoucí k tvorbě gelové sraženiny. Bylo však zjištěno, že například oxidované karbonové NM adsorbují přítomný zymogen, což vede k aktivaci koagulace i v nepřítomnosti LPS. Jiná alternativa je založena na nepřímém průkazu LPS pomocí detekce TNF- α , produkovaného primárními lidskými makrofágy v přítomnosti nebo nepřítomnosti polymyxinu B, inhibitoru LPS.² Tento test je však omezen cytotoxickým potenciálem testovaných nanomateriálů. Další alternativou je využití specifických reportérových buněčných linií citlivých na toll-like receptor (TLR) agonisty, jakým je právě LPS.

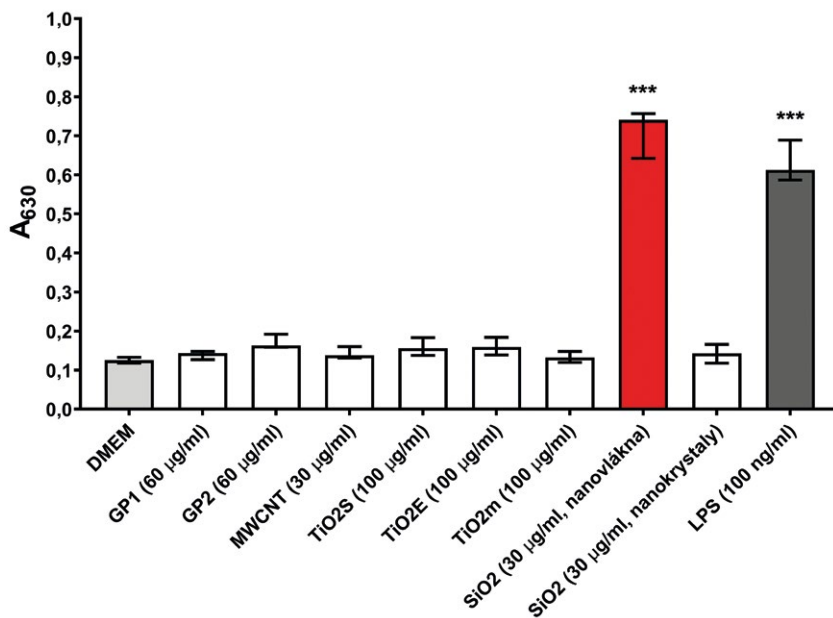
Buněčná esej – TLR

Esej využívá reportérové buněčné linie vycházející z HEK293 (*human embryonic kidney carcinoma*), které mají vnesený gen pro sekretovanou alkalickou fosfatázu (AP). Gen je navázaný na signální dráhu NF- κ B, která je výlučně spojena s konkrétním TLR (v našem případě TLR4 nebo TLR2). Po navázání příslušného agonisty dochází k aktivaci a produkci AP do supernatantu, kde je detekována médiem, které v přítomnosti AP modrá. Výsledná absorbance je přímo úměrná hladině agonisty (například LPS nebo peptidoglykanů).

Příklad

Postup stanovení LPS v suspenzích nanomateriálů

1. HEK-Blue™-4 (150 μ l, Invivogen) se v bezfenolovém médiu (DMEM, 10 % FBS s nízkým obsahem endotoxinu, 2 mM glutamin, antibiotika) nasadí do 96jamkové kultivační destičky (5×10^4 buněk/jamka) a inkubují se 20–24 hodin při 37 °C a 5 % CO₂ s 50 μ l vzorků GP, MWCNTs nebo TiO₂. Používají se nejvyšší pracovní koncentrace, případně nejvyšší necytotoxické koncentrace, které by měly spadat do testovaného koncentračního rozmezí při vlastním hodnocení imunotoxicity. Buňky bez expozice (přidání pouze DMEM) a buňky kultivované s ultra čistým lipopolysacharidem (LPS_{up}, 100 ng/ml) slouží jako kontroly.
2. Destička se odstředí při 1000 \times g, 10 min a 20 μ l supernatantu se přenesou do nové 96jamkové destičky.
3. K supernatantům se přidá 180 μ l detekčního média a destička se nechá 30 minut až 3 hodiny (průběžně kontrolujeme zbarvení) inkubovat při 37 °C a 5 % CO₂.
4. Výsledná absorbance je měřena na destičkovém spektrofotometru (readeru) při vlnové délce 630 nm proti referenční vlnové délce 750 nm, která se odečítá.



Obrázek 34. Výsledky testování biologické kontaminace testovaných suspenzí NM. Hodnocení aktivace HEK-Blue™-4

Poznámka: Data jsou prezentována jako medián s 95 % CI; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ (statistická významnost ve srovnání s neexponovanou kontrolou DMEM).

U TLR (i LAL) testu je nutné kontrolovat možné interference a je nutné, aby testované NM nebyly pro HEK toxické. Limitací je i nutnost použití FBS s certifikovaným ultra nízkým endotoxinem, což dělá metodu více finančně náročnou. Na druhou stranu se jedná o velmi citlivou metodu (0,01 EU/ml). Zároveň lze hodnotit i absenci nespecifických interakcí s konkrétními TLR receptory. V případě pozitivní odpovědi je nutné doplnit metodu jinou alternativou.

Dostupné různé varianty TLR buněk nabízí možnost hodnocení většího počtu možných kontaminantů. V případě HEK-Blue™-4 lze metodu i kvantifikovat pomocí koncentrační řady standardního LPS. Pomocí HEK-Blue™-4 a HEK-Blue™-2 (Invivogen) byla průběžně kontrolována sterilita všech testovaných suspenzí NM. Pomocí buněk byla pozitivní odpověď nalezena pouze u SiO₂ nanovláken, které byly na základě toho z testování imunotoxicity na monocytech a makrofázích vyřazeny (Obrázek 34).

Hodnocení imunotoxicity

Imunotoxicita představuje negativní (toxický) vliv daného faktoru na imunitní systém. Obecně zahrnuje cytotoxické, imunosupresivní a imunostimulační reakce. Hlavním projevem imunotoxického působení je zánět.

Hodnocení cytokinů jako mediátorů zánětu

Akutní zánět je komplexní obranná reakce organismu na narušení vnitřního prostředí. Za fyziologických podmínek odeznívá bez následků. Jestliže dojde k selhání regulačních mechanismů nebo přetrvává-li stimulační agens v organismu, přechází akutní zánět do chronického zánětu. Dlouhodobě přetrvávající chronický zánět je patologický proces, který může vyústit v nevratné poškození tkání, rozvrat imunitních funkcí a nádorové bujení. Mezi klíčové mediátory zánětu jsou řazeny cytokiny a zejména interleukiny (IL), signální molekuly (obvykle polypeptidy a proteiny) produkované imunokompetentními, ale i epitelovými či endoteliálními buňkami.

Na základě stanovení jejich hladiny v plazmě a séru (potažmo v supernatantech) lze hodnotit prozánětlivý nebo protizánětlivý stav. Klíčovými buňkami v procesu zpracování a eliminace NM jsou profesionální fagocyty. Jedná se o monocyty cirkulující v krvi a z nich diferencované makrofágy a tkáňové (rezidentní) makrofágy. Z toho důvodu je pro testování imunotoxicity *in vitro* vhodné používat (jako buněčný model) právě tyto buňky, případně jejich varianty. Při použití nádorových linií je vhodné doplnit měření na více typech buněk nebo lépe na primárních buňkách.

ELISA

Enzymová imunosorbční analýza (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) je standardní metoda využívaná ke stanovení protilátek nebo antigenů, včetně interleukinů, v biologickém vzorku. Principem je specifická interakce antigenu a protilátky, přičemž jeden z této dvojice nese kovalentně navázaný enzym (nejčastěji peroxidázu nebo alkalickou fosfatázu). Enzym katalyzuje chemickou přeměnu bezbarvého substrátu, který je přidán do reakční směsi, na barevný produkt. V případě klasické sendvičové ELISA je pak výsledná absorbance barevného produktu přímo úměrná koncentraci testovaného cytokinu.

Příklad

Postup stanovení hladiny IL-10 v supernatantu metodou sendvičové ELISA (Quantikine, Biotechne) u primárních monocytů exponovaných uhlíkovým NM a následně teplem usmrčeným bakteriím; sledování modulačního účinku NM na reaktivitu vůči bakteriím:

1. Sebrané supernatanty je nutné stočit při $300 \times g$, 5 min, aby se odstranily buňky (v našem případě i nepohlčené bakterie), a přenést do nových zkumavek. Pokud jsou stále přítomné nanočástice, které by mohly interferovat s metodou, je nutné je znovu stočit při $10\,000 \times g$, 10 min.
2. Výsledné supernatanty lze rovnou použít nebo případně uschovat zamrazením při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (IL-10 lze ponechat i při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ cca po dobu tří týdnů).

Další postup vychází z protokolu výrobce:

3. Všechny reagentie včetně 96jamkové destičky se dle pokynů temperují na laboratorní teplotu ($21\text{ }^{\circ}\text{C}$), případně se upraví dle pokynů.
4. Do čistých polypropylenových vialek se připraví kalibrační řada standardů postupným (dvojkovým) ředěním. Poslední (osmá) vialka, obsahující pouze puft/rozpouštědlo, slouží jako standard o nulové koncentraci.

5. Testované vzorky se předem pětkrát naředí (nutné předem ověřit) pomocí ředícího pufru.
6. Připravené standardy a testované ředěné vzorky jsou aplikovány (200 µl) do 96jamkové destičky, která se zalepí přiloženou fólií a nechá se 2 hodiny inkubovat při laboratorní teplotě.
7. Všechny jamky se odsají a třikrát promyjí (300 µl) promývacím pufrům pomocí promývačky, případně multikanálové pipety. Po posledním promytí se destička důkladně (ale krátce) vyklepe proti buničině (nesmí zcela vyschnout).
8. Do všech jamek se napipetuje 200 µl konjugátu a destička zalepená novou fólií se nechá 1 hodinu inkubovat.
9. Promytí jako v bodě 7.
10. Do všech jamek se napipetuje 200 µl substrátu a destička zalepená novou fólií se nechá inkubovat ve tmě, kdy se příležitostně kontroluje vznikající modré zbarvení (max 30 minut).
11. Do všech jamek se přidá STOP roztok (50 µl).
12. Výsledná absorbance se odečítá pomocí spektrofotometru (readeru) při 450 nm proti 570 nm jako referenční vlnové délce.
13. Koncentrace se vypočítá pomocí hodnot kalibrační řady standardu.

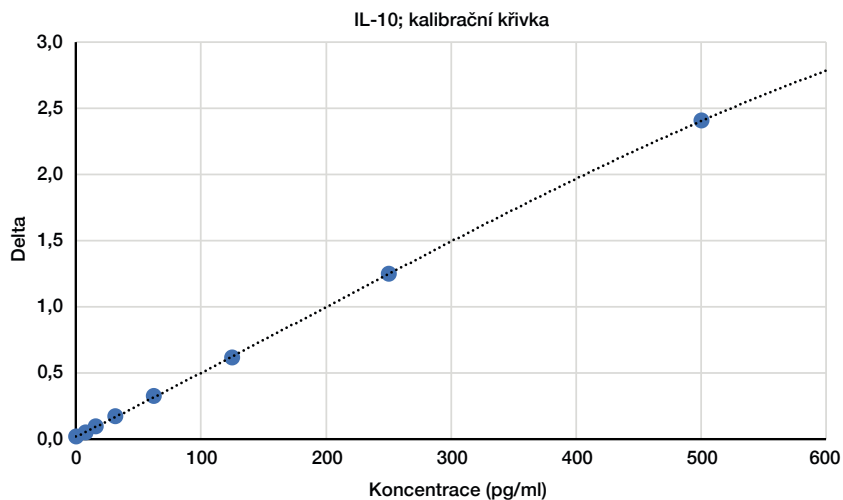
Ukázka výstupu měření (Tabulka 12; Obrázek 35):

Tabulka 12. Hodnoty absorbance kalibrační křivky (sloupec 1) a vzorků

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	2,405	2,45	2,436	2,643	0,810	0,888	1,022						Delta
B	1,251	1,571	1,516	1,792	0,503	0,473	0,487						Delta
C	0,617	2,105	2,39	2,499	0,828	0,576	0,778						Delta
D	0,327	1,208	1,411	1,122	0,282	0,281	0,395						Delta
E	0,173	2,133	2,126	2,22	0,025	0,024	0,025						Delta
F	0,094	1,628	1,202	1,427	0,026	0,024	0,026						Delta
G	0,050	1,853	1,896	1,904	0,027	0,027	0,028						Delta
H	0,020	1,256	1,495	1,274	0,022	0,022	0,023						Delta

ELISA je nejvíce využívanou metodou ke stanovení hladiny cytokinů v supernatantech. Výhodami jsou vysoká citlivost, kvantifikace výsledku, možnost automatizace a rozmanitý výběr v testovaných antigenech. Většina esejí nevyžaduje složitou přípravu vzorku, nicméně zejména sendvičová úprava může být časově náročná. To platí zejména v případě, kdy není možné odebrané supernatanty uchovávat. V závislosti na typu sledovaného analytu může během uchování v mrazicím boxu docházet k degradaci vzorku, což snižuje kvalitu výsledku.

Problémem esejí může být interference složek reakční směsi s testovanými NM. To lze redukovat až eliminovat opakovaným promýváním. Další komplikací představuje skutečnost, že NM mohou měřené cytokiny vyvazovat, což vede k falešně negativním výsledkům. Z tohoto důvodu je nutné provádět test interference, kdy se vzorek s definovanou koncentrací cytokinu (například se standardem) nebo vzorek získaný z buněk předem stimulovaných



Obrázek 35. Kalibrační křivka

definovaným stimulantem inkubuje s NM a výsledky po centrifugaci (odstranění NM s potenciálně navázanými cytokiny) jsou porovnávány se stejnými vzorky bez NM. V případě prokázané interference je nutné přistoupit k alternativním metodám detekce proteinu nebo k molekulárním metodám. V našem případě testování nemodifikovaných karbonových NM k významným interferencím nedocházelo.

Buněčné eseje

Alternativou hodnocení cytokinů jsou buněčné eseje, založené na reportérových buňkách, v našem případě na systému HEK-Blue™ (Invivogen). Princip eseje spočívá ve vnesení genu pro sekretovanou alkalickou fosfatázu (AP), který je navázán na signální dráhu příslušného transkripčního faktoru. Dráha je spojena s povrchovým receptorem specifickým pro konkrétní cytokin. Po navázání cytokinu dochází k aktivaci této dráhy a následně k produkci AP, kterou lze v supernatantu detekovat pomocí média obsahujícího substrát (dochází k barevné změně). Výsledná absorbance je přímo úměrná koncentraci původního cytokinu.

Příklad

Postup stanovení hladiny IL-10 v supernatantu metodou HEK-Blue™ IL-10 u primárních monocytů exponovaných uhlíkovým NM a následně teplem usmrceným bakteriím; sledování modulačního účinku NM na reaktivitu vůči bakteriím

1. Sebrané supernatanty je nutné stočit při $300 \times g$, 5 min, aby se odstranily buňky (v našem případě i nepohlčené bakterie) a přenést do nových zkumavek. Pokud jsou stále přítomné nanočástice, které by mohly interferovat s metodou, je nutné je znovu stočit při $10\,000 \times g$, 10 min.
2. Výsledné supernatanty lze rovnou použít nebo případně uschovat zamrazením při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (IL-10 lze ponechat i při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ cca po dobu tří týdnů).

Další postup vychází z protokolu výrobce (nutno dodržovat sterilní podmínky). Součástí je předchozí kultivace reportérových buněk v selekčním bezfenolovém médiu (DMEM) s obsahem 2 mM glutaminu, 10 % FBS, které musí být inaktivované kvůli eliminaci přirozeně se vyskytující AP, a s obsahem selekčních antibiotik daných výrobcem.

3. Kontroly a vzorky jsou aplikovány (20 µl; triplikáty) do 96jamkové kultivační destičky.
4. Ke všem vzorkům je přidáno 180 µl buněčné suspenze ($0,28 \times 10^6$ buněk/ml) v kultivačním „bezfenolovém“ médiu (bez selekčních antibiotik) a buňky se nechají 20–24 hodin inkubovat při 37 °C a 5 % CO₂.
5. Aplikace 20 µl supernatantů ze vzorků a kontrol do nové 96jamkové destičky.
6. Přidání 180 µl detekčního média (předem připraveno smícháním 1 ml reagentu, 1 ml pufru s 98 ml destilované vody) a nechá se inkubovat (30 minut až 3 hodiny).
7. Výsledná absorbance je měřena pomocí spektrofotometru (readeru) při vlnové délce 630 nm.

Ukázka výstupu měření (Tabulka 13):

Tabulka 13. Hodnoty absorbance měřených vzorků

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,042	0,042	0,043	0,042	0,041	0,043	0,042	0,041	0,041	0,043	0,042	0,042	630
B	0,041	1,387	1,359	1,420	1,426	1,432	1,404	0,600	0,654	0,643	0,043	0,042	630
C	0,040	0,961	0,892	1,070	1,019	0,878	1,024	0,311	0,293	0,325	0,043	0,041	630
D	0,043	1,172	1,210	1,311	1,193	1,210	1,241	0,596	0,354	0,473	0,043	0,043	630
E	0,042	0,956	1,017	0,959	1,096	1,100	1,121	0,233	0,262	0,256	0,043	0,042	630
F	0,041	0,137	0,159	0,149	0,158	0,144	0,17	0,15	0,146	0,112	0,044	0,041	630
G	0,041	0,105	0,147	0,106	0,041	0,044	0,043	0,043	0,042	0,041	0,043	0,041	630
H	0,044	0,043	0,042	0,042	0,043	0,043	0,043	0,042	0,046	0,043	0,042	0,043	630

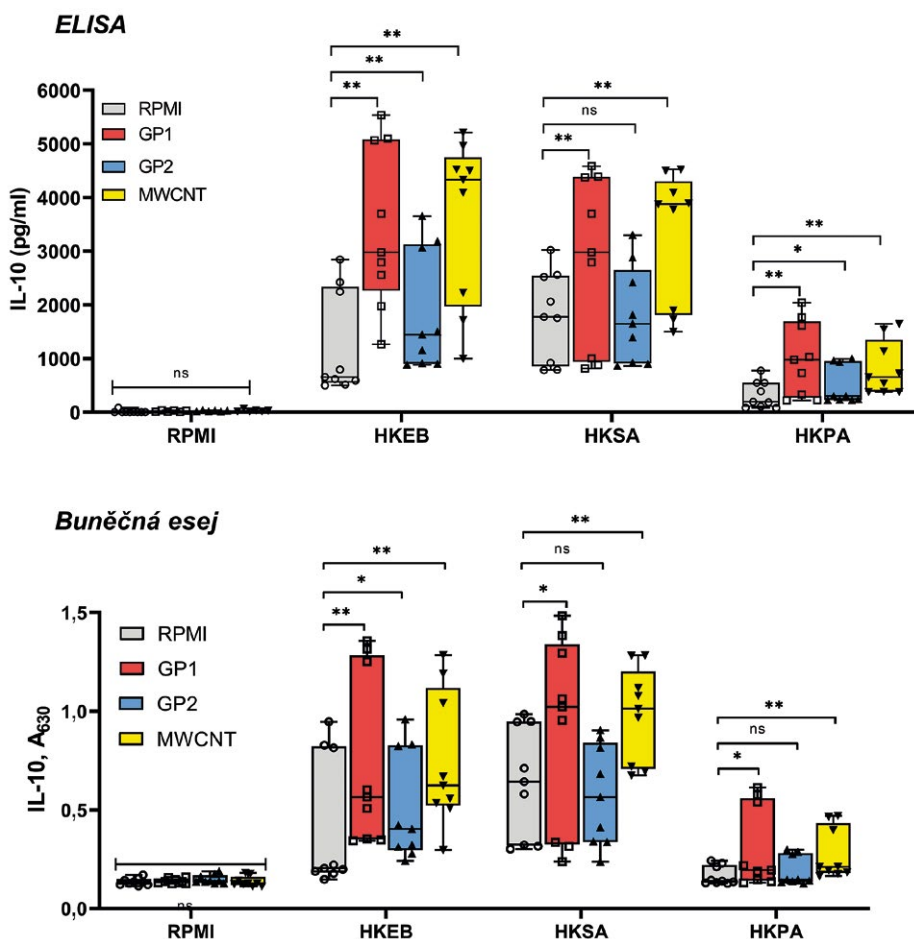
Buněčné eseje jsou původní metodou testování cytokinů. Na rozdíl od ELISA nejsou kvantitativní a mívají nižší citlivost. Časově náročnou součástí testů je udržování buněčných linií. Výhodou je naproti tomu možnost specifické detekce (pouze) bioaktivních forem cytokinů, což u některých ELISA zajištěno není (případně není jasně uvedeno, co se konkrétně testuje). Při testování vysokého počtu vzorků jsou buněčné eseje vhodné jako levná screeningová metoda porovnání různých koncentrací stimulantů (například NM). Vlastní nasazení supernatantů k buňkám zabere obvykle do 30 minut (sendvičová ELISA trvá obvykle 4–6 hodin). Z tohoto pohledu představují buněčné eseje vhodnou metodu stanovení rychle degradujících cytokinů či současného stanovení skupiny cytokinů.

V našich experimentech docházelo při testování IL-1β k jeho degradaci v uskladněných zmrazených vzorcích. Z tohoto důvodu byla pro stanovení vybrána metoda buněčné eseje, kdy byly supernatanty ihned přenášeny na nové destičky a inkubovány s reportérovými buňkami. Jednou osobou tak mohly být ve zbylých supernatantech prováděny současně i další analýzy, například detekce LDH (viz viabilita). Podobně jako u ELISA metody bylo nutné i zde kontrolovat interference a zajistit, aby testované supernatanty neobsahovaly cytotoxické koncentrace stimulantů. To je v případě testování NMs řešeno jejich odstředěním na 10 000 g.

V našich experimentech byly využívány obě metodiky detekce cytokinů pro hodnocení imunotoxicity GP, karbonových nanotrubic (MWCNT) a nano-TiO₂. Používání buněčných esejí nám umožňovalo současný screening několika prozánětlivých i protizánětlivých cytokinů. Část výsledků a detailní postup lze najít v publikaci Švadlákové et al.³

Porovnání ELISA a buněčné esej při měření hladiny IL-10

(Testování modulačních účinků nemodifikovaných karbonových NM na cytokinovou odpověď monocytů vůči bakteriím)



Obrázek 36. Produkce IL-10 u izolovaných monocytů stimulovaných GP (60 µg/ml), MWCNT (30 µg/ml) a bakteriemi HKEB, HKSA a HKPA (1×10^7)

Poznámka: Data jsou prezentována jako krabicový graf od minima do maxima se všemi body. Hodnoty ** $p < 0,01$ a * $p < 0,05$ označuje statistickou významnost ve srovnání s odpovídající kontrolou (RPMI); ns – nesignifikantní.

HODNOCENÍ AKTIVACE NLRP3

V rámci testování mediátorů zánětu (při sledování imunotoxických účinků NM) je za nejvýznamnější cytokin považován prozánětlivý cytokin IL-1 β , jakožto produkt aktivace inflamazomu (intracelulárního makromolekulárního komplexu). NLRP3 inflamazom je klíčovým zprostředkovatelem imunotoxicity NM. Důvodem je jeho „univerzálnost“ a široké spektrum možných aktivátorů, které mají charakter jak PAMP/MAMP (vzory spojené s mikrobiální kontaminací), tak i DAMP (vzory spojené s poškozením buněk). Pomocí stanovení aktivace NLRP3 lze odhalit sterilní zánět, ke kterému vlivem expozice NM často dochází.

Nejjednodušším způsobem monitorování aktivace NLRP3 je měření hladiny cytokinu IL-1 β . Nejčastěji se hodnotí kanonická aktivace NLRP3, která probíhá u makrofágů. Za tímto účelem je vhodné využít (jako *in vitro* buněčný model) právě lidské primární makrofágy, které ovšem nejsou snadno dostupné. Do jisté míry přijatelnou alternativu představují nádorové linie, jejichž odpovědi však nemusí být zcela adekvátní k odpovědím nepozměněných buněk. Jako optimální se jeví použití geneticky modifikovaných (transfekovaných) linií, specificky určených k hodnocení konkrétního mechanismu.

Pro naše experimenty byly zvoleny modifikované lidské monocyty THP1-null a THP1-deff, které umožnily specifické monitorování aktivity NLRP3. Práce s těmito liniemi je analogická práci s klasickými THP-1 (bezfenolové RPMI1640, 10 % FBS, 2 mM glutaminu, 10 mM HEPES), s výjimkou použití selekčních antibiotik v kultivačním médiu. Pro všechny imunitní buňky je vhodné, aby použité FBS bylo inaktivované (s certifikovaným nízkým obsahem endotoxinu) a zabránilo se tak nechtěným „předaktivacím“ buněk a násobením reakcí. Postup hodnocení vychází z doporučení dodavatele buněk.

Příklad

Postup stanovení kanonické aktivace NLRP3 po expozici uhlíkovým NM

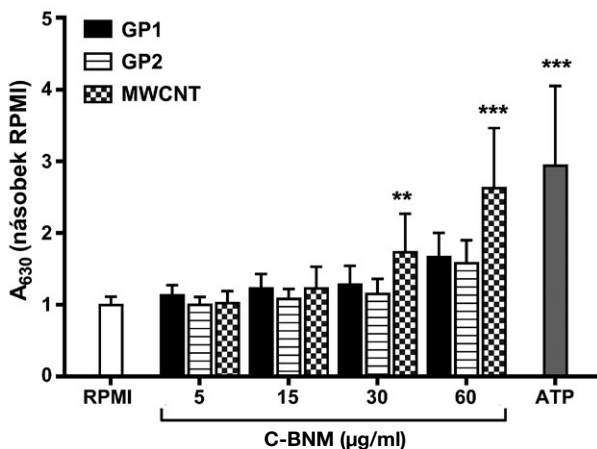
1. THP1-null/deff (Invivogen) se v koncentraci $3,6 \times 10^5$ buněk/jamka / 200 μ l nasadí do 96jamkové kultivační destičky (alternativně lze předem THP1 v koncentraci $1,8 \times 10^6$ buněk/jamka / 200 μ l 3 hodiny aktivovat pomocí phorbol-myristát acetátu (300 ng/ml) a po výměně média 72 hodin diferencovat v makrofágy).
2. Ke všem buňkám včetně negativní kontroly se přidá ultračistý LPS ve výsledné koncentraci 1 μ g/ml a buňky se nechají 3 hodiny inkubovat při 37 °C a 5 % CO₂ („priming“ – nezbytný první signál předcházející kanonickou aktivaci, který ale k samotné aktivaci nevede).
3. Ze všech jamek se opatrně odsaje médium s LPS a přidá se 200 μ l čerstvého média s různými koncentracemi NM. K negativní kontrole se přidá pouze čerstvé médium. Jako pozitivní kontrola může sloužit ATP, krystaly kyseliny močové nebo nanočástice SiO₂. Buňky se nechají 24 hodin inkubovat při 37 °C a 5 % CO₂.
4. Supernatanty se dle potřeby odstředí (viz zpracování supernatantů výše) a přenesou se po 50 μ l do nové 96jamkové destičky, do které se přidá po 150 μ l suspenze HEK-Blue™ IL-1 β ($0,33 \times 10^6$ buněk/ml).
5. Další postup je analogický se stanovením IL-10 (viz výše). Při slabé odpovědi lze nechat buňky inkubovat až 48 hodin.

Postup zahrnující modifikované THP1 buňky s následnou detekcí IL-1 β (pomocí buněčné eseje) byl využit i pro hodnocení imunotoxicity TiO₂ nanočástic. V průběhu hodnocení nebyla

prokázána interference testovaných NM s esejemi. Problém by však mohl nastat u NM, které jsou výrazně cytotoxické a u kterých je nutné optimalizovat testovanou koncentraci. Možnou nevýhodou uvedené metody je vyšší pořizovací cena modifikovaných buněk, nicméně dané buňky lze namnožit a uchovávat téměř neomezeně dlouhou dobu v parách dusíku nebo v kapalném dusíku. Pro metodu je možné využít i základní linii THP-1, nicméně v tomto případě je nutná rozsáhlejší optimalizace. Deficientní buňky lze nahradit použitím specifického inhibitoru MCC950. Samotná metoda není náročná na přístrojové vybavení, kdy je nutné vlastnit pouze destičkový spektrofotometr s monochromátorem, případně s filtry pro dané vlnové délky.

Výsledek hodnocení kanonické aktivace NLRP3

Detailní výsledky shrnující prozánětlivý potenciál karbonových NM lze najít v publikaci Švaldřákové et al. z roku 2020.¹



Obrázek 37. THP1-null: produkce IL-1 β po expozici GP1, GP2 a MWCNT

Poznámka: Data jsou prezentována jako podíl produkce IL-1 β exponovaných buněk a neexponované kontroly (RPMI) a zobrazena jako průměr \pm standardní odchylka; ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$ (statistická významnost ve srovnání s RPMI).

Zásadní význam hodnocení IL-1 β se potvrdil během porovnávání několika různě modifikovaných MWCNT. Zatímco cytokiny neasociované s inflamazomem (IL-6 nebo TNF- α) byly produkovány pouze v jednom případě, IL-1 β byl produkován vždy. Prozánětlivý účinek všech testovaných typů MWCNT byl tak potvrzen pouze na základě IL-1 β . Z uvedeného vyplývá, že hladina IL-1 β by při testování imunotoxických účinků měla být hodnocena vždy.⁴

HODNOCENÍ VIABILITY

Nezbytnou součástí sledování imunotoxicity je hodnocení viability buněk. Vedle sledování intracelulární distribuce je rovněž nutné sledovat, zda danou cytokinovou odpověď nedoprovází i zvýšená úmrtnost, zejména pyroptóza, která je nefyziologickou součástí aktivace NLRP3 a bývá součástí chronického zánětu. Za tímto účelem se využívá měření úniku laktátdehydrogenázy (LDH). Výhodou je možné „párování“ s detekcí IL-1 β , kdy pozitivní nález produkce cytokinu a zároveň úniku LDH lze hodnotit jako pyroptózu, tedy specifickou smrt buňky, při níž dochází k jejímu prasknutí a vylití silně prozánětlivého obsahu do svého okolí. Dále LDH esej, konkrétně u nemodifikovaných karbonových NM, představuje jednu z mála robustních cytotoxických metod, při které nedochází k interferencím. Nicméně NM je nutné z reakční směsi odstraňovat, protože mohou vyvazovat formazan a bránit tak barevné změně. Z uvedeného důvodu byl z palety našich testů vyřazen klasický cytotoxický test MTT. Variabilita výsledků WST-1 byla vázána na charakter použitých buněk.

LDH esej byla využita při hodnocení všech našich buněčných modelů a dostupných NM (GP, MWCNT, TiO₂ a SiO₂). Byla využita i pro stanovení pyroptózy, kdy jeho spolehlivost byla ověřována pomocí reportérových buněk THP1-HMGB1-LuciaTM (Invivogen).

LITERATURA

1. 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.
2. Mukherjee SP, Lozano N, Kucki M et al. Detection of Endotoxin Contamination of Graphene Based Materials Using the TNF- α Expression Test and Guidelines for Endotoxin-Free Graphene Oxide Production. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166816. doi:10.1371/journal.pone.0166816.
3. 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.
4. Svadlakova T, Hubatka F, Masek J et al. Activation of NLRP3 Inflammasome as a Key Indicator of Carbon Nanotubes Proinflammatory Potential. *Eur J Immunol*. 2019;49:601–601.

METODIKY ÚSTAVU PREVENTIVNÍHO LÉKAŘSTVÍ (Lékařská fakulta v Hradci Králové)

MIKRONUKLEUS TEST (TEST GENOTOXICITY A CYTOTOXICITY)

Teoretický základ metodiky

Mikronukleus test s blokací cytokineze (*cytokinesis block micronucleus test*; CBMN) pomocí Cytochalasinu B představuje robustní, levnou, rychlou a senzitivní metodu hodnocení cytotoxických/cytostatických a genotoxických potenciálů chemických látek. Je rovněž vhodná pro hodnocení účinků expozic NM v experimentálních podmínkách (*in vitro* i *in vivo*) a pro biomonitoring exponovaných osob v epidemiologických studiích.^{1,2}

Metoda je založena na detekci až devíti biomarkerů cytotoxického a genotoxického účinku testovaného materiálu v cytoplasmě interfazických buněk. V případě hodnocení cytotoxického potenciálu se jedná o „*cytokinesis-block proliferation index*“ (CBPI), replikační index (RI), index dělení jader (*nuclear division index*; NDI) a s nimi asociované procento cytostázy (% cytostasis) a počet či procentuální zastoupení nekrotických a apoptických buněk. K hodnocení genotoxického potenciálu je využívána detekce počtu či procentuálního zastoupení binukleárních buněk (BNC) s přítomností mikrojádra (MN), jaderného pupenu (*nuclear bud*; NBUD) či nukleoplasmatického můstku (*nucleoplasmic bridge*, NPB) v cytoplasmě.³

Podrobnější popis metodiky

Expoziční scénář vychází z doporučení OECD (2016). CBMN je prováděn podle modifikované metody dle Fenecha (Fenech 2007).

Buněčná linie (v případě našich experimentů THP-1) je v objemu 2,5 ml a koncentraci buněk 2×10^5 buněk/ml nasazena do 6jamkové destičky a exponována zvolené koncentraci NM (smícháno 1,25 ml buněčné kultury o dvojnásobné koncentraci, tedy 4×10^5 buněk/ml, a 1,25 ml suspenze NM o dvojnásobné koncentraci, než je konečná testovaná koncentrace NM). Jsou zařazeny i pozitivní kontroly s genotoxickou látkou (v našem případě cytosin arabinosid v konečné koncentraci 5 a 20 ng/ml) a negativní kontrola (buněčná linie v médiu bez ovlivnění). Doba expozice (kultivace) NM je 1,5 až dvojnásobek délky buněčného cyklu, aby byl zajištěn i kontakt NM s jaderným obsahem a mitotickým aparátem buňky během

dělení. Dobu expozice je tedy nutné upravovat podle použité buněčné linie. V případě THP-1 buněčné linie je doba expozice 40 hodin.

Kultivace buněk probíhá v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5 % CO₂. Po skončení expozice jsou buňky odstředěny při 300 × g po dobu 5 minut a za sterilních podmínek dvakrát opláchnuty PBS. Médium je vyměněno za čerstvé a do všech kultur je přidán Cytochalasin B v konečné koncentraci 5 µg/ml (kultivace pokračuje dalších 30 hodin). Následně jsou kultury přeneseny do konických zkumavek, odstředěny při 200 × g (8 min) a v digestoři fixovány v prvním kroku 8 ml roztoku metanolu a ledové kyseliny octové v poměru 3:1 s přidavkem 225 µl 36–38% formaldehydu. V dalších dvou krocích jsou fixovány 8 ml roztoku metanolu a ledové kyseliny octové v poměru 3:1 pro každý vzorek (příprava je nutná těsně před zpracováním a roztok je nutné uchovat v chladu). Mezi každým fixačním krokem je provedeno odstředění při 200 × g (8 min). Po posledním odstředění (8 min, 200 × g) je odstraněn téměř všechen supernatant s výjimkou cca 1 ml nad peletou, ve kterém je buněčná peleta resuspendována.

Ve finální fázi je suspenze nakapána na dvě vychlazená, navlhčená, vodorovně uložená podložní skla a ponechána přes noc při laboratorní teplotě. Následující den jsou vzorky obarveny 5% roztokem Giemsa-Romanowski po dobu 10 minut, opláchnuty pod tekoucí vodou a následně demineralizovanou vodou a po oschnutí uloženy do boxu na mikroskopické preparáty. Další skladování je možné v boxech při laboratorní teplotě.

Podložní skla jsou před použitím ponořena minimálně 24 hodin do chromsírové směsi (dichroman draselný a koncentrovaná kyselina sírová). Po vynětí jsou třikrát opláchnuta pod tekoucí vodou a další dvě hodiny ponechána v proudu tekoucí vody. Následuje trojitý oplach demineralizovanou vodou. V čisté demineralizované vodě jsou skla ponechána do druhého dne. Po vynětí jsou vyleštěna látkou nepouštějící vlákna, uložena do boxu na mikroskopické preparáty a uchována při –18 °C do doby použití.

Analýza vzorků je prováděna pomocí světelného mikroskopu při 400násobném zvětšení. V případě hodnocení cytostatického potenciálu je hodnoceno nejméně 500 buněk. Při hodnocení genotoxického potenciálu je analyzováno 1000 binukleárních buněk (BNC). K počítání BNC je použit ruční čítač.

Při hodnocení **cytostatického potenciálu** jsou využívány hladiny (n) mononukleárních (MONOC), binukleárních (BNC), trinukleárních (TRINC) a tetranukleárních (TETRC) buněk pro následující výpočty:

$$CBPI = \frac{nMONOC + 2 * nBNC + 3 * (nTRINC + nTETRC)}{\text{(celkový počet buněk)}}$$

$$R = \frac{\frac{nBNC + 2 * (nTRINC + nTETRC)}{\text{(celkový počet buněk)}} T}{\frac{nBNC + 2 * (nTRINC + nTETRC)}{\text{(celkový počet buněk)}} K}$$

$$NDI = \frac{(nMONOC + 2 * nBNC + 3 * nTRINC + 4 * nTETRC)}{\text{(celkový počet buněk)}}$$

T se vztahuje ke kulturám, které jsou exponovány testovaným NM; K se vztahuje ke kontrolní kultuře bez expozice (kultura pouze v kultivačním médiu).

Procento cytostázy (% cytostasis) je pak vypočteno dle vzorce:

$$\% \text{ cytostasis} = 100 - 100 * \frac{(CBPI) T}{(CBPI) K}$$

K hodnocení genotoxického potenciálu jsou používána skórovací kritéria dle Fenecha modifikována dle AHEM (2003).^{3,4}

Použitelnost metodiky pro testování NM

Výhodou CBMN (ve srovnání s jinými testy detekujícími poškození DNA) je: (1) CBMN umožňuje hodnotit jakoukoli populaci buněk bez ohledu na karyotyp, (2) konečný výsledek je jednoduše identifikovatelný (dvojjaderná buňka), (3) odpověď může být zjišťována i po delší době od expozice, (4) je možné detekovat i látky, které poškozují mikrotubuly dělicího vřeténka (aneugenní látky) a (5) bazální frekvence MN je obvykle stabilní.⁵

Vlastní provedení expozice NM se neliší od provedení u jiných testů. Mezi další výhody CBMN patří relativní jednoduchost provedení, finanční nenáročnost, statistická síla, možnost získání řady parametrů z jednoho vzorku (velká výtěžnost) a nenáročnost na laboratorní vybavení. Není například nutné fluorescenční barvení a zobrazení. V současnosti je výhodnější manuální analýza, která umožňuje detekci všech devíti biomarkerů. Automatická analýza zatím umožňuje pouze detekci BNC s MN. Při manuální analýze je také redukováno riziko záměny klastru NM a MN.

Mezi nevýhody testu patří například výskyt pseudomikrojader a při použití Cytochalasinu B možnost ovlivnění internalizace NM buňkou v důsledku inhibice aktinu.^{5,6} Mezi další nevýhody patří riziko záměny klastru NM za MN, nutnost používání (pouze) dělicích se buněk a velká náročnost na laboratorní čas a lidskou práci při manuální analýze. Riziko ovlivnění internalizace lze snížit přidáním Cytochalasinu B až po ukončení expozice buněk (protokoly „delayed co-treatment“ či „post-treatment“).⁶ Při dodržení postupů „delay co-treatment“ či „post-treatment“ jsme nezaznamenali interakce s použitými NM.

Rizikovější (z hlediska výpovědní hodnoty) může být kombinace fluorescenčního barvení a automatické analýzy. Důvodem je (1) zhášení fluorescence (bylo popsáno u některých NM) a (2) záměna shluku NM za MN.

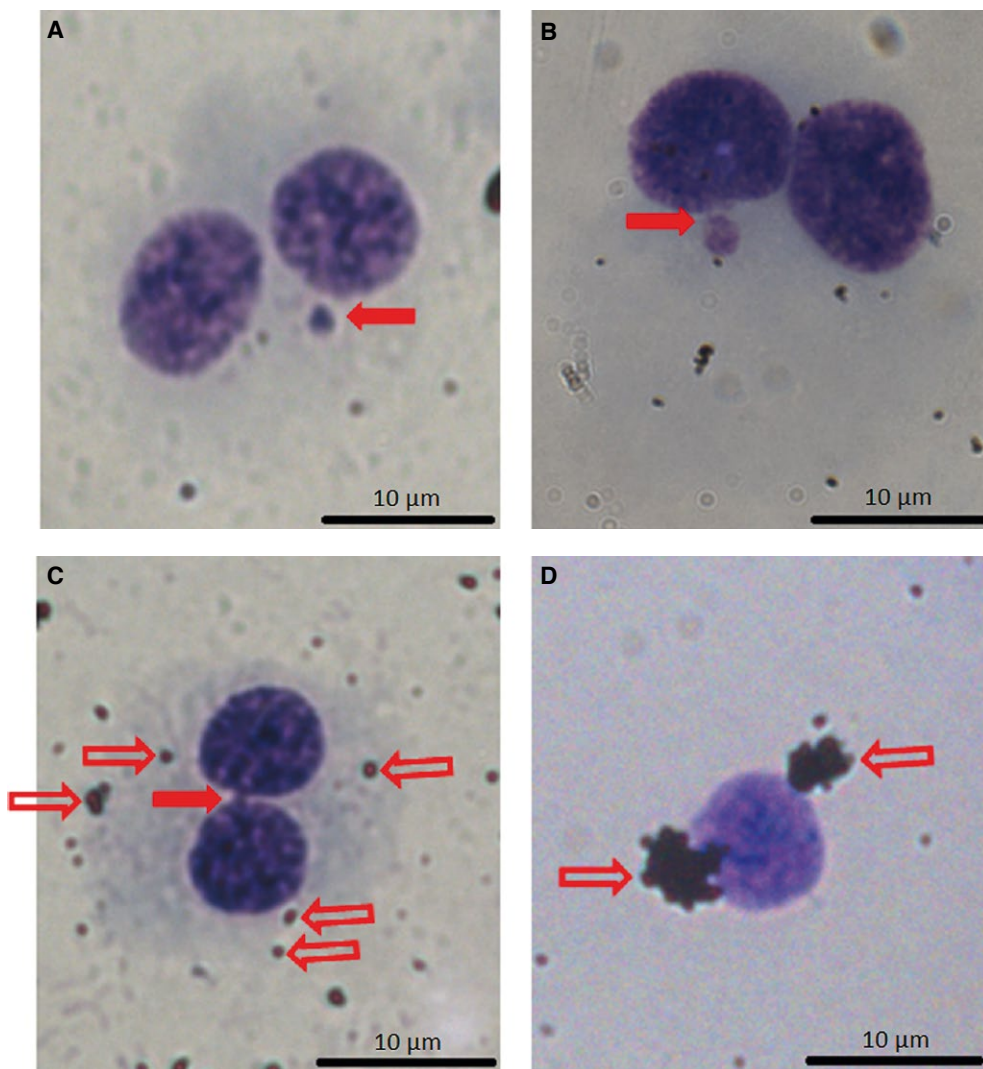
Souhrn nejzajímavějších výsledků

Při testování toxicity dvou typů grafenů (GP1 a GP2; koncentrace 60, 30 a 5 µg/ml; délka expozice 40 hodin) vůči buněčné linii THP-1 jsme metodou CBMN nezaznamenali významný cytostatický potenciál ani jednoho z nich. Ve všech případech se parametry cytostatického potenciálu pohybovaly do 20 % negativní kontroly.⁷

Měření cytostatického potenciálu se zdá být citlivější než klasické metody hodnocení cytotoxického efektu NM, založené na detekci poškození buněčné membrány (například test LDH nebo test trypanové modři) či na metabolické aktivitě buněk (například WST-1 nebo MTT). V případě detekce cytostatického (antiproliferačního) potenciálu jsou buňky živé, mají

intaktní buněčnou membránu a jsou metabolicky aktivní. Nejsou však schopné efektivního jaderného (buněčného) dělení, případně dochází i k prodloužení buněčného cyklu (což může být způsobeno i nutností reparace poškozené DNA). Buňky také mohou být poškozeny méně závažným způsobem a k jejich smrti dojde až v delším časovém horizontu.

Akumulace NM, zejména pokud se jedná o NM nebiodegradabilní, může významně narušovat normální mitotický proces. Při stejném experimentu (GP1, GP2 viz výše) byl zaznamenán na dávce závislý nárůst poškození DNA, zejména nárůst počtu BNC s MN, NBUD



Obrázek 38. Příklady poškození DNA; (A) binukleární buňka (BNC) s mikrojádroem (plná šipka); (B) BNC s jaderným pupenem (NBUD) spojeným s hlavním jádrem tenkou stopkou (plná šipka); (C) BNC s nukleoplasmatickým můstkem (NPB; plná šipka) a malými agregáty GP v cytoplasmě (na buněčném povrchu; prázdné šipky); (D) jádro bez cytoplasmy během CBMN obklopené shluky GP (prázdné šipky)

i NPB, který již dosahoval statistické významnosti. Bazální poškození DNA buněčné linie (vhodné pro testování genotoxického potenciálu) by se mělo pohybovat do 2 %.⁷ V našem případě se počet BNC s MN pohyboval v průměru kolem 0,6 % (v maximu kolem 0,9 %). Můžeme tedy předpokládat, že námi použitá THP-1 buněčná linie je vhodná pro testování genotoxicity NP. Nejnižší koncentrace s pozorovaným genotoxickým potenciálem (*lowest observed genotoxic effect level*; LOGEL) byla pro GP1 nad 5 µg/ml a pro GP2 30 µg/ml.

V případě testovaných GP1 a GP2 se domníváme, že mezi mechanismy poškození DNA může být zařazena přímá interakce GP s jaderným materiálem (odkrytým během buněčného dělení), narušení jaderného dělení vlivem epigenetických mechanismů a/nebo účinek na cytoskelet buňky a mitotický aparát. Interakce s jaderným materiálem či cytoskeletem buňky vede ke zvýšení počtu BNC s NBDU; interakce s jaderným materiálem zase přispívá k nárůstu počtu BNC s NPB.

Nevýznamně vyšší počty sledovaných genotoxických parametrů byly zaznamenány v případě GP1 (menší částice). Lze se domnívat, že genotoxicita u testovaných GP bude záviset jak na dávce, tak i na velikosti částic.

Příklady hodnocených nálezů poškození DNA zobrazuje Obrázek 38. V popisovaném experimentu (GP1 a GP2) jsme pozorovali, že jádra bez cytoplazmy jsou častěji obklopena shluky GP než jádra s cytoplazmou (Obrázky 38c a 38d). Je otázkou, zda shluky GP kolem jaderné membrány jsou příčinou, či naopak následkem ztráty cytoplazmy.

KOMETOVÝ TEST (TEST GENOTOXICITY)

Teoretický základ metodiky

Kometový test (*comet assay*, CA, *single cell gel electrophoresis*) je metoda používaná k detekci poškození (zlomů) DNA v jádrech.⁹ Jedná se o všestranně využitelnou, relativně jednoduchou a citlivou metodu, která je (v závislosti na své variantě) schopná detekovat jednořetězcové i dvouřetězcové zlomy DNA, „alkali“ labilní (apurinová/apyrimidinová) místa DNA, nekompletní reparaci DNA, oxidované purinové či pyrimidinové báze, „cross-link“ vazby a apoptické buňky.^{8,9}

Po lýze buněčné a jaderné membrány v solném roztoku dochází vlivem elektroforetického procesu k migraci fragmentů DNA z jádra („hlavy“) do pytlovitého útvaru za jádrem („ohonu“). Po vizualizaci vhodným barvivem vznikne typický obraz komety (čím více je DNA fragmentovaná, tím je „ohon“ mohutnější). Při neutrálním pH lze detekovat pouze dvouřetězcové zlomy DNA, při vyšším („alkalickém“) pH jsou detekovány i zlomy jednořetězcové.^{8,9}

CA umožňuje detekovat jemnější poškození DNA než CBMN, je ovšem nutno brát v úvahu, že poškození DNA je většinou rychle reparováno bez patologických následků pro buňku. V případě neúspěšné reparace dochází ke vzniku permanentní mutace nebo ke spuštění apoptotických mechanismů vedoucích ke smrti buňky.

Podrobnější popis metodiky

Expozice buněk vybraným NM probíhala obdobně jako u CBMN. Byly zvoleny tři koncentrace NM bez významného cytotoxického účinku. Pro každou testovanou koncentraci

(a pozitivní kontrolu) byly kultury nasazeny v duplikátech, pro negativní kontrolu v tetraplikátech. Experiment byl opakován třikrát.

Příprava podložních skel zahrnovala jejich vyvaření po dobu 30 minut ve směsi peroxidu vodíku a vody (1:10). Po oschnutí ve svislé pozici (po dobu nejméně 3 hodin) byla na 10 vteřin ponořena do podkladové agarózy (1% roztok standardní agarózy v třikrát destilované vodě) o teplotě 95 °C. Přebytek agarózy ze spodní strany skla byl ořen a skla byla uložena na vodorovnou podložku na dosušení (60 °C po dobu 60 minut).

Po zchladnutí (nejlépe druhý den od dosušení) skla rozložíme na chladicí podložku, aplikujeme 85 µl agarózy s vysokou teplotou tání (1% roztok agarózy v PBS) a ihned přikryjeme krycím sklíčkem. Krycí sklíčko odstraníme po úplném ztuhnutí agarózy (neklade odpor při snímání). Takto připravená potažená podložní skla lze skladovat v chladu (v boxu na mikroskopické preparáty) po dobu maximálně jednoho měsíce.

Ke zpracování vzorků je třeba připravit řadu roztoků. Jedná se o PBS pufr skládající se z 8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,2 g KH_2PO_4 a 2,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Po navážení jednotlivých složek se přidá 800 ml vody, pH se upraví na 7,4 a voda doplní do 1000 ml. Lyzační roztok se připraví z 146,0 g NaCl; 29,2 g EDTA; 1,2g Tris a vody. Následně se pH upraví na 10 a doplní se do 1000 ml vodou. V den pokusu se přidá na 100 ml lyzačního roztoku 1 ml Tritonu X-100. Elektroforetický roztok se skládá z 24 g NaOH a 4 ml 0,5M EDTA doplněných do 2000 ml dvakrát destilovanou vodou. Neutralizační roztok se připraví ze 48,5 g Tris a vody. Po úpravě pH na 7,5 se doplní vodou do 1000 ml vodou. Barvicí roztok ethidium bromidu se připravuje z 250 µl zásobního roztoku (2 mg ethidium bromidu v 5 ml vody) a 6 ml vody. Ve všech roztocích, pokud není vedeno jinak, se používá pouze třikrát destilovaná voda (roztoky jsou uchovávány v chladu).

Po skončení expozice v délce trvání 1,5 až 2 buněčných cyklů jsou buňky odstředěny (300 × g, 5 min), spočítány pomocí Bürkerovy komůrky a naředěny na koncentraci 8×10^5 buněk/ml. Objem 35 µl této buněčné suspenze je smíchán s 85 µl agarózy s nízkou teplotou tání (1% roztok agarózy v PBS) při teplotě 38 °C a následně je 85 µl této směsi aplikováno na předem připravená podložní skla potažená agarózami (skla jsou položena na vodorovné chladicí podložce). Kapku agarózy s buňkami ihned přiklopíme krycím sklíčkem (sklíčka opatrně sejmeme po ztuhnutí agarózy – nekladou odpor při pokusu o sejmutí). Tento a následující kroky doporučujeme provádět v zatemněné místnosti při žlutém či oranžovém světle k minimalizaci arteficiálního poškození DNA.

Skla s aplikovanou buněčnou suspenzí v agaróze umístíme do skleněných barvicích kyvet typ Hellendahl, do kterých nalijeme 100 ml lyzačního roztoku s 1 ml Tritonu X-100 (přidáním těsně před nalitím do kyvet), a necháme 60 minut lyzovat v chladu. Po dokončení lýzy roztok vylijeme, podložní skla s buněčnou suspenzí v agaróze přemístíme do elektroforetického tanku (umístěného v chladu), naplněného chlazeným elektroforetickým roztokem (sklíčka na okraji lze přimáčknout skleněnou tyčinkou, aby „neplavala“). Následně po dobu 40 minut necháme „rozplétat“ DNA; po ukončení rozplétání proběhne elektroforéza (25 V, 300 mA, 30 min).

Po dokončení elektroforézy sklíčka vyjmeme z elektroforetického tanku, umístíme do kyvet typ Hellendahl, nalijeme 100 ml chlazeného neutralizačního roztoku a necháme reagovat po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Tento (neutralizační) krok opakujeme třikrát. Následně skla opláchneme při laboratorní teplotě v třikrát destilované vodě (vždy po dobu 5 minut). Nakonec skla rozložíme na filtrační papír agarózou nahoru a necháme uschnout při laboratorní teplotě (nejlépe do druhého dne). Před analýzou je nutno provést rehydrataci

skel v třikrát destilované vodě (v kyvetě typ Hellendahl, 60 min) a aplikovat na jejich povrch 20 µl barvicího roztoku ethidium bromidu (preparát nakonec přikryjeme krycím sklíčkem). Mikroskopická analýza se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu s CCD kamerou (200násobné zvětšení s použitím zeleného excitačního filtru, excitace 510–550 nm, emise 590 nm) a softwaru MetaSystems CometImager.

Výsledky analýzy jsou vyjádřeny jako průměrný procentuální obsah DNA v ohonu komety (% tail DNA; % tDNA; 50 hodnocených komet v každém vzorku). Hodnota udává, kolik procent DNA migrovalo z „hlavy“ komety do „ohonu“. Parametr je považován za velmi užitečný pro kvantitativní hodnocení poškození DNA (nabývá hodnot 0–100 %) a vyznačuje se nízkou variabilitou výsledků v různých studiích.^{10,11}

Použitelnost metodiky pro testování NM

Poškození DNA lze pomocí CA detekovat v suspenzi kvasnic, protozoálních, rostlinných i živočišných buněk (bezobratlí i obratlovci), a to jak dělicích se, tak i nedělicích se buněk.^{8,12} Z uvedeného plyne velká univerzálnost metodiky a možnost testovat i účinky NM na buněčné kultury (*in vitro*) a buňky tkání (*in vivo*).

Pravděpodobně nejvhodnější je vyjádření výsledku analýzy v podobě mediánu nebo aritmetického průměru celého vzorku, který by měl být hodnocen v duplikátu.¹⁰ Automatické či semiautomatické systémy analýzy obrazu obvykle udávají parametry, jako jsou délka ohonu (*tail length*; µm) a moment ohonu (*tail moment*; součin % DNA migrované v ohonu a vzdálenosti DNA migrace v ohonu).¹¹ Pojem délka ohonu je ovšem poněkud zavádějící, protože tato hodnota je ovlivněna jak podmínkami elektroforézy, tak i místem, odkud je měřena (jako výchozí bod se používá jak střed hlavy, tak i místo přechodu hlavy v ohon).^{10,13}

CA je metoda finančně nenáročná. V porovnání s CBMN a testem chromozomálních aberací (ABC) je však náročnější na laboratorní vybavení (fluorescenční mikroskop, CCD kamera a speciální SW pro vyhodnocení) a na množství laboratorní práci. Metoda je citlivá na čistotu materiálu a kvalitu vody (ve většině kroků je zapotřebí třikrát destilované vody). Vliv na kvalitu výsledků má i stáří podložních skel (neměla by být starší než dva roky od data výroby). DNA bez jaderného obalu a buněčných komponent (po lyzačním kroku) je citlivá k arteficiálnímu poškození modrou složkou denního světla a bílým zářivkovým světlem.¹² Z tohoto důvodu je nutné metodu provádět v zatemněné (a nejlépe i chlazené) místnosti při osvětlení žlutooranžovým světlem (při červeném světle se zhoršuje přesnost laboratorní manipulace).

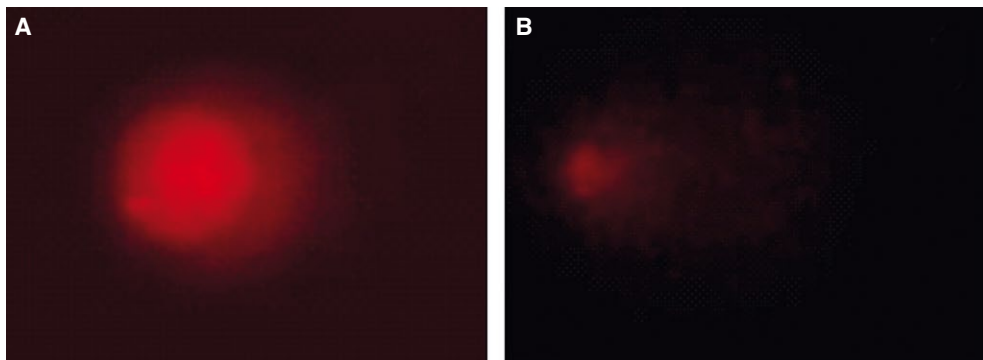
Metodou nelze určit velikost fragmentů DNA, nicméně lze předpokládat, že větší fragmenty by měly migrovat dále od hlavy komety.⁸ Problémem může být replikace buněk během elektroforézy. Za alkalických podmínek se replikační vidlice chovají jako jednořetězcové zlomy, což zvyšuje množství DNA v ohonu komety. Za neutrálních podmínek dochází naopak k snížení migrace DNA do ohonu.⁸ U buněk s velmi dobře strukturovanou cytoplazmou (epiteliální buňky) se může projevit snížená efektivita lýzy. V těchto případech je pro lýzu nutné použít proteáz, které však na druhou stranu mohou ovlivňovat výsledek testu.¹⁴

Zatím nebyl uspokojivě popsán vztah mezi rozsahem poškození DNA (sledovaného v CA) a jeho biologickým dopadem.⁸ Omezení metody představuje i klesající senzitivita testu při nárůstu počtu zlomů DNA nad 10 000 na diploidní savčí buňku.⁸

Použití automatické analýzy snižuje pravděpodobnost lidských chyb, na druhou stranu však může být zdrojem chyb dalších. Jedná se například o situace, kdy shluky NM imitují buňky. Rovněž jev zhášení fluorescence některými NM může při použití automatické analýzy vést ke zkreslení výsledků. Tato rizika lze snižovat semiautomatickou analýzou vzorků. Závěrem je nutno zmínit dosud neúspěšnou standardizaci metody (různé laboratoře používají její různé modifikace), což vede ke značné interlaboratorní variabilitě výsledků a nemožnosti jejich přímého porovnání.¹⁴

Souhrn nejzajímavějších výsledků

Obrázek 39 zachycuje nálezy CA z experimentů s grafenem. Z výsledků vyplývá, že test by mohl být použitelný pro hodnocení genotoxického potenciálu NM vůči THP-1 buněčné linii. Protože jsme si vědomi nejistot souvisejících s možností zhášení fluorescence grafenovými plátky, byly souběžně s expozicí grafenu provedeny i expozice třem formám nanočástic oxidu titaničitého. Výsledky expozic THP-1 oxidu titaničitému potvrdily závěry z expozic THP-1 grafenu týkajících se použitelnosti testu CA pro hodnocení genotoxických účinků NM.

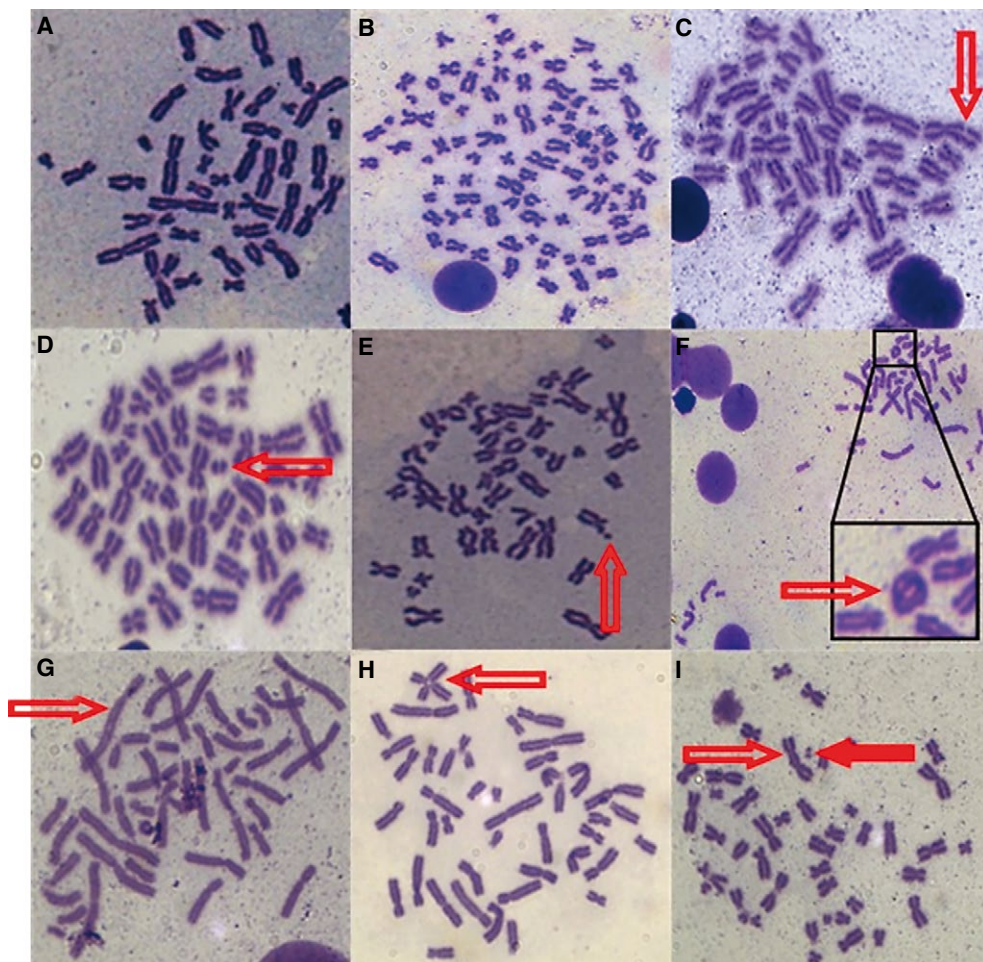


Obrázek 39. Příklady výstupů kometového testu: (A) buněčné jádro (nukleotid) s 10 % jaderného obsahu uvolněného do „ohonu“; (B) nukleotid se 40 % jaderného obsahu uvolněného do „ohonu“

TEST CHROMOZOMÁLNÍCH ABERACÍ (TEST GENOTOXICITY)

Teoretický základ metodiky

Jako chromozomální aberace (ABC) jsou označovány změny struktury a/nebo počtu chromozomů. Mohou se objevovat spontánně nebo být indukovány expozicí chemickým či fyzikálním faktorům.¹⁵ ABC lze pozorovat v dělicích se buňkách. Dělení je v této fázi cyklu (metafáze) zastaveno pomocí mitotického jedu colcemidu, který naruší dělicí vřeténko.¹⁶ Po obarvení preparátů roztokem Giemsa-Romanowski lze analyzovat stav chromozomů a studovat jejich strukturální aberace, jako jsou zlomy, gapy, acentrické fragmenty, dicentrické chromozomy či výměny a rovněž numerické aberace, tedy změny v počtu chromozomů.¹⁷ Na



Obrázek 40. Ukázky aberací chromozomů lidských monocytů po expozici látkám s genotoxickým účinkem; (A) normální mitotická buňka, (B) polyploidní buňka, (C) zlom (označen šipkou), (D) dvojitý fragment (označen šipkou), (E) minute (označeno šipkou), (F) prstenčitý (ring) chromozom (označen šipkou), (G) translokace (označeno šipkou), (H) mezichromozomová výměna (označeno šipkou), (I) dicentrický chromozom (označeno prázdnou šipkou) a dvojitý fragment (označeno plnou šipkou)

Obrázku 40 jsou ukázky aberovaných chromozomů lidských monocytů po expozici látkám s genotoxickým účinkem.

Podrobnější popis metodiky

Expozice buněk vybraným NM probíhá jako v případě CBMN. Rovněž je nutné volit alespoň tři koncentrace NM bez významného cytotoxického účinku. Pro každou testovanou koncentraci a pozitivní kontrolu by kultury měly být nasazeny v duplikátu, pro negativní kontrolu

v tetraplikátu. Experiment je vhodné opakovat třikrát. Podložní skla před aplikací vzorku jsou připravována identickým způsobem jako v případě CBMN.

Po ukončení primární expozice (kultivace) NM je k buňkám přidán roztok colcemidu o koncentraci 0,24 µg/ml kultury a kultivace pokračuje další 1,5 až 3 hodiny v závislosti na délce buněčného cyklu použité buněčné kultury (u THP-1 po dobu dalších 2 hodin). Před aplikací colcemidu lze zařadit vymývací krok k odstranění NM obdobně jako u CBMN. Po ukončení kultivace jsou buňky odstředovány (300 × g; 3 min), supernatant je odstraněn a buňky jsou ve třech krocích fixovány (v digestoři). Mezi každým fixačním krokem se provádí odstředění (300 × g; 3 min) a odstranění supernatantu. V prvním fixačním kroku je použito 92 ml demineralizované vody, 3 ml metanolu a 5 ml ledové kyseliny octové.

V druhém fixačním kroku je použit pouze metanol a ve třetím roztok metanolu a ledové kyseliny octové (3:1). Roztoky obsahující metanol a ledovou kyselinu octovou je nutné po přípravě uchovávat v lednici. Roztoky jsou připravovány těsně před zahájením zpracování vzorků. Po třetím fixačním kroku následuje opět odstředění (300 × g; 3 min) a odstranění supernatantu s výjimkou cca 1 ml nad peletou, ve kterém je buněčná peleta resuspendována. Následně je suspenze nakapána na dvě vychlazená, navlhčená, vodorovně uložená podložní skla a ponechána uschnout přes noc při laboratorní teplotě. Následující den jsou vzorky obarveny 5% roztokem Giemsa-Romanowski (po dobu 5 minut), opláchnuty pod tekoucí vodou a v demineralizované vodě a po uschnutí uloženy do boxu na mikroskopické preparáty. Skladování preparátů je možné při laboratorní teplotě.

Analýza ABC je prováděna pomocí světelného mikroskopu s použitím imerzního oleje (100násobné zvětšení). Je hodnoceno 100 dobře rozestoupených mitotických metafázických buněk. K hodnocení jsou používána skórovací kritéria AHEM 2007.¹⁶

Použitelnost metodiky pro testování NM

Analýza ABC je metoda poměrně levná a její materiální a přístrojová náročnost je srovnatelná s CBNM. Výhodou je standardizace provedení testu, využitelnost v epidemiologických studiích s použitím periferních lymfocytů a rovněž standardizace bazální hladiny poškození DNA periferních lymfocytů v české populaci.^{16,18}

Analýza ABC je náročná na laboratorní práci, čas, a zejména zkušenosti hodnotitele. Z tohoto důvodu se ustupuje od vyjádření výsledků analýzy ve formě konkrétních poškození (například počtu zlomů, fragmentů a dicentrických chromozomů na 100 buněk) a upřednostňuje se vyjádření počtu aberovaných buněk na 100 metafázických buněk bez bližší specifikace.¹⁹ Gapy se do celkového počtu aberovaných buněk nezahrnují, ale lze je prezentovat jako samostatnou kategorii na 100 metafázických buněk.¹⁶ Při detekci numerických aberací je standardní verze testu vhodná pouze pro hodnocení polyploidii. Při analýze aneuploidii může docházet k nadhodnocení v důsledku arteficiální ztráty chromozomů při zpracování.¹⁹

Automatické vyhodnocování preparátů je komplikované a může být zatíženo značnou chybou. Vhodnějším se zdá být semiautomatické vyhodnocení pomocí vyhledávací metafázických buněk a dicentrických chromozomů.¹⁵ Analýza ABC je ve srovnání s jinými metodami detekce poškození DNA poměrně málo citlivá, nicméně je stále používána při hodnocení akutních (nárazových) expozic (například radiační nehody) nebo rizikových subchronických a chronických expozic, zahrnujících dlouhodobé pracovní vystavení karcinogenům a/ nebo ionizujícímu záření.^{20,21} Nevýhodou analýzy ABC je její neuniverzálnost, zejména pro

buněčné linie s variabilním počtem chromozomů. Použití analýzy ABC pro testování genotoxického potenciálu NM komplikuje možnost překrytí metafazických chromozomů shluky NM (zejména při použití vyšších koncentrací). Problémem může rovněž být záměna malých shluků NM za minutu (Obrázek 40). Analýzu ABC nepovažujeme za vhodnou pro testování genotoxického potenciálu uvedených NM na použitých buněčných liniích, protože obě linie vykazovaly vysoký bazální počet aberovaných buněk (přes 50 %).

V jedné metafazické buňce buněčné linie THP-1 bylo nalezeno maximálně 48 chromozomů (centromer). THP-1 buněčná linie je považována v současnosti za téměř diploidní buněčnou linii s 49 chromozomy, ale původně byla popsána jako diploidní linie s karyotypem 46 XY.^{22,23} Někteří autoři uvádějí, že linie získané z různých zdrojů se mohou mírně odlišovat.²⁴ THP-1 buněčná linie tedy není vhodná pro hodnocení numerických aberací, kvůli nestabilnímu počet chromozomů, ani pro hodnocení strukturálních aberací, kvůli přítomnosti minimálně jednoho zlomu v každé druhé hodnocené metafazické buňce. Linie by byla použitelná, pokud by se výsledek udával jako počet zlomů a dalších nálezu na 100 hodnocených metafazických buněk. Od tohoto hodnocení se však obecně upouští pro velkou variabilitu i mezi zkušenými hodnotiteli.¹⁹ Z obdobných důvodů není ABC vhodný pro A549 buněčnou linii, která je hypotriploidní (počet chromozomů se pohybuje kolem 66) a vykazuje vysoký bazální počet mutací.²⁵

Souhrn nejzajímavějších výsledků

ABC se ukázal být nevhodným pro použití na buněčné linii THP-1. Nejčtenější počet centromer (chromozomů) v jedné metafazické buňce byl u námi použité linie 48. THP-1 buněčná linie je považována v současnosti za téměř diploidní buněčnou linii s 49 chromozomy, ale původně byla popsána jako diploidní linie s karyotypem 46 XY.^{22,23} Rovněž se dochází k závěru, že se linie získaná z různých zdrojů mírně odlišuje.²⁴ U námi použité linie jsme zachytili vysoký bazální počet aberovaných buněk (přes 50 %). Proto bylo rozhodnuto, že ABC je nevhodný test pro THP-1 buněčnou linii. Z obdobných důvodů není ABC vhodný pro A549 buněčnou linii, která je hypotriploidní (počet chromozomů se pohybuje kolem 66) a vykazuje rovněž vysoký bazální počet mutací.²⁵ ABC zůstává však významným testem s použitím periferních lymfocytů, zejména pak v epidemiologických studiích, společně s CBMN a CA.

LITERATURA

1. Sabharwal R, Verma P, Syed MA et al. Emergence of Micronuclei as a Genomic Biomarker. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2015;36(4):212–218. doi:10.4103/0971-5851.171541.
2. Ruiz-Ruiz B, Arellano-García ME, Radilla-Chávez P et al. Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Human Lymphocytes as a Sensitive Tool for Cytotoxicity/Genotoxicity Evaluation of AgNPs. *ACS Omega.* 2020;5(21):12005–12015. doi:10.1021/acsomega.0c00149.
3. Fenech M. Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay. *Nat Protoc.* 2007;2(5):1084–1104. doi:10.1038/nprot.2007.77.
4. Komárek L. Standardní operační postupy pro biologické monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí. *Acta Hyg Epidemiol Microbiol.* Praha, Česká republika: Státní zdravotní ústav; 2003. 190 s. ISBN: 0862-5956.

5. Hayashi M. The Micronucleus Test Most Widely Used In Vivo Genotoxicity Test. *Genes Environ.* 2016;38:18. doi:10.1186/s41021-016-0044-x.
6. Gonzalez L, Sanderson BJ, Kirsch-Volders M. Adaptations of the In Vitro MN Assay for the Genotoxicity Assessment of Nanomaterials. *Mutagenesis.* 2011;26(1):185–191. doi:10.1093/mutage/geq088.
7. Burgum MJ, Clift MJD, Evans SJ et al. Few-Layer Graphene Induces Both Primary and Secondary Genotoxicity in Epithelial Barrier Models In Vitro. *J Nanobiotechnology.* 2021;19(1):24. doi:10.1186/s12951-021-00769-9.
8. Olive PL, Banáth JP. The Comet Assay: A Method to Measure DNA Damage in Individual Cells. *Nat Protoc.* 2006;1(1):23–29. doi:10.1038/nprot.2006.5.
9. OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. 2023. doi:10.1787/9789264264861-en.
10. Møller P. Assessment of Reference Values for DNA Damage Detected by the Comet Assay in Human Blood Cell DNA. *Mutat Res.* 2006;612(2):84–104. doi:10.1016/j.mrrev.2005.10.001.
11. Collins A, Koppen G, Valdiglesias V et al. The Comet Assay as a Tool for Human Biomonitoring Studies: The ComNet Project. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2014;759:27–39. doi:10.1016/j.mrrev.2013.10.001.
12. Dvořák M, Matejovičová M. Principy a využití kometové analýzy při detekci poškození DNA. *Chem Listy.* 2008;102:977–983.
13. Dusínská M, Collins AR. The Comet Assay in Human Biomonitoring: Gene-Environment Interactions. *Mutagenesis.* 2008;23(3):191–205. doi:10.1093/mutage/gen007.
14. Afanasieva K, Sivolob A. Physical Principles and New Applications of Comet Assay. *Biophys Chem.* 2018;238:1–7. doi:10.1016/j.bpc.2018.04.003.
15. Mateuca RA, Decordier I, Kirsch-Volders M. Cytogenetic Methods in Human Biomonitoring: Principles and Uses. *Methods Mol Biol.* 2012;817:305–334. doi:10.1007/978-1-61779-421-6_15.
16. Rössner P, Bavorová H, Očadlíková D. Metody biologického monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí: Cytogenetická analýza periferních lymfocytů: Aktualizace platné standardní metodiky (Příloha AHEM 20/89). *Acta Hyg Epidemiol Microbiol.* Praha, Česká republika: Státní zdravotní ústav; 2000. 27 s.
17. Grujičić D, Radović M, Arsenijević S, Milošević-Djordjević O. Cytogenetic Biomarkers in Detection of Genotoxic Effects of Gestagens in Peripheral Blood Lymphocytes In Vitro and In Vivo. *Eur J Med Genet.* 2016;59(12):624–633. doi:10.1016/j.ejmg.2016.10.009.
18. Cerná M, Krsková A, Cejchanová M, Spěváčková V. Human Biomonitoring in the Czech Republic: An Overview. *Int J Hyg Environ Health.* 2012;215(2):109–119. doi:10.1016/j.ijheh.2011.09.007.
19. Registre M, Proudlock R. The In Vitro Chromosome Aberration Test. In: *Genetic Toxicology Testing: A Laboratory Manual.* Boston, MA: Academic Press; 2016:207–267. doi:10.1016/B978-0-12-800764-8.00007-0.
20. Natarajan AT. Chromosome Aberrations: Past, Present and Future. *Mutat Res.* 2002;504(1–2):3–16. doi:10.1016/s0027-5107(02)00075-1.
21. Tichy A, Kabacik S, O'Brien G et al. The First In Vivo Multiparametric Comparison of Different Radiation Exposure Biomarkers In Human Blood. *PLoS One.* 2018;13(2):e0193412. doi:10.1371/journal.pone.0193412.
22. Odero MD, Zeleznik-Le NJ, Chinwalla V, Rowley JD. Cytogenetic and Molecular Analysis of the Acute Monocytic Leukemia Cell Line THP-1 with an MLL-AF9 Translocation. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000;29(4):333–338. doi:10.1002/1098-2264(2000)9999:9999::AID-GCC1040>3.0.CO;2-Z.
23. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and Characterization of a Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line (THP-1). *Int J Cancer.* 1980;26(2):171–176. doi:10.1002/ijc.2910260208.

24. Adati N, Huang MC, Suzuki T, Suzuki H, Kojima T. High-Resolution Analysis of Aberrant Regions in Autosomal Chromosomes in Human Leukemia THP-1 Cell Line. *BMC Res Notes*. 2009;2:153. doi:10.1186/1756-0500-2-153.
25. Peng KJ, Wang JH, Su WT, Wang XC, Yang FT, Nie WH. Characterization of Two Human Lung Adenocarcinoma Cell Lines by Reciprocal Chromosome Painting. *Dongwuxue Yanjiu*. 2010;31(2):113–121. doi:10.3724/SP.J.1141.2010.02113.
26. 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.
27. 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.
28. Svadlakova T, Hubatka F, Masek J et al. Activation of NLRP3 inflammasome as a Key Indicator of Carbon Nanotubes Proinflammatory Potential. *Eur J Immunol*. 2019;49:601.

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	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 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	krysi 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

SUMMARY

The present book deals with the biomedical use of carbon nanomaterials (CNMs) and the evaluation of their potential health risks. The book was prepared following the results of the NanoBio project (ERDF project; OP VVV), as you can read in the preface of the book. The book is divided into a theoretical part which summarizes the information available to the authors about the biomedical use of carbon nanomaterials, their toxicokinetics, biological interactions, and potential danger (toxicity), and a practical part, which consists of the significant results of the NanoBio project. The appendix of the book is a set of optimized methodologies suitable for testing the hazard of selected CNMs.

CNMs have very specific physical and chemical properties, which significantly differentiate them from the character of the same chemical substances on the micro and macro scale. For this reason, they have found wide application in a number of manufacturing industries, including electronics, agriculture, food, cosmetics, pharmaceuticals, and medicine. Graphene, graphene oxide, carbon nanotubes, and fullerenes are currently the focus of interest in biomedicine. The biomedical use of CNMs is diverse and includes diagnostic areas (imaging, EEG, ECG, photoacoustic diagnostics, biomarkers and electrochemical biosensors) as well as therapeutic areas (adsorption, hemofiltration and hemodialysis, photodynamic and photothermal therapy, vaccination, drug transport, and gene therapy). The use of CNMs in the areas of regenerative medicine (biocompatible CNMs in orthopedics, cardiology, and dentistry) and in the area of radiation protection against X-ray radiation is also significant.

The effect of CNMs on biological systems depends on the structure of the materials, their surface physicochemical properties, application (exposure) routes, the nature of distribution in the organism, the method of penetration into the intracellular environment, and the mechanisms of induction of cellular toxicity. These factors modulate CNM interactions with cell membranes, cell internalization, and interference with cell functions. From the point of view of toxicokinetics, CNMs can interfere with all the main processes that influence the fate of xenobiotics in the organism (absorption, distribution, accumulation, biotransformation, and elimination).

The book describes the effects of CNM on the respiratory, cardiovascular, gastrointestinal, nervous, and genitourinary systems. The effect of CNM on the skin, eye, and genome of the developing fetus is also discussed in detail. Toxicity depends on the type of CNM, dose and duration of exposure. Some tissues are more sensitive to CNMs and, in their presence, undesirable damaging effects are induced, such as increased oxidative stress, induction of chronic inflammation, damage to genetic information, cellular processes essential for cell life, which is also associated with the occurrence of malformations in fetuses. However, it is also necessary to mention that some tissues, such as the skin, are more resistant, and even

prolonged exposure may not cause damage. Some CNMs may even be protective, promoting cell proliferation and differentiation, and reducing oxidative stress. The effects of CNMs on cells are therefore very diverse.

The more significant results of the NanoBio project are commented on in the practical part of the book.

In the study “The Effect of Chronic Exposure of Graphene Nanoplates on the Viability and Motility of A549 Cells” (Šestáková et al.), the effect of graphene on the viability and motility of A549 cells (immortalized human lung adenocarcinoma cell line) was investigated. The experiment did not confirm a negative effect on these cells.

The publication “The Dose- and Time-Dependent Cytotoxic Effect of Graphene Nanoplatelets: In Vitro and In Vivo Study (Bavorová et al.) focused on the evaluation of graphene cytotoxicity against alveolar epithelial cells (PAEC) and on histopathological analysis of organs of male mice (C57Bl/6) after intratracheal and oral (acute and chronic) exposure to graphene. The results confirmed the presence of dose-dependent cytotoxic effects. Neither acute nor chronic oral exposure of mice induced pathological changes in the morphology of harvested organs (only thickening of the alveolar septa and local accumulation of graphene in the endocardium were found).

In the publications “Proinflammatory Effect of Carbon-Based Nanomaterials: In Vitro Study on Stimulation of Inflammasome NLRP3 via Destabilisation of Lysosomes” and “Carbon-Based Nanomaterials Increase Reactivity of Primary Monocytes Towards Various Bacteria and Modulate Their Differentiation into Macrophages” (Švadlákova et al.) the pro-inflammatory effect of unmodified CNMs on the monocyte-macrophage system as a key effector in the process of processing and elimination of nanomaterials in the organism was investigated. Changes in immune cell behavior were observed, although the CNMs used did not exert direct cytotoxic and pro-inflammatory effects. Therefore, it is possible to speculate that some CNMs with low or no cytotoxicity could be immunotoxic.

According to the publication “In Vitro Assessment of the Genotoxic Potential of Pristine Graphene Platelets” (Málková et al.), when THP-1 cells (a monocytic human cell line from the blood of a patient with acute leukemia) were exposed to graphene, there were no significant changes in cell viability or induction of oxidative stress. However, a dose-dependent increase in DNA damage was detected, probably due to direct interaction of graphenes with “naked” DNA during cell division and/or direct interaction of graphenes with the cytoskeleton and mitotic apparatus of the cells.

The set of optimized methodologies, which can be found in the appendix of the book, includes tests for cytotoxicity, genotoxicity, immunotoxicity, gene quantification, cell proliferation, adhesion, viability, and morphology, as well as histological analysis and transmission electron microscopy methodologies.

An equally important chapter is the preparation of new or modified methodologies for CNMs (in)security testing. A significant complication is the specific properties of nanoparticles (significantly different from the properties of solid forms of materials or their solutions) and the variability of the behavior of nanoparticles in the internal environment of organisms.

Finally, we would like to draw attention to the fact that a large part of the existing toxicological data have been obtained from acute and subacute experiments *in vitro* and *in vivo*. In the following phases of research, it is therefore necessary to focus on subchronic and chronic experiments (which correspond more closely to the real situation) and on epidemiological studies in the field of human exposures.