

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Doktorský studijní program

Lékařská imunologie

Nanočástice a jejich vliv na imunitní systém:

Studium prozánětlivého potenciálu vybraných karbonových nanomateriálů

Nanoparticles and Their Effect on the Immune System:

Study of the Proinflammatory Potential of Selected Carbon Nanomaterials

Mgr. Tereza Švadláková

Školitel: prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.

Školitel konzultant: prof. Ing. Zdeněk Fiala, CSc.

Prohlášení autora

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

Hradec Králové, 2022

Tereza Švadláková

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Janu Krejskovi, CSc. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady při zpracování disertační práce a dále prof. Ing. Zdeňku Fialovi, CSc. za odborné konzultace.

Dále bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Jaroslavu Turánkovi, CSc. a celému kolektivu z Oddělení farmakologie a toxikologie, Výzkumného ústavu veterinárního lékařství za poskytnuté zázemí a odbornou pomoc v úvodní fázi experimentální práce, zejména pak MVDr. Pavlu Kulichovi, PhD. za pomoc a odbornou asistenci při provedení transmisní elektronové mikroskopie a Mgr. Františku Hubatkovi za pomoc při řešení přípravy suspenzí nanomateriálů.

Díky patří též Dr. Ing. Janu Macákovi z Centra materiálů a nanotechnologií, Fakulty chemicko-technologické, Univerzity Pardubice za zprostředkování detailní charakterizace nanomateriálů a dále Dr. Adrielu Prina-Mellovi a prof. Yurimu Volkovovi z Oddělení klinické medicíny, Trinity College Dublin za cenné rady a spolupráci během mé zahraniční stáže na Trinity College Dublin v Irsku.

V neposlední řadě děkuji také prof. RNDr. Ctiradu Andrysovi, PhD., Mgr. Martině Koláčkové, PhD. a všem kolegům z Ústavu Klinické imunologie a alergologie za četné konzultace a přátelské zázemí během celé práce.

Tato práce vznikla za podpory programu PROGRES Q40/10 a projektu MŠMT: 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 financovaného z EFRR.

OBSAH

Seznam zkratk	8
Souhrn	11
Summary	12
1. Úvod	13
1.1. Nanomateriály a nanočástice	13
1.1.1. Rozdělení NPs a NMs	13
1.2. Karbonové nanomateriály (CNMs)	15
1.2.1. Grafen	16
1.2.2. Karbonové nanotrubičky (CNTs)	18
1.2.3. Biomedicínské aplikace CNMs	19
1.2.4. Vstup CNMs do organismu	20
1.3. Imunotoxicita CNMs	21
1.3.1. Role kontaminace	22
1.3.2. Rozpoznání a vstup CNMs do buněk imunitního systému	23
1.3.3. Profesionální fagocyty	24
1.3.4. THP-1 buněčná linie	26
1.3.5. Záněť jako hlavní mechanismus imunotoxicity	27
2. Cíle práce	31
3. Materiál a metody	32
3.1. CNMs a jejich charakterizace	32
3.1.1. Optimalizace stabilizace nanomateriálů v suspenzi	32
3.1.2. Příprava suspenzí	33
3.1.3. Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)	33
3.1.4. Dynamický rozptyl světla (DLS)	34
3.1.5. Zeta potenciál	34
3.1.6. Biologická kontaminace	34
3.2. Buněčné populace	35

3.2.1.	Kultivace a uchovávání buněčných linií	36
3.2.2.	Izolace monocytů	37
3.2.3.	Stanovení čistoty izolace monocytů	38
3.3.	Expozice CNMs.....	39
3.3.1.	Intracelulární lokalizace CNMs pomocí TEM	40
3.3.2.	Hodnocení cytotoxicity CNM stanovením uvolnění LDH	41
3.3.3.	Stanovení produkce cytokinů pomocí ELISA metody.....	41
3.3.4.	Stanovení alternativní aktivace NLRP3 pomocí detekce IL-1 β	41
3.3.5.	Stanovení kanonické aktivace NLRP3 pomocí detekce IL-1 β	42
3.3.6.	Hodnocení poškození lysozomů pomocí detekce katepsinu B	43
3.3.7.	Hodnocení pyroptózy pomocí detekce HMGB1	43
3.4.	Hodnocení modulace imunitní funkce	44
3.4.1.	Stanovení modulace produkce cytokinů	44
3.4.2.	Stanovení fagocytární aktivity	45
3.4.3.	Hodnocení diferenciaci monocytů po expozici CNMs.....	46
3.5.	Statistické hodnocení	47
4.	Výsledky.....	48
4.1.	Charakterizace CNMs.....	48
4.1.1.	Velikost, tvar a náboj	48
4.1.2.	Biologická kontaminace CNMs	50
4.2.	Buněčná expozice CNMs	51
4.2.1.	Intracelulární lokalizace	51
4.2.2.	Cytotoxicita CNMs	52
4.2.3.	Produkce cytokinů.....	54
4.2.4.	Alternativní aktivace NLRP3 u primárních monocytů	55
4.2.5.	Kanonická aktivace NLRP3	55
4.2.6.	Uvolnění katepsinu B	58
4.2.7.	Pyroptóza.....	59

4.3.	Modulace imunitní funkce.....	60
4.3.1.	Modulace produkce cytokinů u THP-1 makrofágů.....	61
4.3.2.	Modulace fagocytární aktivity u THP-1 makrofágů	63
4.3.3.	Modulace produkce cytokinů u izolovaných monocytů.....	64
4.3.4.	Modulace fagocytární odpovědi u izolovaných monocytů	67
4.3.5.	Modulace diferenciaci izolovaných monocytů.....	68
5.	Diskuze.....	71
6.	Závěr.....	80
7.	Použitá literatura	82

SEZNAM ZKRATEK

AIM2	Absent in Myeloma 2
ANOVA	analýza rozptylu (Analysis of Variance)
AP	alkalická fosfatáza (Alkaline Phosphatase)
ASC	Apoptosis-Associated Speck-Like Protein
ATP	Adenosine Triphosphate
BCG	Bacille Calmette-Guérin
C	uhlík (carbon)
CARD	doména vázající kaspázu (Caspase Activation and Recruitment Domain)
CD	Cluster of Differentiation
CNFs	karbonová nanovlákná (Carbon Nanofibres)
CNMs	karbonové nanomateriály (Carbon-Based Nanomaterials)
CNTs	karbonové nanotubice (Carbon Nanotubes)
CVD	chemická depozice z plynné fáze (Chemical Vapor Deposition)
DAMPs	Danger-Associated Molecular Patterns
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DWCNTs	dvoustěnné karbonové nanotubice (Double-Walled Carbon Nanotubes)
EC	pHrodo™ Red <i>E. coli</i> BioParticles™
FADD	FAS-Associated Death Domain
FBS _{LE}	fetální bovinní sérum s nízkým obsahem endotoxinu
Fc	Fragment Crystallizable
FLG	několikvrstvý grafen (Few-Layer Graphene)
GO	grafen oxid
GPs	grafenové plátky (Graphene Platelets)
GSDMD	gasdermin d
GSDMD-N	N-koncový zbytek gasderminu d

HEK	Human Embryonic Kidney Carcinoma
HEPES	2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl) ethansulfonová kyselina
HK	teplem usmrčené (Heat-Killed)
HKEB	teplem usmrčené <i>Escherichia coli</i>
HKPA	teplem usmrčené <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
HKSA	teplem usmrčené <i>Staphylococcus aureus</i>
HMGB1	High-Mobility Group Box 1
IFN- γ	interferon gamma
IL	interleukin
LAL	Limulus Amoebocyte Lysate
LBP	LPS vázající protein (LPS Binding Protein)
LDH	laktát dehydrogenáza
LPS	lipopolysacharid
LRRs	Leucin Rich Repeats
MAMPs	Microbe-Associated Molecular Patterns
MD-2	Myeloid Differentiation Factor 2
MDP	muramyl dipeptid
MFI	Median Fluorescence Intensity
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MWCNTs	mnohostěnné karbonové nanotrubičky (Multi-Walled Carbon Nanotubes)
Nek7	NIMA Related Protein Kinase 7
NF- κ B	Nuclear Factor kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells
NLRP3	NOD-Like Receptor Family Pyrin Domain Containing 3
NLRs	Nod-like receptory
NMs	nanomateriály (Nanomaterials)
NOD	Nucleotide-Binding Oligomerization Domain
NPs	nanočástice (Nanoparticles)

PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PEG	polyethylenglykol
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PRRs	Pattern Recognition Receptors
PYD	pyrinová doména
ROS	reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
SEAP	Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase
SWCNTs	jednostěnné karbonové nanotrubic (Single-Walled Carbon Nanotubes)
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TLRs	Toll-like receptory
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alfa

SOUHRN

Karbonové nanomateriály (CNMs) disponují unikátními fyzikálně-chemickými vlastnostmi, díky kterým nachází potenciální uplatnění v průmyslu i medicíně. Společně s produkcí však rostou obavy o jejich působení na lidský organismus. Z toho důvodu jsou CNMs častým tématem toxikologických studií. Klíčovým krokem v objasnění jejich bezpečnosti je hodnocení vzájemné interakce se složkami imunitního systému, konkrétně schopnosti vyvolat zánět. U některých alotropů, např. nemodifikovaných derivátů grafenu, podstatné výsledky stále chybí nebo nejsou kompletní. Z těchto důvodů se tato disertační práce zabývá hodnocením prozánětlivého účinku dvou typů nemodifikovaných grafenových plátků (GPs), které obvykle vznikají jako meziproduct při zpracování dalších grafenových derivátů a do organismu mohou pronikat např. vdechutím. Pro srovnání práce zahrnuje hodnocení prozánětlivého účinku mnohostěnných karbonových nanotrubic (MWCNTs).

Profesionální fagocyty, především monocyty a makrofágy představují klíčové buňky ve zpracování a odstraňování cizorodých i tělu vlastních poškozených či abnormálních elementů. Vzhledem k tomu, že se zároveň jedná o hlavní mediátory zánětu, byly pro vlastní testování CNMs zvoleny buněčné modely založené na lidských primárních monocyttech a lidské monocytární linii THP-1 diferencované na makrofágy. U obou modelů byla pomocí transmisní elektronové mikroskopie potvrzena rychlá endocytóza všech CNMs. Životnost buněk byla hodnocena měřením úniku laktát dehydrogenázy (LDH) a HMGB1 (High-Mobility Group Box 1). Přímý prozánětlivý účinek byl hodnocen na základě aktivity inflamazomu NLRP3 a produkce IL-1 β . Aktivace NLRP3 kanonickou i alternativní cestou byla pozorována pouze v případě MWCNTs. Jako možný mechanismus byl mikroskopicky potvrzen únik katepsinu B nastalý v důsledku poškození lyzozomů. V případě GPs nebylo detekováno žádné narušení buněčné integrity ani akutní prozánětlivá aktivita. Potenciální inhibice zánětu byla vyvrácena souběžnou expozicí GPs s reprezentativním prozánětlivým stimulátorem. Naopak byla pozorována zesílená reaktivita, na jejímž základě byl dále hodnocen nepřímý prozánětlivý účinek pomocí stanovení modulace ve formě měření buněčné reaktivity vůči vybraným bakteriím. U předem exponovaných monocytů i THP-1 makrofágů CNMs byla hodnocena následná fagocytární aktivita pomocí mikroskopie a průtokové cytometrie a produkce IL-6, TNF- α a IL-10 pomocí ELISA metody nebo biologické eseje založené na reportérových buňkách. Součástí práce bylo též mikroskopické a cytometrické sledování vlivu CNMs na diferenciaci primárních monocytů. Výsledky práce potvrdily imunomodulační účinek u všech tří testovaných CNMs.

SUMMARY

Carbon-based nanomaterials (CNMs) have unique physical-chemical properties, which make them appropriate candidates for both industry and medicine. However along with production, there are growing concerns about their effects on human organism. For this reason, CNMs are frequent topic of toxicological studies. A key step in the clarification of their safety is to evaluate their interaction with the components of the immune system, particularly their ability to cause inflammation. For some allotropes e.g., pristine graphene derivatives, significant results are still missing or incomplete. For these reasons, this dissertation deals with the evaluation of the proinflammatory effect of two types of pristine graphene platelets (GPs), which represent common intermediate in the processing of other graphene derivatives, and which can penetrate to body via inhalation. For comparison, our work also includes an evaluation of the proinflammatory effect of multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs).

Professional phagocytes, particularly monocytes and macrophages represent key cells in processing and elimination of foreign and damaged or abnormal elements. Since phagocytes also represent main mediators of inflammation, we selected human primary monocytes and human monocytic cell line THP-1 differentiated in macrophages as a biological model for testing of CNMs. In both models, rapid endocytosis of all CNMs was confirmed by transmission electron microscopy. Cell viability was assessed via measurement of lactate dehydrogenase (LDH) and HMGB1 (High-Mobility Group Box 1) release. The direct proinflammatory effect was assessed by detection of NLRP3 inflammasome activity and IL-1 β production. Activation of NLRP3 by canonical and alternative pathways was observed only in the case of MWCNTs. As possible mechanism was microscopically detected Cathepsin B leakage caused by lysosome damage. In case of GPs, there was neither disruption of cell integrity nor acute inflammation. Potential inhibition of inflammation was denied by co-exposure of GPs with a representative proinflammatory stimulator. On the contrary, we observed an enhanced response, based on which we further evaluated a modulatory effect in the form of testing of cell reactivity against selected bacteria. Monocytes and THP-1 macrophages pre-treated by CNMs were subsequently analysed for phagocytic activity (using microscopy and flow cytometry) and for production of IL-6, TNF- α and IL-10 (using ELISA or reporter cell-based biological assays). The effect of CNMs on the differentiation of primary monocytes was monitored by microscopy and flow cytometry. Results confirmed immunomodulatory effect for all three CNMs.

1. ÚVOD

1.1. Nanomateriály a nanočástice

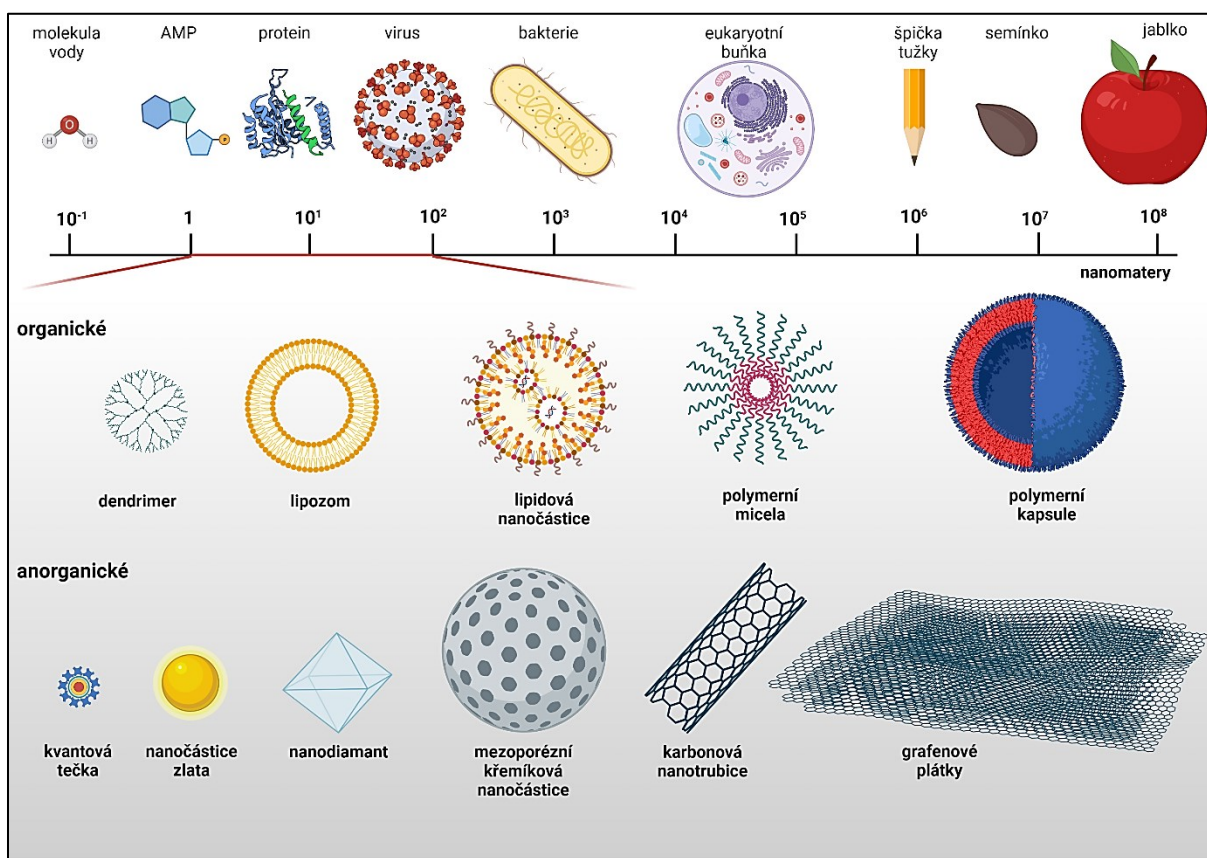
Nanomateriály (NMs, Nanomaterials) jsou objekty, jejichž jednotlivé stavební struktury disponují minimálně jedním vnějším rozměrem v nanoměřítku (obvykle 1–100 nm). Naproti tomu nanočástice (NPs, Nanoparticles) jsou objekty o třech vnějších rozměrech v nanoměřítku [1]. Díky tomu získávají NMs i NPs nové unikátní vlastnosti. Podstatou je přechod elektronů na vyšší energetickou hladinu v důsledku zkrácení své vlnové délky dle rozměrů částic (efekt kvantového omezení). Se zmenšováním částice se zároveň mění i vzájemný poměr atomů povrchu a vnitřních atomů. Zjednodušeně řečeno, vlastnosti povrchu částic převládají nad vlastnostmi dané částice. Z tohoto důvodu jsou fyzikální, chemické a optické vlastnosti nanoobjektů odlišné od ekvivalentního materiálu v makroskopickém měřítku. Typickým znakem vycházejícím z rozměrů v nanoměřítku je obrovský reakční povrch, který umožňuje široké uplatnění v průmyslu i medicíně [2; 3]. Velikost a tvar rozhoduje též o agregaci, která může jednotlivé vlastnosti maskovat. NPs pak přejímají vlastnosti výsledného nanokompozitu [4]. Výrobou, chováním a využitím nanoobjektů včetně NMs, NPs a různých nanostruktur, se zabývá nanotechnologie. Její kořeny pochází z roku 1959, kdy americký fyzik Richard Feynman přednesl na výroční schůzi Americké společnosti fyziků v Kalifornii svoji přednášku „There’s Plenty of Room at the Bottom“ („Tam dole je spousta místa“). V současnosti se jedná o interdisciplinární obor, který zahrnuje klasickou fyziku, kvantovou mechaniku, fyzikální chemii, biologii a jiné [5].

1.1.1. Rozdělení NPs a NMs

Nanomateriály (i NPs) lze dělit na základě několika kritérií. Prvním z nich je rozdělení dle původu na přírodní a syntetické (průmyslově vyráběné). Přírodní NMs vznikají prostřednictvím (bio)geochemických či mechanických procesů bez přímé účasti člověka (např. vulkanickou činností) a vyskytují se prakticky ve všech sférách. Patří sem oxidy kovů, jílové minerály, sulfidy, nebo také viry [4]. Pod syntetické NMs spadají průmyslově vyráběné NMs a NMs, které vznikají jako vedlejší produkt lidské činnosti. Příkladem neúmyslných NMs jsou nanoplasty a složky sazí [6; 7].

Na základě složení lze NMs rozlišit na organické, anorganické (obrázek 1), dále na kompozitní a karbonové. Klasickými zástupci organických NMs jsou polymerní částice tvořící sféry nebo kapsule, dendrimery a lipidové částice (lipozomy). Vzhledem ke svému složení jsou

téměř netoxické, biokompatibilní a degradabilní. Díky přítomnosti nekovalentních vazeb je lze snadno modelovat do požadovaných struktur. Všechny tyto vlastnosti z nich dělají nadějně kandidáty v nanomedicíně např. jako nosiče léčiv [6; 8]. Anorganické NMs zahrnují převážně celokovové částice (např. NPs zlata a stříbra) a oxidy kovů (např. oxid titaničitý). Řadí se sem i nekovové částice jako jsou oxidy křemíku, případně karbonové (C)NMs [9]. Kompozitní NMs pak zahrnují hybridní, či kombinované struktury, kdy se kombinují buď různé NMs, nebo NMs s makroskopickými materiály. Vznikají též spojení organických a anorganických NMs, např. kovové jádro obalené polymery [1].



Obrázek 1: Schéma různých typů NPs a NMs v rámci nanoměřítko 1–100 nm, vytvořeno pomocí Biorender.com

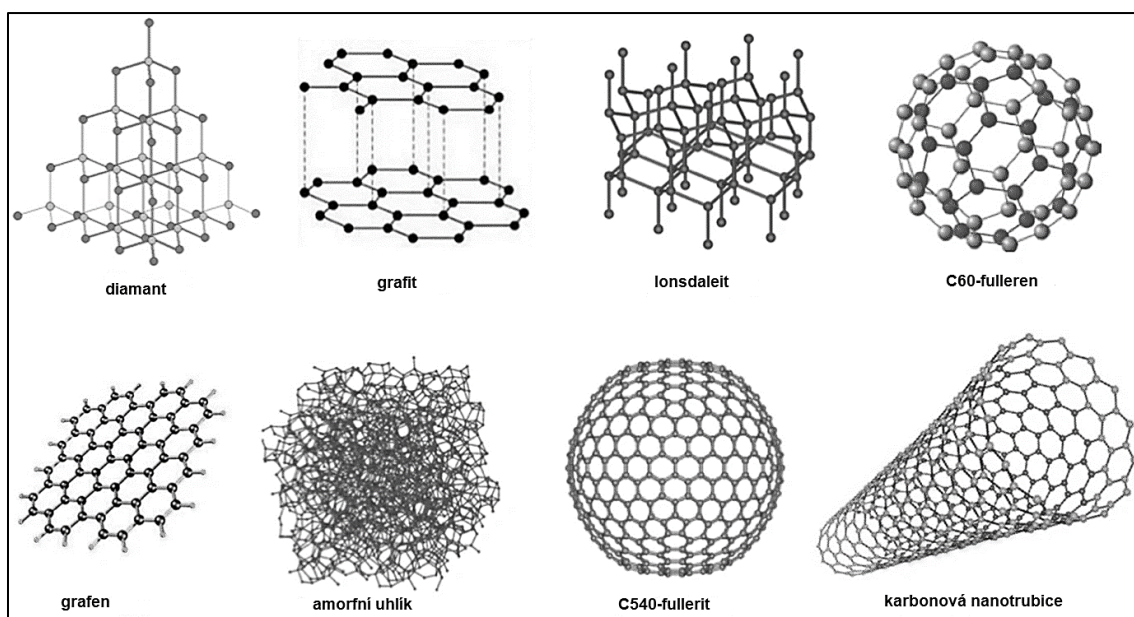
V roce 2007 byla zavedena nová klasifikace založená na prostorovém uspořádání. Podle ní se NMs dělí na bezrozměrné (0D), jednorozměrné (1D), dvourozměrné (2D) a trojrozměrné (3D). Rozdělení vychází z pohybu elektronů podél dimenzí v NM, kdy např. v 0D jsou elektrony zachyceny v bezrozměrném prostoru. Naproti tomu v 1D se pohybují podél osy x, ve 2D podél os x a y, a ve 3D podél os x, y a z [10]. Do skupiny 0D spadají např. magnetické NPs, polymerní tečky a kvantové tečky, které bývají jen několik nm velké. Díky speciálním fyzikálně-chemickým vlastnostem vyplývajících z kvantového omezení nachází potenciální uplatnění především v biomolekulárním rozpoznávání a detekci iontů [11]. Jednorozměrné

NMs zahrnují různé povrchové nanovrstvy a dále nanotrubic, nanovlákna a nanodráty. Využití nachází především v optice, elektronice a v přípravě fotovoltaických článků [12]. Dvourozměrné NMs jsou definovány jako jeden atom silné pláty, resp. vrstvy, které bývají izolovány z běžných makroskopických matic, např. grafen izolovaný z grafitu, viz dále [13]. Mezi 3D NMs řadíme např. dendrimery, svazky nanodrátů a nanotubic, a jiné [14; 15].

1.2. Karbonové nanomateriály (CNMs)

Uhlík (C, carbon) je základním stavebním kamenem veškeré živé hmoty na Zemi. V přírodě se v elementárním stavu vyskytuje v několika formách. Nejvýznamnější krystalické formy představují grafit a diamant. V krystalické mřížce diamantu jsou na každý atom uhlíku kovalentně navázány další čtyři atomy uhlíku (hybridizace sp^3), díky čemuž vzniká velmi pevná a odolná struktura. Diamant je téměř nejtvrdějším přírodním materiálem, tepelně vodivý a nevede elektrický proud. Naproti tomu grafit je tvořený mnoha jednotlivými vrstvami grafenu, které spolu drží jen pomocí van der Waalsových sil. Jedná se o velmi měkký materiál, čehož se využívá např. při výrobě tužek. Na rozdíl od diamantu vede elektrický proud. Příkladem amorfního alotropu jsou uhlí a saze.

Uhlík představuje také základní stavební prvek CNMs (obrázek 2). První CNMs byly objeveny roku 1980 a od té doby jejich počet a potenciální využití neustále narůstá [16]. V současnosti v této skupině anorganických NMs nalezneme amorfní částice, tj. ultrajemné karbonové částice, karbonové NPs a karbonové tečky, dále sp^2 alotropy, tj. nanotrubic, grafen, fullereny, karbonové kvantové tečky, aj., a sp^3 alotropy, tj. nanodiamanty a lonsdaleit [17].

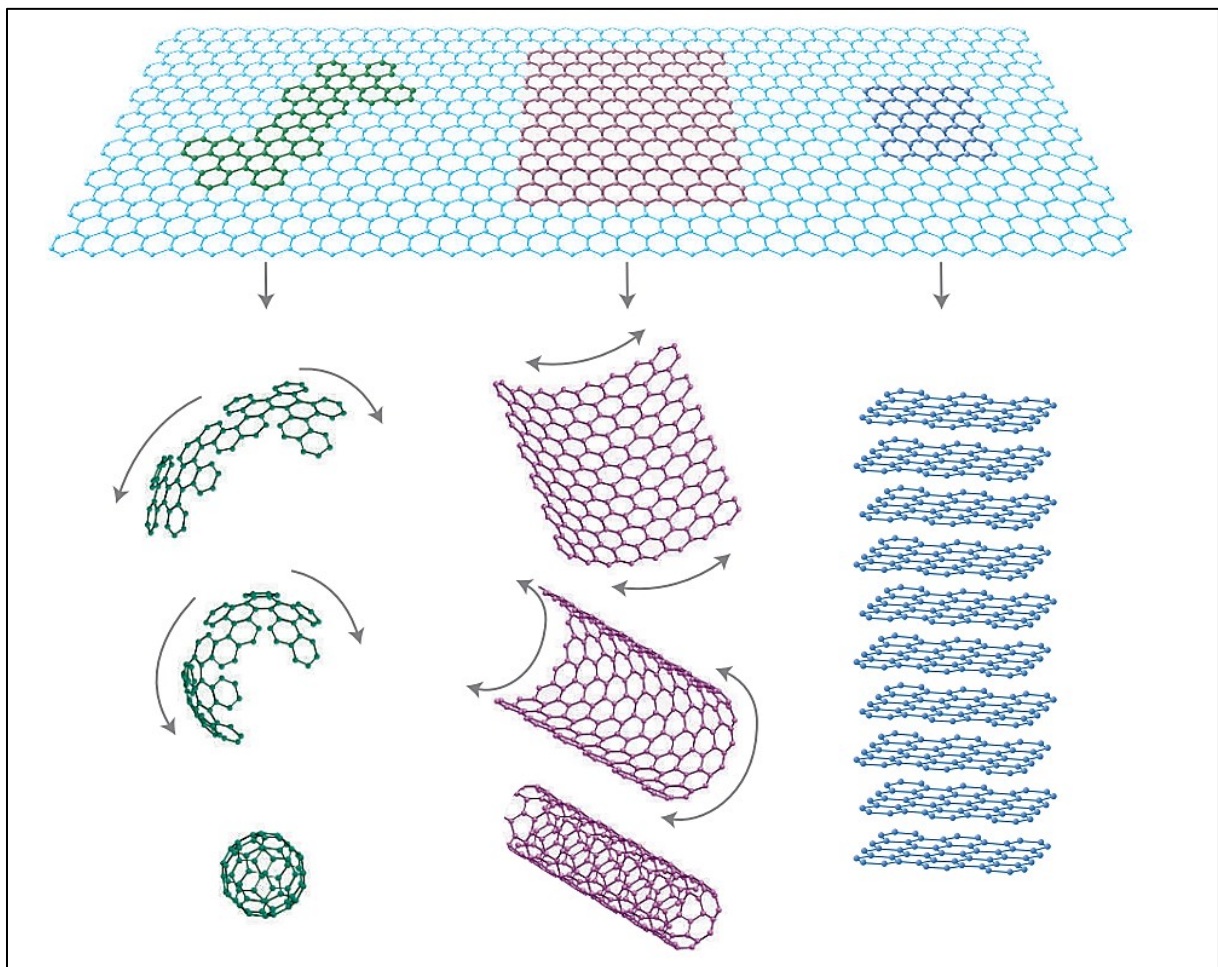


Obrázek 2: Různé alotropy uhlíku vykazují různé struktury a funkce, převzato a upraveno [17]

Přítomnost čistého uhlíku zajišťuje CNMs vysokou stabilitu, výjimečné mechanické vlastnosti, tj. pevnost, tuhost a houževnatost, dále tepelnou a elektrickou vodivost. Díky tomu nachází uplatnění v mnoha odvětvích průmyslu. Používají se např. při separačních procesech, úpravě vody, nebo v elektronice [18]. Mezi nejvíce studované CNMs patří grafen a karbonové nanotrubic (CNTs, Carbon Nanotubes).

1.2.1. Grafen

Grafen byl z grafitu poprvé izolován v roce 2004 [19]. Následně v roce 2010 byla za objev grafenu udělena Nobelova cena za fyziku. Tento výjimečný NM se skládá z jeden atom silné vrstvy sp^2 -hybridizovaných atomů uhlíku, vzájemně uspořádaných do 2D matrice připomínající včelí plástev. Unikátní uspořádání, které zahrnuje delokalizované π vazby, propůjčuje grafenu neobvyklé elektronické a vodivostní vlastnosti. Grafen je zároveň jedním z nejpevnějších materiálů vůbec. Představuje též výchozí matici dalších CNMs, kdy jeho rolováním vznikají nanotrubic a nebo zabalením fullereny (obrázek 3) [13].

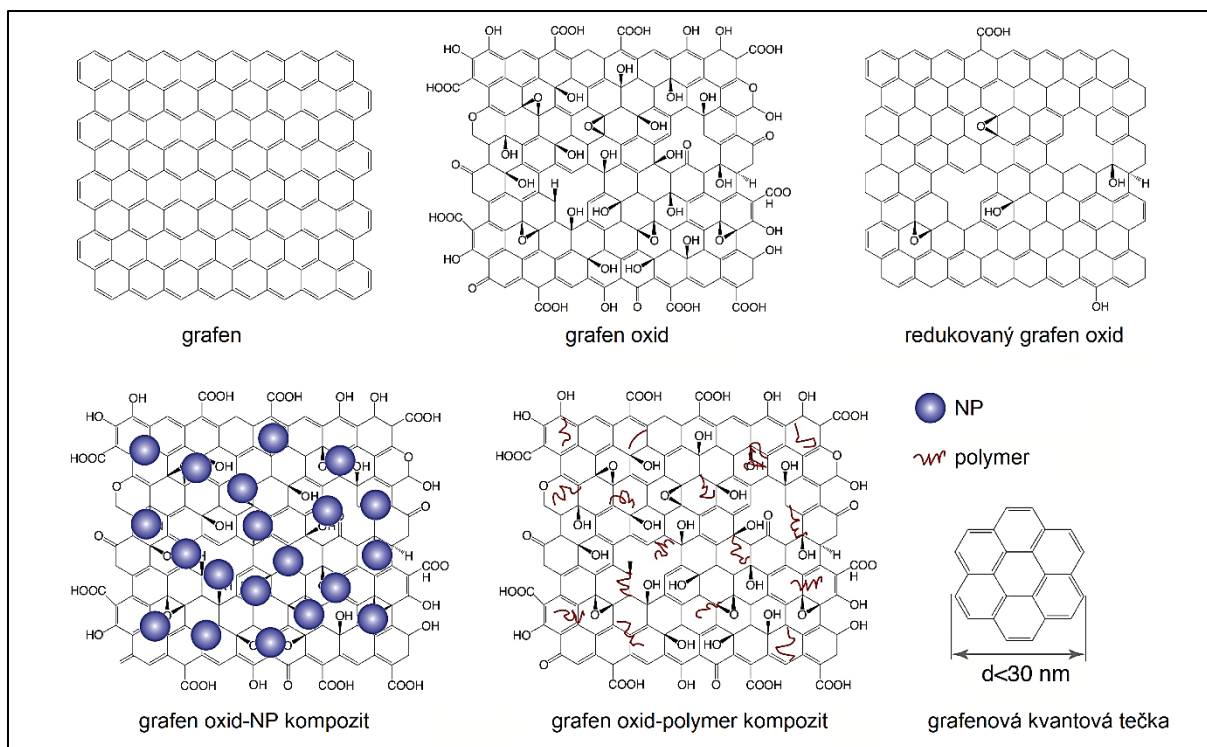


Obrázek 3: Struktura grafenu a jeho možné modifikace do 0D fullerenů, 1D trubic a 3D grafitu; převzato [13]

Příprava grafenu může probíhat několika způsoby. Nejjednodušší metodou je opakované mechanické odlupování (exfoliace) vrstev z grafitu pomocí lepicí pásky [19]. Nevýhodou této metody je velmi malý výtěžek. Využit lze i ultrazvukovou exfoliaci po dispergování grafitu v kapalném médiu. Výsledkem je produkce vícevrstvých grafenových plátek (GPs, Graphene Platelets) [20]. Další možný postup zahrnuje chemickou depozici z plynné fáze (CVD, Chemical Vapor Deposition) za použití kovových substrátů, např. mědi nebo niklu. Nevýhodou je přítomnost zbytků polymerních nosičů, které ovlivňují výsledné charakteristiky [21; 22]. Vysoce kvalitní několikavrstvý grafen lze připravit epitaxiálním růstem pomocí CVD na karbidu křemíku [23].

Úskalím přípravy grafenu je jeho obrovská reaktivita a tendence k agregaci. Díky svému hydrofobnímu povrchu ho nelze stabilně resuspendovat ve vodném prostředí. Z těchto důvodů se přistupuje k různým modifikacím, které vychází především z chemické funkcionalizace. Mezi nejběžnější chemické modifikace patří kovalentní navázání organických molekul, vodíku nebo halogenů, a dále nekovalentní vazba s různými biokompatibilními polymery pomocí hydrofobních nebo elektrostatických interakcí, případně kombinování s jinými, převážně kovovými NPs [24-27].

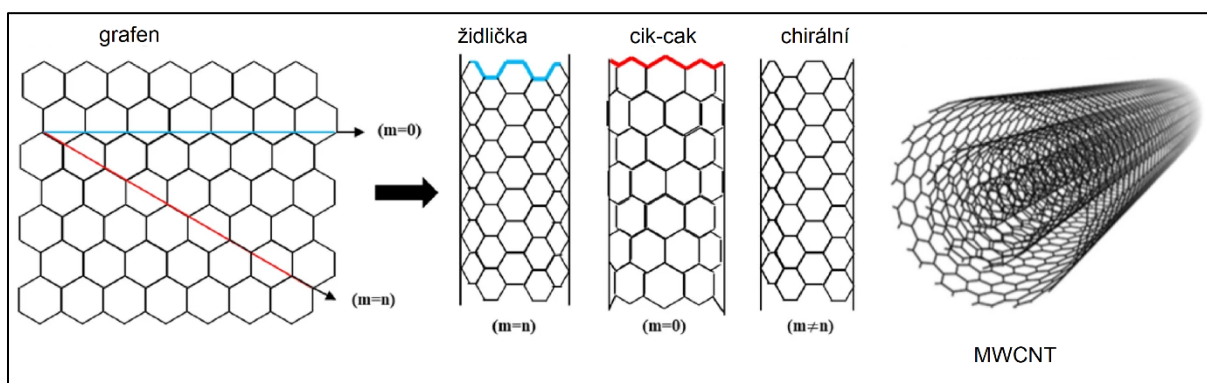
Mezi nejvíce rozšířené grafenové deriváty (obrázek 4) patří vícevrstvé GPs nebo několikavrstvý grafen (FLG, Few-Layer Graphene), které mohou být buď nemodifikované (čisté), nebo modifikované. Jak je patrné z názvu, jedná se o více vrstev grafenu (u FLG dvě až pět) ve tvaru listů či plátek, které jsou vzájemně vázány van der Waalovými silami [28]. Nemodifikované GPs i FLG vznikají jako meziproduct při výrobě čisté monovrstvy grafenu [29]. Nejvýznamnější derivát představuje grafen oxid (GO), jehož výhodou je lepší koloidní stabilita a vyšší reaktivita díky přítomným funkčním skupinám [30]. Nejčastěji se vyrábí Hummersovou metodou, kdy dochází k oxidaci grafitu za přítomnosti kyseliny sírové a manganistanu draselného [31]. Chemickou, tepelnou nebo elektrochemickou redukcí GO vzniká redukovaný GO, který se vyznačuje vysokou elektrickou vodivostí a potenciálně lepší biokompatibilitou [32; 33]. Zvýšenou biokompatibilitou disponují také grafenové kvantové tečky představující 0D NMs. Skládají se z několika vrstev GPs o laterální dimenzi menší než 100 nm. Uplatnění nachází díky svým unikátním optickým vlastnostem především v bioobrazovacích aplikacích [34].



Obrázek 4: Schéma různých derivátů grafenu; převzato a upraveno [35]

1.2.2. Karbonové nanotrubicice (CNTs)

karbonové nanotrubicice byly poprvé popsány japonským fyzikem Sumio Iijimou v roce 1991 [36]. Jedná se o duté tubulární objekty vytvořené z cylindricky uspořádané vrstvy grafenu. Na koncích bývají obvykle uzavřené polosférou fullerenu. Dle počtu vrstev rozlišujeme jednotěnné (SW, Single-Walled), dvoustěnné (DW, Double-Walled) a mnohostěnné (MW, Multi-Walled) CNTs. Na základě prostorového uspořádání se SWCNTs dále dělí na typ židlička (armchair), chirální (chiral) a cik-cak (zig-zag) (obrázek 5). Jednotlivé typy se pak liší ve svých optických a elektrických vlastnostech. Průměr SWCNTs se pohybuje do 10 nm, avšak délka může být až desítky μm [37].



Obrázek 5: Schéma různých konfigurací CNT; m, n = vektory chiraloty; převzato a upraveno [38; 39]

Dvoustěnné a mnohostěnné nanotrubicice se skládají ze dvou a více koncentricky uspořádaných trubic, podle jejichž uspořádání rozeznáváme dva různé modely. V modelu ruská panenka jsou jednotlivé trubice uspořádány od středu dle průměru od nejmenšího po největší. V pergamenovém modelu se opakovaně stáčí jeden plát grafenu za vzniku kontinuální role [40]. Vícevrstvé uspořádání MWCNTs poskytuje ochranu vnitřním trubicím proti nežádoucím chemickým reakcím a zároveň oproti SWCNTs zlepšuje pevnost v tahu [41]. Vnitřní průměr MWCNTs se obvykle pohybuje v rozmezí od 0,4 nm do několika nm a vnější průměr může, dle počtu vrstev, dosahovat až 100 nm [17].

Možné metody výroby CNTs zahrnují obloukový výboj, laserovou ablaci a CVD. Pomocí obloukového výboje lze kromě CNTs připravit i další CNMs, např. fullereny. Výhodou je vysoká kvalita vznikajícího produktu [42]. Od laserové ablace se v současnosti spíše ustupuje kvůli vysoké energetické náročnosti a nutnosti dodat vysoce kvalitní grafit [43]. Nejvyužívanější metodou je pak CVD. Výhodami CVD jsou ekonomická nenáročnost i možnost pomocí vhodných katalyzátorů vyrábět předem definované struktury [44].

Z obecného hlediska vysoký poměr stran a přítomnost sp² vazeb poskytují CNTs velkou pevnost, tepelnou i mechanickou odolnost a podobně jako u grafenu je lze různě modifikovat. Díky těmto vlastnostem nachází perspektivní využití v elektronice, průmyslu, v přípravě konstrukčních systémů a různých polymerů a teoreticky i v medicíně [38].

1.2.3. Biomedicínské aplikace CNMs

Karbonové nanomateriály jsou v současnosti studovány pro svoji potenciální biomedicínskou aplikaci v oblastech zahrnujících zobrazovací metody, biosenzory, nosiče protinádorových léčiv či jako samotná léčiva, adjuvancia a tkáňové inženýrství. Nejvýznamnější roli v přípravě nosičů a adjuvancií hraje přítomnost již mnohokrát zmíněného obrovského reakčního povrchu a možnost chemické modifikace [45]. Vazebná kapacita CNMs je dále využitelná při vylučování nežádoucích látek z krve. Např. inkorporace GPs do polytetrafluoroethylenového filmu zvyšuje během mimotělního oběhu vylučování prozánětlivých cytokinů [46].

Významný potenciál v oblasti biodetekce představuje schopnost některých CNMs po excitaci emitovat fluorescenci. Týká se to především grafenových kvantových teček a karbonových teček, které zároveň díky svým malým rozměrům lépe pronikají do různých tělních tkání [34; 47]. Snímání fluorescence lze navíc kombinovat s detekcí např. navázaných radionuklidů, a tím zvýšit rozlišení a celkovou citlivost snímání [48]. Velký reakční povrch grafenových derivátů nebo CNTs zase nabízí možnost vazby velkého množství různých

detekčních molekul, což umožňuje multiplexní snímání [49]. Lze využít i selektivní migrace CNMs do lymfatických uzlin, kdy jsou pomocí černého zbarvení odhalována různá potenciální metastázová ložiska [50]. Další perspektivní aplikací je fotodynamická terapie, která se zakládá na cytotoxickém efektu kyslíkových radikálů vznikajících v přítomnosti některých CNMs [51]. Fototermální terapie zase využívá schopnosti zejména CNTs během ozařování světlem blízko infračervené oblasti přenést světelnou energii na tepelnou [52]. V oblasti regenerativní medicíny se dají různé CNMs využít ke tvorbě matric a tkáňového lešení (scaffoldů) [53]. Zajímavý je jejich účinek na diferenciací kapacitu kmenových buněk [54].

Potenciál biomedicínského využití CNMs je naprosto evidentní, nicméně vznáší otázky o jejich bezpečnosti. Během úmyslné i neúmyslné interakce člověka s CNMs může docházet k negativním účinkům, kterými se obecně zabývá nanotoxikologie [55].

1.2.4. Vstup CNMs do organismu

Člověk bývá neúmyslně vystaven CNMs během jejich výroby či přípravy a postprodukčního zpracování. Vstup CNMs do organismu probíhá různými cestami, kdy nejčastěji dochází k inhalaci, dermální penetraci a ingesci [55; 56]. Následná distribuce v organismu je závislá na řadě faktorů, které zahrnují vnitřní fyzikálně-chemické vlastnosti, jako jsou velikost, náboj či funkcionalizace, a vlastnosti získané po kontaktu s biologickým prostředím [57]. Příkladem je tvorba proteinové korony, kdy dochází ke spontánnímu a rychlému navázání biologických složek na povrch CNMs. První vrstvu tzv. tvrdou koronu tvoří vysoko afinní proteiny, které se váží ireversibilně. Na ně se navazují proteiny s nízkou afinitou a formují tzv. měkkou koronu, jejíž složení se dynamicky mění v průběhu času a v závislosti na prostředí [58]. O celkovém složení proteinové korony rozhodují výchozí fyzikálně-chemické vlastnosti, zejména plocha a náboj. Vazba proteinů může tyto vlastnosti zpětně měnit, což se odráží např. na změně hydrodynamického průměru a koloidní stabilitě [59]. Obecně lze říct, že interakce mezi CNMs a organismem je výsledkem dynamického procesu neustálých změn, které CNMs prodělávají postupem v různých biologických soustavách [60].

Z bezpečnostního hlediska se jako klíčový mechanismus neúmyslného prostupu CNMs do organismu považuje inhalace. Zatímco větší částice (1–10 μm) většinou zůstávají na úrovni průdušek a průdušnice, menší částice pronikají do hlubších vrstev (plicní sklípky, aleveolo-kapilární bariéra). Zde hraje významnou roli přítomnost plicního surfaktantu, který je tvořen směsí fosfolipidů, proteinů a iontů a tvoří první vrstvu aleveolo-kapilární bariéry. Vazbou složek surfaktantu na povrch CNMs dochází ke změnám v jeho celkových viskoelastických

vlastnostech, což může přispívat k výsledné pulmonální toxicitě [61; 62]. Zároveň se takto pozměněné NMs dostávají do kontaktu s pneumocyty a alveolárními makrofágy, kdy jsou buď fagocytovány nebo zůstávají zachycené v extracelulárním prostředí [63; 64]. Nálezy CNMs v krvi, játrech, slezině nebo ledvinách během *in vivo* studií ukazují, že v menší míře mohou prostupovat i do krevního oběhu, případně mohou prostupovat střevní bariérou po ingestci [65; 66].

Významné riziko představují CNTs a karbonová nanovlákna (CNFs, Carbon Nanofibres), u kterých byla opakovaně prokázána pulmonální toxicita spojená především s indukcí chronického zánětu a fibrotizací plicní tkáně [67]. Podobně jako u azbestových vláken může v důsledku těchto změn docházet až k nádorovému bujení. V roce 2014 IARC WG (International Agency for Research on Cancer Working Group) oficiálně klasifikovala dlouhé rigidní MWCNT-7 (výrobce Mitsui, Japonsko) jako potenciální karcinogen skupiny 2B [68].

Předpokladem využití CNMs v medicíně je intravenózní podání, kdy dochází ke 100% biologické dostupnosti. Následující translokace opět závisí na výchozích vlastnostech daných CNMs. Větší částice (>2 μm) jsou filtrovány plicními kapilárními cévami. Zbývající částice jsou distribuovány do jiných tkání a orgánů, přičemž velmi malé částice (<100nm) mohou vstoupit do sleziny a kostní dřeně [69; 70]. Biokompatibilitu lze zvyšovat cílenou modifikací, např. navázáním polyethylenglykolu (PEG), který brání navazování proteinů a pomáhá „maskovat“ CNMs před složkami imunitního systému [54; 71]. Nicméně je nutné počítat s individualitou různých typů CNMs, kdy zmíněné modifikace mohou nežádoucí reakce naopak zesílit, případně i vyvolat [72].

1.3. Imunotoxicita CNMs

Vyhodnocení interakce s imunitním systémem je klíčovým krokem ve stanovení bezpečnosti CNMs. Jako vysoce organizovaný komplex představuje imunitní systém naší hlavní obranu proti cizím mikroorganismům a částicím a podílí se na udržení vnitřní homeostázy. Hraje nenahraditelnou roli v rozpoznání a včasné eliminaci endogenních agens, jako jsou například poškozené tkáně nebo abnormální buňky. Je dobře známo, že různé chemikálie a xenobiotika mohou integritu imunitního systému narušit [73]. Porušení homeostázy a narušení imunitních funkcí vede ke vzniku chronických abnormalit a následnému rozvratu celého organismu. Vzhledem k faktu, že složky imunitního systému jsou zastoupeny v krevním oběhu, ve tkáních a na sliznicích, je vzájemný kontakt s CNMs nevyhnutelný. Myšlenka využití CNMs v biomedicíně ještě naléhavěji volá po důkladném hodnocení jejich biologických interakcí.

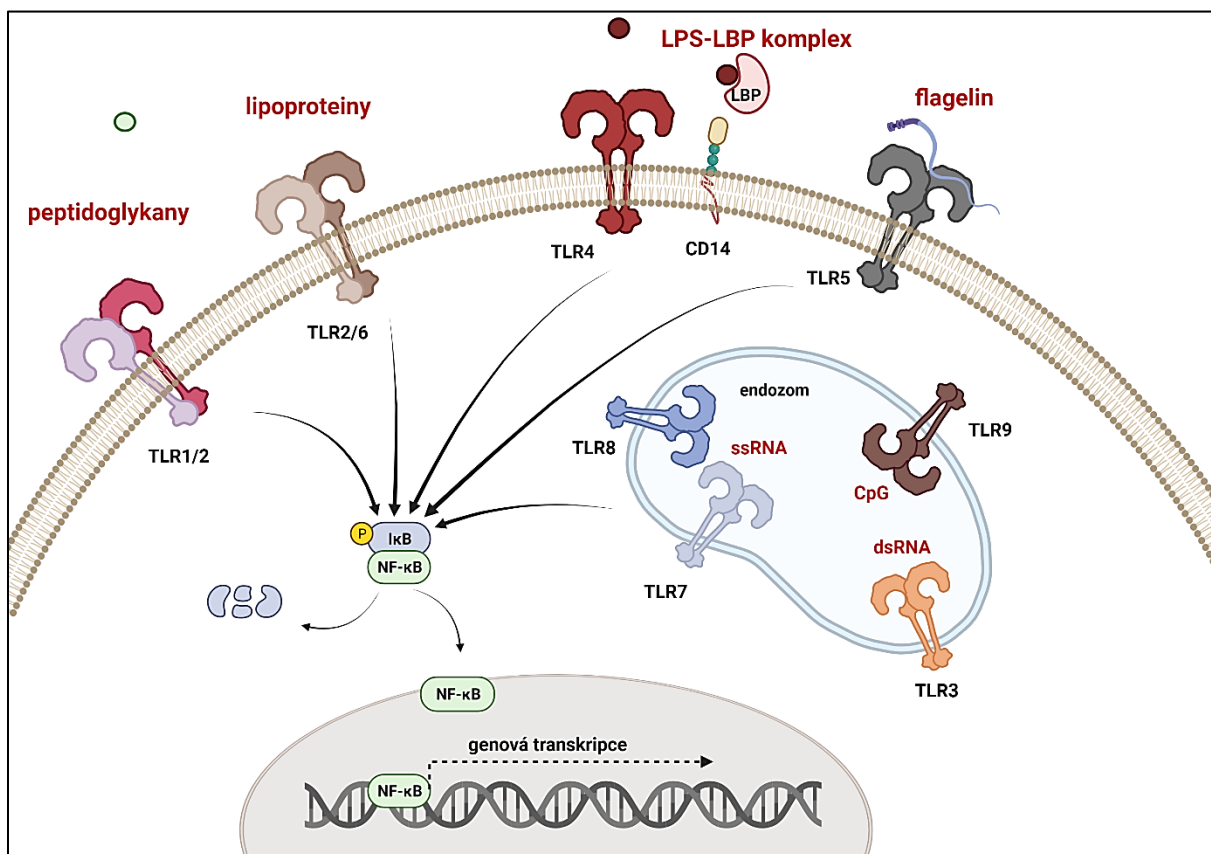
Díky své odolnosti mohou CNMs, zejména ty nemodifikované, přetrvávat v organismu po velmi dlouhou dobu [63; 64]. Na druhou stranu různé povrchové úpravy, jako je např. oxidace, otevírají cestu k případné enzymatické degradaci [74]. V obou situacích, ať už v procesu zpracování nebo eliminace CNMs, dochází k zapojení specifických imunitních funkcí vycházejících z interakcí se složkami jak vrozené tak adaptivní imunity [75]. Následkem může být vznik imunotoxicity, která zahrnuje cytotoxické, imunosupresivní nebo imunostimulační reakce [76].

1.3.1. Role kontaminace

Zásadním problémem při řešení imunotoxicity nanočástic, včetně CNMs, je biologická kontaminace. V tomto ohledu hraje rozhodující úlohu vrozená imunita, především fagocyty, které pomocí široké škály cytoplazmatických a membránových receptorů (PRRs, Pattern Recognition Receptors) rozpoznávají evolučně zakonzervované motivy typické pro různé skupiny mikrobů (MAMPs, Microbe-Associated Molecular Patterns), patogenních mikrobů (PAMPs, Pathogen-Associated Molecular Patterns) a motivy spojené s poškozením buněk a tkání (DAMPs, Danger-Associated Molecular Patterns), některé z nich mající charakter alarminů. Mezi cytoplazmatické PRRs se řadí např. NOD (Nucleotide-Binding Oligomerization Domain)-like receptory (NLRs), které jsou mimo jiné součástí inflamazomu, viz dále. Membránové receptory reprezentuje např. skupina glykoproteinů zvaná Toll-like receptory (TLRs), které zahrnují TLR3, TLR7, TLR8 a TLR9 ukotvené v membráně intracelulárních váčků, a TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 a TLR10 ukotvené v cytoplazmatické membráně. Interakcí receptorů se svým ligandem dochází k signalizační kaskádě a aktivaci příslušných proteinových komplexů a transkripčních faktorů. Centrální úlohu zde plní NF- κ B (Nuclear Factor kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells), který po aktivaci putuje do jádra buňky a zahájí přepis konkrétních genů a mimo jiné tvorbu a sekreci prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů (obrázek 6) [77].

Typický ligand a zároveň nejčastější kontaminant je lipopolysacharid (LPS), který se nachází u gramnegativních bakterií jako součást vnější membrány. Skládá se hydrofilního polysacharidu a hydrofobního lipidu A, který je silným vzorem PAMP. V krvi spolu s LPS vázajícím proteinem (LBP, LPS-Binding Protein) vytváří komplex, který je rozeznáván TLR4 a za účasti membránové molekuly CD14 (Cluster of Differentiation 14) a MD-2 (Myeloid Differentiation Factor-2) stimuluje signalizační kaskádu vedoucí k produkci prozánětlivých cytokinů IL-6 (Interleukin-6) a TNF- α (Tumor Necrosis Factor alfa) [78]. Samotný LPS se běžně vyskytuje jako kontaminace v různých chemikáliích a na laboratorních površích a díky

termostabilitě ho nelze snadno odstranit [79]. Lehce tedy přichází do kontaktu s CNMs, na které se pomocí hydrofobních a elektrostatických interakcí naváže [80; 81]. Takto kontaminované CNMs, které mohly být původně biokompatibilní, se stávají více imunogenní a potenciálně cytotoxické [81]. Zároveň mohou představovat „Trojského koně“ pro látky, které by se za fyziologických podmínek do buňky nedostaly [82]. Vyjma nežádoucích biologických účinků dochází i k chybné interpretaci dat imunologických a cytotoxických testů a je proto nutné přítomnost biologické kontaminace LPS neustále kontrolovat.



Obrázek 6: Toll-like receptory a jejich ligandy, vytvořeno pomocí Biorender.com

1.3.2. Rozpoznání a vstup CNMs do buněk imunitního systému

Prvním krokem imunitní odpovědi buněk imunitního systému na přítomné CNMs je jejich identifikace, které začíná samotným kontaktem s cytoplazmatickou membránou. Zde hrají nezanedbatelnou úlohu zmíněné TLRs, které se aktivují přítomností adherovaných PAMPs, nebo scavenger receptory, které rozeznávají polyanionické skupiny u karboxylovaných CNMs [81; 83]. Zdá se, že některé CNMs mohou TLRs aktivovat i nespecificky díky vzájemným hydrofobním interakcím [84]. Příkladem jsou nemodifikované CNTs a C60 fullerény, jejichž odhalené části se váží do hydrofobních kapes TLR1/2, TLR2/6

a TLR4/MD-2 [85; 86]. V tomto případě je rozhodujícím faktorem tvar CNMs, kdy tubulární částice na sebe váží méně proteinů, které by pomohly hydrofobní části maskovat a u kterých častěji dochází ke konformačním změnám vedoucím k odhalení nových vazebných míst [86-88]. Naopak planární grafenové částice disponují mnohem větší adsorbční kapacitou a velké množství navázaných proteinů může, kromě efektivnějšího maskování, také zesilovat tloušťku jednotlivých plátků a tím limitovat případné pohlcení [88; 89]. V tomhle se dobře uplatňují především plazmatické proteiny jako albumin, transferin, fibrinogen a gamma globuliny, případně komplement inhibující faktor H [89-91]. Opačného efektu lze dosáhnout navázáním komplementových proteinů C1q nebo C3 [92]. Navíc může dojít k aktivaci celé komplementové kaskády jak klasickou, tak alternativní cestou [93; 94]. V rámci interakcí mezi CNMs a buňkami nelze opomenout ani přímý vliv na fosfolipidovou membránu, kdy její poškození, např. narušením lipidových raftů nadměrnou oxidací cholesterolu v přítomnosti GO, také slouží jako úvodní signál imunitní reakce [95; 96].

Je zřejmé, že výsledný proces rozpoznání CNMs buňkami imunitního systému závisí na kombinaci mnoha faktorů zahrnujících velikost, tvar a povrchovou úpravu. S tím souvisí i následný mechanismus transportu, kdy dochází buď k pasivní difúzi, nebo k aktivní endocytóze [97; 98].

Endocytóza je energeticky a metabolicky náročný proces, při kterém buňka obklopí částici cytoplazmatickou membránou (ve formě žlábků nebo pomocí výběžků), kterou následně vnoří do cytoplazmy ve formě uzavřených váčků, endozomů. Na základě mechanismu se rozlišují pinocytóza, která nejčastěji slouží k pohlcení kapiček extracelulární tekutiny, fagocytóza a receptorem zprostředkovaná endocytóza [99]. Vzhledem k výše uvedenému, právě fagocytóza a receptorem zprostředkovaná endocytóza jsou hlavními mechanismy vstupu CNMs do buněk [14; 83; 87; 100]. Za určitých okolností, kdy je částice větší než fagocytující buňka, např. dlouhé rigidní CNTs, dochází k neúplnému pohlcení nazývaném nekompletní nebo též frustrovaná fagocytóza [101]. Klíčovou roli v pohlcování a následném zpracování CNMs hrají profesionální fagocyty, převážně monocyty a makrofágy [102].

1.3.3. Profesionální fagocyty

Monocyty jsou velké jednojaderné leukocyty kulatého až améboidního tvaru. Vznikají z myeloidních prekurzorů v kostní dřeni a u zdravého dospělého člověka tvoří 2–8 % všech leukocytů v krvi. Dle exprese specifických povrchových znaků je lze rozdělit na klasické CD14⁺ monocyty zahrnující dvě subpopulace CD14⁺/CD16⁻ a CD14⁺/CD16⁺, a neklasické CD14^{low}/CD16⁺, též nazývané patrolující monocyty (obrázek 7) [103; 104]. Klasické

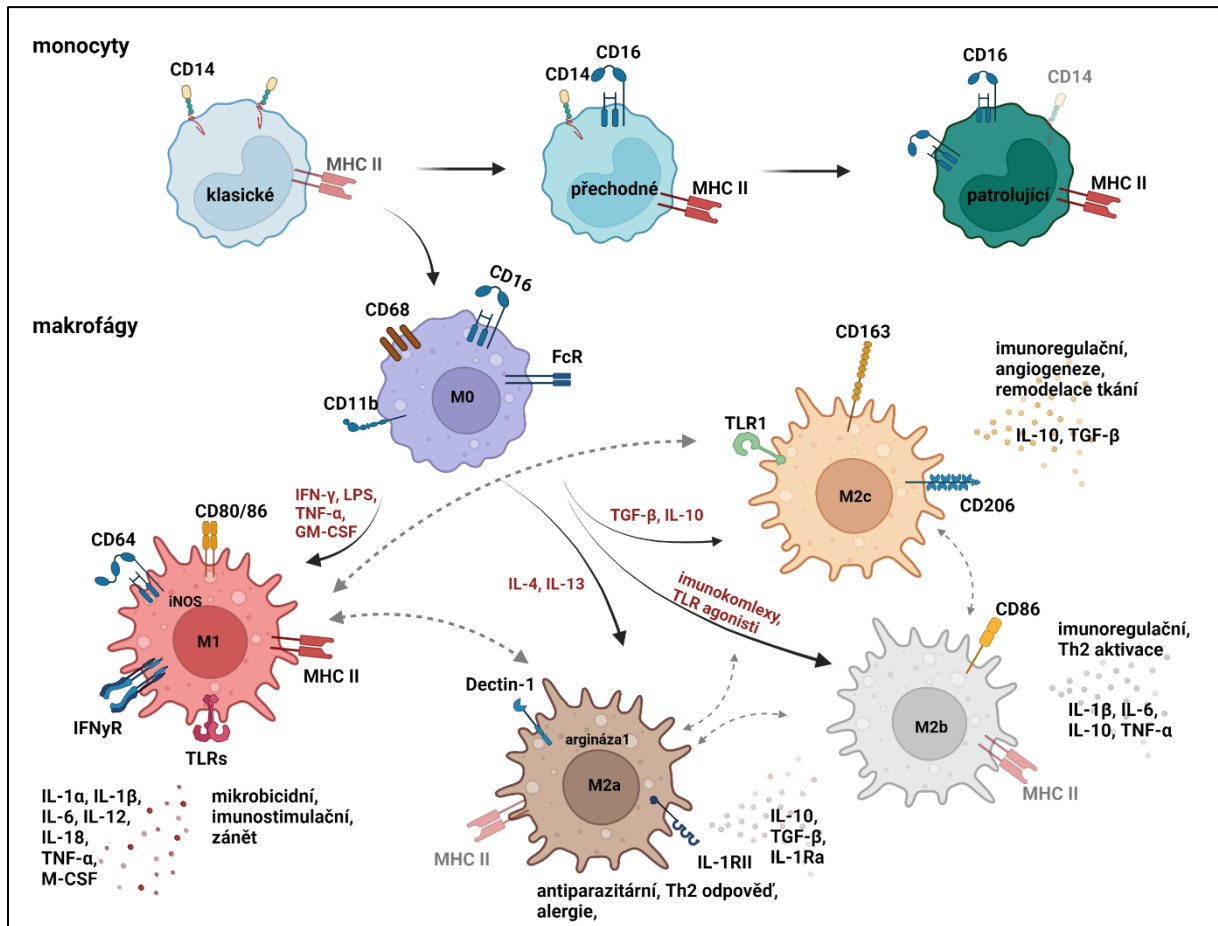
CD14⁺/CD16⁻ monocyty tvoří ~85 % monocytární populace a obvykle cíleně migrují do tkání do místa zánětu, kde se diferencují na makrofágy [105]. Zároveň mohou přecházet do neklasických CD14^{low}/CD16⁺ monocytů, které se pravděpodobně už dále nediferencují. Konkrétní dynamika mezi jednotlivými subpopulacemi není dosud objasněna [106].

Kromě diferenciac v makrofágy a část v dendritické buňky patří mezi jejich fyziologické funkce fagocytóza, prezentace antigenu, produkce prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů a imunomodulace (obrázek 7). Na svém povrchu nesou celou řadu receptorů včetně vysoké exprese PRRs (převážně TLR4 a TLR2), což zvyšuje jejich citlivost vůči různým typům PAMPs [107]. Také se podílí na vzniku vrozené imunologické paměti, nazývané též vrozená trénovaná imunita, kdy v důsledku epigenetických a metabolických změn dochází k zesílení imunitní odpovědi na opakovaný stimul [108].

Makrofágy tvoří velmi heterogenní skupinu velkých jednojaderných leukocytů, jejichž hlavními funkcemi jsou eliminace cizorodých částic, zbytků buněk a poškozených tkání, modulace zánětu pomocí prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů a prezentace antigenu. Vyznačují se svojí plasticitou, kdy mění své vlastnosti v závislosti na signálech ze svého mikroprostředí [77]. Lze je rozdělit na makrofágy diferencované z cirkulujících monocytů a tkáňově specifické (rezidentní) makrofágy, které se od sebe vzájemně morfologicky a funkčně odlišují. Řadíme mezi ně např. plicní alveolární makrofágy, jaterní Kupferovy buňky, mikroglie v centrální nervové soustavě (CNS) a kosterní osteoklasty. Je zajímavé, že některé rezidentní makrofágy, např. mikroglie vznikají již za embryonálního vývoje a tvoří tak oddělenou populaci, která je schopná v menší míře proliferovat [109]. Zároveň se uvádí, že dochází i k doplňování z cirkulujících monocytů, což jen potvrzuje nesmírnou plasticitu těchto buněk [110].

Z funkčního hlediska lze makrofágy dělit dle stavu aktivace na klasicky aktivované M1 a alternativně aktivované M2. M1 představují efektorové buňky prozánětlivé odpovědi vrozené imunity charakteristické vysokou produkcí cytokinů IL-6, TNF- α a IL1- β . Zvýšenou produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS, Reactive Oxygen Species) a oxidu dusnatého (NO) napomáhají zabíjení fagocytovaných patogenů a pomocí IL-12 stimulují Th1 lymfocytární odpověď. Polarizace do M1 je stimulována přítomností interferonu gamma (IFN- γ) a pokud není regulována, vede vlivem navození silného zánětu k destrukci okolních tkání [111]. Naproti tomu M2 makrofágy, které se vyznačují tvorbou převážně protizánětlivých cytokinů IL-10 a TGF- β (Transforming Growth Factor beta), navozují angiogenezi, remodelaci a opravu poškozených tkání. Celkově tlumí probíhající zánět, ale jejich činnost může vést až k fibróze nebo pronádorové aktivitě [112]. M2 makrofágy jsou mimořádně heterogenní skupina několika

subtypů, které se liší druhem stimulace i produkcí cytokinů (obrázek 7) [111]. Je ale nezbytné zdůraznit, že díky své plasticitě neustále přechází z jednoho aktivačního stavu do jiného v závislosti na konkrétní situaci [113]. Narušení rovnováhy mezi různými aktivačními subtypy během zánětlivé odpovědi nebo následné reparace může mít fatální důsledky pro celý organismus.



Obrázek 7: Rozdělení monocytů a makrofágů dle specifických znaků; polarizace makrofágů, vytvořeno pomocí Biorender.com

1.3.4. THP-1 buněčná linie

THP-1 je lidská nádorová buněčná linie izolována z krve 1letého chlapce trpícího akutní monocytární leukémií [114]. Jedná se o menší kulaté až polygonální buňky, které na svém povrchu nesou znaky monocytů i makrofágů. Na rozdíl od jiných monocytárních linií mají stabilní diploidní karyotyp, což z nich dělá jedny z nejvíce využívaných buněčných populací v oblasti studia cytotoxicity, regulace aktivity monocytů a makrofágů a mechanismů imunopatologických dějů aterosklerózy či kardiovaskulárních onemocnění [115-117]. Za optimálních kultivačních podmínek rostou ve formě suspenze s časem zdvojení 26–34 h. Na prozánětlivý podnět reagují zvýšením exprese adhezních molekul a produkcí prozánětlivých

cytokinů (IL-6). Pomocí PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate), kyseliny retinové, nebo vitamínu D3 je lze diferencovat na makrofágům podobné buňky, které přetrvávají v adherentní kultuře a dále se nedělí [118; 119]. Také na rozdíl od neaktivovaných THP-1 vykazují zvýšenou fagocytární aktivitu a na prozánětlivý podnět produkují větší množství cytokinů [119]. Diferencované THP-1 makrofágy lze dále vhodnou kultivací polarizovat na M1 (pomocí LPS a IFN- γ) nebo M2 (pomocí IL-13 a IL-4) makrofágy [120]. THP-1 obecně nedisponují žádnými cytoplazmatickými ani membránovými imunoglobuliny, naopak se u nich potvrdila exprese Fc receptorů Fc γ RI a Fc γ RII, CD16, CD11b, CD14, případně CD68 a CD163 [121; 122]. Ke studiu konkrétních metabolických drah bývají často využívány i jejich geneticky modifikované varianty [123].

1.3.5. Zánět jako hlavní mechanismus imunotoxicity

Akutní zánět je komplexní obranná reakce organismu na narušení vnitřního prostředí. Za fyziologických podmínek odeznívá bez následků. Jestliže dojde k selhání regulačních mechanismů, 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 [77].

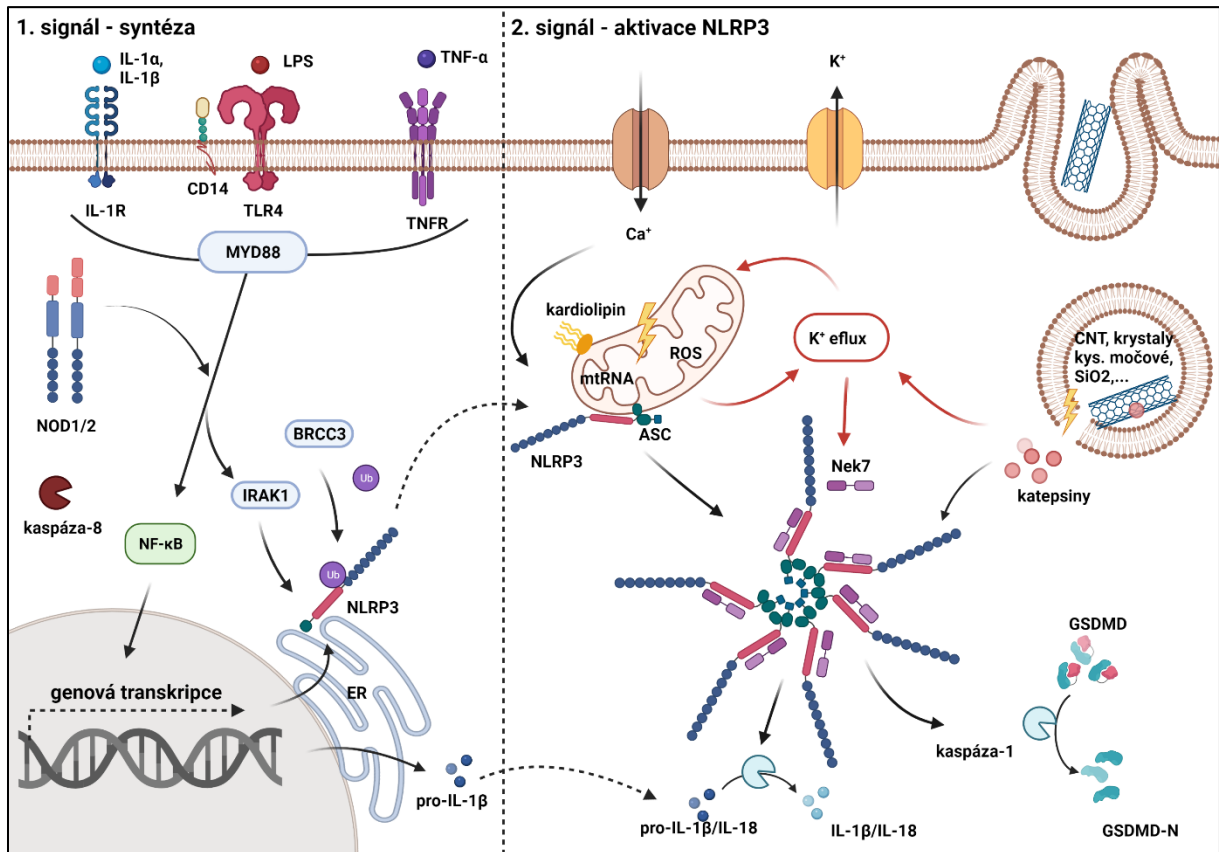
Vyvolání zánětu patří mezi základní mechanismy imunotoxického působení CNMs. Prozánětlivá odpověď vzniká nejčastěji v důsledku působení oxidačního stresu a přítomnosti kontaminace. Nelze opomenout ani mechanické poškození, k němuž dochází během transportu CNMs do buněk i během intracelulárních interakcí [124]. Jak bylo zmíněno dříve, ve většině případů jsou CNMs zpracovávány profesionálními fagocyty. Ty se obvykle snaží cizorodé částice eliminovat prostřednictvím uzavření do endozomů, případně fagozomů, které jsou buď transportovány ven v podobě exozomů, nebo fúzí s lysozomy, kde dochází k degradaci pomocí proteolytických enzymů [77]. Velmi důležitá je autofagie, při které jsou obvykle recyklovány vlastní makromolekulární komponenty za účelem buněčného přežívání [125]. Obdobně jako u endocytózy dochází k degradaci vlastního obsahu pomocí fúze s lysozomy [125]. Zároveň je to jedna z cest eliminace intracelulárních patogenů a nanočástic [126; 127]. Veškeré tyto procesy mohou být kdykoli přítomností CNMs narušeny ať už specifickými interakcemi vycházejícími z funkcionalizace částic, nebo mechanickým narušením intracelulárních membrán. Častým jevem je únik CNTs nebo nanodiamantů z lysozomů do cytoplazmy, kde mohou interagovat s dalšími organelami. Zároveň dochází k vyjití i veškerého lysozomálního obsahu, který má charakter DAMP [98; 128; 129]. Poškozené a destabilizované lysozomy nemohou být fúzovány s autofagozomy a tím je zablokován tzv. autofagický tok,

který je nezbytný pro fyziologický průběh a degradaci autofagie [130]. Ať už se jedná o oxidační nebo mechanický stres, výsledkem je soubor signálů vedoucí k rozvoji zánětu, ve kterém hraje klíčovou roli inflamazom.

Z obecného hlediska jsou inflamazomy makromolekulární komplexy jejichž prostřednictvím je aktivována kaspáza-1. Kaspáza-1 je enzym ze skupiny cysteinových proteináz, který štěpí gasdermin D (GSDMD), pro-IL-1 β , pro-IL-18 na biologicky aktivní IL-1 β , IL-18 a N-koncový zbytek gasderminu D (GSDMD-N) [77]. Mezi dosud popsané inflamazomy se řadí inflamazomy z rodiny NLR, NLRP3, NLRP1 a NLRP4, které jsou charakteristické vysokým obsahem leucinu na svém C-konci, tzv. LRRs (Leucin-Rich Repeats) rozpoznávající ligand a N-koncovou pyrinovou doménou (PYD), která asociuje s kaspázu vázající doménou (CARD, Caspase Activation and Recruitment Domain). Podskupinou NLR rodiny je NLRC a její jediný zástupce NLRC4, který se liší vazbou CARD domény přímo na NOD. Mezi ostatní inflamazomy patří AIM2 (Absent in Melanoma 2), který sestává pouze s PYD domény a NOD, a inflamazom Pyrin [131]. Kromě struktury se všechny inflamazomy liší i svými ligandy. Z tohoto hlediska je nejvýznamnější inflamazom NLRP3 [123].

NLRP3 (NOD-Like Receptor Family Pyrin Domain Containing 3), nebo též NALP3, je dosud nejvíce charakterizovaný inflamazom. Jeho význam spočívá v reaktivitě na velké množství různých signálů ze skupiny DAMPs i PAMPs. Dosud byly popsány tři hlavní cesty aktivace NLRP3, kanonická, nekanonická a alternativní. Liší se ligandy i buněčným typem, ve kterém probíhají. Nejlépe popsaná kanonická aktivace probíhá převážně u makrofágů a zahrnuje dva signály (obrázek 8) [132]. Exprese NLRP3 u makrofágů v klidovém stavu je velmi nízká a na sestavení inflamazomu nestačí. Klidové makrofágy také postrádají hlavní substrát kaspázy-1 pro-IL-1 β . První signál neboli „priming“ expresi těchto proteinů zvyšuje. Je závislý na aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B, která vychází ze signalizační kaskády PRRs [133]. Mezi typické aktivátory prvního signálu patří mikrobiální produkty, např. LPS, nebo endogenní molekuly, např. TNF- α [134]. Samy o sobě ovšem k aktivaci NLRP3 nevedou. Druhý signál zahrnuje vlastní sestavení NLRP3. Je závislé na konformační změně, kterou jednotlivé NLRP3 prodělávají pravděpodobně v důsledku úniku K⁺ iontů (K⁺ eflux) do extracelulárního prostředí [135]. Není zcela jasné, zda K⁺ eflux následuje po rozpoznání NLRP3 ligandů nebo zda k němu dochází souběžně. Nicméně dle mnoha studií se jedná o dosud jediný nalezený společný znak předcházející kanonickou a nekanonickou aktivaci [136]. Konformační změny na NLRP3 vedou k sebeoligomerizaci a k interakci s adaptorovým proteinem ASC (Apoptosis-Associated Speck-Like Protein) skrze vazbu ve svých PYD doménách. Následně se několik NLRP3 se svými ASC sestavují do makromolekulárního

komplexu a do odkrytých vazebných míst na NLRP3 se váže centrozomální protein Nek7 (NIMA-Related Protein Kinase 7) [137]. Dochází k masivní oligomerizaci ASC a navázání prokaspázy-1, která se takto sama aktivuje. Aktivovaná kaspáza-1 následně štěpí pro-IL-1 β , pro-IL-18 a GSDMD. Nakonec jsou aktivované IL-1 β a IL-18 transportovány pomocí transmembránového GSDMD-N ven z buňky [138].

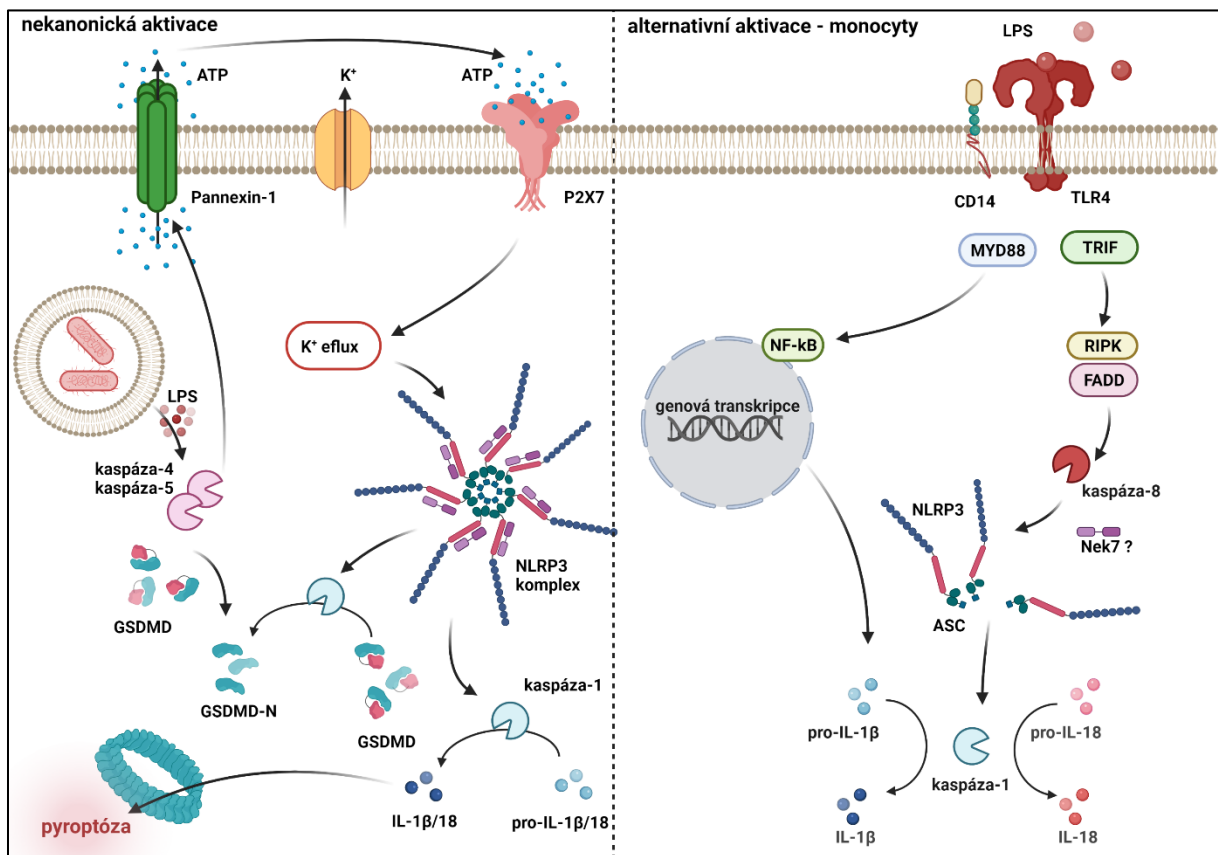


Obrázek 8: Kanonická aktivace NLRP3, vytvořeno pomocí Biorender.com

Sestavení NLRP3 u makrofágů bylo dosud prokázáno v přítomnosti vyšší koncentrace DAMPs, jako jsou katepsiny, HMGB1 (High-Mobility Group Box 1), krystaly kyseliny močové, a dále mitochondriální poškození a s ním související ROS a nerovnováha iontů. Vyvolat ho může též přítomnost intracelulárních patogenů, případně průnik např. *Escherichia coli* do cytoplazmy [139]. V souvislosti s *Escherichia coli* či mitochondriálním poškozením dochází k nekanonické aktivaci, která nezřídka končí buněčnou smrtí spojenou s uvolněním prozánětlivých markerů, tzv. pyroptózou (obrázek 9) [132]. Podíl na aktivaci zde mají kaspáza-4 a kaspáza-5, které nezávisle na TLR4 specificky váží LPS gramnegativních bakterií a po aktivaci štěpí cytoplazmatickou část pannexinu-1, který představuje membránový kanál pro ATP (Adenosine Triphosphate). Uvolněný ATP se v tomto případě chová jako autokrinní stimulant, který skrze purinoreceptor P2X7 iniciuje K⁺ eflux a ještě více posiluje aktivaci

NLRP3 [140; 141]. V důsledku masivní tvorby GSDMD-N a P2X7 porů je změněn osmotický tlak a buňka praská, přičemž do okolí uniká veškerý její obsah. Dá se předpokládat, že nekanonická aktivace NLRP3 je nefyziologickým procesem asociovaným s řadou autoimunitních onemocnění [142].

Nejméně probádaná alternativní aktivace NLRP3 (obrázek 9) je charakteristická pro cirkulující monocyty, které na rozdíl od makrofágů exprimují vysoký podíl NLRP3. Tím pádem není potřeba dvou signálů a produkce IL-1 β nastává již po stimulaci LPS [143; 144]. Důležitou roli tu zastává signalizační kaskáda skrze adaptorový protein FADD (FAS Associated Death Domain) a kaspázu-8, ale přesný mechanismus aktivace je neznámý. Je zajímavé, že pravděpodobně nedochází k úniku K⁺ iontů ani k sestavení komplexu, přestože se zapojují jak ASC, tak kaspáza-1. Výsledkem je slabší, avšak dlouhodobá produkce IL-1 β [145].



Obrázek 9: Nekanonická aktivace NLRP3 u makrofágů a alternativní aktivace NLRP3 u monocytů pomocí LPS, vytvořeno pomocí Biorender.com

2. CÍLE PRÁCE

Cílem předkládané disertační práce bylo *in vitro* hodnocení možného prozánětlivého účinku vybraných CNMs, konkrétně nemodifikovaných GPs a MWCNTs na základě:

- (1) stanovení cytotoxicity u vybraných exponovaných imunokompetentních buněk
- (2) stanovení produkce cytokinů u vybraných exponovaných imunokompetentních buněk s ohledem na aktivitu inflamazomu NLRP3
- (3) stanovení modulačních účinků na fyziologické prozánětlivé funkce vybraných exponovaných imunokompetentních buněk

3. MATERIÁL A METODY

3.1. CNMs a jejich charakterizace

K hodnocení prozánětlivého účinku byly vybrány následující CNMs:

GP1: nemodifikované grafenové plátky, forma prášku (PL-P-G750; PlasmaChem GmbH, Německo)

GP2: nemodifikované grafenové plátky, forma prášku, laskavě poskytnuto prof. Adriele Prina-Mello z centra CRANN (The Centre for Research on Adaptive Nanostructures and Nanodevices, Trinity College Dublin, Irsko)

MWCNTs: nemodifikované mnohostěnné karbonové nanotrubičky, forma prášku (659258; Merck, Německo)

Detailní charakterizace pomocí rentgenové spektroskopie, Ramanovy spektroskopie a termogravimetrické analýzy byla provedena ve spolupráci s Centrem materiálů a nanotechnologií (CEMNAT, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice) a s Ústavem fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v. v. i. (Praha). Výsledky jsou dostupné jako doplňující data v naší publikované práci [146]. Základní elementární analýzu shrnuje tabulka 1.

Tabulka 1: Elementární analýza CNMs [146]

	C (%)	O (%)
GP1	92,5	7,5
GP2	95,5	4,5
MWCNTs	98,5	1,5

3.1.1. Optimalizace stabilizace nanomateriálů v suspenzi

Vzhledem k hydrofobnímu charakteru používaných nanomateriálů musela být nejprve provedena vhodná stabilizace CNMs ve vodném prostředí. Na základě literární rešerše byl jako vhodný detergent vybrán cholát sodný (Merck, Německo). V pilotním pokusu byly vzorky CNMs 30 min. homogenizovány ve 0,25% roztoku cholátu v milliQ vodě nebo absolutním etanolu (p.a., PENTA, Česká republika) pomocí ultrazvukové sondy (Bandelin, Německo). Stabilita CNMs suspenze a stav agregace byly následně ověřeny pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM), hodnocení hydrodynamického průměru (D_H) a hodnoty polydisperzního indexu (Pdl) (postup měření viz dále). Dále byla připravena koncentrační řada cholátu sodného od počáteční koncentrace 0,001 % a ředěné CNMs byly postupně proměřovány a získaná data

porovnávána s výchozími hodnotami z pilotního pokusu. Jako nejnižší koncentrace cholátu sodného pro stabilizaci GPs a MWCNTs, kdy nedochází ke změnám H_D a PdI po dobu minimálně 96 h, byla stanovena koncentrace 0,02 %.



Obrázek 10: Reprezentativní ukázka hotové suspenze GPs

3.1.2. Příprava suspenzí

Zásobní suspenze MWCNTs (0,5 mg/ml) a obou GPs (0,25 mg/ml) byly připraveny dispergováním prášku v 0,02% cholátu sodném v milliQ vodě (Merck, Německo) s následnou ultrazvukovou homogenizací pomocí „microtip“ sondy (GPs: 30 min, 75 % amplitudy; MWCNTs: 5 min, 55 % amplitudy; Q700, QSonica, NY, USA). Z hotových suspenzí byly odebrány vzorky ke stanovení základní charakterizace. Zásobní suspenze byly dále ředěny do kultivačních médií.

3.1.3. Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Vzorky suspenzí byly 10krát nebo 100krát zředěny v milliQ vodě a naneseny ve formě jedné kapky na mřížku pokrytou uhlíkovou membránou. Po 1 min. byly kapky odsáty a mřížka vysušena pomocí filtračního papíru. Vzorky byly pozorovány mikroskopem Philips 208 S Morgagni při urychlovacím napětí 80 kV (FEI, CA, USA).

3.1.4. Dynamický rozptyl světla (DLS)

Před vlastním měřením byly suspenze GP1 a GP2 10krát zředěny v milliQ vodě nebo v plném kultivačním médiu s obsahem 10 % FBS (kompletní složení viz kap. 3.2.1.). Měření probíhalo na základě intenzity rozptýleného světla (He laser o vlnové délce 633 nm, úhel rozptylu 173°) pomocí přístroje Zetasizer Nano-Ultra (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK). Výsledné hodnoty H_D ve vodě a v médiu vychází z aritmetického průměru minimálně šesti měření.

3.1.5. Zeta potenciál

GP1, GP2 a MWCNTs suspenze byly 100krát zředěny v milliQ vodě a následně 2krát zředěny ve vodě nebo v kultivačním médiu obsahujícím 10 % FBS (kompletní složení viz kap. 3.2.1.) Měření zeta potenciálu (ζ) probíhalo na přístroji Zetasizer Nano-Ultra (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK).

Závislost ζ -potenciálu a H_D na pH byla měřena pomocí přístroje Zetasizer Nano ZSP s titrátorem MPT-2 (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK). Před měřením byly všechny suspenze CNMs zředěny v 10mM roztoku Na_2HPO_4 (pH 7,2; Merck, Německo) a během měření bylo pH postupně upravováno pomocí 10 mM NaOH nebo HCl (PENTA, Česká republika).

Data byla zaznamenána a analyzována s využitím Zetasizer Software v7.11. Hodnoty ζ -potenciálu byly vypočteny pomocí Smoluchovského rovnice. Každá hodnota dat představuje průměr ze tří měření.

3.1.6. Biologická kontaminace

Přítomnost biologické kontaminace všech tří CNMs byla hodnocena pomocí buněčné eseje, která zahrnuje komerčně dostupné reportérové buněčné linie citlivé na TLR4 a TLR2 agonisty, HEK-BlueTM-4, respektive HEK-BlueTM-2 (InvivoGen, Francie). Tyto buňky vychází z linie lidských HEK293 (Human Embryonic Kidney Carcinoma), která je výrobcem stabilně transfekována konkrétními geny, které zajišťují požadovanou signalizaci (v tomto případě spojenou s TLR4, respektive TLR2), a genem pro sekretovanou alkalickou fosfatázu (SEAP, Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase). SEAP se aktivuje v důsledku aktivity NF- κ B navázané na požadovanou signální dráhu a výsledkem je produkce alkalické fosfatázy (AP). Přítomnost AP v supernatantech je hodnocena kolorimetricky pomocí média QUANTI-BlueTM, kdy reakcí substrátu s AP dochází k modrému zbarvení.

Buněčné linie HEK-BlueTM-4 a HEK-BlueTM-2 byly udržovány jako adherentní kultura v selekčním médiu (viz kap. 3.2.1.) při teplotě 37 °C a v atmosféře 5 % CO₂. Po dosažení

~80 % konfluence byly buňky sklizeny sklepním, stočeny (300 g, 5 min., pokojová teplota) a resuspendovány v základním médiu (viz kap. 3.2.1). Následně byly nasazeny do 96jamkové kultivační destičky (5×10^4 buněk/jamka/200 μ l) a inkubovány se vzorky GP1, GP2 (60 μ g/ml) a MWCNTs (30 μ g/ml). Buňky bez expozice, buňky kultivované s ultra čistým lipopolysacharidem (LPS_{up}, 100 ng/ml, InvivoGen, Francie) a buňky kultivované s teplem usmrcenými bakteriemi *Staphylococcus aureus* (HKSA, 10^7 bakterií/ml, InvivoGen, Francie) byly použity jako kontroly. Jako kontrola interference sloužily buňky exponované kombinaci GP1, GP2 a MWCNTs s LPS_{up} nebo HKSA. Po 24h inkubaci při teplotě 37 °C a 5 % CO₂ byly supernatanty (20 μ l) přeneseny do nové 96jamkové destičky a 2 h inkubovány se 180 μ l QUANTI-Blue™ při teplotě 37 °C. Absorbance byla měřena při vlnové délce 630 nm (spektrofotometr Synergy HTX, Biotek, Německo).

Životnost buněk byla hodnocena pomocí měření úniku laktát dehydrogenázy (LDH, CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay, Invitrogen, USA) z poškozených buněk do supernatantů dle pokynů výrobce, viz dále. Absorbance byla měřena při 490 nm proti 690 nm jako referenční vlnové délce (spektrofotometr Synergy HTX).

3.2. Buněčné populace

Potenciálně imunotoxický vliv GPs a MWCNTs byl sledován u buněčných populací:

THP-1: lidská leukemická monocytární linie (The European Collection of Authenticated Cell Cultures, ECACC, Salisbury, UK)

THP1-null: linie odvozena od THP-1, pozitivní kontrola aktivace inflamazomu NLRP3 (stabilní exprese NLRP3, ASC a pro-kaspázy 1, InvivoGen, Francie)

THP1-defNLRP3: linie odvozena od THP-1, negativní kontrola aktivace inflamazomu NLRP3 (knockdown exprese NLRP3 genu, InvivoGen, Francie)

THP1-defASC: linie odvozena od THP-1, negativní kontrola aktivace inflamazomu NLRP3 (knockdown exprese ASC genu, InvivoGen, Francie)

THP1-HMGB1-Lucia™: reportérová buněčná linie odvozená od THP-1, detekce pyroptózy (stabilní exprese fúzního proteinu HMGB1::Lucia, InvivoGen, Francie)

Primární monocyty: Izolace monocytů z periferní krve dobrovolných dárců probíhala se souhlasem Etické komise Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové (č. 201902 S22P)

Jako detekční systém byly využívány buněčné eseje založené na reportérových buňkách odvozených od linie HEK293, které v reakci na konkrétní ligand tvoří AP. Princip detekce je analogický s hodnocením kontaminace, viz kap. 3.1.6.:

HEK-Blue™ IL-1β: specifická detekce lidského IL-1β v rozmezí 0,1 – 100 ng/ml (stabilní exprese IL-1R1, SEAP, knockdown hTNFR1, hTNFR2, InvivoGen, Francie)

HEK-Blue™ IL-6: specifická detekce lidského IL-6 v rozmezí 0,03 – 10 ng/ml (stabilní exprese IL-6R, STAT3, SEAP, InvivoGen, Francie)

HEK-Blue™-4: specifická citlivost vůči TLR4 agonistům (LPS: 0.01 EU/ml; stabilní exprese hTLR4, SEAP, součást HEK-Blue™ LPS Detection Kit, InvivoGen, Francie)

HEK-Blue™-2: specifická citlivost vůči TLR2 agonistům (stabilní exprese hTLR2, SEAP, součást Plasmotest™ - Mycoplasma Detection Kit InvivoGen, Francie)

3.2.1. Kultivace a uchování buněčných linií

Pokud není uvedeno jinak, probíhaly všechny kultivace a inkubace vždy v inkubátoru při 37 °C v 5 % CO₂. Pro kultivaci byla využívána média RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) a DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) bez fenolové červeně od firmy Corning (MA, USA), inaktivované fetální bovinní sérum s nízkým obsahem endotoxinu (FBS_{LE}, Biosera, MO, USA), GlutaMAX™ (Gibco, MA, USA), pyruvát sodný, HEPES, antibiotika penicilin a streptomycin (Merck, Německo), Normocin™ (InvivoGen, Francie) a selekční antibiotika Hygromycin B Gold, Zeocin® a HEK-Blue™ Selection (InvivoGen, Francie). Složení médií pro konkrétní buněčné linie je znázorněno v tabulkách 2 a 3.

Tabulka 2: Složení kultivačních médií linií THP-1

	Základní	Selekční	
	THP-1	THP1-null/defNLRP3/defASC	THP1-HMGB1-Lucia™
	RPMI 1640	RPMI 1640	RPMI 1640
FBS_{LE}	10 % (v/v)	10 % (v/v)	10 % (v/v)
GlutaMAX™	2 mM	2 mM	2 mM
Pyruvát sodný	1 mM	1 mM	1 mM
HEPES	10 mM	25 mM	25 mM
Penicilin	50 U/ml	100 U/ml	100 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
Normocin™	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
Hygromycin B		200 µg/ml	
Zeocin®			100 µg/ml

Tabulka 3: Složení kultivačních médií linií HEK293

	Základní	Selekční		
	HEK	HEK IL-1 β	HEK-Blue™ IL-6	HEK-Blue™ -4/-2
	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
FBS_{LE}	10 % (v/v)	10 % (v/v)	10 % (v/v)	10 % (v/v)
GlutaMAX™	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
Penicilin	50 U/ml	50 U/ml	50 U/ml	50 U/ml
Streptomycin	50 μ g/ml	50 μ g/ml	50 μ g/ml	50 μ g/ml
Normocin™	100 μ g/ml	100 μ g/ml	100 μ g/ml	100 μ g/ml
Hygromycin B		200 μ g/ml		
Zeocin®		100 μ g/ml		
HEK-Blue™ Selection			0,4 % (v/v)	0,4 % (v/v)

Buňky monocytární linie THP-1 byly po rozmrazení kultivovány v základním médiu, přičemž transfekované THP-1 byly po 2. pasáži přeneseny do selekčního média. Všechny THP-1 byly udržovány ve formě buněčné suspenze v koncentračním rozmezí 1×10^5 – 8×10^5 buněk/ml (THP-1) a 5×10^5 – $1,8 \times 10^6$ buněk/ml (transfekované THP-1).

Buňky odvozené od linie HEK293 byly po rozmrazení kultivovány v základním médiu a následně po 2. pasáži přeneseny do selekčního média. Všechny HEK byly udržovány jako adherentní kultura a pasážovány po dosažení ~80 % konfluence.

Před vlastními experimenty byly veškeré buňky vždy počítány pomocí trypanové modři (0,2 %, Gibco, MA, USA) v Bürkerově komůrce (Blau Brand, Německo) pod optickým mikroskopem (Nikon Eclipse TS2, Nikon, Japonsko). Zásobní populace v koncentraci 3 – 5×10^6 buněk/ml byly vždy uchovávány zamrazené v parách dusíku (-165 °C) v zamrazovacím médiu stávajícím se z 20 % FBS_{LE}, 10 % dimethylsulfoxidu (DMSO, Merck, Německo) a 70 % RPMI/DMEM.

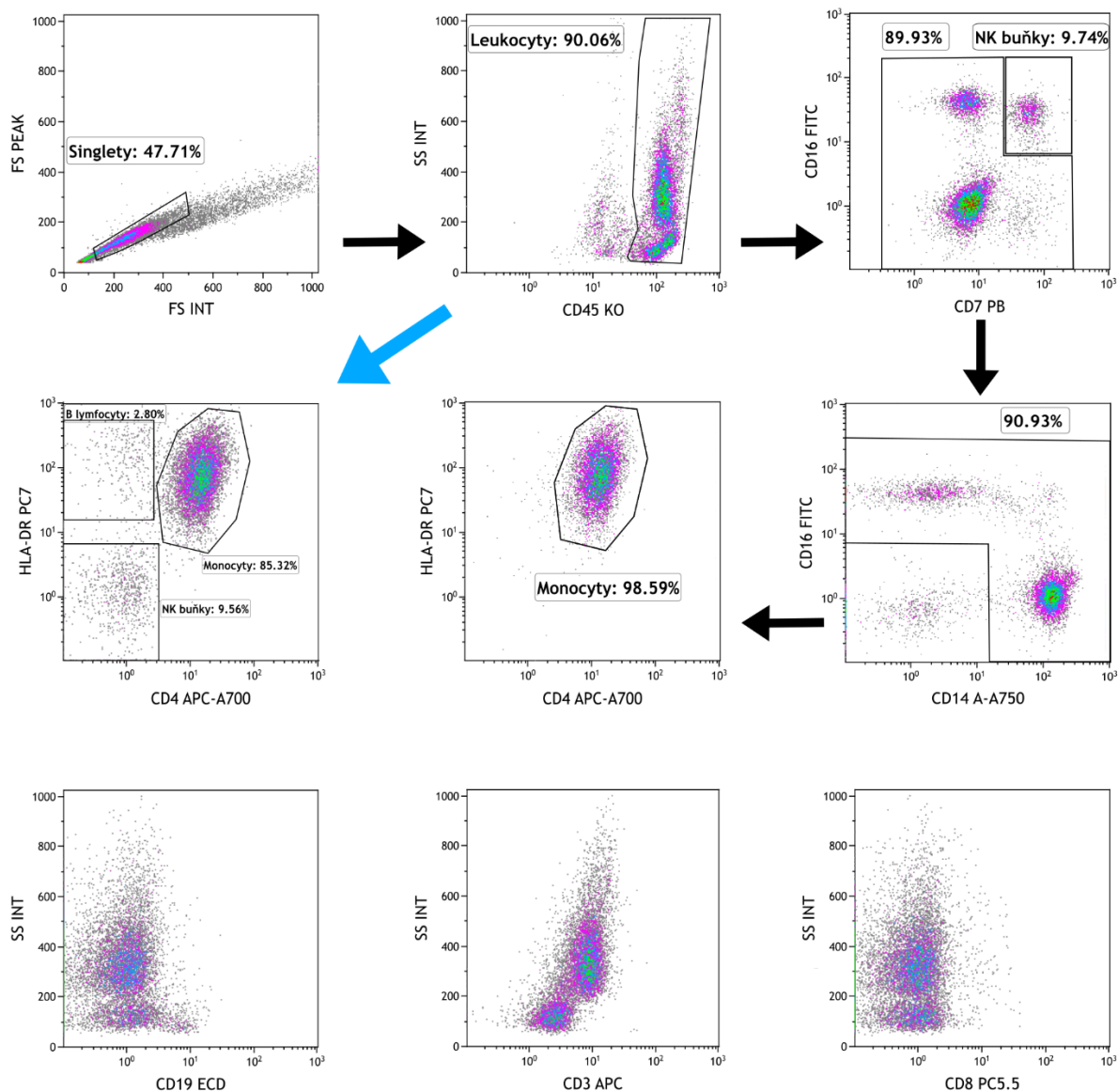
3.2.2. Izolace monocytů

Ke sběru plné krve pro izolaci monocytů byly použity odběrové zkumavky Vacutainer® obsahující Na₂EDTA (Becton Dickinson, Česká republika). Dále byla plná krev odebírána do zkumavek Vacutainer® bez antikoagulačního činidla, kdy se krev nechala 1 h srážet při pokojové teplotě a následně byla stočena při 1000 g, 10 min. Získané autologní sérum bylo odebráno pro přípravu kultivačního média. Monocyty byly izolovány na základě negativní selekce inkubací krve s RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail dle protokolu výrobce (50 μ l/ml, STEMCELL Technologies Inc., Kanada). Nechtěné populace byly odděleny centrifugací (1200 g, 20 min., pokojová teplota) na základě hustotního gradientu v Histopaque®-1077 (Merck, Německo). Zbytkové erytrocyty byly odstraněny lyzačním

roztokem obsahujícím 150 mM KH_4Cl , 10 mM KHCO_3 a 0,1 mM Na_2EDTA (pH 7,2; Merck, Německo). Izolované monocyty byly 2krát promyty 2% FBS_{LE} v PBS a nakonec resuspendovány v kultivačním médiu RPMI 1640 bez fenolové červeně, které obsahovalo 20 % autologního séra, 2 mM GlutaMAX™ a antibiotikum Primocin™ (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, InvivoGen, Francie).

3.2.3. Stanovení čistoty izolace monocytů

Čistota izolace monocytů byla stanovena pomocí průtokové cytometrie (cytometr Navios™, Beckman Coulter, KA, USA), kdy jednotlivé buněčné populace byly rozlišeny na základě exprese specifických povrchových znaků. Po odstranění erytrocytů byla část izolátu promyta roztokem PBS obsahujícím bovinní sérový albumin (BSA, 1 %; Merck, Německo), FBS (2 %) a NaN_3 (0,1 %; Merck, Německo) a inkubována ve tmě 15 min. při pokojové teplotě s protilátkami proti CD16 FITC (klon 3G8), CD56 PE (klon N901), CD19 ECD (klon J3-119), CD8 PC5.5 (klon B9.11), HLA-DR PC7 (klon Immu-357), CD3 APC (klon UCHT1), CD4 APC-Alexa 700 (klon 13B8.2), CD14 APC-Alexa 750 (klon RMO52), CD7 PB (klon 8H8.1), a CD45 KO (klon J33). Všechny protilátky byly zakoupeny od společnosti Beckman Coulter. K vyhodnocení analýzy vzorků včetně nastavení kompenzací byl využit software Kaluza (Beckman Coulter). Reprezentativní gatovací strategii znázorňuje obrázek 11.

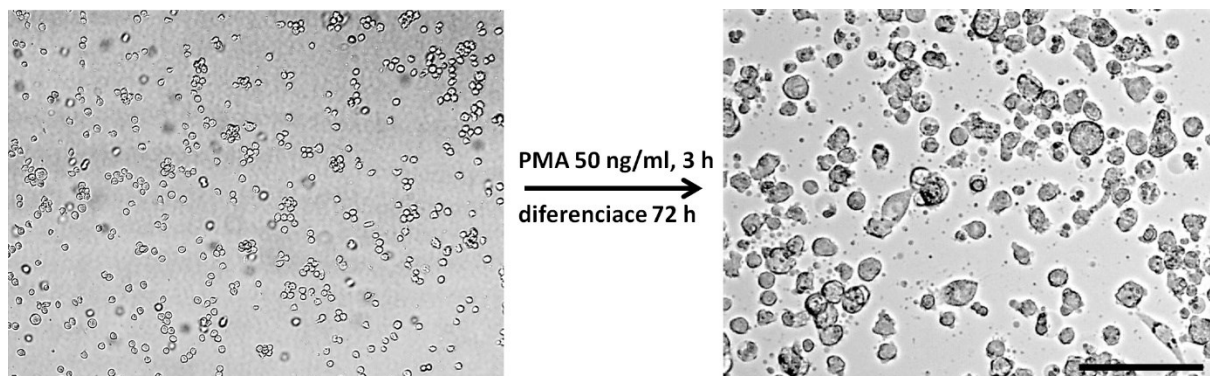


Obrázek 11: Reprezentativní gatovací strategie hodnocení čistoty izolace monocytů

3.3. Expozice buněk CNMs

Na vlastní hodnocení cytotoxického a prozánětlivého a protizánětlivého účinku CNMs byly využívány buněčná linie THP-1 a primární monocyty. Buňky THP-1 byly vždy před vlastní expozicí diferencovány na THP-1 makrofágy (obrázek 3) pomocí PMA (Merck, Německo). Postup diferenciaci probíhal tak, že suspenze THP-1 byly v koncentraci 1×10^6 buněk/ml nasazeny do 6jamkových ($1,8 \times 10^6$ buněk/jamka/1 ml) nebo 96jamkových ($1,8 \times 10^5$ buněk/jamka/200 μ l) kultivačních destiček a 3 hodiny inkubovány s PMA (50 ng/ml). Poté bylo médium s PMA opatrně odsáto a buňky se nechaly dalších 72 h diferencovat v kultivačním

médiu již bez PMA. Takto diferencované buňky byly dále při zachování původního objemu exponovány různým koncentracím CNMs.



Obrázek 12: Schéma diferenciac THP-1 monocytů na makrofágy: Diferencované THP-1 makrofágy se přestaly dělit a adhovaly k povrchu kulturační destičky, měřítko: 20 μm

Transfekované linie THP-1 byly použity pro specifické hodnocení aktivace NLRP3 a jejich příprava probíhala dle pokynů výrobce, viz dále.

Čerstvě izolované monocyty byly resuspendovány v kulturačním médiu, spočítány v Bürkerově komůrce a v koncentraci 2×10^6 buněk/ml nasazeny do 6jamkových (2×10^6 buněk/jamka/1 ml) nebo 96jamkových (2×10^5 buněk/jamka/200 μl) kulturačních destiček. Po 1 hodině inkubace byly odstraněny nepřisedlé buňky a přidány CNMs v různých koncentracích (při zachování původního objemu).

3.3.1. Intracelulární lokalizace CNMs pomocí TEM

V 6jamkových destičkách byly THP-1 makrofágy a izolované monocyty 24 h inkubovány s MWCNTs (25 $\mu\text{g/ml}$), GP1 (50 $\mu\text{g/ml}$), nebo GP2 (50 $\mu\text{g/ml}$). Následně byly buňky promyty DPBS pufrem (Merck, Německo), fixovány ve studeném 3% glutaraldehydu (Merck, Německo) a po promytí Milloning pufrem (135 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 107 mM NaOH, Merck, Německo) znovu fixovány v 1% roztoku OsO_4 v Milloning pufru. Vzorokly byly postupně dehydratovány v acetonové řadě (30% 50%, 70%, 90%, 100%, 100%), zality ve směsi Epon-Durcupan (Epon 812 Serva, Heidelberg, Německo; Durcupan, ACM Fluka, Buchs, Švýcarsko) a polymerovány při 60 $^\circ\text{C}$ po dobu 72 hodin. Na ultramikrotomu UC 7 (UC 7, Leica, Rakousko) byly pomocí skleněných nožů nařezány ultratenké řezy (60 nm), které byly kontrastovány 2% octanem uranulu a 2% citrátem olovnatým. Řezy byly pozorovány pomocí mikroskopu Philips 208 S Morgagni, (FEI, San Jose, CA, USA).

3.3.2. Hodnocení cytotoxicity CNM stanovením uvolnění LDH

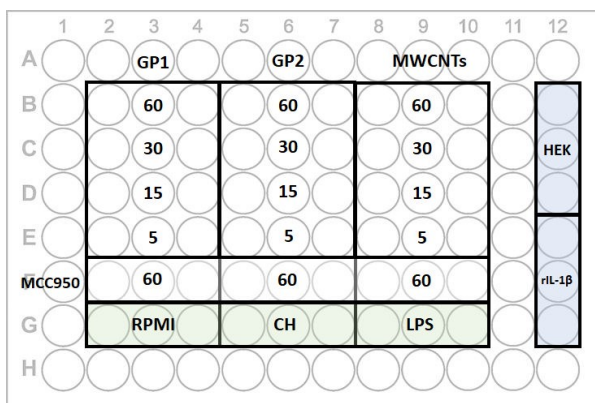
V 96jamkových destičkách byly THP-1 makrofágy a izolované monocyty exponovány různými koncentracemi GP1, GP2 a MWCNTs po dobu 24–48 h. Buňky bez expozice a buňky kultivované s 0,004% cholátem sodným byly použity jako kontroly. 45 min. před ukončením expozice byl ke kontrolním buňkám přidán lyzační roztok (10krát koncentrovaný, Invitrogen, USA). Aby se odstranily CNMs, byly následně odebrané supernatanty stočeny při 10 000 g, 10 min. Čisté supernatanty spolu s lyzáty byly po 50 μ l přeneseny do nové 96jamkové destičky a zbytek byl uschován pro měření cytokinů, viz dále. K hodnocení byla použita souprava CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay, (Invitrogen, USA). Ke vzorkům byl přidán substrát (50 μ l) a destička se nechala 30 min inkubovat za pokojové teploty ve tmě. Nakonec byl přidán STOP roztok a byla odečtena absorbance při 490 nm proti 690 nm jako referenční vlnové délce (spektrofotometr Synergy HTX).

3.3.3. Stanovení produkce cytokinů pomocí ELISA metody

Supernatanty získané z exponovaných monocytů a THP-1 makrofágů byly hodnoceny pro přítomnost cytokinů IL-6, TNF- α a IL-10 pomocí sendvičové ELISA metody. Byly použity soupravy od firmy Bio-Techne R&D Systems s.r.o. (MN, USA) a to konkrétně: Human IL-6 Quantikine ELISA Kit (citlivost 0,7 pg/ml), Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit (citlivost 6,23 pg/ml) a Human IL-10 Quantikine ELISA Kit (citlivost 3,9 pg/ml). Postup probíhal dle protokolu výrobce. Ředění supernatantů se řídilo dle pilotních měření daných buněk s pozitivní kontrolou LPS (z *Escherichia coli* O55:B5; Merck, Německo) ve finální koncentraci 100 ng/ml. Výsledné ředění supernatantů bylo 25krát (IL-6) a 5krát (TNF- α , IL-10). Pokusy byly následně opakovány s finálním ředěním 2krát.

3.3.4. Stanovení alternativní aktivace NLRP3 pomocí detekce IL-1 β

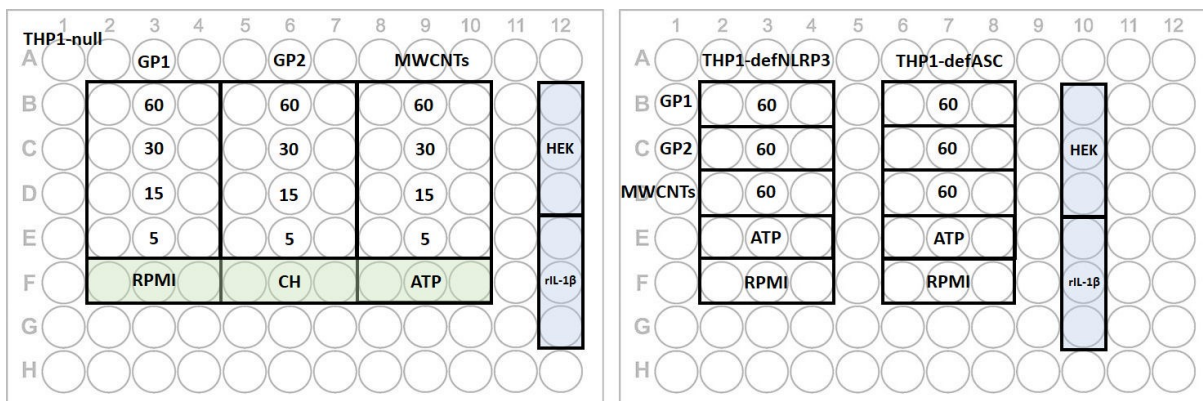
Hodnocení produkce IL-1 β izolovaných monocytů probíhalo pomocí buněčné eseje zahrnující HEK-Blue™ IL-1 β . Izolované monocyty byly 24 h inkubovány s GP1, GP2 a MWCNTs v 96jamkové kultivační destičce. Neexponované monocyty, monocyty kultivované s 0,004% cholátem sodným a monocyty kultivované s LPS_{up} (100 ng/ml) sloužily jako kontroly. Pro ověření specifické aktivace NLRP3 byl použit inhibitor MCC950 (10 μ M, Invivogen, Francie). Po skončení inkubace byly supernatanty (50 μ l) přeneseny do nové 96jamkové destičky a ke každému z nich bylo přidáno 150 μ l buněčné suspenze HEK-Blue™ IL-1 β ve finální koncentraci 5×10^4 buněk /jamku. Po 48 h inkubace bylo 50 μ l supernatantu přeneseno ke 150 μ l QUANTI-Blue™ a po 1 h inkubace byla odečítána absorbance při 630 nm.



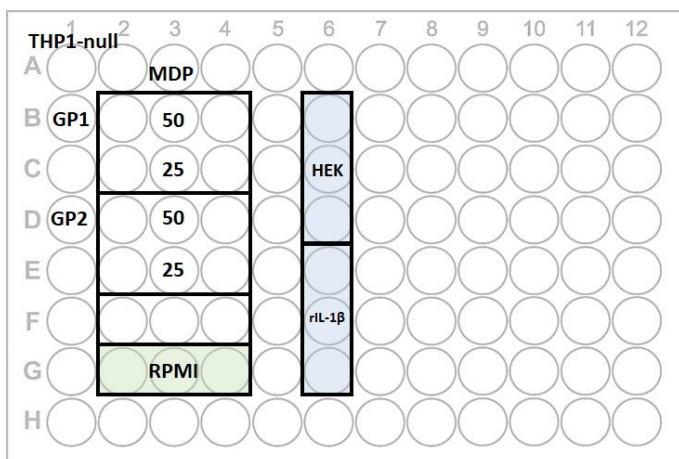
Obrázek 13: Schéma nasazení pokusu: RPMI – neexponované monocyty; HEK – kontrola eseje; rIL-1 β – rekombinantní IL-1 β (250 ng/ml) pozitivní kontrola eseje; GP1/GP2/MWCNTs – koncentrace 5–60 μ g/ml; CH – monocyty exponované cholátu sodnému; MCC950 – inhibitor spolu s CNMs

3.3.5. Stanovení kanonické aktivace NLRP3 pomocí detekce IL-1 β

Ke stanovení kanonické aktivace NLRP3 byly použity THP1-null buňky, které byly výrobcem standardizovány jako pozitivní kontrola kanonické aktivace NLRP3. Jako kontrola specifity NLRP3 byly využity deficientní buňky THP1-defNLRP3 a THP1-defASC. K detekci produkovaného IL-1 β byly použity HEK-Blue™ IL-1 β . Nejdříve byly všechny THP-1 buňky nasazeny do 96jamkové destičky ($3,6 \times 10^5$ buněk/jamka/200 μ l) a aktivovány pomocí LPS_{up} (1 μ g/ml, 1. signál kanonické aktivace). Po 3 h inkubace bylo médium s LPS_{up} odstraněno a nahrazeno médiem s GP1, GP2 a MWCNTs (2. signál kanonické aktivace). Neexponované buňky, buňky kultivované s 0,004% cholátem sodným a buňky kultivované s ATP (5 mM, Invivogen, Francie) sloužily jako kontroly. Pro vyloučení případné inhibice a interference byly LPS_{up} aktivované THP1-null kultivovány s kombinací muramyl dipeptidu (MDP, 10 μ g/ml, Invivogen, Francie) a GP. Buňky exponované pouze MDP sloužily jako kontrola. Postup hodnocení supernatantů probíhal totožně jako u monocytů.



Obrázek 14: Schéma nasazení pokusu: RPMI – LPS_{up} stimulované THP1-null bez expozice; CH – LPS_{up} stimulované THP1-null exponované cholátu sodnému; HEK – kontrola eseje; rIL-1 β – rekombinantní IL-1 β (250 ng/ml) pozitivní kontrola eseje; GP1/GP2/MWCNTs – koncentrace 5–60 μ g/ml



Obrázek 15: Schéma nasazení pokusu: RPMI – LPS_{up} stimulované THP1-null bez expozice; HEK – kontrola esejí; rIL-1β – rekombinantní IL-1β (250 ng/ml) pozitivní kontrola esejí; GP1/GP2 – koncentrace 25 a 50 μg/ml

3.3.6. Hodnocení poškození lysozomů pomocí detekce katepsinu B

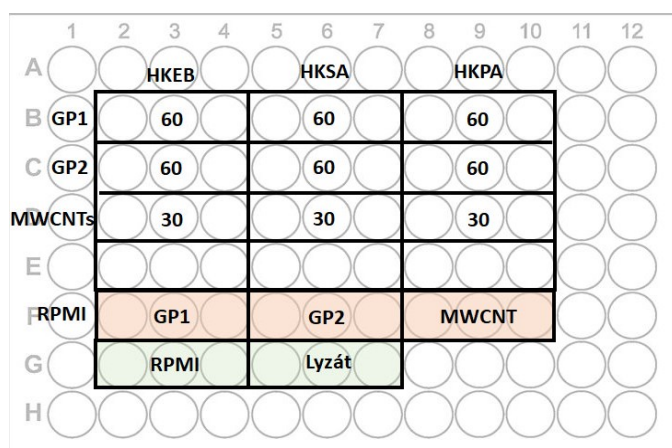
THP1-null byly nasazeny do 6jamkových destiček v koncentraci 1×10^6 buněk/ml a 3 h aktivovány pomocí LPS_{up} (1 μg/ml). Po aktivaci bylo médium opatrně odsáto a nahrazeno médiem s GP1, GP2 nebo MWCNTs (30 μg/ml). Jako pozitivní kontrola sloužily buňky ošetřené Leu-Leu metyl ester hydrobromidem (LLME, 100 μM, Merck, Německo). Inkubace probíhala 2, 6 a 24 h. Poté byly buňky opatrně seškrábnuty pomocí buněčné škrabky, 2krát promyty v DPBS pufru a resuspendovány v kultivačním médiu v koncentraci 2×10^6 /ml. Suspenze byly přeneseny do kultivačních misek se skleněným dnem μ-Slide (Ibidi GmbH, Německo) a postupně 1 h inkubovány s cresil violet – (arginin-arginin)₂ (CV-(RR)₂) a 10 min. barveny pomocí Hoechst 33342. Reagencie byly součástí soupravy CV-Cathepsin Detection Kit, (Enzo Life Sciences, Inc., NY, USA). Živé buňky byly snímány za běžných kultivačních podmínek pomocí konfokálního mikroskopu SP-2 (Leica Microsystems, Německo).

3.3.7. Hodnocení pyroptózy pomocí detekce HMGB1

Ke stanovení pyroptózy byly vybrány reportérové buňky THP1-HMGB1-LuciaTM, které při pyroptické smrti uvolňují do supernatantu luminiscenčně značený HMGB1. Buňky byly v počtu 1×10^6 /jamku/200 μl nasazeny do 96jamkové destičky a nechaly se 3 h inkubovat s PMA (50 ng/ml) a následně 72 h diferencovat v čerstvém médiu. Diferencované buňky byly 24 h inkubovány s GP1, GP2 a MWCNTs. Buňky bez expozice, exponované cholátu sodnému nebo nanočásticím SiO₂ (100 μg/ml, Invivogen, Francie) byly použity jako kontroly. Supernatanty (10 μl) byly přeneseny do bílé 96jamkové destičky a pomocí injektorů (Biotek, Německo) bylo ke každému vzorku přidáno 50 μl roztoku QUANTI-LucTM (Invivogen, Francie). Luminiscence byla odečítána na multidetekčním spektrofotometru HTX Synergy.

3.4. Hodnocení modulační funkce

Pro hodnocení modulačních účinků CNMs na fyziologické funkce imunitních buněk byly vybrány nejvyšší necytotoxické koncentrace GPs (60 µg/ml) a MWCNTs (30 µg/ml). THP-1 makrofágy nebo izolované monocyty byly v 96jamkových destičkách 24 h inkubovány s CNMs. Neexponované buňky byly použity jako kontroly. Následně bylo médium vyměněno a nepohlčené CNMs odstraněny. K buňkám včetně kontrol byly na dalších 24 h přidány teplem usmrcené (HK, heat killed) bakterie v čerstvém kultivačním médiu, konkrétně: *Escherichia coli* sérotyp 0111:B4 (HKEB), *Staphylococcus aureus* (HKSA) a *Pseudomonas aeruginosa* (HKPA) (InvivoGen, Francie) ve finální koncentraci 1×10^7 bakterií/ml//200 µl. Buňky bez jakékoli expozice, buňky exponované pouze CNMs nebo bakteriím byly použity jako kontroly. Po ukončení inkubace byly sebrány supernatanty, které byly rozděleny na analýzu cytokinů a na hodnocení životnosti buněk pomocí stanovení LDH.



Obrázek 16: Schéma nasazení pokusu imunomodulace: RPMI – neexponované monocyty/THP-1 makrofágy; HEK – kontrola eseje; rIL-1 β – rekombinantní IL-1 β (250 ng/ml) pozitivní kontrola eseje; GP1/GP2/MWCNTs – koncentrace 5–60 µg/ml; RPMI+GP1/GP2/MWCNTs – kontrolní expozice bez bakterií

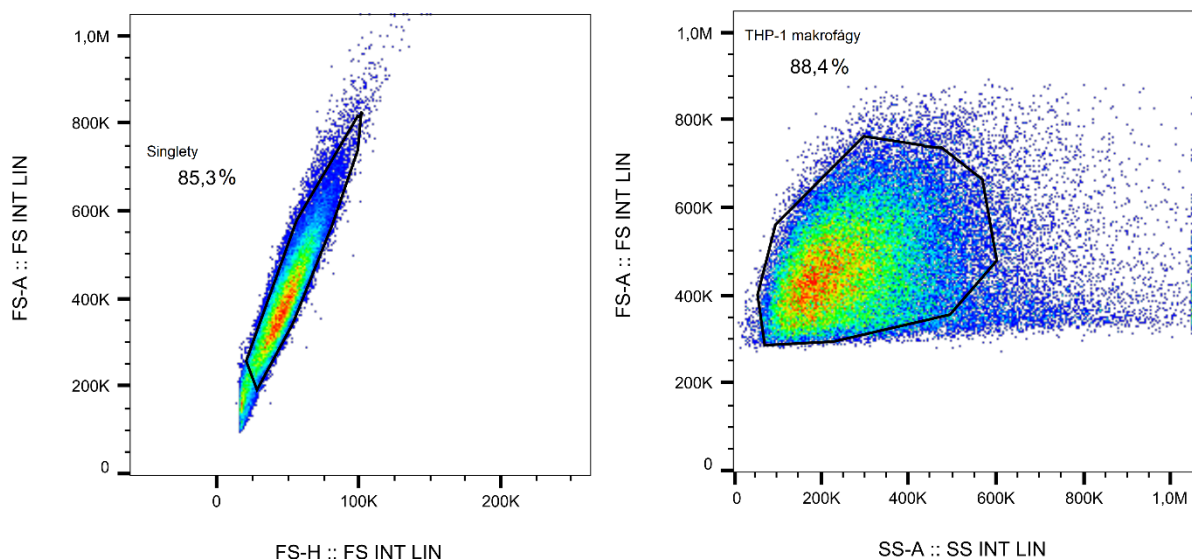
3.4.1. Stanovení modulační produkce cytokinů

TNF- α a IL-10 byly v supernatantech hodnoceny pomocí sendvičové ELISA metody, a to konkrétně s využitím souprav od firmy Bio-Techne R&D Systems s.r.o. (MN, USA): Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit (citlivost 6,23 pg/ml) a Human IL-10 Quantikine ELISA Kit (citlivost 3,9 pg/ml). Postup probíhal dle protokolu výrobce. Výsledné ředění supernatantů u THP-1 makrofágů bylo 2krát a izolovaných monocytů 10krát (IL-10) a 5krát (TNF- α). Stanovení IL-6 probíhalo pomocí buněčné eseje HEK-Blue™ IL-6 a to tak, že supernatanty byly přeneseny do nové 96jamkové kultivační destičky a k nim bylo přidáno 180 µl suspenze HEK-Blue™ IL-6 v koncentraci 5×10^4 buněk/jamku. Inkubace probíhala 24 h. Následně bylo

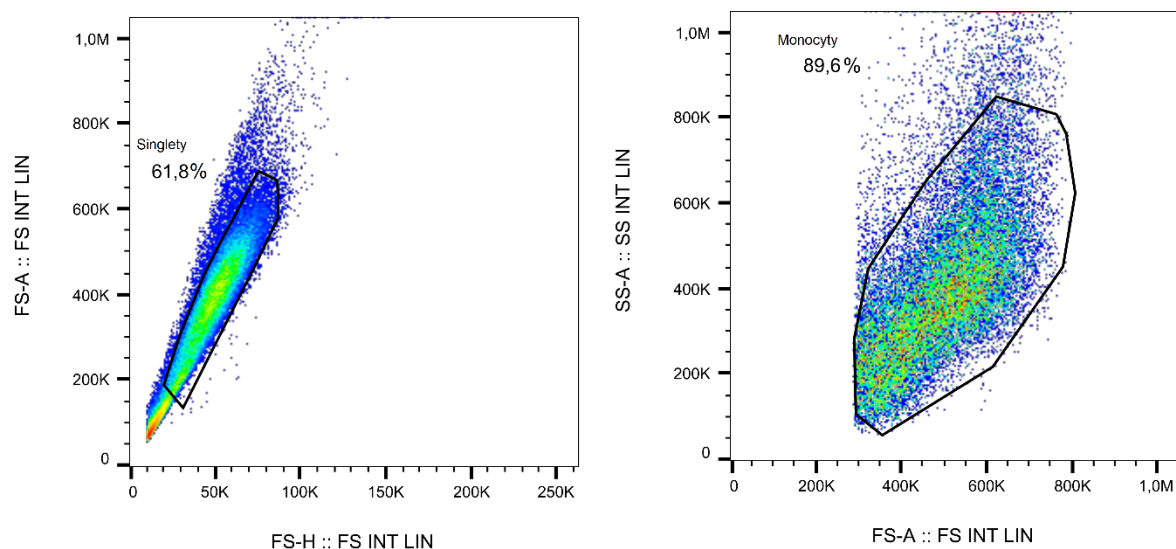
20 μ l supernatantu smícháno se 180 μ l QUANTI-Blue™ a po 1 h inkubace byla odečítána absorbance při vlnové délce 630 nm (spektrofotometr Synergy HTX).

3.4.2. Stanovení fagocytární aktivity

V kultivačních miskách se skleněným dnem μ -Dish^{35mm} (Ibidi GmbH, Německo) byly THP-1 makrofágy nebo izolované monocyty 24 h inkubovány s GP1, GP2 (60 μ g/ml) a MWCNTs (30 μ g/ml). Poté co byly buňky opatrně promyty DPBS pufrem, byla k nim přidána suspenze pHrodo™ Red E. coli BioParticles™ (EC; 200 μ g/ml, Life Technologies, CA, USA) v kultivačním médiu. Buňky bez předchozí expozice kultivované pouze s EC sloužily jako kontrola. Po 3 h inkubace byly buňky 2krát promyty DPBS pufrem a v DPBS pufru pozorovány v holotomografickém mikroskopu Nanolive 3D Cell Explorer-fluo (Nanolive, Švýcarsko). Fotografie byly pořízeny a analyzovány pomocí programu STEVE verze 1.6.3496 (Nanolive, Švýcarsko). Po dokončení mikroskopické analýzy byly buňky opatrně seškrábnuty, přeneseny do cytometrických zkušev a stočeny při 300 g, 10 min. Buněčné pelety byly resuspendovány v PBS obsahujícím 1 % BSA, 2 % FBS 0,1 % NaN₃ a 1 mM EDTA a znovu stočeny při 300 g, 10 min. Analýza fluorescenčního signálu (30 000 buněk) proběhla pomocí průtokového cytometru Navios™ (Beckman Coulter, KA, USA) s použitím 488nm argon-iontového laseru a 620/30 FL3 kanálu. Kvůli vyloučení možné interference byly analyzovány také vzorky s CNMs bez přítomnosti EC.



Obrázek 17: Gatovací strategie analýzy THP-1 makrofágů

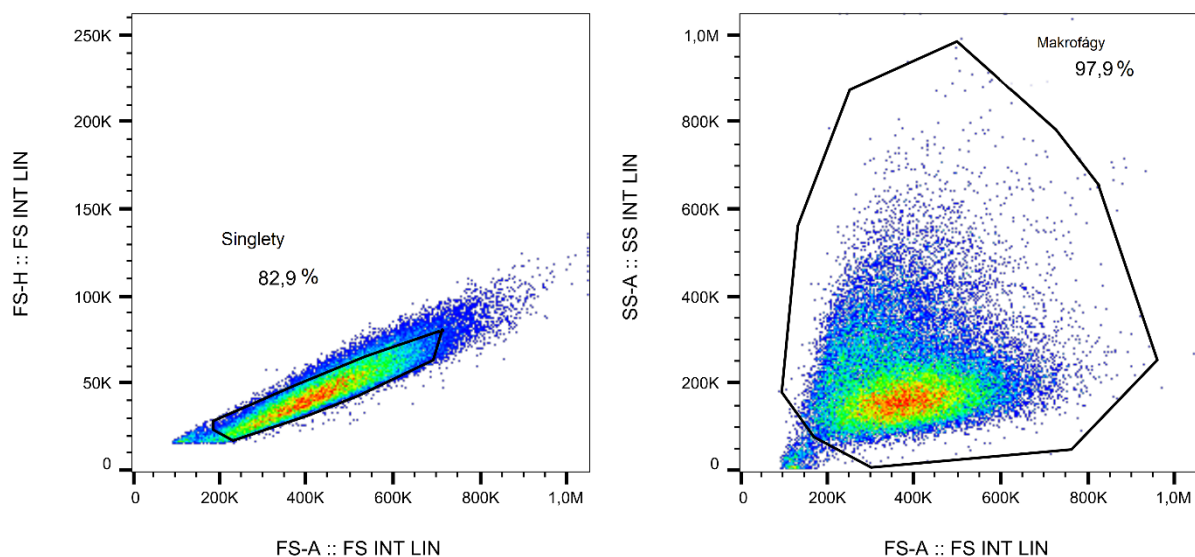


Obrázek 18: Gatovací strategie analýzy monocytů

3.4.3. Hodnocení diferenciacie monocytů po expozici CNMs

Izolované monocytů byly nasazeny do 6jamkové destičky a 24 h inkubovány s GP1, GP2 (60 $\mu\text{g/ml}$) a MWCNTs (30 $\mu\text{g/ml}$). Po ukončení inkubace bylo médium s CNMs vyměněno za čerstvé s 10 % autologního séra a bez CNMs a monocytů se nechaly diferencovat po dobu 7 dní. Stav jejich diferenciacie byl porovnáván s kontrolními monocytů, které nebyly exponovány žádným CNMs. Po ukončení experimentu byly všechny buňky včetně kontrol opatrně seškrábnuty a stočeny při 300 g, 10 min. a resuspendovány v PBS obsahujícím 1 % BSA, 2 % FBS a 0,1 % NaN_3 a inkubovány 15 min. ve tmě (pokojová teplota) s protilátkami proti CD64 PE (klon 22, Beckman Coulter, Brea, KA, USA) a CD163 FITC (klon Mac2-158, Becton Dickinson, Česká republika). Analýza fluorescenčního signálu (60 000 buněk) proběhla pomocí průtokového cytometru Navios™ (Beckman Coulter, KA, USA) s použitím 488nm argon-iontového laseru a kanálech 525/40 FL1 a 575/30 FL2. V důsledku vysoké a variabilní autofluorescence jednotlivých vzorků se výsledné hodnoty MFI (Median Fluorescence Intensity) stanovily jako poměr označené a neoznačené varianty pro každý typ vzorku zvlášť, včetně kontroly bez expozice CNMs.

Morfologie byla sledována pomocí optické mikroskopie (Nikon Eclipse TS2, Nikon, Japonsko) a holotomografické mikroskopie (Nanolive 3D Cell Explorer-fluo, Nanolive, Švýcarsko).



Obrázek 19: Gatovací strategie analýzy primárních makrofágů

3.5. Statistické hodnocení

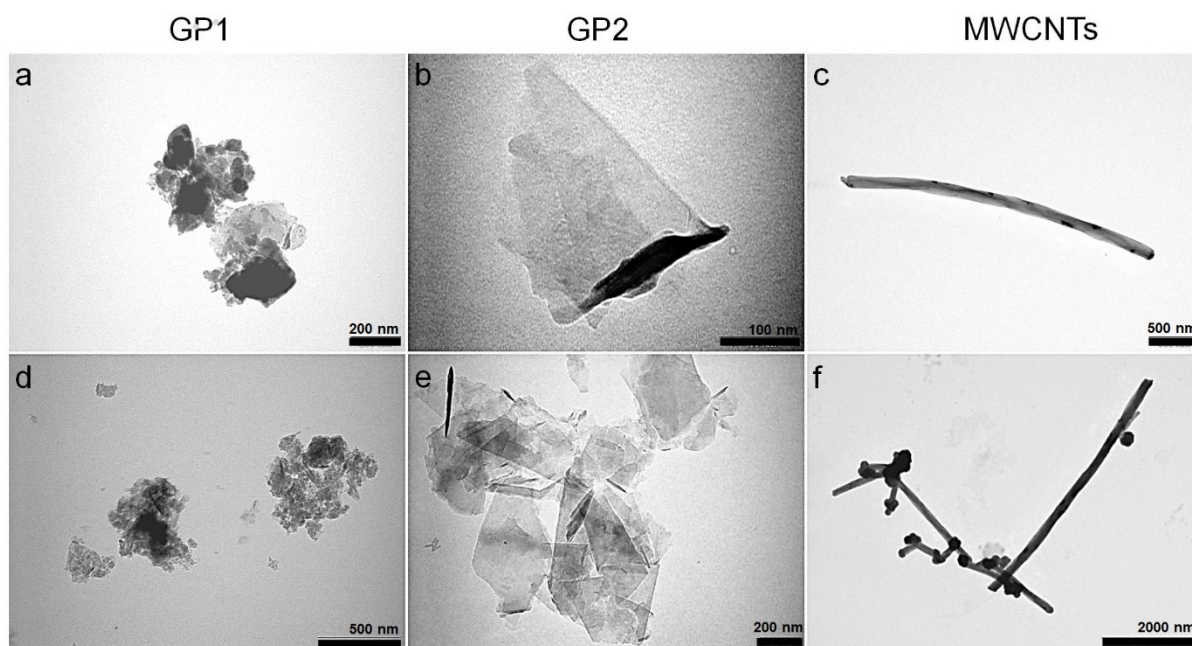
Výsledná data všech pokusů byla získána minimálně ze tří nezávislých měření provedených v duplikátech nebo triplikátech. Hodnocení probíhalo pomocí programu GraphPad Prism™ verze 8.2.1 (GraphPad Software Inc., CA, USA). Na základě Shapiro-Wilkova testu normality byla provedena buď parametrická nebo neparametrická 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 *** $p < 0,001$. Pokud není uvedeno jinak, data jsou znázorněna jako střední hodnoty \pm standardní odchylka.

4. VÝSLEDKY

4.1. Charakterizace CNMs

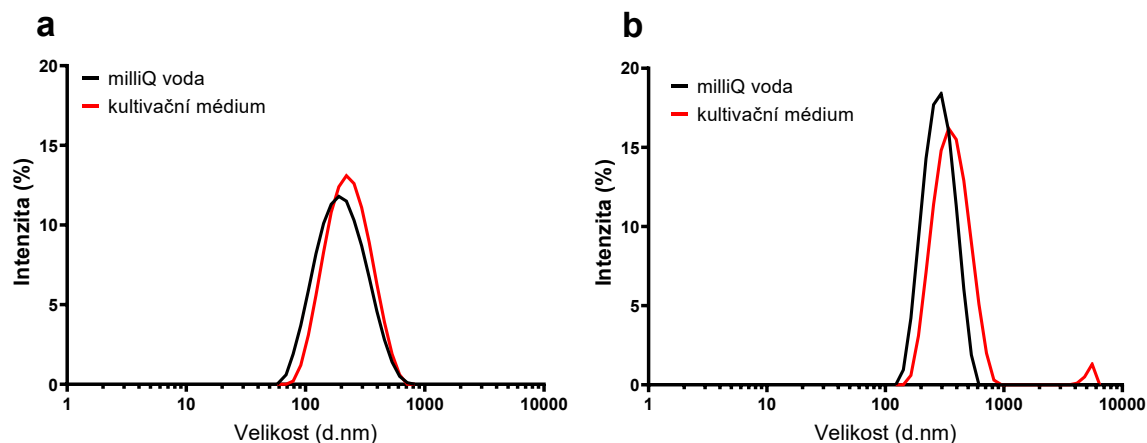
4.1.1. Velikost, tvar a náboj

Morfologie GP1, GP2 a MWCNTs v suspenzi byla hodnocena pomocí TEM (obrázek 20). Snímky ukázaly, že všechny tři CNMs mají heterogenní tvar, velikost a v případě MWCNTs i délku. Oba GPs tvořily menší nepravidelné agregáty (obrázek 20d,e), přičemž výrazně menší GP1 (laterální velikost 80–200 nm) tvořil spíše vločky podobné hrudkám, což ukazuje na výrazně nižší kvalitu. Naopak GP2 tvořil velké pláty o laterální velikosti přibližně 250–400 nm s okraji připomínající tvar čepele (obrázek 20b). MWCNTs tvořily až 10 μm dlouhé trubice o průměru přibližně 80–200 nm a s hladkým povrchem (obrázek 20c). Kromě samostatných trubic byly pozorovány i menší agregáty obsahující různě zalomené trubice. Místa zlomu a kraje často tvořily kulovité útvary (obrázek 20f).



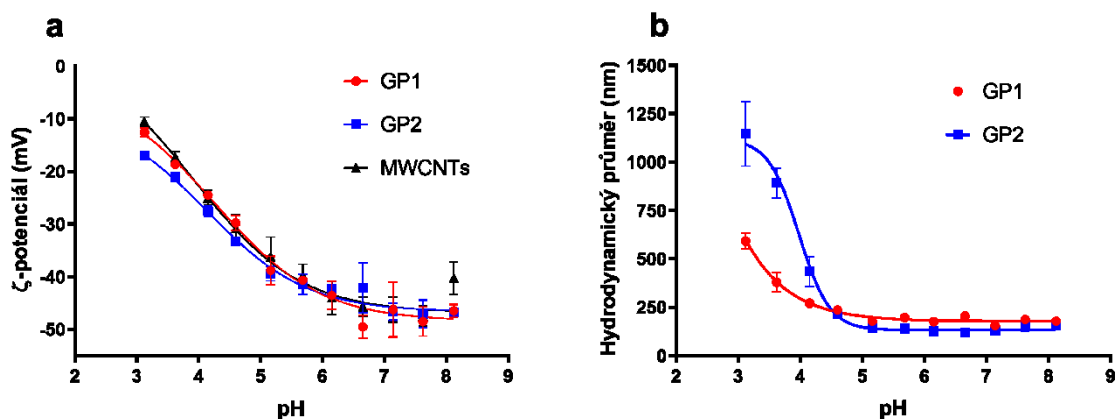
Obrázek 20: Reprezentativní TEM snímky GP1, GP2 a MWCNTs

Velikost a distribuce částic byla dále hodnocena pomocí stanovení hydrodynamického průměru D_H . Vzhledem k tomu, že metoda měření je optimální pouze pro sférické částice, nebyly MWCNTs touto metodou hodnoceny. Výsledné hodnoty odpovídaly velikostem pozorovaným v TEM. Průměrné hodnoty D_H po naředění v milliQ vodě byly u GP1 179 ± 103 nm (obrázek 21a) a u GP2 332 ± 85 nm (obrázek 21b). D_H obou GPs se po naředění do kultivačního média zvýšil jen minimálně. Hodnoty polydisperzního indexu PdI zůstaly ve všech případech nižší než 0,3, což odpovídá homogenní distribuci materiálů.



Obrázek 21: Reprezentativní křivky distribuce velikostí (a) GP1 a (b) GP2 v milliQ vodě a kultivačním médiu

Stabilita CNMs byla dále sledována dle hodnoty ζ -potenciálu (obrázek 22a). Výrazný negativní potenciál (≤ -40 mV) v neutrálním pH všech tří sledovaných CNMs odpovídá funkční stabilizaci cholátem sodným. To potvrzují i křivky D_H v rozmezí pH 5–8 (obrázek 22b). Okyselení pH vedlo ke snížení absolutní hodnoty ζ -potenciálu (> -20 mV) a zároveň nárůstu agregace a zvýšení D_H . Přenesení CNMs do kultivačního média (pH 7,2) vedlo ke tvorbě proteinové korony, kdy absolutní hodnota ζ -potenciálu klesla na hodnoty blízké -10 mV, ale zároveň byla zachována homogenní distribuce. Základní naměřené údaje shrnuje tabulka 4.



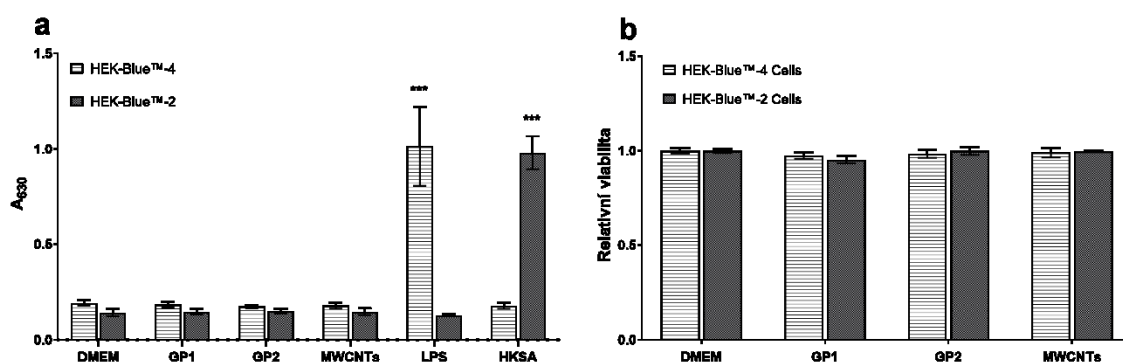
Obrázek 22: Závislost (a) ζ -potenciálu a (b) D_H na pH

Tabulka 4: Základní charakteristiky CNMs v suspenzi ředěné v milliQ vodě a kultivačním médiu

	milliQ voda			kultivační médium (10% FBS _{LE})		
	D_H (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	359 ± 123	0,226	- 10,8 ± 12,3
MWCNTs	-	-	-39,1 ± 6,7	-	-	-13,1 ± 12

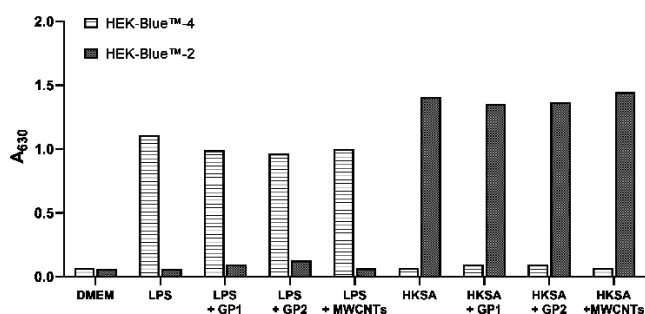
4.1.2. Biologická kontaminace CNMs

Možná biologická kontaminace byla hodnocena pomocí buněčných esejí HEK-BlueTM-4 a HEK-BlueTM-2, které se v přítomnosti svých ligandů (TLR4 a TLR2) aktivují a produkují AP, která se stanovuje spektrofotometricky. GP1, GP2 (60 µg/ml) ani MWCNTs (30 µg/ml) neaktivovaly produkci AP u daných buněk, čímž byla vyloučena bakteriální kontaminace, či kontaminace samotným LPS (obrázek 23a). Jako pozitivní kontroly sloužily LPS_{up} (100 ng/ml, TLR4) a HKSA (10⁷ buněk/ml, TLR2). Zároveň bylo potvrzeno, že žádný z CNMs sám o sobě TLR4 a TLR2 neaktivuje. Případný cytotoxický účinek CNMs byl hodnocen pomocí vylítky LDH z poškozených buněk do supernatantu, kdy exponované buňky byly porovnány s neexponovanou kontrolou (obrázek 23b).



Obrázek 23: (a) Hodnocení aktivace HEK-BlueTM-4 a HEK-BlueTM-2; Data jsou prezentována jako průměr ± standardní odchylka; *** $p < 0,001$ zdůrazňuje statistickou významnost ve srovnání s neexponovanou kontrolou (DMEM). (b) Životnost HEK-BlueTM-4 a HEK-BlueTM-2; Data jsou prezentována jako podíl měřeného LDH exponovaných buněk a neexponované kontroly (DMEM) a zobrazena jako průměr ± standardní odchylka.

Zároveň byla hodnocena možná interference použitých CNMs s buněčnými esejemi tak, že HEK-BlueTM-4 a HEK-BlueTM-2 byly exponovány buď samotnému TLR ligandu (100 ng/ml LPS_{up}, 10⁷ buněk/ml HKSA) nebo zároveň kombinaci stejné koncentrace ligandu a GP1, GP2 (60 µg/ml) a MWCNTs (30 µg/ml). Z obrázku č. 24 vyplývá, že žádný z CNMs významně neovlivňoval výsledky produkce AP.

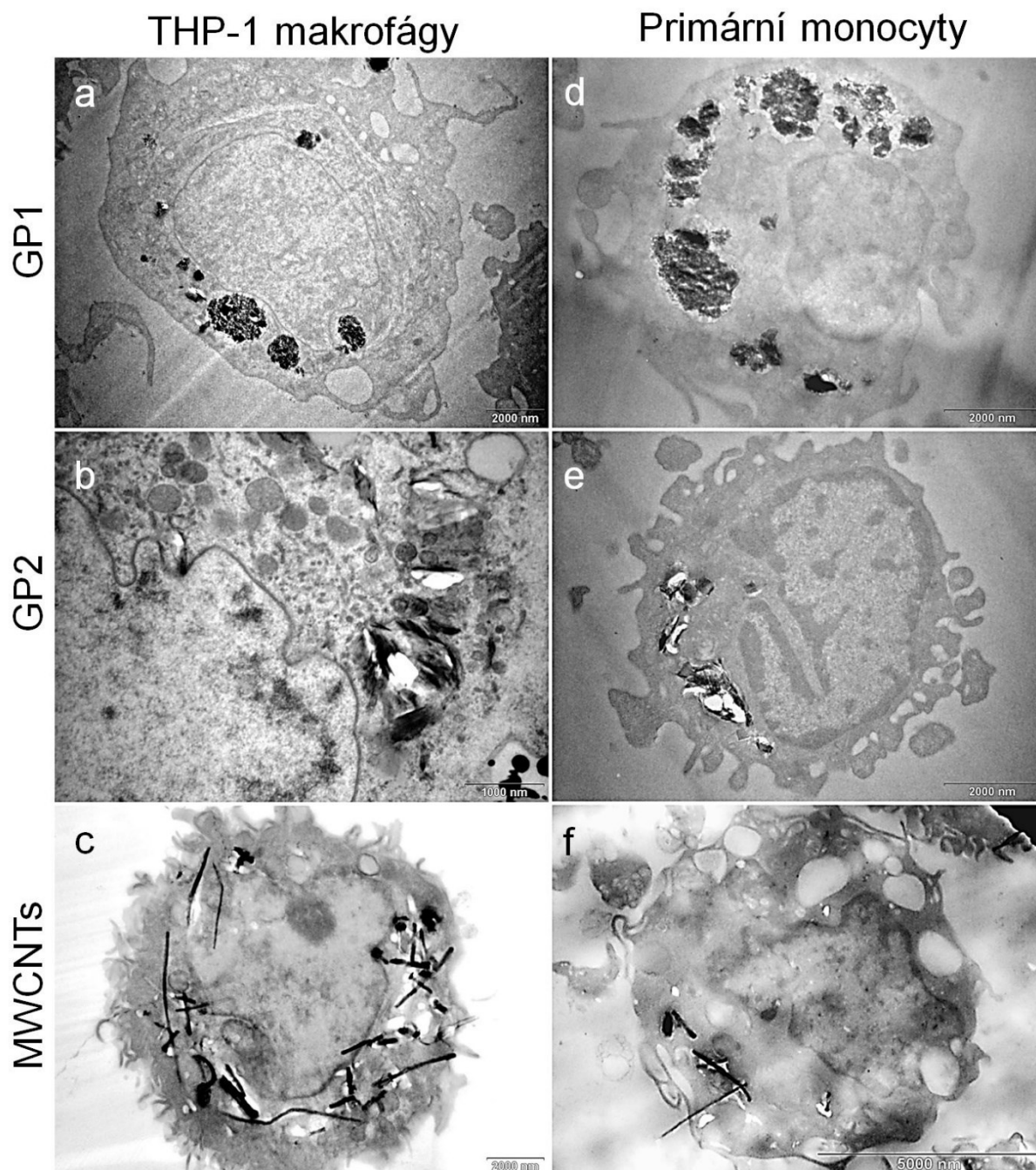


Obrázek 24: Grafické znázornění sledování možné interference CNMs s esejí; DMEM: negativní kontrola esejí.

4.2. Buněčná expozice CNMs

4.2.1. Intracelulární lokalizace

Intracelulární lokalizace GP1, GP2 (50 $\mu\text{g/ml}$) a MWCNTs (25 $\mu\text{g/ml}$) byla hodnocena u THP-1 makrofágů a izolovaných monocytů pomocí TEM (obrázek 25).



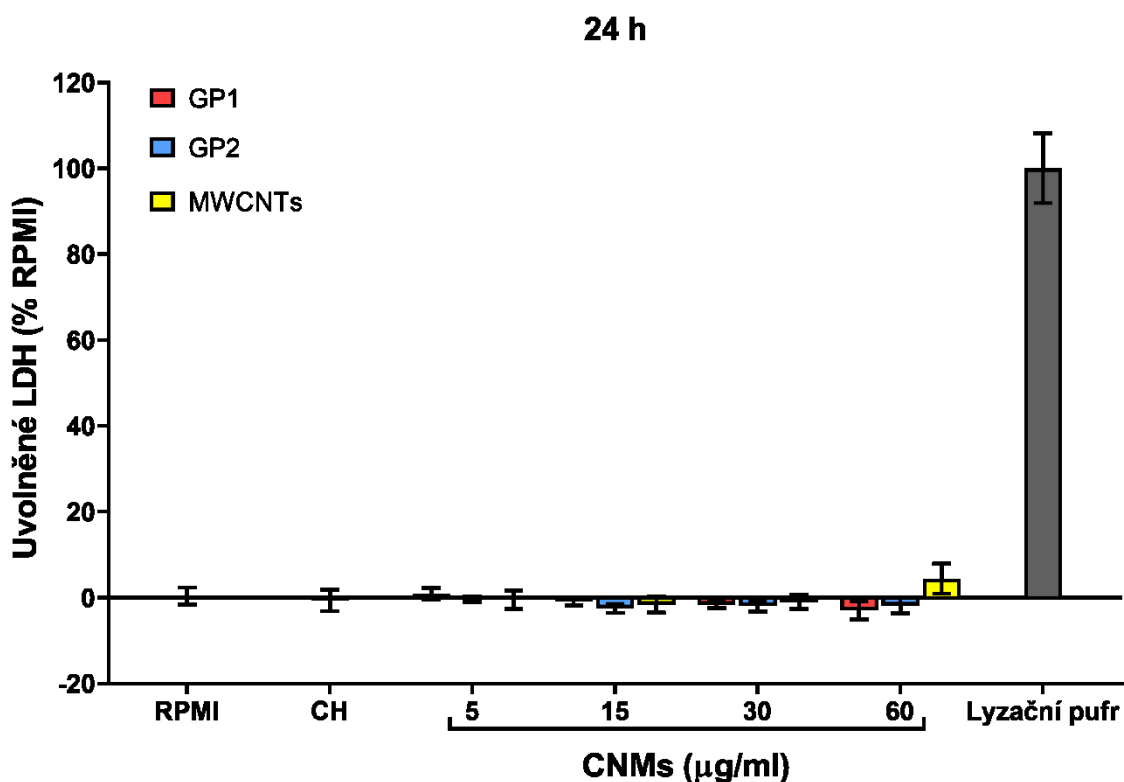
Obrázek 25: Intracelulární lokalizace (a, d) GP1, (b, e) GP2 a (c, f) MWCNTs u THP-1 makrofágů a izolovaných monocytů po 24 h expozice pomocí TEM.

Všechny typy CNMs byly po 24 h inkubace nalezeny v cytoplasmě, přičemž distribuce byla podobná u obou typů buněk. Částice GP1 se vyskytovaly převážně ve formě větších

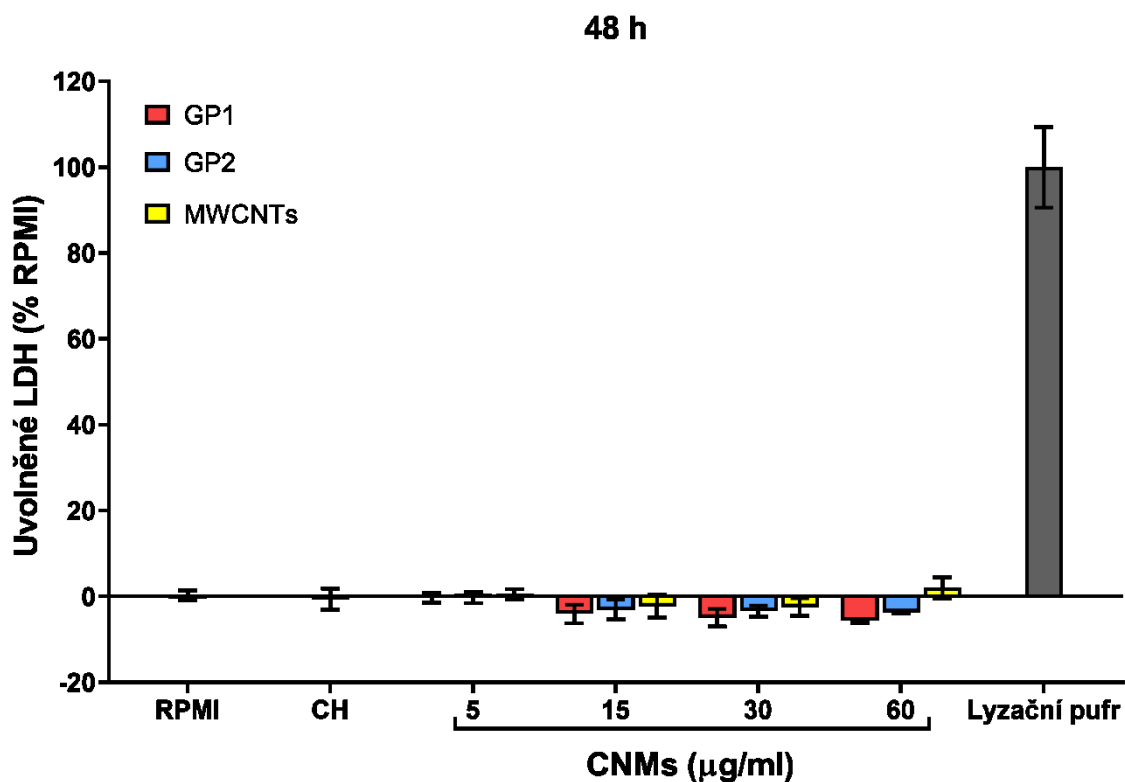
agregátů uzavřených v endozomech, zatímco GP2 tvořily menší agregáty a byly více rozptýlené. Kromě uzavřených váčků se sporadicky vyskytovaly i volně v cytoplazmě. Nebyly pozorovány žádné specifické interakce mezi GPs a organelami a žádné GPs nebyly nalezeny v jádře. MWCNTs byly lokalizovány převážně jako volně rozptýlené trubice s potenciálním narušením intracelulárních struktur a průnikem do jádra. Nicméně přímá distribuce MWCNTs v jádře nebyla potvrzena.

4.2.2. Cytotoxicita CNMs

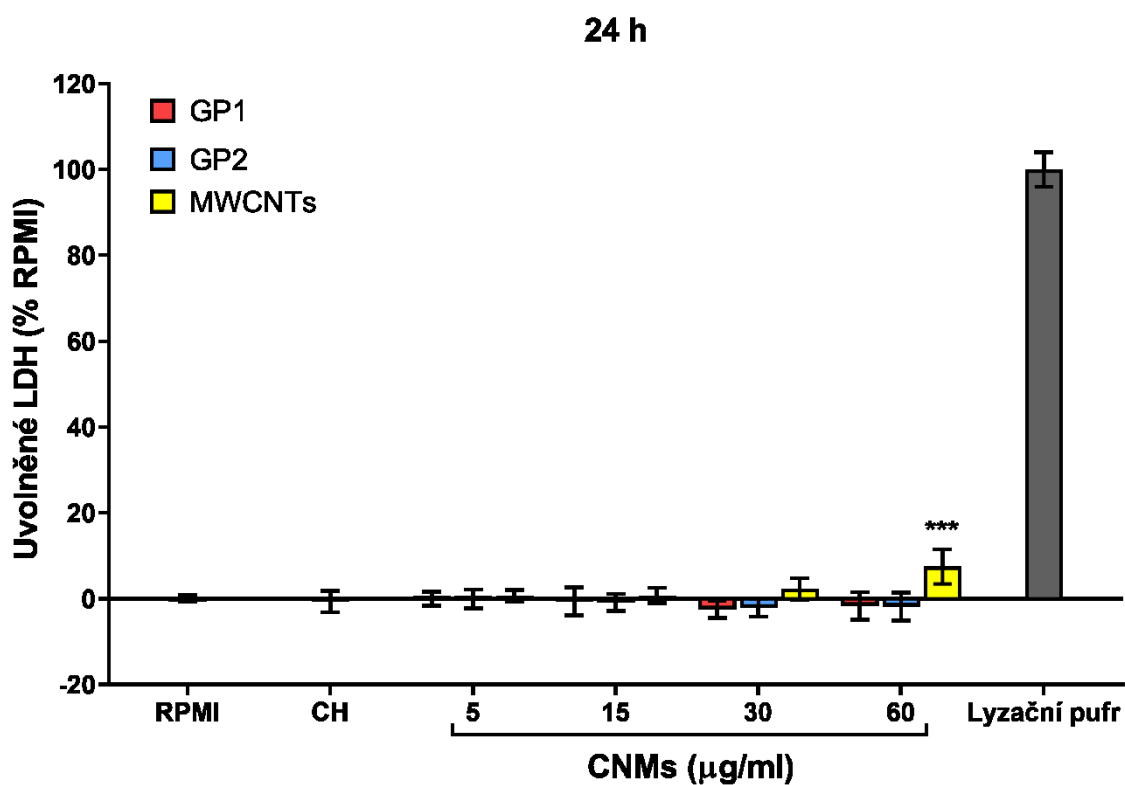
Viabilita buněk byla hodnocena pomocí stanovení LDH v supernatantech po 24–48 h expozice THP-1 makrofágů (obrázky 26, 27) a primárních monocytů (obrázky 28, 29) různým koncentracím CNMs. Za fyziologických podmínek se enzym LDH vyskytuje převážně v cytoplazmě a k jeho úniku dochází až při narušení integrity cytoplazmatické membrány během buněčné smrti. Jeho koncentrace v supernatantu je tedy přímo úměrná úrovni cytotoxicity. GP1 ani GP2 nezpůsobily významnou cytotoxicitu v žádné testované koncentraci. MWCNTs způsobily mírné zvýšení LDH při nejvyšší koncentraci 60 $\mu\text{g/ml}$, přičemž statisticky významné ($\sim 10\%$, $p < 0,001$) bylo pouze u primárních monocytů (obrázky 28, 29).



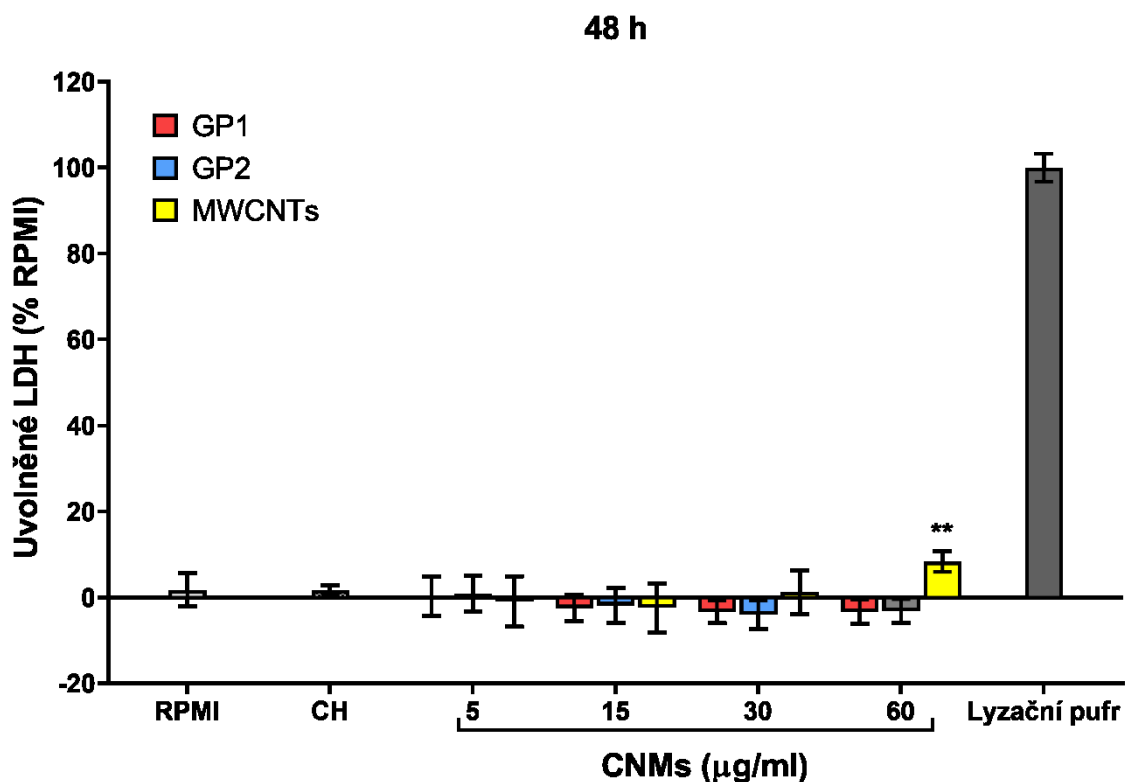
Obrázek 26: Viabilita THP-1 makrofágů jako %únik LDH po 24 h expozice GP1, GP2 a MWCNTs; CH – cholát sodný; Data jsou zobrazena jako průměr \pm standardní odchylka



Obrázek 27: Viabilita THP-1 makrofágů jako %únik LDH po 48 h expozice GP1, GP2 a MWCNTs; CH – cholát sodný; Data jsou zobrazena jako průměr ± standardní odchylka



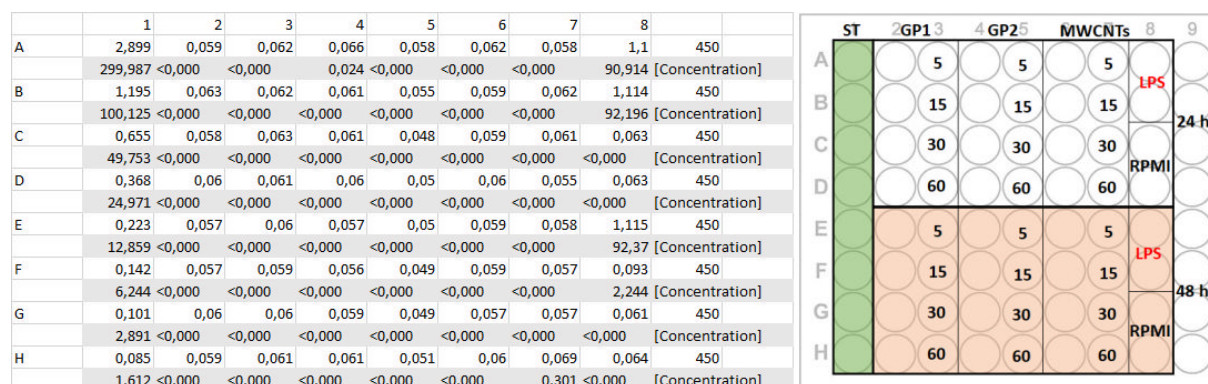
Obrázek 28: Viabilita primárních monocytů hodnocená jako %únik LDH po 24 h expozice GP1, GP2 a MWCNTs; CH – cholát sodný; Data jsou zobrazena jako průměr ± standardní odchylka; *** $p < 0,001$ zdůrazňuje statistickou významnost ve srovnání s neexponovanou kontrolou (RPMI).



Obrázek 29: Viabilita primárních monocytů hodnocená jako %únik LDH po 48 h expozice GP1, GP2 a MWCNTs; CH – cholát sodný; Data jsou zobrazena jako průměr ± standardní odchylka; ** $p < 0,01$ zdůrazňuje statistickou významnost ve srovnání s neexponovanou kontrolou (RPMI).

4.2.3. Produkce cytokinů

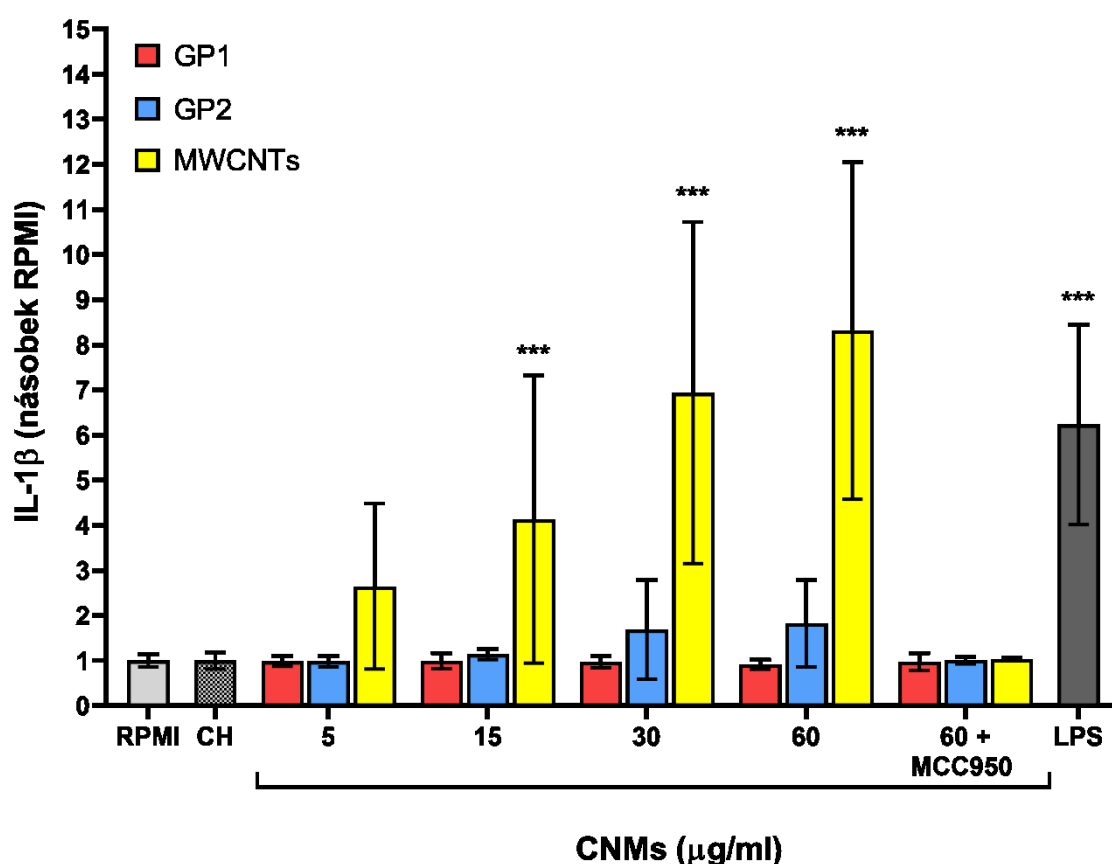
Cytokiny IL-6, TNF- α a IL-10 byly stanoveny v supernatantech exponovaných THP-1 makrofágů a primárních monocytů po 24–48 h expozice CNMs pomocí sendvičové ELISA metody. Ve všech případech byla hladina cytokinů srovnatelná s neexponovanou kontrolou, pod hranicí detekce dané metody.



Obrázek 30: Ukázka výsledné absorbance ELISA detekce IL-6; Expozice THP-1 makrofágů GP1, GP2, MWCNTs (5–60 $\mu\text{g/ml}$), LPS (100 ng/ml) a bez expozice (RPMI); ST: kalibrační řada

4.2.4. Alternativní aktivace NLRP3 u primárních monocytů

Aktivace inflamazomu NLRP3 byla u primárních monocytů hodnocena pomocí stanovení produkce IL-1 β . Hladina IL-1 β byla změřena pomocí buněčné eseje HEK-Blue™ IL-1 β . Princip metody je totožný jako u hodnocení biologické kontaminace pomocí HEK-Blue™-4 (kapitola 4.1.2.). Po 24h inkubaci MWCNTs způsobily statisticky významnou ($p < 0,001$) a na koncentraci závislou produkci IL-1 β . V případě GPs došlo k mírné variabilní produkci IL-1 β po expozici GP2, ovšem bez statistické významnosti. Specifická aktivace NLRP3 byla potvrzena úplnou inhibicí aktivace pomocí MCC950 (obrázek 31).

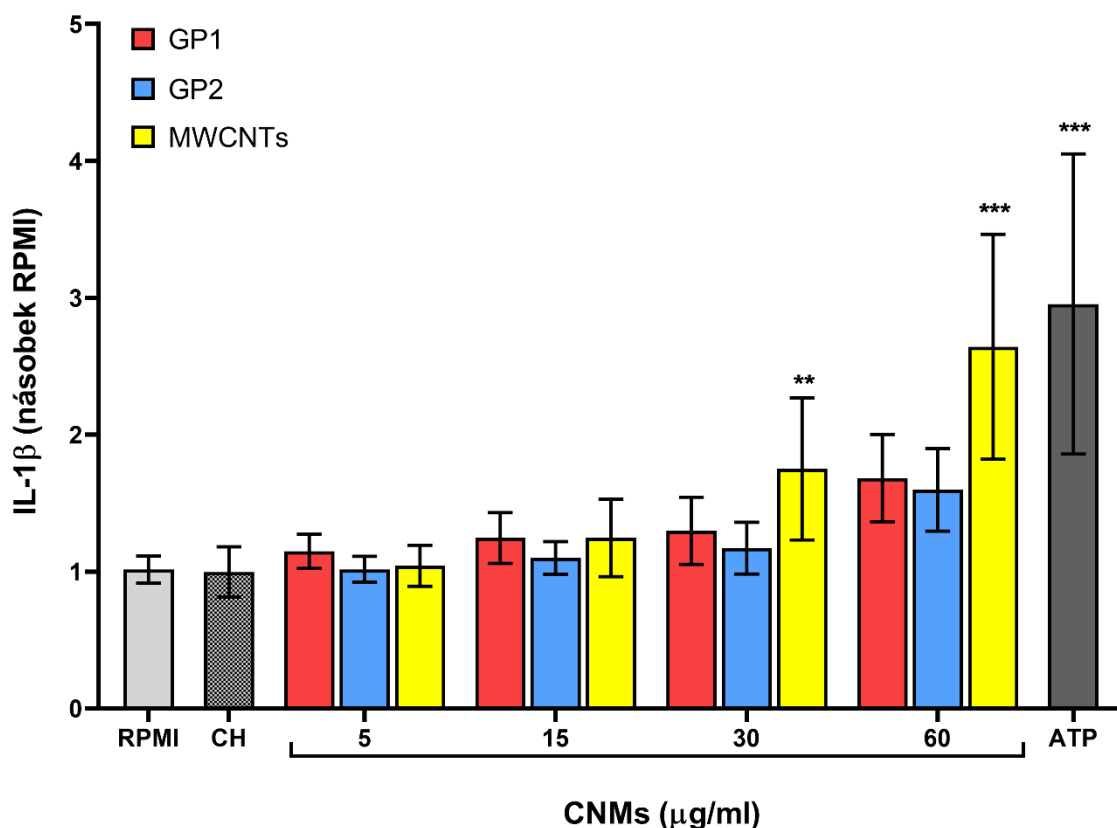


Obrázek 31: Produkce IL-1 β u primárních monocytů po expozici GP1, GP2 a MWCNTs; CH – cholát sodný; Data jsou prezentována jako podíl produkce IL-1 β exponovaných buněk a neexponované kontroly (RPMI) a zobrazena jako průměr \pm standardní odchylka; *** $p < 0,001$ zdůrazňuje statistickou významnost ve srovnání s RPMI

4.2.5. Kanonická aktivace NLRP3

Aktivace inflamazomu NLRP3 kanonickou cestou byla hodnocena pomocí kontrolní buněčné linie THP1-null, která stabilně exprimuje receptor NLR3 a adaptorový protein ASC. Produkce IL-1 β byla hodnocena, totožně jako u primárních monocytů, pomocí HEK-Blue™

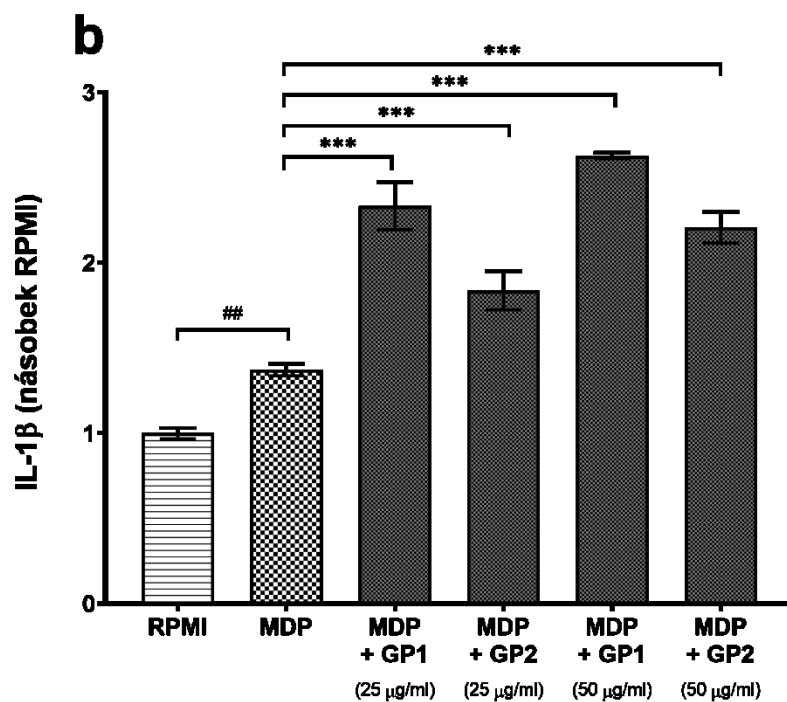
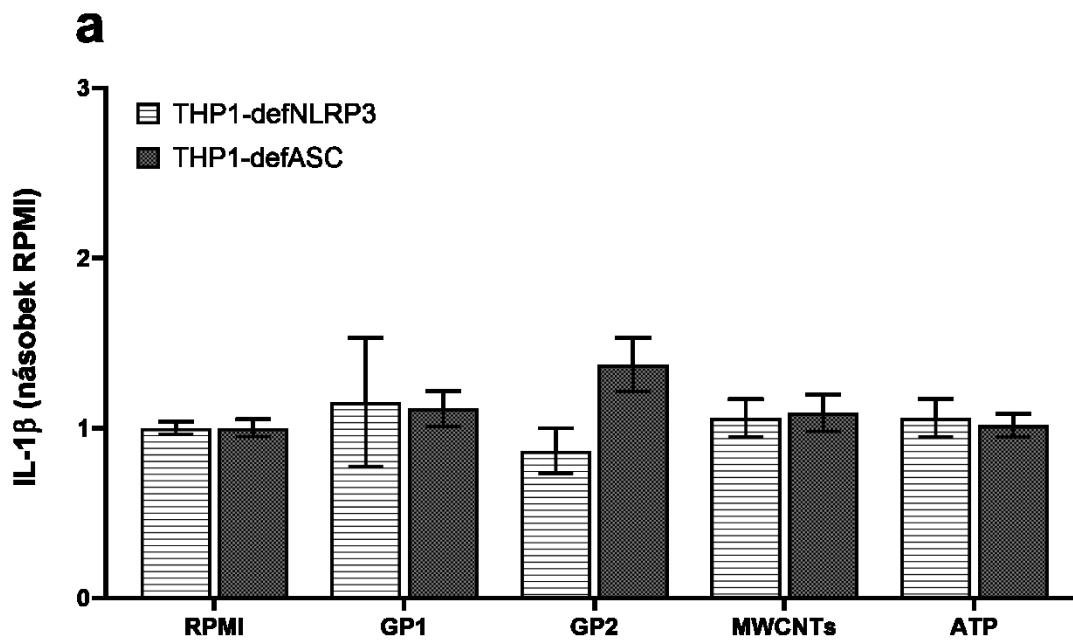
IL-1 β . Jako první signál nezbytný pro syntézu dostatečného množství pro-IL-1 β , avšak bez následné aktivace NLRP3, sloužil LPS_{up} ve finální koncentraci 1 μ g/ml. Takto předem aktivované buňky byly exponovány různým koncentracím CNMs, které sloužily jako druhý signál potřebný pro vlastní aktivaci. ATP (5 mM) byl použit jako pozitivní kontrola. Jak je vidět na obrázku 32, oba GPs indukovaly pouze nízkou statisticky nevýznamnou produkci IL-1 β . Naopak MWCNTs indukovaly výraznou produkci IL-1 β od koncentrace 30 μ g/ml.



Obrázek 32: Produkce IL-1 β u THP1-null po expozici GP1, GP2 a MWCNTs; CH – cholát sodný; 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 *** $p < 0,001$ zdůrazňují statistickou významnost ve srovnání s RPMI.

Specifická aktivace NLRP3 byla hodnocena pomocí kontrolních linií THP1-defNLRP3 a THP1-defASC. Expozice a hodnocení produkce IL-1 β probíhalo analogicky s THP1-null (obrázek 33a). Absence produkce IL-1 β potvrdila specifickou aktivaci NLRP3 a vyloučila zapojení jiného inflamazomu.

Aby se vyloučila případná inhibice NLRP3 či interference metody s GPs, byly THP1-null dále exponovány kombinací MDP (10 μ g/ml) a GP1 nebo GP2. Výsledky produkce byly srovnány s kontrolou, která byla exponována pouze samotnému MDP (obrázek 33b).



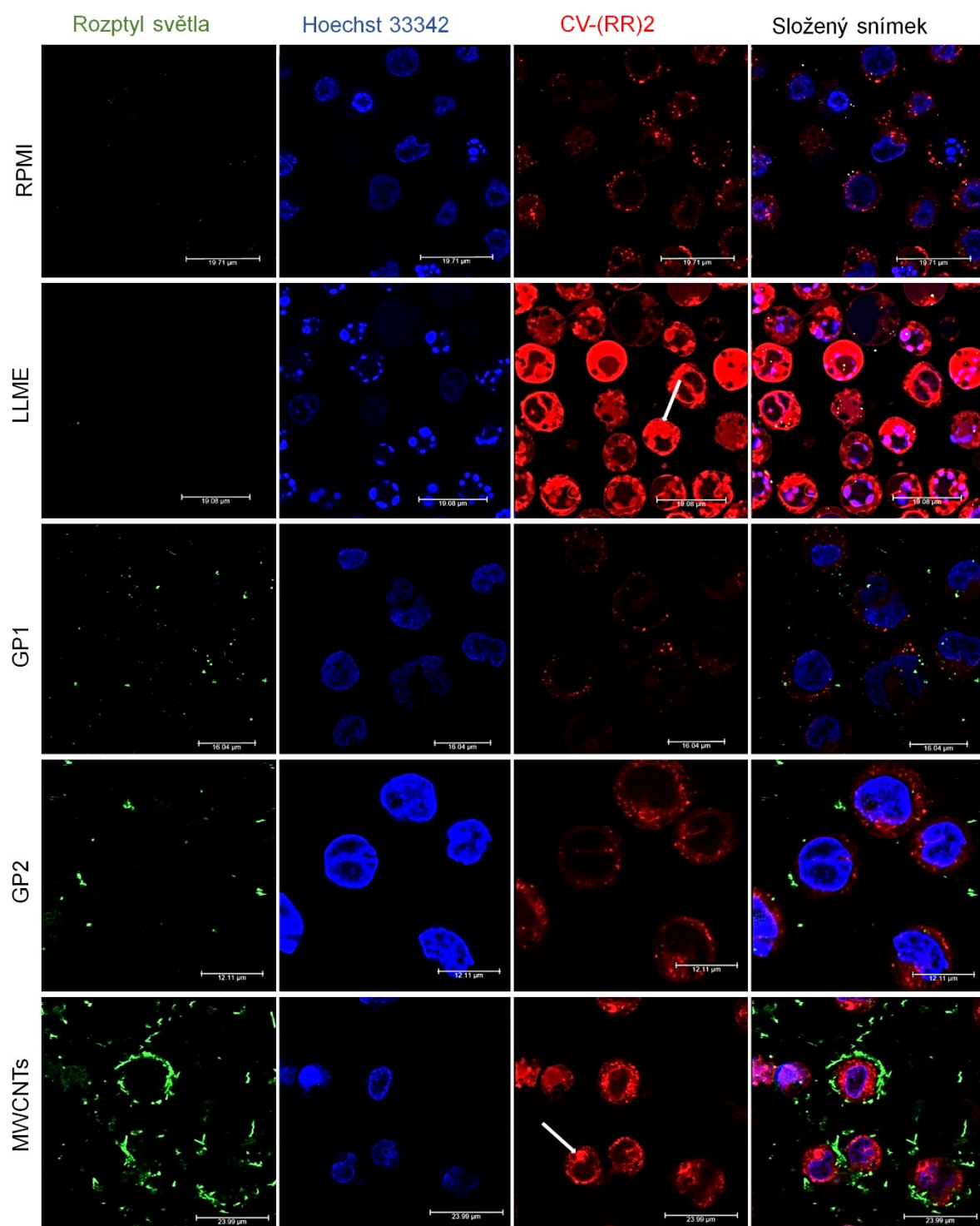
Obrázek 33: (a) Produkce IL-1 β u THP1-defNLRP3 a THP1-defASC po expozici GP1, GP2 a MWCNTs. (b) Produkce IL-1 β u THP1-null po expozici MDP, GP1 a GP2; ## $p < 0,01$ zdůrazňuje statistickou významnost ve srovnání s RPMI a *** $p < 0,001$ zdůrazňuje statistickou významnost ve srovnání s MDP; Data jsou prezentována jako podíl produkce IL-1 β exponovaných buněk a neexponované kontroly (RPMI) a zobrazena jako průměr \pm standardní odchylka

V porovnání s neexponovanou kontrolou došlo v přítomnosti samotného MDP k mírné, avšak statisticky významné ($p < 0,01$) produkci IL-1 β . Nicméně v přítomnosti obou GPs se produkce více než zdvojnásobila, což ukazuje na prozánětlivě modulační efekt obou GPs.

4.2.6. Uvolnění katepsinu B

Možný mechanismus aktivace NLRP3 byl zkoumán sledováním úniku katepsinu B pomocí konfokální mikroskopie (obrázek 34). Za fyziologických podmínek se proteináza katepsin B nachází v lysozomech. Narušení lysozomů různými lysozomálními disruptory vede k jejímu úniku do cytoplazmy a následně k aktivaci NLRP3. Detekce probíhala pomocí reakce fluorogenního substrátu CV-(RR)² s katepsinem B po 2, 6 a 24 h expozice THP1-null GP1, GP2 a MWCNTs (30 μ g/ml). Jako pozitivní kontrola sloužil LLME, kdy k narušení lysozomů došlo již po 2 h inkubace. V případě CNMs došlo k největšímu záchytu katepsinu B až po 24 h inkubace buněk s MWCNTs, což koresponduje s aktivací NLRP3 (obrázek 32) a potvrzuje možné poškození způsobené tvarem (kapitola 4.2.1., obrázek 25c). U obou GPs byl záchyt srovnatelný s neexponovanou kontrolou.

Záznam fluorescenčních teček představuje penetraci substrátu do lysozomů a disperzní signál ukazuje na uvolňování katepsinu B z poškozených lysozomů do cytoplazmy.

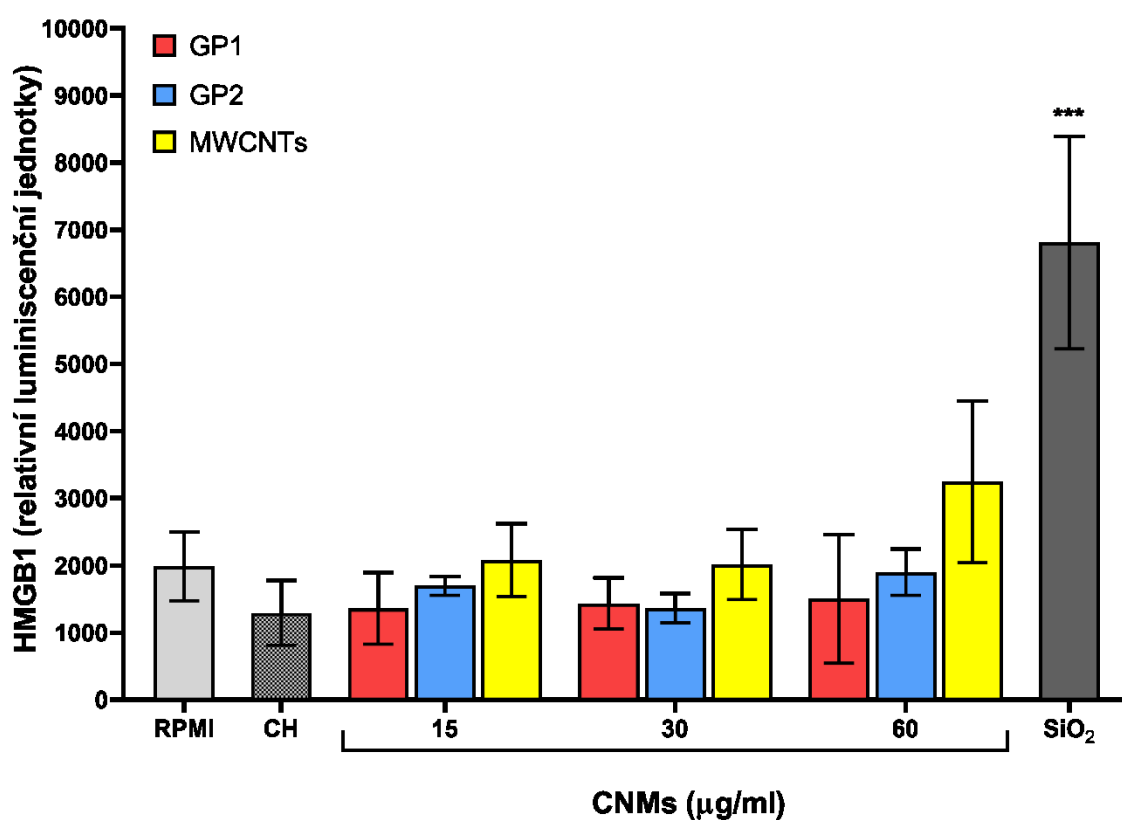


Obrazek 34: Fluorescenční detekce katepsinu B (červeně) u THP1-null po 24h inkubaci s 30 $\mu\text{g/ml}$ GP1, GP2 a MWCNTs (rozptyl světla zeleně); bílá šipka – únik katepsinu B do cytoplazmy, Hoechst 33342 – jádra (modře)

4.2.7. Pyroptóza

Jedním z důsledků převážně nekanonické aktivace inflamazomu může být pyroptóza, při níž dochází k prasknutí buňky a vylití cytoplazmatického obsahu včetně silných vzorů poškození (DAMPs) do extracelulárního prostředí. Tradiční metodou detekce, která má ale

nízkou citlivost, je měření úniku LDH. Z toho důvodu byly předchozí výsledky ověřeny pomocí luminiscenční detekce HMGB1 (obrázek 35). Po 24 h expozice reportérových buněk THP1-HMGB1-Lucia™ různým koncentracím CNMs byl detekován luminiscenční signál přímo úměrný uvolnění HMGB1 a tedy pyroptóze. Buňky exponované nanočásticím SiO₂ (100 µg/ml) sloužily jako pozitivní kontrola. Nárůst luminiscence byl sledován pouze u MWCNTs, ale na hranici statistické významnosti ($p = 0,09$). Každopádně výsledky korelovaly s hodnotami procentuálního úniku LDH (kapitola 4.2.2.). Absence pyroptózy u GPs také odpovídala absenci aktivace NLRP3.



Obrázek 35: Detekce uvolnění HMGB1 z exponovaných THP1-HMGB1-Lucia™; CH – cholát sodný; Data jsou prezentována jako průměr ± standardní odchylka; *** $p < 0,001$ zdůrazňuje statistickou významnost ve srovnání s neexponovanou kontrolou (RPMI).

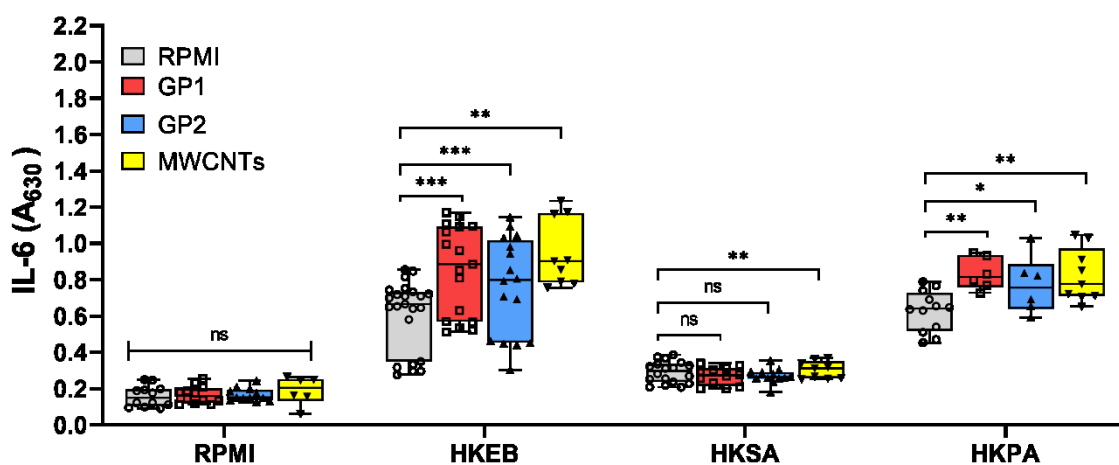
4.3. Modulace imunitní funkce

Imunomodulační účinky necytotoxických koncentrací GP1, GP2 (60 µg/ml) a MWCNTs (30 µg/ml) byly hodnoceny paralelně na THP-1 makrofázích a primárních monocytech. V obou případech bylo testováno, zda intracelulární přítomnost těchto CNMs narušuje primární funkce ve smyslu reaktivity vůči běžným bakteriálním stimulům, a to prozánětlivou odpověď ve formě

sekrece cytokinů a schopnost fagocytózy. Jako kontrola cytokinové odpovědi byly testovány reakce vůči teplem usmrceným bakteriím *Escherichia coli* sérotyp 0111:B4 (HKEB; TLR4 a TLR2 ligand), *Staphylococcus aureus* (HKSA; TLR2 ligand) a *Pseudomonas aeruginosa* (HKPA; TLR2 a TLR5 ligand) ve finální koncentraci doporučené výrobcem 1×10^7 bakterií/ml. Zachování schopnosti fagocytózy bylo testováno pomocí pohlcování značených pHrodo™ Red *E. coli* BioParticles™ (EC) ve finální koncentraci 200 $\mu\text{g/ml}$. Zároveň byla sledována viabilita pomocí detekce LDH.

4.3.1. Modulace produkce cytokinů u THP-1 makrofágů

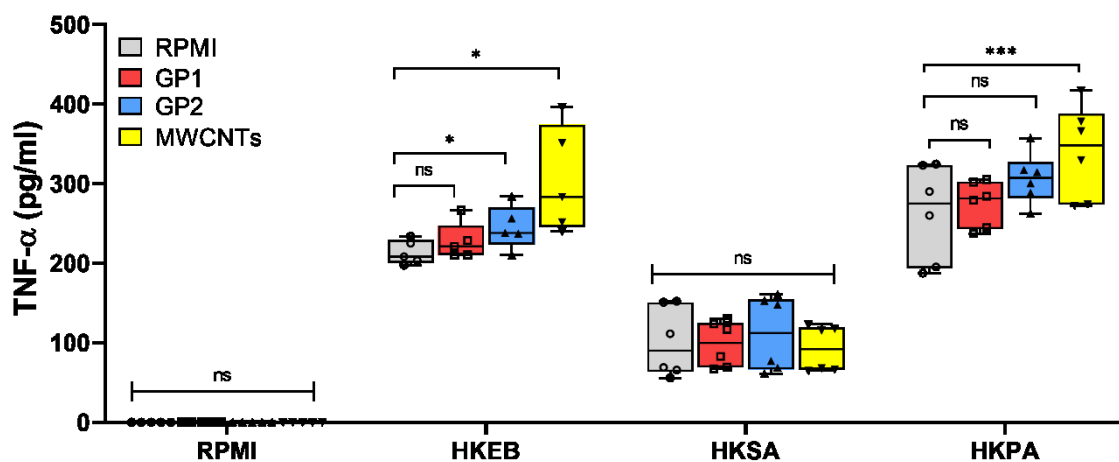
THP-1 makrofágy byly nejprve 24 h inkubovány s GP1, GP2 a MWCNTs. Po odstranění nepohlcených částic byly dále 24 h inkubovány s HKEB, HKSA a HKPA v čerstvém médiu. Hladina IL-6 v supernatantech byla hodnocena pomocí HEK-Blue™ IL-6. Z obrázku 36 je patrné, že přítomnost MWCNTs výrazně zvýšila produkci IL-6 v reakci na všechny typy bakterií. GP1 a GP2 výrazně zvýšily produkci IL-6 v reakci zejména na HKEB a v menší míře i HKPA. Naopak produkce IL-6 v reakci na HKSA nebyla ovlivněna. Zároveň bylo potvrzeno, že žádný z CNMs sám o sobě produkci IL-6 nestimuluje.



Obrázek 36: Produkce IL-6 u THP-1 makrofágů stimulovaných GP (60 $\mu\text{g/ml}$), MWCNTs (30 $\mu\text{g/ml}$) a bakteriemi HKEB, HKSA a HKPA (1×10^7); 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); ns – nesignifikantní.

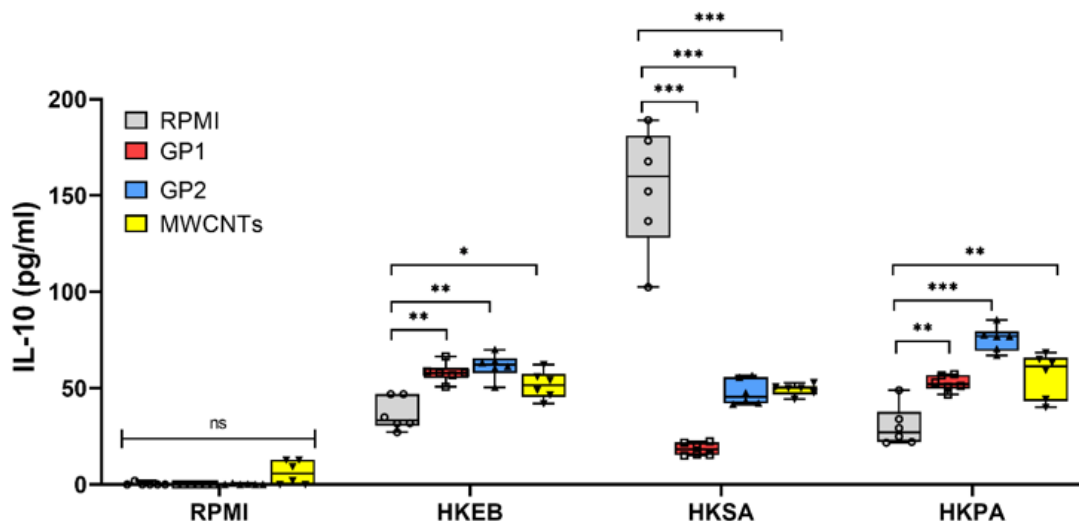
Jako další prozánětlivý cytokin byla sledována hladina TNF- α , která byla hodnocena pomocí sendvičové ELISA metody. Z obrázku 37 vyplývá, že žádný z CNMs neovlivnil produkci TNF- α v reakci na HKSA. Přítomnost GP1 neměla vliv ani na reaktivitu vůči HKEB a HKPA. Výrazné zvýšení bylo pozorováno u kombinace MWCNTs a HKEB, respektive

HKPA. GP2 mírně zvyšoval TNF- α v případě HKEB. Opět, TNF- α nebyl produkován v přítomnosti samotných CNMs.



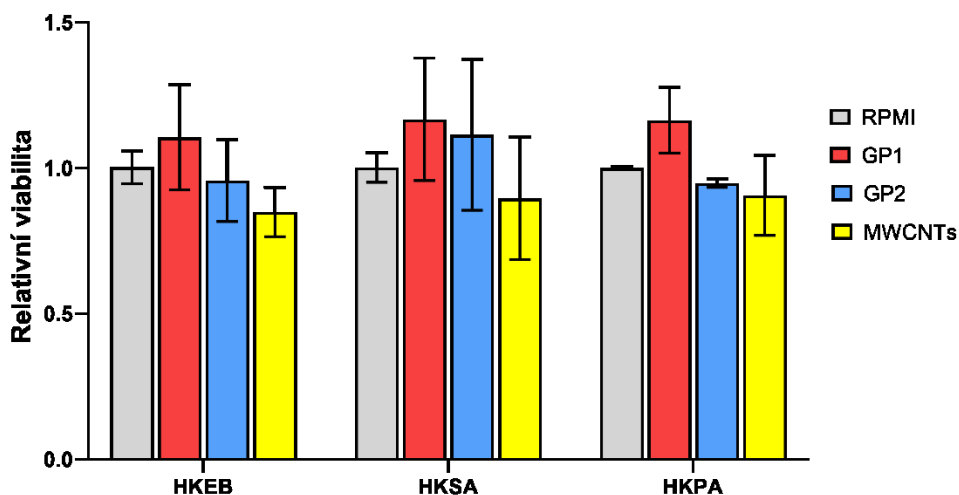
Obrázek 37: Produkce TNF- α u THP-1 makrofágů stimulovaných GPs (60 μ g/ml), MWCNTs (30 μ g/ml) a bakteriemi HKEB, HKSA a HKPA (1×10^7); Data jsou prezentována jako krabicový graf od minima do maxima se všemi body. Hodnoty *** $p < 0,001$ a * $p < 0,05$ značí statistickou významnost ve srovnání s odpovídající kontrolou (RPMI); ns – nesignifikantní.

Hodnocení modulační protizánětlivé reakce probíhalo měřením hladiny IL-10 pomocí sendvičové ELISA metody. Oproti předchozím výsledkům byl pozorován nejsilnější vliv u reaktivity vůči HKSA, kdy MWCNTs a oba GPs inhibovaly produkci IL-10. Naopak ve všech případech došlo k posílení produkce v odpovědi na HKEB a HKPA (obrázek 38).



Obrázek 38: Produkce IL-10 u THP-1 makrofágů stimulovaných GPs (60 μ g/ml), MWCNTs (30 μ g/ml) a bakteriemi HKEB, HKSA a HKPA (1×10^7); 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); ns – nesignifikantní

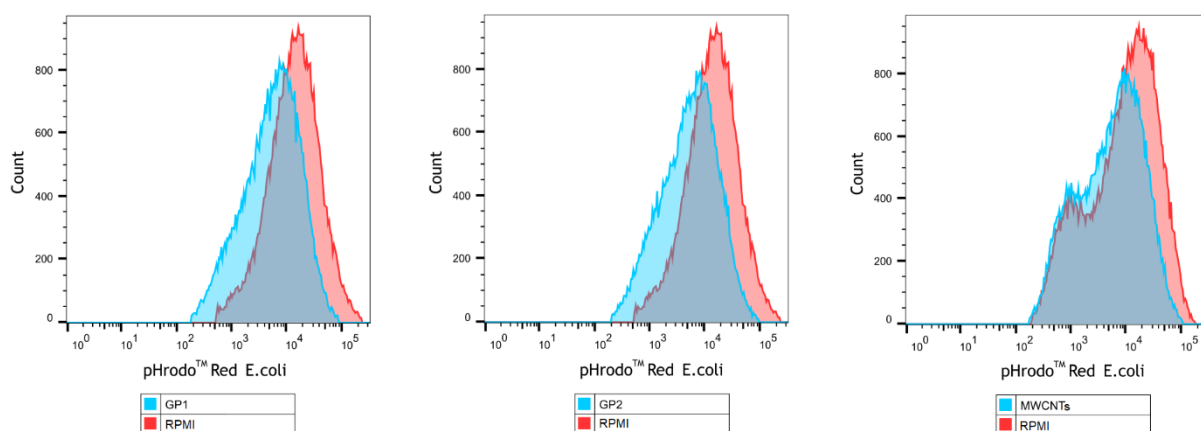
Souběžně probíhalo i vyhodnocení životnosti exponovaných buněk pomocí LDH. Přestože výsledky byly značně variabilní, životnost THP-1 makrofágů nebyla v žádném z případů statisticky významně ovlivněna (obrázek 39).



Obrázek 39: Životnost THP-1 makrofágů stimulovaných GPs (60 $\mu\text{g/ml}$), MWCNTs (30 $\mu\text{g/ml}$) 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.

4.3.2. Modulace fagocytární aktivity u THP-1 makrofágů

Vzhledem k tomu, že se fluorescence barviva pHrodo® u použitých EC partikulí zvyšuje pouze při nízkém pH, které odpovídá pH ve fagozomech, míra intenzity fluorescence odpovídá míře fagocytózy. Ta byla u THP-1 makrofágů hodnocena po 3 h inkubace s EC pomocí průtokové cytometrie. V porovnání s neexponovanou kontrolou, přítomnost GP1, GP2 a MWCNTs potenciálně snižovala fagocytární schopnost THP-1 makrofágů (obrázek 40).



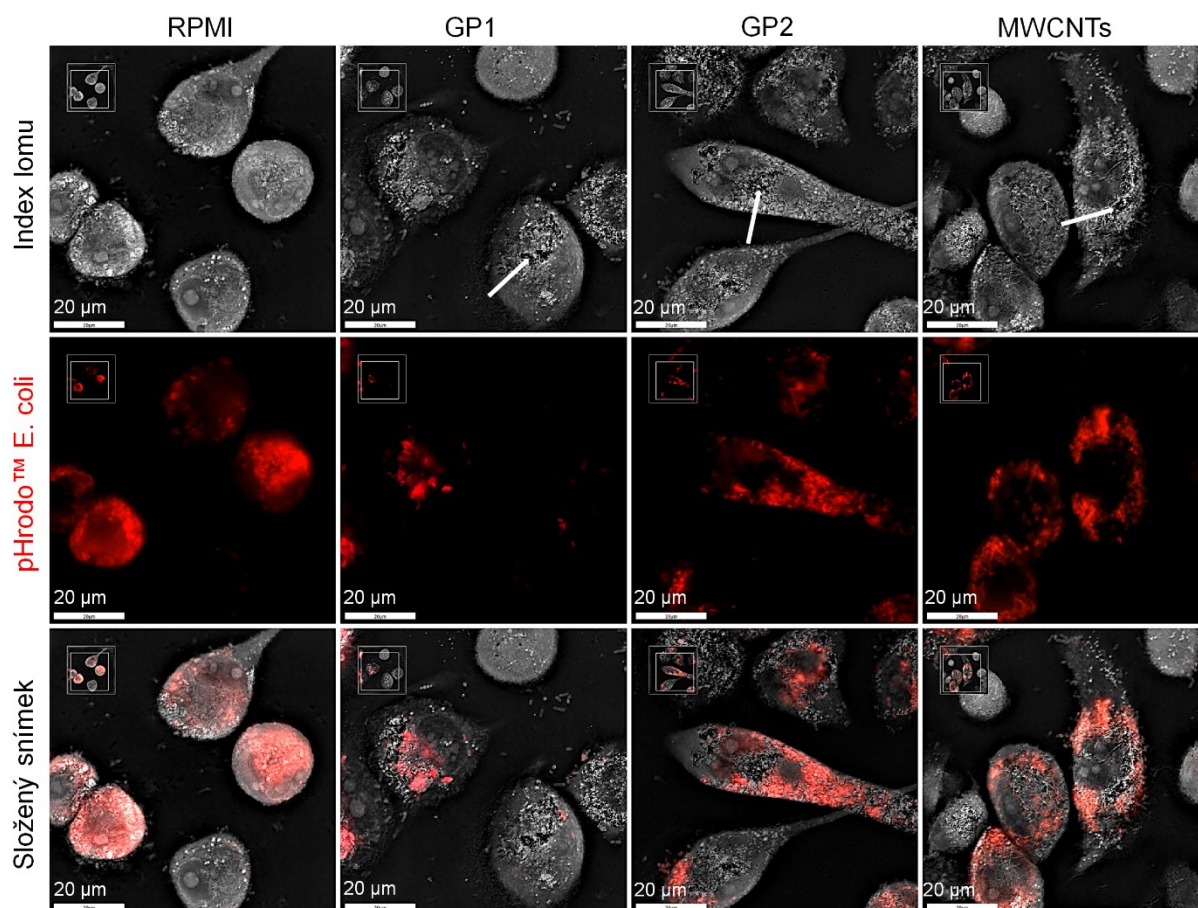
Obrázek 40: Reprezentativní snímky cytometrického stanovení fagocytózy EC (200 $\mu\text{g/ml}$); modře – THP-1 makrofágy předem stimulované GP1, GP2 (60 $\mu\text{g/ml}$) nebo MWCNTs (30 $\mu\text{g/ml}$); RPMI – THP-1 makrofágy bez stimulace CNMs.

Výsledné hodnoty střední intenzity fluorescence (MFI, Median Fluorescence Intensity) shrnuje tabulka 5.

Tabulka 5: Fagocytóza pHrodo® EC (MFI jako min max hodnoty)

	RPMI	GP1	GP2	MWCNTs
min	10674	4852	4575	6062
max	25844	12889	10222	6630

Přítomnost fagocytovaných EC byla potvrzena i při mikroskopické analýze. Dle obrázku 41 byla patrná menší míra výskytu fagocytovaných EC u THP-1 s pohlcenými CNMs, a to zejména v případě GP1. Zároveň nebyla pozorována ko-lokalizace s pohlcenými CNMs.

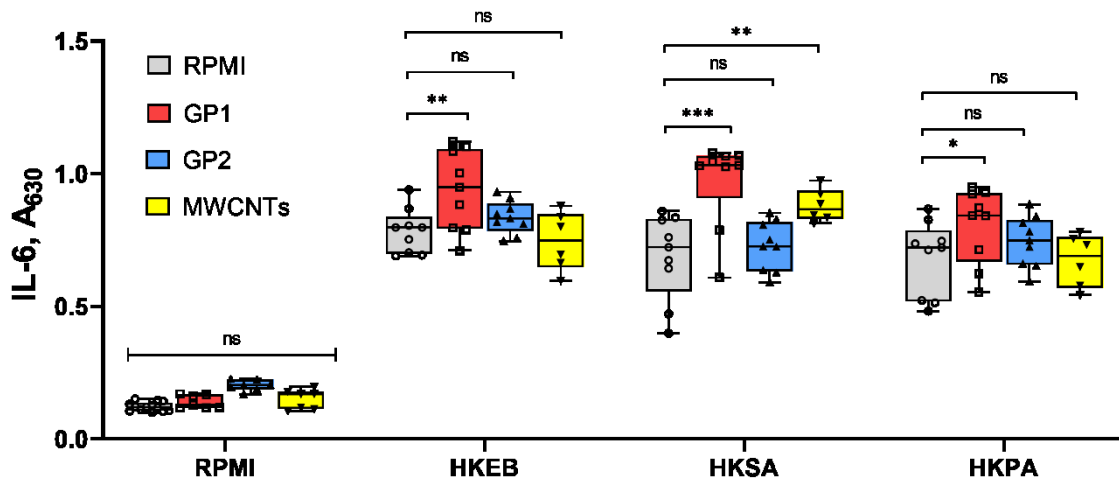


Obrázek 41: Fagocytóza EC (červeně) THP-1 makrofágů předem stimulovaných GP1, GP2 (60 μg/ml) nebo MWCNTs (30 μg/ml); RPMI – bez předchozí stimulace; bílá šipka – ukázka pohlcených CNMs.

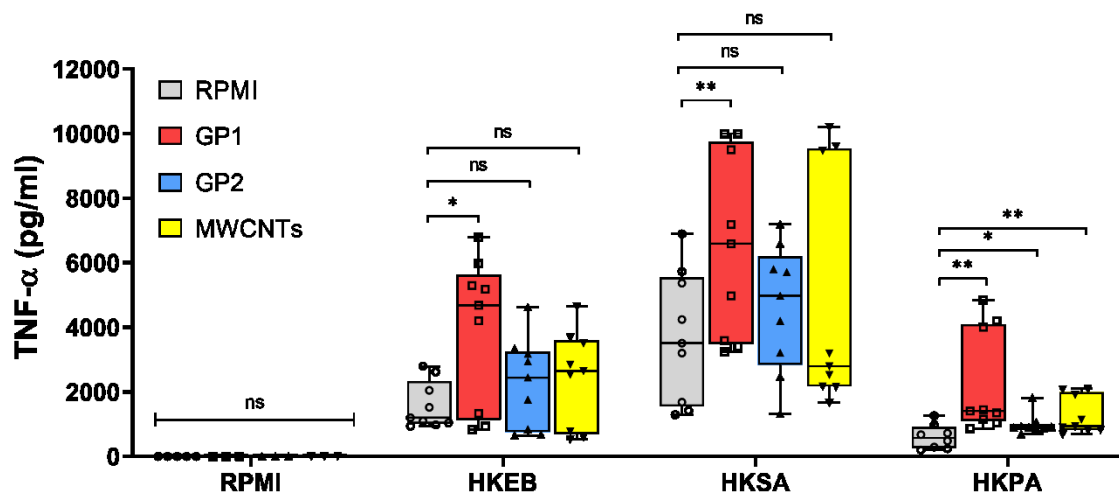
4.3.3. Modulace produkce cytokinů u izolovaných monocytů

Stanovení produkce cytokinů probíhalo totožně jako u THP-1 makrofágů. Na rozdíl od THP-1 makrofágů, přítomnost CNMs u monocytů nevedla k žádné inhibici produkce cytokinů. Naopak, přítomnost GP1 vedla k významnému zvýšení produkce prozánětlivých cytokinů

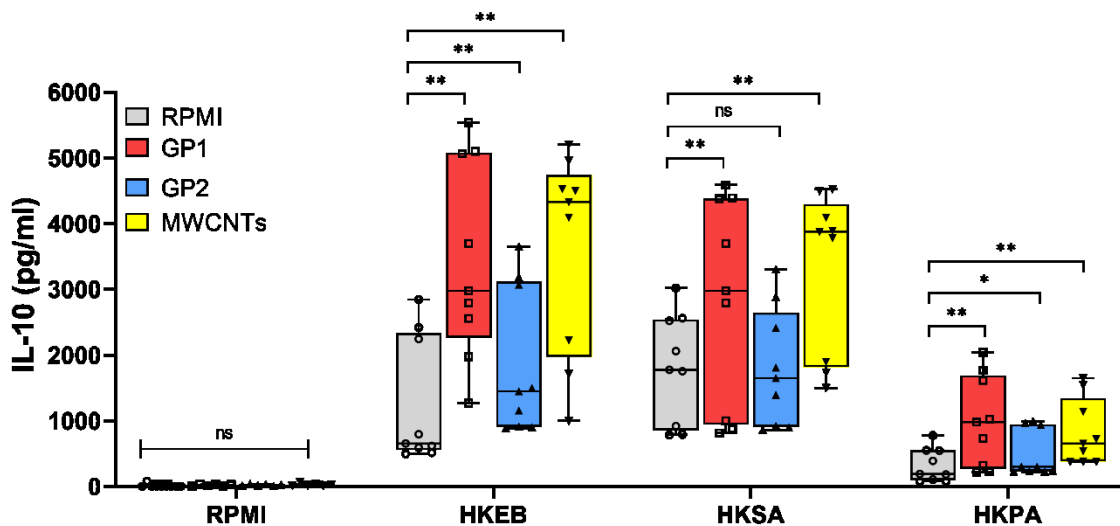
IL-6 (obrázek 42), TNF- α (obrázek 43) i protizánětlivého cytokinů IL-10 (obrázek 44) u všech testovaných bakterií. Podobně MWCNTs ve všech případech významně zesílily produkci IL-10, dále pak IL-6 v odpovědi na HKSA a TNF- α v odpovědi na HKPA. Nejméně výrazný vliv byl pozorován u GP2, kdy došlo k pozitivní modulaci pouze v případě odpovědi na HKPA zvýšením produkce IL-10 a TNF- α a v případě HKEB produkcí IL-10. Zároveň bylo potvrzeno, že samotné CNMs neindukují významnou tvorbu žádného z uvedených cytokinů.



Obrázek 42: Produkce IL-6 u izolovaných monocytů stimulovaných GPs (60 $\mu\text{g/ml}$), MWCNTs (30 $\mu\text{g/ml}$) a bakteriemi HKEB, HKSA a HKPA (1×10^7); 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); ns – nesignifikantní

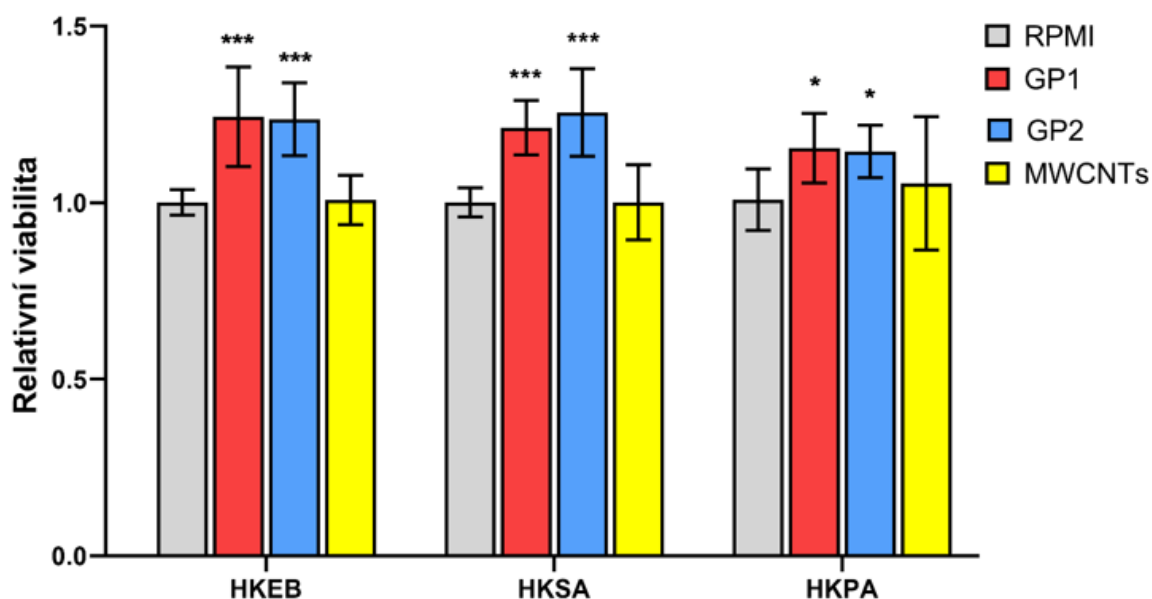


Obrázek 43: Produkce TNF- α u izolovaných monocytů stimulovaných GPs (60 $\mu\text{g/ml}$), MWCNTs (30 $\mu\text{g/ml}$) a bakteriemi HKEB, HKSA a HKPA (1×10^7); Data jsou prezentována jako krabicový graf od minima do maxima se všemi body. Hodnoty ** $p < 0,01$ a * $p < 0,05$ značí statistickou významnost ve srovnání s odpovídající kontrolou (RPMI); ns – nesignifikantní.



Obrázek 44: Produkce IL-10 u izolovaných monocytů stimulovaných GPs (60 $\mu\text{g/ml}$), MWCNTs (30 $\mu\text{g/ml}$) a bakteriemi HKEB, HKSA a HKPA (1×10^7); Data jsou prezentována jako krabicový graf od minima do maxima se všemi body. Hodnoty ** $p < 0,01$ a * $p < 0,05$ značí statistickou významnost ve srovnání s odpovídající kontrolou (RPMI); ns – nesignifikantní.

Na rozdíl od THP-1 makrofágů došlo u monocytů i k významnému ovlivnění životnosti. Oproti neexponované kontrole vedla expozice izolovaných monocytů samotným bakteriím ke zvýšenému úniku LDH (~10 %) do supernatantů. Ovšem u monocytů, které byly předem stimulovány GP1 a GP2, k nárůstu úniku LDH po expozici bakteriím nedošlo. MWCNTs neměly významný vliv na cytotoxicitu bakterií (obrázek 45).

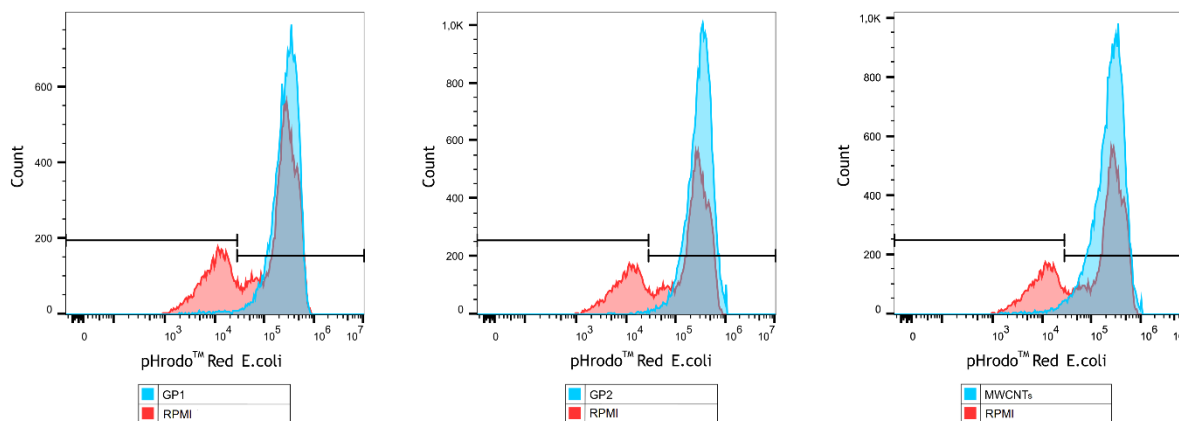


Obrázek 45: Životnost izolovaných monocytů stimulovaných GPs (60 $\mu\text{g/ml}$), MWCNTs (30 $\mu\text{g/ml}$) a bakteriemi HKEB, HKSA a HKPA (1×10^7); Data jsou prezentována jako podíl měřeného LDH exponovaných buněk

a související kontroly (RPMI) a zobrazena jako průměr ± standardní odchylka, *** $p < 0,001$ a * $p < 0,05$ značí statistickou významnost ve srovnání s odpovídající kontrolou (RPMI – bakterie).

4.3.4. Modulace fagocytární odpovědi u izolovaných monocytů

Na rozdíl od THP-1 makrofágů neprobíhala fagocytóza u všech izolovaných monocytů. Bylo zjištěno, že 62–72 % předem nestimulovaných monocytů EC nepohlcovalo. Naopak, monocity předem stimulované GP1, GP2 (60 $\mu\text{g/ml}$) a MWCNTs (30 $\mu\text{g/ml}$) fagocytovaly z 82 až 99 % (obrázek 46).



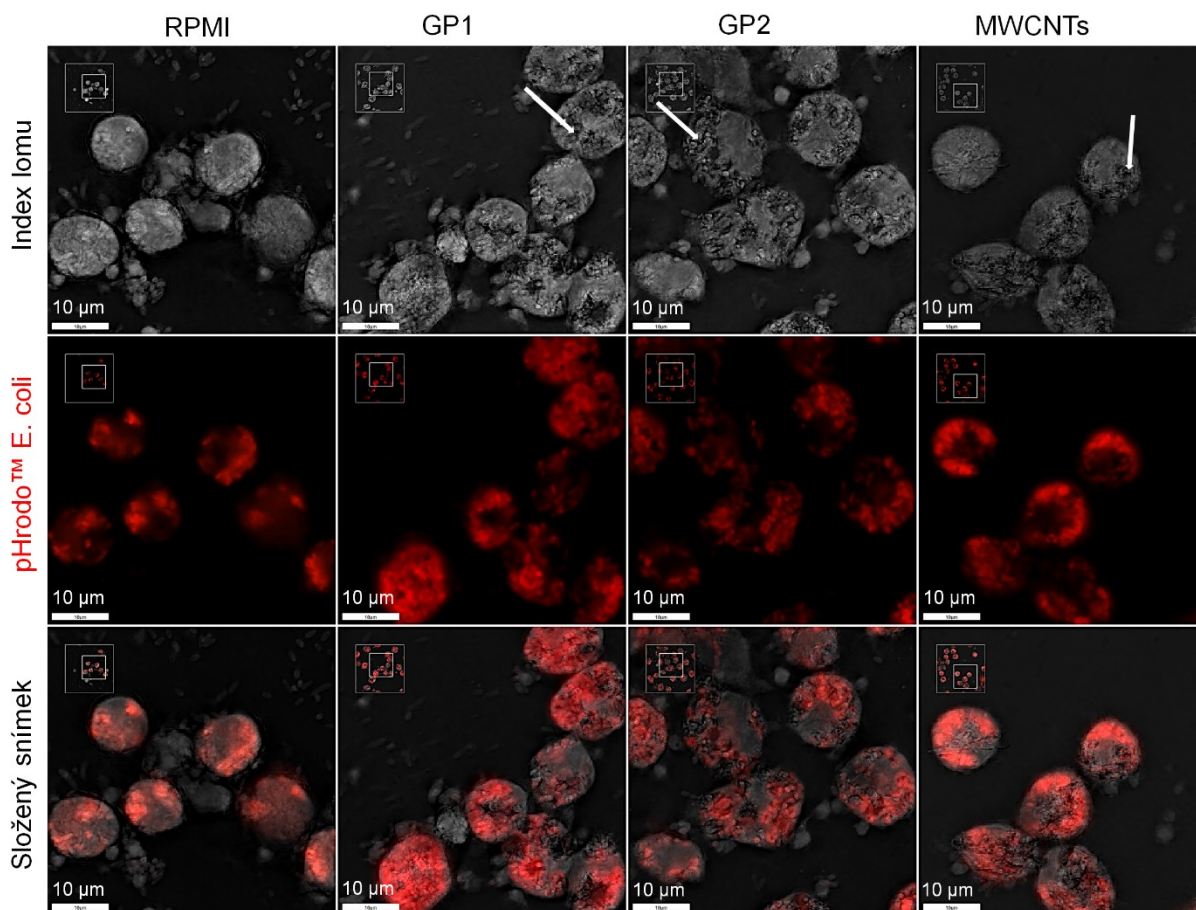
Obrázek 46: Reprezentativní snímky cytometrického stanovení fagocytózy EC (200 $\mu\text{g/ml}$); modře – monocity předem stimulované GP1, GP2 (60 $\mu\text{g/ml}$) nebo MWCNTs (30 $\mu\text{g/ml}$); RPMI – monocity bez stimulace CNMs.

Výsledné hodnoty střední intenzity fluorescence shrnuje tabulka 6.

Tabulka 6: Fagocytóza pHrodo® EC (MFI jako min max hodnoty)

	RPMI	GP1	GP2	MWCNTs
min	1367	1015	884	777
max	2727	2988	3296	2619

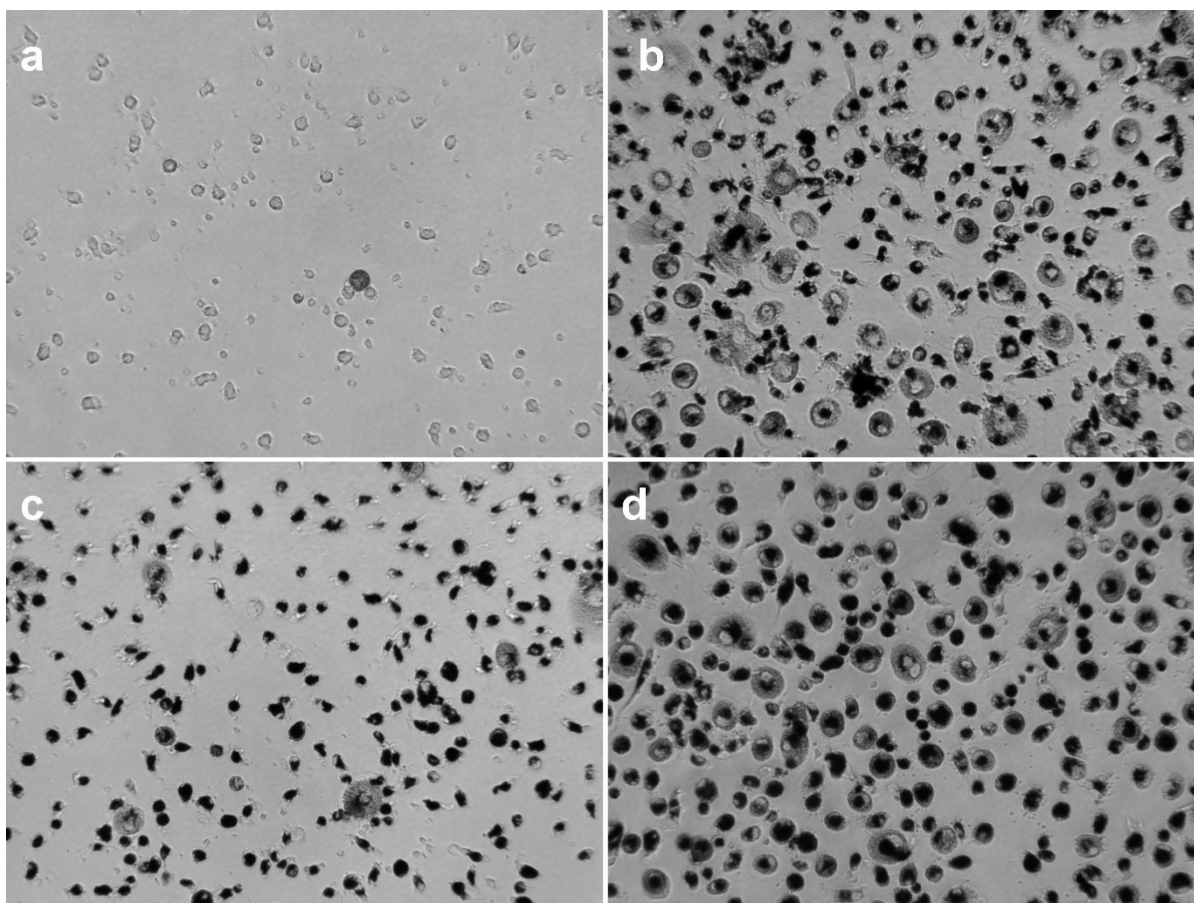
Vzhledem k odlišnému poměru fagocytujících buněk nebylo možné s jistotou stanovit rozdíl mezi předem stimulovanými a kontrolními monocity. Projevila se i výrazná variabilita mezi dárci. Nicméně se ukázalo, že pohlcení GPs a MWCNTs vedlo k výrazným změnám už po 24 h, což se mimo jiné potvrdilo zvýšením celkové fagocytózy, respektive zvýšením počtu fagocytujících buněk (obrázek 34). Mikroskopická analýza (obrázek 47) dále potvrdila, že už po 24 h se začala lišit morfologie neexponované kontroly a předem stimulovaných buněk. Monocity, které pohltily GPs a MWCNTs, byly lépe adherované k povrchu kultivační destičky a jevíly se mít více oválný tvar. Naopak velké % kontrolních buněk mělo menší kulovitý tvar a část buněk bylo odlepených.



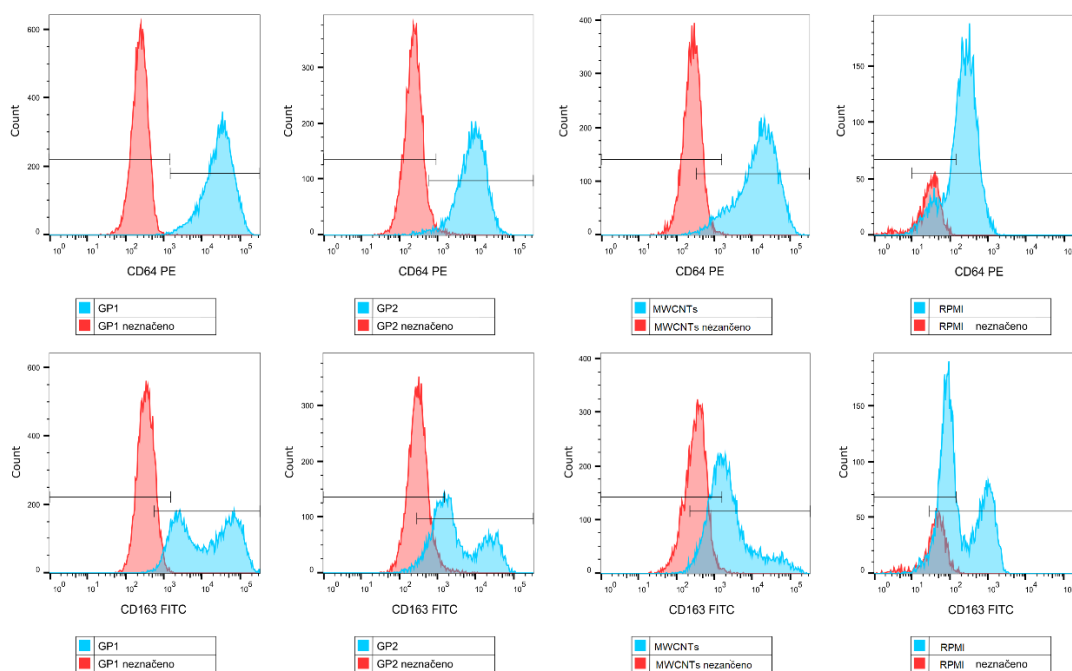
Obrázek 47: Fagocytóza EC (červeně); Izolované monocyty předem stimulovaných GP1, GP2 (60 $\mu\text{g/ml}$) nebo MWCNTs (30 $\mu\text{g/ml}$); RPMI – bez předchozí stimulace; bílá šipka – ukázka pohlcených CNMs.

4.3.5. Modulace diferenciaci izolovaných monocytů

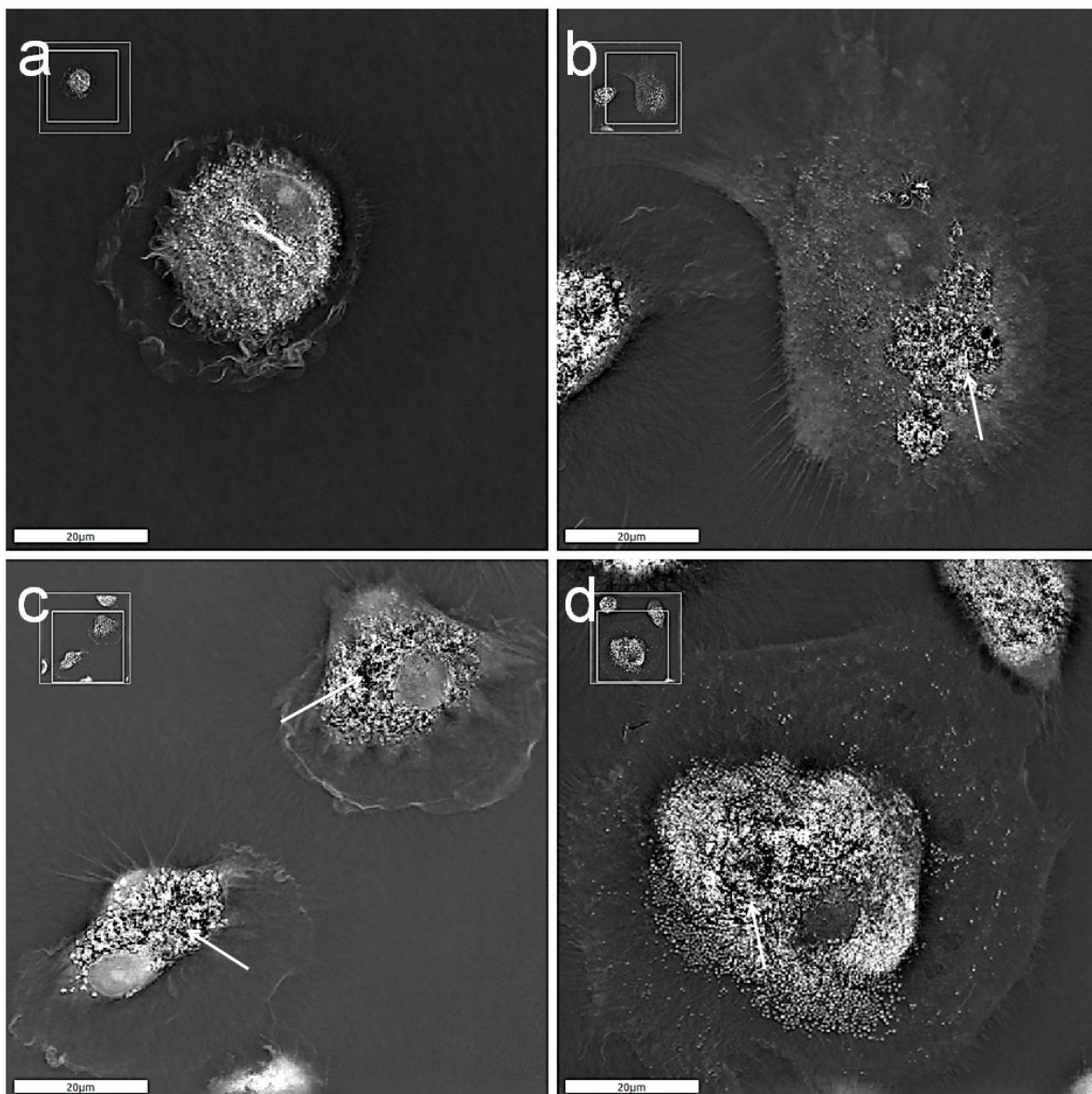
Vzhledem k předchozím výsledkům byly izolované monocyty, které pohltily CNMs, sledovány dalších 7 dní. Zatímco u kontrolních monocytů bez předchozí stimulace došlo k výraznému poklesu množství buněk, monocyty s pohlcenými CNMs si svůj počet zachovaly. Byly patrné i morfologické změny ukazující na rychlou diferenciaci v makrofágy. Po 7 dnech inkubace byla pozorována vesměs heterogenní populace, přičemž u makrofágů s pohlcenými GP1 a MWCNTs převládaly velké kulaté buňky. Makrofágy s GP2 častěji tvořily menší protáhlé buňky a více se morfologicky blížily kontrole (obrázek 48). Z mikroskopie bylo též patrné, že CNMs zůstávaly po celou dobu diferenciaci uvnitř buněk převážně v perinukleární oblasti (obrázek 50). Na základě exprese CD64 a CD163 byla hodnocena případná polarizace do M1 a M2 subtypu. Nález odpovídal heterogenní populaci, přičemž nejvýraznější exprese jak CD64 tak CD163 byla nalezena u GP1. V důsledku vysoké variability nebylo možné stanovit převládající typ polarizace. Hodnoty indexů MFI shrnuje tabulka 7.



Obrázek 48: Morfologie diferencovaných makrofágů po 7denní kultivaci, a – kontrola, b – GP1, c – GP2, d – MWCNTs, zvětšení 20krát.



Obrázek 49: Reprezentativní snímky cytometrického stanovení exprese CD64 a CD163 v diferencujících se buňkách po 7denní kultivaci po jejich 24h inkubaci s CNMs, nebo bez inkubace (RPMi). V důsledku vysoké a variabilní autofluorescence jednotlivých vzorků se výsledné hodnoty MFI stanovily jako poměr označené (modře) a neoznačené (červeně) varianty pro každý typ vzorku zvlášť, včetně kontroly bez expozice CNMs.



Obrázek 50: Detailní zobrazení diferencovaných makrofágů pomocí holotomografické mikroskopie (snímání na základě rozdílů v indexu lomu); a – kontrola, b – GP1, c – GP2, d – MWCNTs, bílá šipka – CNMs

Tabulka 7: Indexy MFI exprese CD64 a CD163 (n = 2)

	RPMI	GP1	GP2	MWCNTs
CD64	5,8	102,2	30,5	59,1
	7	87,2	51,2	73,6
CD163	2,6	36,5	6,8	5,2
	5,9	52,2	23,2	24,7

5. DISKUZE

Od svého objevu v osmdesátých letech představují CNMs jedny z nejvíce studovaných syntetických anorganických materiálů. Jejich unikátní fyzikálně-chemické vlastnosti, jmenovitě mechanická odolnost, nastavitelné elektronické a elektrické vlastnosti, termální a chemická stabilita a obrovský reakční povrch, vybízejí k široké škále aplikací v mnoha odvětvích průmyslu, v pokročilých technologiích a v medicíně [147-149]. S tím souvisí masivní produkce, díky které stoupá míra rizika přímého kontaktu s člověkem, nemluvě o aplikaci v rámci medicínálního využití. Z tohoto důvodu se CNMs řadí mezi nejvíce zkoumané látky i v rámci toxikologie. Pravidelným nálezem toxikologických studií bývá zvýšená produkce prozánětlivých cytokinů [150]. Je tedy jasné, že aktivita imunitního systému je v tomto ohledu klíčová. Dosavadní studie prokázaly vliv CNMs na humorální (komplementový systém) i buněčnou (makrofágy, dendritické buňky, NK buňky, lymfocyty, granulocyty) složku imunity. Nicméně dosažené výsledky jsou velmi variabilní a často dokonce protichůdné [150-152].

Jednou z příčin nekonzistence dat může být špatná nebo nedostatečná charakterizace materiálu. Typickým příkladem je právě grafen, u kterého často dochází např. k nevhodnému názvosloví a v důsledku toho k chybnému zařazení do kontextu s jinými CNMs [153]. Je nutné poznamenat, že většina toxikologických studií obvykle netestuje grafen jako takový, tedy čistou jednovrstvou 2D strukturu, nýbrž derivát, nejčastěji GO [152]. Pokud si výzkumníci nepřipravují materiál sami, nezřídka jsou nalezeny rozdíly mezi doručeným produktem a tím, co deklaruje výrobce. To potvrzuje náš případ s GP1, který dle Ramanovy spektroskopie odpovídá více nanografitu než grafenu [146]. Nižší kvalita GP1 je patrná také z mikroskopické analýzy, kdy v porovnání s charakteristickými hladkými pláty GP2 jsou GP1 více rozdrobené v malých hrudkách (obrázek 20). Nezbytným krokem ve správné charakterizaci je ověření míry oxidace, případně jiné funkcionalizace. To je následně důležité i z hlediska výběru správných toxikologických *in vitro* testů, u kterých je známo, že s nimi různě funkcionalizované a modifikované CNMs interferují [154]. Klasickým příkladem jsou cytotoxické testy založené na enzymatické redukci tetrazoliových solí na barevný formazan. Zjistilo se, že zatímco přítomnost GO vede ke spontánní redukci dané soli, nemodifikovaný grafen ji naopak blokuje svým vyvázáním, případně brání výsledné barevné změně vyvázáním formazanu [155; 156].

V této práci byly pro hodnocení prozánětlivých účinků vybrány nemodifikované CNMs, konkrétně MWCNTs a dva typy GPs. Přestože podle detailní fyzikálně-chemické charakterizace obsahovaly všechny tři CNMs v různé míře defekty (hlavně již zmíněný GP1),

elementární analýza potvrdila velmi nízký stupeň oxidace (tabulka 1). Aby bylo možné nemodifikované CNMs testovat v biologických systémech ve své původní nanoformě, bylo nutné je nejprve stabilizovat ve vhodném médiu. Samotná stabilizace ale není napříč studii uniformní, což teoreticky představuje další zdroj variability výsledků. Nejčastěji jsou využívány polymery, či povrchově aktivní tenzidy, které se váží na NMs nekovalentně [157]. Podmínkou je, aby vybraná látka byla biokompatibilní, případně aby byla použita taková koncentrace, která nevede k cytotoxicitě. Zároveň nesmí docházet k narušení samotného NM, což je problém u kovalentně vázaných stabilizátorů [158]. Další důležitou proměnnou je kritická micelární koncentrace, po jejíž překročení dochází k opětovné agregaci CNMs [159; 160]. Námí vybraná sodná sůl kyseliny cholové (cholát sodný) v maximální koncentraci 0,02 % tato kritéria splňuje. Soli kyseliny cholové byly dosud úspěšně využívány ke stabilizaci řady CNMs, např. SWCNTs nebo karbonových kvantových teček [161; 162]. Otázkou však zůstává, jakým způsobem se mění chování navázaného stabilizátoru a jak moc velký vliv má na výsledné chování buněk vůči testovaným CNMs. Testování samotného cholátu sodného během naší práce sice neukázalo žádné cytotoxické ani prozánětlivé či protizánětlivé účinky (obrázky 26 až 32), ale nejedná se o plně relevantní kontrolu. V momentě, kdy je cholát sodný nebo jakákoli jiná molekula navázána na povrch NMs, může se spolu s nimi dostávat do kontaktu s takovými částmi buněk a tkání, se kterými běžně neinteraguje (Trojský kůň) [82]. Z toho vyplývá, že relevantní kontrola v podstatě neexistuje, respektive jedinou ideální kontrolou je jiný stejně ošetřený materiál podobných charakteristik. Z tohoto důvodu se dále v práci k testování samotného cholátu nepřistoupilo.

Před zahájením vlastních experimentů byly všechny suspenze CNMs testovány na přítomnost TLR4 a TLR2 agonistů. Pro tyto účely byla přednostně využita buněčná esej, jelikož při tradičně používané LAL (Limulus Amoebocyte Lysate) esěji může při testování CNMs docházet k interferencím [163]. Principem LAL esej je na LPS závislá koagulační kaskáda vedoucí ke tvorbě sraženiny, která se následně detekuje. Ve studii Smulderse a kol. se zymogen přítomný v LAL esěji navázal na oxidované MWCNTs, což vedlo ke koagulaci i bez přítomnosti LPS [164]. Falešně pozitivní výsledky byly naměřeny i ve studii zkoumající GO, který interferoval s chromogenní variantou detekce. Autoři zároveň navrhli alternativu v podobě detekce TNF- α produkovaným makrofágy za nebo bez přítomnosti inhibitoru LPS, polymyxinu B [165]. Možnou nevýhodou testů založených na buněčné interakci je nutná nízká cytotoxicita testovaných NMs. V případě testovaných GPs a MWCNTs nebyla nalezena žádná interference ani kontaminace. Zároveň díky využití reportérových buněk byla vyvrácena i nespecifická reaktivita s TLR4 a TLR2 receptory (obrázky 23, 24).

Pro vlastní testování prozánětlivého účinku MWCNTs a obou GPs byly zvoleny buněčné modely založené na primárních lidských monocytech a lidské monocytární linii THP-1, konkrétně PMA diferencované THP-1 makrofágy. Jak bylo zmíněno dříve, CNMs jsou po vstupu do organismu nejčastěji zpracovávány právě profesionálními fagocyty [102]. Kupříkladu nemodifikované GPs byly po inhalaci přednostně nacházeny v alveolárních makrofázích, dokonce i po 90 dnech od expozice [63]. *in vitro* studie zaměřené na cytotoxické účinky MWCNTs ukázaly, že v případě expozice lidským nádorovým epiteliálním buňkám A549 nebo neutrofilům podobným HL-60 téměř k žádnému pohlcení nedocházelo. Aktivní endocytóza byla naopak sledována u THP-1 makrofágů, primárních makrofágů nebo myších NR8383 makrofágů [128; 166]. S těmito výsledky souhlasí i naše pozorování, při kterém byly všechny tři CNMs pohlceny THP-1 makrofágy a primárními monocyty již během prvních 24 h od expozice (obrázek 25). Dle předpokladů se oba GPs nacházely v uzavřených váčcích, což odpovídá aktivní endocytóze. K endocytóze pravděpodobně docházelo i v případě MWCNTs, nicméně následná distribuce ukazovala na potenciální únik MWCNTs do cytoplazmy. Ten byl potvrzen detekcí uvolněného katepsinu B v cytoplazmě (obrázek 34).

Některé studie určily jako hlavní mechanismus vstupu nemodifikovaných CNMs do buněk hydrofobní interakce s TLRs [85; 86]. Jak bylo zmíněno výše, v našem případě k aktivaci TLR4 ani TLR2 nedocházelo, což podíl tohoto mechanismu vyvrací. Negativní výsledky potvrdila také absence IL-6 a TNF- α , k jejichž produkci obvykle po aktivaci TLRs a následně NF- κ B dochází (obrázky 6, 30). Hlavní podíl v tom mohly mít planární struktura GPs a příliš velký průměr MWCNTs, které se takto nemohly „zachytit“ v hydrofobních kapsách TLRs. Naopak přítomnost cholátu sodného spolu s navázanými proteiny potenciálně podpořily vstup do buňky pomocí scavenger receptorů. Ve studii Huynh a kol. navázání BSA na nemodifikované MWCNTs vedlo ke zvýšení jejich fagocytózy prostřednictvím scavenger receptoru SC-A1 [87].

V souladu s dosavadními studiemi měl pak na následnou distribuci CNMs podíl převážně tvar, který zároveň představuje klíčový faktor v jejich cytotoxickém působení [167]. U různých CNMs byly prokázány cytotoxické a s tím související prozánětlivé účinky v důsledku mechanického nebo biologického poškození buněčné membrány, specifických organel, a narušení buněčného cyklu včetně dezintegrace cytoskeletálních struktur [97; 126; 168; 169]. Destruktivní efekt spojený s vyvoláním akutního a chronického zánětu byl mnohokrát prokázán pro různé typy CNTs [170-172]. Z distribuce GP1, které byly většinou pevně uzavřené ve velkých endozomech, bylo naopak patrné, že k žádnému mechanickému poškození nedocházelo (obrázek 25a, d). Závěry potvrdila absence uvolněného LDH jak u THP-1

makrofágů, tak u monocytů (obrázky 26–29). Podobně na tom byly GP2, přestože byly více rozptýlené a jejich čepelovité okraje mohly potenciálně poškozovat různé cytoplazmatické struktury. Dosažené výsledky u GPs byly každopádně v souladu s pozorováním na 3D plicním buněčném modelu ve studii Draslera a kol. [173]. Několikvrstvé GPs nenarušovaly životnost ani u primárních lymfocytů a nevedly ke zvýšené tvorbě prozánětlivých cytokinů ani po pohlcení myšími makrofágy [174; 175]. Zdá se tedy, že i přes vysokou akumulaci ve fagocytech, nemodifikované GPs obecně nemají přímý prozánětlivý potenciál. ELISA vyloučila produkci IL-6, TNF- α a IL-10 u všech tří námi sledovaných CNMs. Vzhledem k tomu, že se jedná o cytokiny typické převážně pro stimulaci patogenními organismy, nebyl výsledek překvapující a pouze potvrdil sterilitu použitých CNMs. Zároveň byl takto vyloučen významný oxidační stres, ke kterému obvykle dochází např. při expozici GO [176; 177]. Na druhou stranu, přítomnost MWCNTs vyvolala aktivaci NLRP3 inflamazomu jak kanonickou cestou (obrázek 32) u THP1-null modelu, tak alternativní cestou (obrázek 31) u primárních monocytů. K aktivaci došlo pravděpodobně v důsledku narušení lyzozomů, kdy uvolněný katepsin B zafungoval jako stimulátor potřebný pro sestavení inflamazomu (obrázek 34). Stejný mechanismus byl pozorován ve studii zaměřené na nanodiamanty [98]. Jiná studie navrhla aktivaci NLRP3 jako klíčový mechanismus pulmonální toxicity CNTs a nanovláken s tím, že stěžejní úlohu zde hraje aktivita NADPH oxidázy. V tomto případě došlo u exponovaných THP-1 buněk vlivem zvýšení NADPH k oxidativnímu vzplanutí a tvorbě ROSu a následně k destrukci lyzozomů a poškození mitochondrií [169]. Tyto události za účasti NLRP3 obvykle vedou k pyroptóze [139]. V naší studii však k významné pyroptóze nedošlo (obrázek 35). Rozdíly mohly pocházet jednak z absence oxidačního stresu, viz absence IL-6, TNF- α , a jednak z rozdílné velikosti použitých MWCNTs. Délka MWCNTs v naší práci dosahovala maximálně 10 μ m, přičemž konce byly často zaoblené (obrázek 20c, f). Z toho vyplývá, že by nemělo docházet v přílišné míře k frustrované fagocytóze, která je také známa jako jedna z příčin cytotoxicity CNTs [101]. Patrná delokalizace trubic na snímcích TEM, evidentní též u GP2, mohla být z části způsobena i procesem řezání na ultramikrotomu. Zmíněná studie neuvádí kontrolu kontaminace, která mohla přispět k výslednému efektu. Mírný únik LDH (~10 %) po expozici MWCNTs byl pozorován pouze u primárních monocytů, ale až při nejvyšší koncentraci 60 μ g/ml. Primární monocyty si obvykle svoji životnost při aktivaci NLRP3 zachovávají [145]. Podobný stav, nazvaný hyperaktivace, byl pozorován u primárních makrofágů odvozených z kostní dřeně a dendritických buněk [138; 178]. Studie ukázaly, že některé molekuly charakteru DAMP, jako oxidované lipidy, mohou tento stav bez narušení životnosti navodit [178]. Nakonec použití geneticky modifikovaných THP-1 buněk

a specifických inhibitorů u monocytů potvrdilo výlučnou specifitu inflamazomu NLRP3 v imunotoxickém účinku MWCNTs (obrázky 33a, 31).

Přestože samotné GPs nevedly k uvolnění katepsinu B ani významně neindukovaly aktivaci NLRP3, jiná situace nastala v případě kanonické aktivace, kdy byly jako druhý signál současně podány GPs a MDP. V porovnání se samotným MDP došlo v případě GP1 i GP2 k násobnému zvýšení produkce IL-1 β (obrázek 33b). Tento nálezný vyvrátil předpoklad inhibice NLRP3 a zároveň potvrdil možnou roli CNMs jako Trojského koně [82]. MDP má charakter PAMP a obvykle se nachází u grampozitivních a gramnegativních bakterií. Za normálních okolností aktivuje intracelulární NOD2 receptor a potenciálně působí jako první i druhý signál pro aktivaci NLRP3 [179]. Z obrázku 33b je patrné, že samotná stimulace prozánětlivým MDP nebyla příliš silná. Zvýšená aktivace mohla nastat v důsledku intracelulárního zakoncentrování MDP díky zvýšené endocytóze GPs. MDP zároveň působil jako doplňující signál, díky kterému mohlo dojít k překročení určitého prahu a NLRP3 byl aktivován v plném rozsahu. Podobný nárůst reaktivity makrofágů ve formě zvýšené produkce IL-6 a TNF- α byl zaznamenán pro souběžnou expozici grafenu nebo MWCNTs a LPS [81]. Z dosud uvedeného je evidentní, že ačkoli nemodifikované CNMs nemusí mít samy o sobě přímý cytotoxický a prozánětlivý potenciál, jejich přítomnost může imunitní funkce významně modulovat.

Imunitní systém pracuje jako vysoce dynamická soustava, která musí vyrovnávat různé reakce na mnoho podnětů zároveň. K tomu mu dopomáhají vysoce specifické regulace a jakékoli zásahy mohou danou rovnováhu narušit. V tomto ohledu je nezbytné prověřit možný imunomodulační efekt zejména takových NMs, které se jeví jako biokompatibilní. Nejčastěji se jedná o NMs a NPs, které mají svůj potenciál v biomedicině, předpokládá se jejich intravenózní podání a tedy 100% biologická dostupnost. Dosud byl imunomodulační efekt pozorován např. u negativně nabitých sulfonát-polystyrenových NPs a NPs oxidu železa, které u lidských primárních monocytů a mononukleárních leukocytů periferní krve snižovaly prozánětlivou odpověď na LPS [180; 181]. Nanočástice zlata modulovaly sekundární paměťovou odpověď vůči LPS inhibicí protizánětlivé i prozánětlivé odpovědi u monocytů předem stimulovaných vakcinačním kmenem *M. bovis* BCG (Bacille Calmette-Guérin) [182]. Modulační vliv na základní imunitní funkce je nutné hodnotit také u NMs, které v organismu přetrvávají dlouhou dobu, což jsou právě nemodifikované CNMs.

Základní imunitní funkcí monocytů a makrofágů je schopnost vyvolat zánět. Jak bylo zmíněno výše, vedoucím mechanismem přímého prozánětlivého účinku CNMs je aktivace NLRP3 a produkce IL-1 β [98; 183-185]. Naproti tomu fyziologická odpověď běžným

mikrobům probíhá obvykle produkcí různých cytokinů, mezi které řadíme IL-6, IL-10 a TNF- α . Tyto cytokiny jsou esenciální pro první fázi prozánětlivé odpovědi, podílí se na buněčné signalizaci a vzájemně se ovlivňují. Je jasné, že jakýkoli zásah do jejich regulace potenciálně vede k nekontrolovatelnému zánětu a poškození tkání [186]. Jejich produkce závisí na aktivitě PRRs, převážně TLRs. Vzhledem k tomu, že tyto receptory obvykle reagují na celý soubor PAMPs, byly námi pro testování modulace vybrány celé (teplem usmrcené) bakterie, které simulují reálnou situaci lépe než jeden purifikovaný bakteriální ligand. Aby byla vyloučená možná výhradní odpověď vůči některému typu bakterií, byly u obou buněčných modelů testovány tři různé druhy bakterií, konkrétně HKEB (TLR4 a TLR2 agonista), HKSA (TLR2 agonista) a HKPA (TLR2 a TLR5 agonista). Kontrolou zde byly buňky exponované bakteriím, které nebyly předem vystaveny CNMs. Abychom vyloučili efekt Trojského koně, byly THP-1 makrofágy i monocyty nejdříve kultivovány s necytotoxickými koncentracemi CNMs, a následně až po jejich pohlcení a odstranění přebytečných částic, byly vystaveny bakteriím. Modulace prozánětlivé odpovědi byla potvrzena pro všechny tři typy CNMs, nicméně se výsledky lišily jak mezi oběma buněčnými modely, tak mezi jednotlivými CNMs (obrázky 36 až 44).

THP-1 makrofágy diferencované pomocí PMA byly v minulosti hodnoceny jako vhodná alternativa k primárním makrofágům [117; 187]. Na druhou stranu jejich maligní původ občas vede k rozdílné reaktivitě. Tedesco a kol. potvrdili, že v porovnání s lidskými primárními makrofágy diferencovanými z monocytů vede M1 stimulace THP-1 makrofágů k násobně snížené expresi IL-6 a naopak zvýšené tvorbě IL-1 β [188]. Obecně nižší reaktivita v porovnání s monocytů byla pozorována i v naší studii. Každopádně nejvýraznější modulace THP-1 odpovědi byla patrná u regulace IL-6, jehož produkce byla v přítomnosti všech tří CNMs zvýšena. Podobné výsledky získali Lebre a kol., kteří během své práce odhalili, že nemodifikované GPs mohou předem naprogramovat makrofágy odvozené z kostní dřeně. Objeví, že přítomnost GPs zvyšovala produkci IL-6 a TNF- α pomocí mechanismu vrozené trénované imunity [189]. Zdá se, že u buněčných modelů reprezentujících makrofágy dochází vlivem působení nemodifikovaných CNMs nejprve k modulaci prozánětlivým směrem. S ohledem na variabilní výsledky u různých typů bakterií však není tato hypotéza uniformní a záleží na typu podnětu.

Mnohem zajímavější byla v tomto ohledu reaktivita primárních monocytů, u kterých byla kromě produkce cytokinů hodnocena také jejich diferenciace. Nedávné studie poukázaly na to, že CNMs mohou modulovat imunitní funkce pomocí epigenetických změn, které vyjma vrozené imunitní paměti zodpovídají také za M1 a M2 polarizaci a podílí se na autofagii [190-

192]. Autofagie reprezentuje jednu z cest eliminace CNMs a teoreticky by mohla představovat mechanismus modulace monocytů [126; 127; 193]. Pokud při probíhající autofagii nedochází k zablokování autofagického toku, který obvykle vyústí v buněčnou smrt, dochází jejím působením ke snížení produkce cytokinů a inhibici aktivace NLRP3 [192]. V našem případě po expozici CNMs a následně bakteriím nebyla pozorována žádná zvýšená úmrtnost ani THP-1 makrofágů ani primárních monocytů (obrázky 39, 45), ale zároveň nedošlo ani ke snížení produkce cytokinů (až na výjimku IL-10 u HKSA a THP-1), což představu o probíhající autofagii nebo její blokaci u žádného z modelů nepodporuje. Nicméně se autofagie podílí také na buněčné diferenciaci, a právě u monocytů má význam v jejich přežívání [194]. Všechny tři testované CNMs nejenže nezpůsobily cytotoxicitu u primárních monocytů, ale vylepšily jejich přežití a stimulovaly jejich rychlou diferenciaci v makrofágy (obrázek 48). Příčina by dále mohla spočívat v metabolickém přepnutí vyvolaném již zmíněnými epigenetickými změnami. Současné studie ukázaly, že primární monocyty, které byly předem stimulované necytotoxickými koncentracemi NPs nebo patogenů, podstoupily epigenetické změny z části založené na signalizační kaskádě mTOR (Mammalian Target of Rapamycin), jejíž aktivace vedla k přepnutí metabolismu do anaerobní glykolýzy, která je spojována s lepším přežitím buněk [108; 195]. Epigenetické změny úzce souvisí také s reorganizací cytoskeletu, ke které nutně došlo při úvodní endocytóze CNMs. Není vyloučeno, že samotné pohlcení CNMs sloužilo jako úvodní signál k zahájení signalizační kaskády, která vyústila v diferenciaci monocytů i bez přítomnosti růstových faktorů nebo bakteriálního stimulu. Změny v reorganizaci buněčného cytoskeletu probíhají prakticky neustále a jejich vlivem dochází k diferenciaci požadovanými směry [196; 197]. Vliv CNMs na cytoskelet se již mnohokrát potvrdil. Například velké GPs narušily cytoskeletální síť v myších makrofázích a epiteliálních buňkách [97]. Pláty GO narušily migraci epiteliálních buněk A549 a HeLa přímou reakcí s aktinem [168; 198]. Efekt by mohl být též nepřímý v důsledku nesespecifického mechanického útlaku intracelulárních komponent. Z obrázku 25 lze vidět, že největší endozomy vytvářely GP1, tedy k největšímu útlaku docházelo právě v jeho přítomnosti. To by mohlo teoreticky vysvětlit rozdíl v imunomodulačních účincích jednotlivých GPs, kdy právě jako největší modulátor (u obou typů buněk) byly potvrzeny GP1 (obrázky 42–44). Naopak více rozptýlené GP2 vedly u monocytů k mírné až zanedbatelné modulaci produkce cytokinů. Významnou úlohu zde mohly sehrát i navázané proteiny, které se obvykle snáze váží na velké planární struktury [89]. Díky velké laterální velikosti GP2 mohlo dojít k lepšímu maskování vlastního hydrofobního povrchu a tím pádem k minimalizaci jeho interakcí s intracelulárním obsahem.

Pozorované zvýšení produkce protizánětlivého cytokinu IL-10 naznačuje zapojení autoregulačních mechanismů, obzvláště pak u MWCNTs, které samy stimulovaly aktivaci NLRP3 [199; 200]. Prokázalo se, že nadměrná nebo opakovaná stimulace primárních monocytů vede za určitých okolností k utlumení zánětlivé odpovědi, což se podílí na udržení vnitřní homeostázy [201]. V důsledku toho dochází k preferenční polarizaci do subpopulace M2. Bohužel se nám nepodařilo přesně stanovit výslednou polarizaci diferencujících se monocytů. Vlivem CNMs došlo k vytvoření heterogenní populace, která disponovala znaky M1 (CD64) i M2 (CD163) makrofágů (tabulka 7). V porovnání s nestimulovanou kontrolou však bylo překvapující, v jaké míře byly CD163 a CD64 exprimovány (tabulka 7). Analýza vycházela ve všech případech ze stejného počtu buněk, tudíž se nejednalo o zkreslení v důsledku snížení počtu kontrolních monocytů-makrofágů v průběhu diferenciace. Ke zvýšení exprese receptoru pro komplex hemoglobin-haptoglobinu CD163 obvykle dochází během pozdní fáze akutního i chronického zánětu v reakci např. na působení endogenních glukokortikoidů a cytokinů IL-6 a IL10 [202; 203]. Za fyziologických podmínek představuje CD163 jeden z prominentních znaků M2c makrofágů, jejichž úkolem je především remodelace tkání a angiogeneze. CD163 se zároveň podílí na tlumení silného mikrobiálního a sterilního zánětu [204]. Naopak CD64 představuje znak asociovaný s výraznou prozánětlivou aktivitou, např. během sepse [205]. Jedná se o aktivační vysokoafinní Fc receptor (FC γ RI), který se podílí na fagocytóze, uvolnění prozánětlivých mediátorů, na protilátkách závislé buněčné cytotoxicitě a prezentaci antigenu [206]. Exprese CD64 bývá zvyšována během akutního zánětu působením IFN- γ [207]. Z obecného hlediska je stanovení polarizace na základě CD znaků velmi náročné, jelikož se dané znaky v různých poměrech vyskytují u obou subpopulací [208]. Navíc studie porovnávací různé CNTs ukázala, že se polarizace jedné populace může změnit v průběhu času. Kultivace myších alveolárních makrofágů s CNTs nejdříve vyvolala polarizaci do M1 charakteristické produkcí IL-1 β , která byla posléze inhibována ve prospěch polarizace M2 a zvýšení produkce TGF- β [113]. Na základě těchto informací je možné, že k podobnému efektu docházelo i v naší práci a bylo by vhodné stávající měření zopakovat ve vícero časových intervalech na větším množství vzorků.

Celkově rozdílné cytokinové spektrum u monocytů a THP-1 makrofágů vycházelo pravděpodobně z odlišného diferenciačního stádia buněk a již zmíněných zásadních rozdílů mezi primárními a nádorovými buňkami. Oba buněčné modely si však zachovaly svoji fagocytární funkci (obrázky 41, 47). Vlivem zahájení diferenciace došlo u monocytů k celkovému zvýšení fagocytózy díky navýšení počtu fagocytujících buněk. Kvůli vysoké autofluorescenci a možnému zhášení fluorescence nebylo možné s jistotou určit, zda jednotlivé

monocyty s CNMs fagocytují EC méně, či více. Výsledky THP-1 makrofágů byly více homogenní a ukazovaly na mírné snížení fagocytární aktivity (tabulka 5). I zde se samozřejmě mohlo projevit zhášení fluorescence. Jako doplňující test byla provedena kolorimetrická esej založená na fagocytóze zymosanu, která snížení fagocytózy potvrdila, avšak dosud nebyla zopakována. Snížení fagocytózy u THP-1 makrofágů by odpovídalo endocytóze pomocí scavenger receptorů. Studie sledující vychytávání karboxylovaných MWCNTs pomocí SC-A1 zároveň potvrdila snížení fagocytózy SC-A1 ligandů v důsledku spotřeby receptorů pro MWCNTs [83]. Potenciální narušení fagocytární aktivity nicméně nestálo za modulací produkce cytokinů.

Závěrem lze říct, že přestože žádné z testovaných CNMs nepůsobily přímo cytotoxicky, jejich přítomnost významně ovlivnila zánětlivou odpověď, zejména produkci cytokinů. Na výsledné modulaci se pravděpodobně podílelo více mechanismů závislých jak na typu buněk, tak na typu nanomateriálu. Všechny tři suspenze CNMs byly připravovány podle totožného protokolu, což vzhledem k rozdílnosti výsledků mezi jednotlivými typy CNMs vylučuje zásadní přispění cholátu. Podobně jako u přímého prozánětlivého účinku se zde jako rozhodující faktory jeví tvar a velikost částic. Je evidentní, že samotná endocytóza a intracelulární distribuce CNMs vyvolaly mimo jiné reorganizaci cytoskeletu, který je obecně přímo i nepřímo zapojen do řady signálních drah [196].

6. ZÁVĚR

Cílem této disertační práce bylo *in vitro* hodnocení prozánětlivého účinku vybraných CNMs, a to konkrétně nemodifikovaných MWCNTs a dvou typů GPs. K vlastnímu testování byly vybrány buněčné modely reprezentující profesionální fagocyty, konkrétně primární monocyty izolované od zdravých dárců a buňky vycházející z lidské monocytární linie THP-1 diferencované na makrofágy.

Stanovení imunotoxicity po expozici CNMs probíhalo ve třech základních krocích, kdy byly postupně hodnoceny (1) životnost ovlivněných buněk, (2) přímý prozánětlivý účinek a (3) nepřímý prozánětlivý účinek ve formě stanovení modulačního účinku na základní imunitní funkce.

(1) Výsledky na základě stanovení LDH, HMGB1 a mikroskopické analýzy ukázaly, že námi zvolené nemodifikované GPs neměly akutní cytotoxický efekt. Navíc došlo vlivem jejich endocytózy u primárních monocytů k zahájení mechanismů podporujících jejich přežívání. Podobný efekt nastal i v případě MWCNTs, pouze však do určité koncentrace (v našem případě 60 $\mu\text{g/ml}$), kdy pravděpodobně začaly převažovat signály asociované s tvorbou DAMPs vedoucí ke smrti buňky.

(2) U samotných GPs nebyl prokázán žádný přímý prozánětlivý, případně protizánětlivý, efekt. Výsledky odpovídaly mikroskopické analýze, kdy byly GPs nalezeny převážně „bezpečně“ uzavřeny v endozomech. V porovnání s tím byl potvrzen prozánětlivý účinek MWCNTs, které díky svému tvaru poškozovaly lysozomy a uvolněný katepsin B aktivoval NLRP3 s následnou produkcí IL-1 β . Nicméně aktivace NLRP3 nevedla k pyroptické smrti buňky.

(3) Nehledě na absenci cytotoxicity byl pro všechny CNMs potvrzen modulační efekt, a to zejména v zesílení cytokinové odpovědi vůči bakteriálním stimulům. Taktéž byl pro GPs potvrzen kostimulační efekt na aktivaci NLRP3 v odpovědi na reprezentativní stimul. Celkově došlo k posílení prozánětlivé odpovědi, a tedy potvrzení akutního nepřímého prozánětlivého účinku CNMs. Nicméně zvýšení tvorby IL-10 naznačovalo možné zahájení autoregulačních mechanismů ukazující na preferenční polarizaci směrem k M2. To však vyžaduje mnohem komplexnější ověření.

Celkově výsledky této práce ukazují na důležitý fakt, že nanomateriály, které mohou být považovány za biokompatibilní, mohou ve skutečnosti silně ovlivňovat důležité imunitní funkce. Tato práce také jako jedna z prvních dokládá modulační účinky nemodifikovaných CNMs na lidské primární monocyty, a to hned v několika směrech. Dosud byl imunomodulační

efekt CNMs hodnocen převážně na makrofázích různého původu nebo suspenzních THP-1 monocytech. V této práci je mimo jiné ukázáno, že se odpovídavost těchto modelů vzájemně výrazně liší. Primární monocyty představují velice plastickou populaci s mnoha esenciálními funkcemi a narušení těchto funkcí může vést k závažným následkům. V kontextu vyslovené hypotézy vlivu cytoskeletálních změn by bylo vhodné se dále zaměřit na hodnocení buněčné migrace, která je s cytoskeletem úzce spjata, a rozšířit stávající měření o časoběrné detekce specifických proteinů a hodnocení širší škály asociovaných fenotypových znaků.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] JEEVANANDAM, J., A. BARHOUM, Y. S. CHAN, A. DUFRESNE, et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J Nanotechnol*, 2018, **9**, s. 1050-1074.
- [2] FENG, L., Z. LIU. Biomedical Applications of Carbon Nanomaterials. *Biomedical Applications and Toxicology of Carbon Nanomaterials*. 2016, s. 131-162.
- [3] BATISTA, C. A. S., R. G. LARSON, a N. A. KOTOV Nonadditivity of nanoparticle interactions. *Science*, 2015, **350**(6257), s. 1242477.
- [4] HOHELLA, M. F., D. W. MOGK, J. RANVILLE, I. C. ALLEN, et al. Natural, incidental, and engineered nanomaterials and their impacts on the Earth system. 2019, **363**(6434), s. eaau8299.
- [5] HULLA, J. E., S. C. SAHU, a A. W. HAYES Nanotechnology: History and future. *Hum Exp Toxicol*, 2015, **34**(12), s. 1318-1321.
- [6] ABD ELLAH, N. H., S. A. ABOUELMAGD Surface functionalization of polymeric nanoparticles for tumor drug delivery: approaches and challenges. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2017, **14**(2), s. 201-214.
- [7] LI, R., Z. NING, J. CUI, B. KHALSA, et al. Ultrafine particles from diesel engines induce vascular oxidative stress via JNK activation. *Free Radic Biol Med*, 2009, **46**(6), s. 775-782.
- [8] GUJRATI, M., A. MALAMAS, T. SHIN, E. JIN, et al. Multifunctional Cationic Lipid-Based Nanoparticles Facilitate Endosomal Escape and Reduction-Triggered Cytosolic siRNA Release. *Molecular Pharmaceutics*, 2014, **11**(8), s. 2734-2744.
- [9] RICHARDS, D. A., A. MARUANI, a V. CHUDASAMA Antibody fragments as nanoparticle targeting ligands: a step in the right direction. *Chemical Science*, 2017, **8**(1), s. 63-77.
- [10] POKROPIVNY, V. V., V. V. SKOROKHOD Classification of nanostructures by dimensionality and concept of surface forms engineering in nanomaterial science. *Materials Science and Engineering: C*, 2007, **27**(5), s. 990-993.
- [11] WANG, Z., T. HU, R. LIANG, a M. WEI Application of Zero-Dimensional Nanomaterials in Biosensing. 2020, **8**.
- [12] MACHÍN, A., K. FONTÁNEZ, J. C. ARANGO, D. ORTIZ, et al. One-Dimensional (1D) Nanostructured Materials for Energy Applications. 2021, **14**(10), s. 2609.

- [13] GEIM, A. K., K. S. NOVOSELOV The rise of graphene. *Nature Materials*, 2007, **6**(3), s. 183-191.
- [14] CUI, X., B. WAN, Y. YANG, X. REN, et al. Length effects on the dynamic process of cellular uptake and exocytosis of single-walled carbon nanotubes in murine macrophage cells. *Scientific Reports*, 2017, **7**(1), s. 1518.
- [15] LU, Y., J. WANG, L. WANG, D. ZHAO, et al. Construction of 3D carbon fiber/carbon nanotube/silicone rubber nanocomposites for stretchable conductors through interface host-guest dendrimers. *Composites Science and Technology*, 2021, **205**, s. 108692.
- [16] SHARMA, M. Understanding the mechanism of toxicity of carbon nanoparticles in humans in the new millennium: A systemic review. *Indian journal of occupational and environmental medicine*, 2010, **14**(1), s. 3-5.
- [17] NEGRI, V., J. PACHECO-TORRES, D. CALLE, a P. LÓPEZ-LARRUBIA Carbon Nanotubes in Biomedicine. *Topics in Current Chemistry*, 2020, **378**(1), s. 15.
- [18] RAO, N., R. SINGH, a L. BASHAMBU Carbon-based nanomaterials: Synthesis and prospective applications. *Materials Today: Proceedings*, 2021, **44**, s. 608-614.
- [19] NOVOSELOV, K. S., A. K. GEIM, S. V. MOROZOV, D. JIANG, et al. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. *Science*, 2004, **306**(5696), s. 666-669.
- [20] PARK, S., R. S. RUOFF Chemical methods for the production of graphenes. *Nat Nanotechnol*, 2009, **4**(4), s. 217-224.
- [21] LI, X., W. CAI, J. AN, S. KIM, et al. Large-area synthesis of high-quality and uniform graphene films on copper foils. *Science*, 2009, **324**(5932), s. 1312-1314.
- [22] KIM, K. S., Y. ZHAO, H. JANG, S. Y. LEE, et al. Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes. *Nature*, 2009, **457**(7230), s. 706-710.
- [23] BERGER, C., Z. SONG, X. LI, X. WU, et al. Electronic Confinement and Coherence in Patterned Epitaxial Graphene. *Science*, 2006, **312**(5777), s. 1191-1196.
- [24] GEORGAKILAS, V., M. OTYEPKA, A. B. BOURLINOS, V. CHANDRA, et al. Functionalization of Graphene: Covalent and Non-Covalent Approaches, Derivatives and Applications. *Chemical Reviews*, 2012, **112**(11), s. 6156-6214.
- [25] ZHANG, L., Z. LU, Q. ZHAO, J. HUANG, et al. Enhanced chemotherapy efficacy by sequential delivery of siRNA and anticancer drugs using PEI-grafted graphene oxide. *Small*, 2011, **7**(4), s. 460-464.

- [26] YANG, K., L. HU, X. MA, S. YE, et al. Multimodal Imaging Guided Photothermal Therapy using Functionalized Graphene Nanosheets Anchored with Magnetic Nanoparticles. *Advanced Materials*, 2012, **24**(14), s. 1868-1872.
- [27] HU, Z., Y. HUANG, S. SUN, W. GUAN, et al. Visible light driven photodynamic anticancer activity of graphene oxide/TiO₂ hybrid. *Carbon*, 2012, **50**(3), s. 994-1004.
- [28] DOMENECH, J., A. HERNÁNDEZ, E. DEMIR, R. MARCOS, et al. Interactions of graphene oxide and graphene nanoplatelets with the in vitro Caco-2/HT29 model of intestinal barrier. *Scientific Reports*, 2020, **10**(1), s. 2793.
- [29] SANCHEZ, V. C., A. JACHAK, R. H. HURT, a A. B. KANE Biological Interactions of Graphene-Family Nanomaterials: An Interdisciplinary Review. *Chemical Research in Toxicology*, 2012, **25**(1), s. 15-34.
- [30] WANG, H., W. GU, N. XIAO, L. YE, et al. Chlorotoxin-conjugated graphene oxide for targeted delivery of an anticancer drug. *Int J Nanomedicine*, 2014, **9**, s. 1433-1442.
- [31] HUMMERS, W. S., R. E. OFFEMAN Preparation of Graphitic Oxide. *Journal of the American Chemical Society*, 1958, **80**(6), s. 1339-1339.
- [32] LIN, X., X. SHEN, Q. ZHENG, N. YOUSEFI, et al. Fabrication of Highly-Aligned, Conductive, and Strong Graphene Papers Using Ultralarge Graphene Oxide Sheets. *ACS Nano*, 2012, **6**(12), s. 10708-10719.
- [33] ZHANG, X.-F., S. GURUNATHAN Biofabrication of a novel biomolecule-assisted reduced graphene oxide: an excellent biocompatible nanomaterial. *Int J Nanomedicine*, 2016, **11**, s. 6635-6649.
- [34] YOUNIS, M. R., G. HE, J. LIN, a P. HUANG Recent Advances on Graphene Quantum Dots for Bioimaging Applications. *Frontiers in Chemistry*, 2020, **8**.
- [35] ZHAO, H., R. DING, X. ZHAO, Y. LI, et al. Graphene-based nanomaterials for drug and/or gene delivery, bioimaging, and tissue engineering. *Drug Discovery Today*, 2017, **22**(9), s. 1302-1317.
- [36] IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 1991, **354**(6348), s. 56-58.
- [37] DRESSELHAUS, M. S., G. DRESSELHAUS, a A. JORIO UNUSUAL PROPERTIES AND STRUCTURE OF CARBON NANOTUBES. *Annual Review of Materials Research*, 2004, **34**(1), s. 247-278.
- [38] HUANG, B. Carbon nanotubes and their polymeric composites: the applications in tissue engineering. *Biomufacturing Reviews*, 2020, **5**(1), s. 3.

- [39] ZHAO, W.-S., K. FU, D.-W. WANG, M. LI, et al. Mini-Review: Modeling and Performance Analysis of Nanocarbon Interconnects. *Applied Sciences*, 2019, **9**(11), s. 2174.
- [40] EATEMADI, A., H. DARAEI, H. KARIMKHANLOO, M. KOUHI, et al. Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications. *Nanoscale Research Letters*, 2014, **9**(1), s. 393.
- [41] VANDER WAL, R. L., G. M. BERGER, a T. M. TICICH Carbon nanotube synthesis in a flame using laser ablation for in situ catalyst generation. *Applied Physics A*, 2003, **77**(7), s. 885-889.
- [42] JOURNET, C., W. K. MASER, P. BERNIER, A. LOISEAU, et al. Large-scale production of single-walled carbon nanotubes by the electric-arc technique. *Nature*, 1997, **388**(6644), s. 756-758.
- [43] JOSÉ-YACAMÁN, M., M. MIKI-YOSHIDA, L. RENDÓN, a J. G. SANTIESTEBAN Catalytic growth of carbon microtubules with fullerene structure. *Applied Physics Letters*, 1993, **62**(2), s. 202-204.
- [44] YANG, F., X. WANG, D. ZHANG, J. YANG, et al. Chirality-specific growth of single-walled carbon nanotubes on solid alloy catalysts. *Nature*, 2014, **510**(7506), s. 522-524.
- [45] TADYSZAK, K., J. K. WYCHOWANIEC, a J. LITOWCZENKO Biomedical Applications of Graphene-Based Structures. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 2018, **8**(11), s. 944.
- [46] ZHENG, Y., N. PESCATORE, Y. GOGOTSI, B. DYATKIN, et al. Rapid Adsorption of Proinflammatory Cytokines by Graphene Nanoplatelets and Their Composites for Extracorporeal Detoxification. *Journal of Nanomaterials*, 2018, **2018**, s. 6274072.
- [47] LIU, J., R. LI, a B. YANG Carbon Dots: A New Type of Carbon-Based Nanomaterial with Wide Applications. *ACS Cent Sci*, 2020, **6**(12), s. 2179-2195.
- [48] BAYOUMI, N. A., A. N. EMAM 99mTc radiolabeling of polyethylenimine capped carbon dots for tumor targeting: synthesis, characterization and biodistribution. *International Journal of Radiation Biology*, 2021, **97**(7), s. 977-985.
- [49] GHOSH, D., A. F. BAGLEY, Y. J. NA, M. J. BIRRER, et al. Deep, noninvasive imaging and surgical guidance of submillimeter tumors using targeted M13-stabilized single-walled carbon nanotubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, **111**(38), s. 13948-13953.

- [50] LIU, P., J. TAN, Q. TAN, L. XU, et al. Application of Carbon Nanoparticles in Tracing Lymph Nodes and Locating Tumors in Colorectal Cancer: A Concise Review. *Int J Nanomedicine*, 2020, **15**, s. 9671-9681.
- [51] GE, J., M. LAN, B. ZHOU, W. LIU, et al. A graphene quantum dot photodynamic therapy agent with high singlet oxygen generation. *Nat Commun*, 2014, **5**(1), s. 4596.
- [52] YU, J., L. YANG, J. YAN, W.-C. WANG, et al. Carbon Nanomaterials for Photothermal Therapies. *Carbon Nanomaterials for Bioimaging, Bioanalysis, and Therapy*. 2019, s. 309-340.
- [53] LI, Q., J. WEN, C. LIU, Y. JIA, et al. Graphene-Nanoparticle-Based Self-Healing Hydrogel in Preventing Postoperative Recurrence of Breast Cancer. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2019, **5**(2), s. 768-779.
- [54] GHOSH, S., K. CHATTERJEE Poly(Ethylene Glycol) Functionalized Graphene Oxide in Tissue Engineering: A Review on Recent Advances. *Int J Nanomedicine*, 2020, **15**, s. 5991-6006.
- [55] OBERDÖRSTER, G., E. OBERDÖRSTER, a J. OBERDÖRSTER Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 2005, **113**(7), s. 823-839.
- [56] KUHNBUSCH, T. A., C. ASBACH, H. FISSAN, D. GÖHLER, et al. Nanoparticle exposure at nanotechnology workplaces: A review. *Particle and Fibre Toxicology*, 2011, **8**(1), s. 1-18.
- [57] BHATTACHARYA, K., S. P. MUKHERJEE, A. GALLUD, S. C. BURKERT, et al. Biological interactions of carbon-based nanomaterials: From coronation to degradation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2016, **12**(2), s. 333-351.
- [58] NGUYEN, V. H., B. J. LEE Protein corona: a new approach for nanomedicine design. *Int J Nanomedicine*, 2017, **12**, s. 3137-3151.
- [59] CHEN, R., J. E. RIVIERE. Biological Surface Adsorption Index of Nanomaterials: Modelling Surface Interactions of Nanomaterials with Biomolecules. *Modelling the Toxicity of Nanoparticles*. Cham: Springer International Publishing, 2017, s. 207-253. ISBN 978-3-319-47754-1.
- [60] GRAHAM, U. M., G. JACOBS, R. A. YOKEL, B. H. DAVIS, et al. From Dose to Response: In Vivo Nanoparticle Processing and Potential Toxicity. *Modelling the Toxicity of Nanoparticles*. Cham: Springer International Publishing, 2017, s. 71-100. ISBN 978-3-319-47754-1.

- [61] KONDEJ, D., T. R. SOSNOWSKI Interactions of Carbon Nanotubes and Carbon Nanohorns with a Model Membrane Layer and Lung Surfactant In Vitro. *Journal of Nanomaterials*, 2019, **2019**, s. 9457683.
- [62] VALLE, R. P., T. WU, a Y. Y. ZUO Biophysical influence of airborne carbon nanomaterials on natural pulmonary surfactant. *ACS Nano*, 2015, **9(5)**, s. 5413-5421.
- [63] KIM, J. K., J. H. SHIN, J. S. LEE, J. H. HWANG, et al. 28-Day inhalation toxicity of graphene nanoplatelets in Sprague-Dawley rats. *Nanotoxicology*, 2016, **10(7)**, s. 891-901.
- [64] PARK, E. J., S. J. LEE, K. LEE, Y. C. CHOI, et al. Pulmonary persistence of graphene nanoplatelets may disturb physiological and immunological homeostasis. *J Appl Toxicol*, 2017, **37(3)**, s. 296-309.
- [65] LI, B., J. YANG, Q. HUANG, Y. ZHANG, et al. Biodistribution and pulmonary toxicity of intratracheally instilled graphene oxide in mice. *NPG Asia Materials*, 2013, **5(4)**, s. e44-e44.
- [66] CZARNY, B., D. GEORGIN, F. BERTHON, G. PLASTOW, et al. Carbon Nanotube Translocation to Distant Organs after Pulmonary Exposure: Insights from in Situ ¹⁴C-Radiolabeling and Tissue Radioimaging. *ACS Nano*, 2014, **8(6)**, s. 5715-5724.
- [67] BERGAMASCHI, E., G. GARZARO, G. WILSON JONES, M. BUGLISI, et al. Occupational Exposure to Carbon Nanotubes and Carbon Nanofibres: More Than a Cobweb. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 2021, **11(3)**, s. 745.
- [68] GROSSE, Y., D. LOOMIS, K. Z. GUYTON, B. LAUBY-SECRETAN, et al. Carcinogenicity of fluoro-edenite, silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes. *Lancet Oncol*, 2014, **15(13)**, s. 1427-1428.
- [69] RAHMATI, M., M. MOZAFARI Biological Response to Carbon-Family Nanomaterials: Interactions at the Nano-Bio Interface. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, **7**, s. 4.
- [70] YANG, S.-T., X. LIU, a J. XIE. Biodistribution and Pharmacokinetics of Carbon Nanomaterials In Vivo. *Biomedical Applications and Toxicology of Carbon Nanomaterials*. 2016, s. 55-96.
- [71] RAVELLI, D., D. MERLI, E. QUARTARONE, A. PROFUMO, et al. PEGylated carbon nanotubes: preparation, properties and applications. *RSC Advances*, 2013, **3(33)**, s. 13569-13582.

- [72] LUO, N., J. K. WEBER, S. WANG, B. LUAN, et al. PEGylated graphene oxide elicits strong immunological responses despite surface passivation. *Nat Commun*, 2017, **8**(1), s. 14537.
- [73] LUEBKE, R. Immunotoxicant screening and prioritization in the twenty-first century. *Toxicol Pathol*, 2012, **40**(2), s. 294-299.
- [74] KURAPATI, R., A. BIANCO Peroxidase mimicking DNazymes degrade graphene oxide. *Nanoscale*, 2018, **10**(41), s. 19316-19321.
- [75] ELGRABLI, D., W. DACHRAOUI, C. MÉNARD-MOYON, X. J. LIU, et al. Carbon Nanotube Degradation in Macrophages: Live Nanoscale Monitoring and Understanding of Biological Pathway. *ACS Nano*, 2015, **9**(10), s. 10113-10124.
- [76] HUSSAIN, S., J. A. VANOIRBEEK, a P. H. HOET Interactions of nanomaterials with the immune system. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2012, **4**(2), s. 169-183.
- [77] KREJSEK, J., C. ANDRÝS, a I. KRČMOVÁ. *Imunologie člověka*. Hradec Králové: Garamon s.r.o, 2016. ISBN 978-80-86472-74-4.
- [78] BERTANI, B., N. RUIZ Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus*, 2018, **8**(1), s. 10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018.
- [79] GORBET, M. B., M. V. SEFTON Endotoxin: The uninvited guest. *Biomaterials*, 2005, **26**(34), s. 6811-6817.
- [80] VALLHOV, H., J. QIN, S. M. JOHANSSON, N. AHLBORG, et al. The importance of an endotoxin-free environment during the production of nanoparticles used in medical applications. *Nano Lett*, 2006, **6**(8), s. 1682-1686.
- [81] LAHIANI, M. H., K. GOKULAN, K. WILLIAMS, M. V. KHODAKOVSKAYA, et al. Graphene and carbon nanotubes activate different cell surface receptors on macrophages before and after deactivation of endotoxins. *J Appl Toxicol*, 2017, **37**(11), s. 1305-1316.
- [82] BIANCHI, M. G., M. ALLEGRI, A. L. COSTA, M. BLOSI, et al. Titanium dioxide nanoparticles enhance macrophage activation by LPS through a TLR4-dependent intracellular pathway. *Toxicology Research*, 2015, **4**(2), s. 385-398.
- [83] WANG, R., R. LOHRAY, E. CHOW, P. GANGUPANTULA, 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), s. 2417.

- [84] ZHOU, H., K. ZHAO, W. LI, N. YANG, et al. The interactions between pristine graphene and macrophages and the production of cytokines/chemokines via TLR- and NF-kappaB-related signaling pathways. *Biomaterials*, 2012, **33**(29), s. 6933-6942.
- [85] TURABEKOVA, M., B. RASULEV, M. THEODORE, J. JACKMAN, 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), s. 3488-3495.
- [86] MUKHERJEE, S. P., O. BONDARENKO, P. KOHONEN, F. T. ANDÓN, et al. Macrophage sensing of single-walled carbon nanotubes via Toll-like receptors. *Scientific Reports*, 2018, **8**(1), s. 1115.
- [87] HUYNH, M. T., C. MIKORYAK, P. PANTANO, a R. DRAPER Scavenger Receptor A1 Mediates the Uptake of Carboxylated and Pristine Multi-Walled Carbon Nanotubes Coated with Bovine Serum Albumin. *Nanomaterials*, 2021, **11**(2), s. 539.
- [88] PARK, S. J. Protein-Nanoparticle Interaction: Corona Formation and Conformational Changes in Proteins on Nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 2020, **15**, s. 5783-5802.
- [89] GE, C., J. DU, L. ZHAO, L. WANG, et al. Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, **108**(41), s. 16968-16973.
- [90] CHONG, Y., C. GE, Z. YANG, J. A. GARATE, et al. Reduced Cytotoxicity of Graphene Nanosheets Mediated by Blood-Protein Coating. *ACS Nano*, 2015, **9**(6), s. 5713-5724.
- [91] BELLING, J. N., J. A. JACKMAN, S. YORULMAZ AVSAR, J. H. PARK, et al. Stealth Immune Properties of Graphene Oxide Enabled by Surface-Bound Complement Factor H. *ACS Nano*, 2016, **10**(11), s. 10161-10172.
- [92] BELIME, A., N. M. THIELENS, E. GRAVEL, P. FRACHET, et al. Recognition protein C1q of innate immunity agglutinates nanodiamonds without activating complement. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2019, **18**, s. 292-302.
- [93] WIBROE, P. P., S. V. PETERSEN, N. BOVET, B. W. LAURSEN, et al. Soluble and immobilized graphene oxide activates complement system differently dependent on surface oxidation state. *Biomaterials*, 2016, **78**, s. 20-26.
- [94] SALVADOR-MORALES, C., E. FLAHAUT, E. SIM, J. SLOAN, et al. Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Mol Immunol*, 2006, **43**(3), s. 193-201.

- [95] ZHANG, X., F. CAO, L. WU, a X. JIANG Understanding the Synergic Mechanism of Weak Interactions between Graphene Oxide and Lipid Membrane Leading to the Extraction of Lipids. *Langmuir*, 2019, **35**(43), s. 14098-14107.
- [96] MUKHERJEE, S. P., B. LAZZARETTO, K. HULTENBY, L. NEWMAN, et al. Graphene Oxide Elicits Membrane Lipid Changes and Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Chem*, 2018, **4**(2), s. 334-358.
- [97] LI, Y., H. YUAN, A. VON DEM BUSSCHE, M. CREIGHTON, 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), s. 12295-12300.
- [98] KNÖTIGOVÁ, P. T., J. MAŠEK, F. HUBATKA, J. KOTOUČEK, 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. *Molecular Pharmaceutics*, 2019.
- [99] CANTON, I., G. BATTAGLIA Endocytosis at the nanoscale. *Chemical Society Reviews*, 2012, **41**(7), s. 2718-2739.
- [100] YARON, P. N., B. D. HOLT, P. A. SHORT, M. LÖSCHE, et al. Single wall carbon nanotubes enter cells by endocytosis and not membrane penetration. *Journal of Nanobiotechnology*, 2011, **9**, s. 45-45.
- [101] BOYLES, M. S., L. YOUNG, D. M. BROWN, L. MACCALMAN, 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), s. 1513-1528.
- [102] GUSTAFSON, H. H., D. HOLT-CASPER, D. W. GRAINGER, a H. GHANDEHARI Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem. *Nano today*, 2015, **10**(4), s. 487-510.
- [103] ZIEGLER-HEITBROCK, L., P. ANCUTA, S. CROWE, M. DALOD, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 2010, **116**(16), s. e74-80.
- [104] BUSCHER, K., P. MARCOVECCHIO, C. C. HEDRICK, a K. LEY Patrolling Mechanics of Non-Classical Monocytes in Vascular Inflammation. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 2017, **4**, s. 80-80.
- [105] SERBINA, N. V., E. G. PAMER Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature Immunology*, 2006, **7**(3), s. 311-317.

- [106] GINHOUX, F., S. JUNG Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 2014, **14**(6), s. 392-404.
- [107] DALE, D. C., L. BOXER, a W. C. LILES The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*, 2008, **112**(4), s. 935-945.
- [108] BEKKERING, S., B. A. BLOK, L. A. JOOSTEN, N. P. RIKSEN, et al. In Vitro Experimental Model of Trained Innate Immunity in Human Primary Monocytes. *Clin Vaccine Immunol*, 2016, **23**(12), s. 926-933.
- [109] GINHOUX, F., M. GRETER, M. LEOEUF, S. NANDI, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 2010, **330**(6005), s. 841-845.
- [110] LOCATI, M., G. CURTALE, a A. MANTOVANI Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2020, **15**(1), s. 123-147.
- [111] LENDECKEL, U., S. VENZ, a C. WOLKE Macrophages: shapes and functions. *ChemTexts*, 2022, **8**(2), s. 12.
- [112] JETTEN, N., S. VERBRUGGEN, M. J. GIJBELS, M. J. POST, et al. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis*, 2014, **17**(1), s. 109-118.
- [113] ZHANG, X., M. LUO, J. ZHANG, Z. YAO, et al. Carbon nanotubes promote alveolar macrophages toward M2 polarization mediated epithelial-mesenchymal transition and fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation. *Nanotoxicology*, 2021, **15**(5), s. 588-604.
- [114] TSUCHIYA, S., M. YAMABE, Y. YAMAGUCHI, Y. KOBAYASHI, et al. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer*, 1980, **26**(2), s. 171-176.
- [115] QIN, Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*, 2012, **221**(1), s. 2-11.
- [116] BRÜCK, W., P. PORADA, S. POSER, P. RIECKMANN, et al. Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Annals of Neurology*, 1995, **38**(5), s. 788-796.
- [117] CHANPUT, W., J. J. MES, a H. J. WICHERS THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, 2014, **23**(1), s. 37-45.

- [118] SCHWENDE, H., E. FITZKE, P. AMBS, a P. DIETER Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Journal of Leukocyte Biology*, 1996, **59**(4), s. 555-561.
- [119] PARK, E. K., H. S. JUNG, H. I. YANG, M. C. YOO, et al. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res*, 2007, **56**(1), s. 45-50.
- [120] GENIN, M., F. CLEMENT, A. FATTACCIOLI, M. RAES, et al. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*, 2015, **15**(1), s. 577.
- [121] FLEIT, H. B., C. D. KOBASIUK The Human Monocyte-Like Cell Line THP-1 Expresses Fc γ RI and FC γ RII. *Journal of Leukocyte Biology*, 1991, **49**(6), s. 556-565.
- [122] FORRESTER, M. A., H. J. WASSALL, L. S. HALL, H. CAO, et al. Similarities and differences in surface receptor expression by THP-1 monocytes and differentiated macrophages polarized using seven different conditioning regimens. *Cell Immunol*, 2018, **332**, s. 58-76.
- [123] SHARMA, B., C. B. MCLELAND, T. M. POTTER, S. T. STERN, et al. Assessing NLRP3 Inflammasome Activation by Nanoparticles. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. New York, NY: Springer New York, 2018, s. 135-147. ISBN 978-1-4939-7352-1.
- [124] FARRERA, C., B. FADEEL It takes two to tango: Understanding the interactions between engineered nanomaterials and the immune system. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, **95**(Pt A), s. 3-12.
- [125] PERROTTA, C., M. G. CATTANEO, R. MOLTENI, a C. DE PALMA Autophagy in the Regulation of Tissue Differentiation and Homeostasis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, **8**(1563).
- [126] DI CRISTO, L., S. MC CARTHY, K. PATON, D. MOVIA, et al. Interplay between oxidative stress and endoplasmic reticulum stress mediated- autophagy in unfunctionalised few-layer graphene-exposed macrophages. *2D Materials*, 2018, **5**(4), s. 045033.
- [127] PARK, E.-J., G.-H. LEE, B. S. HAN, B.-S. LEE, et al. Toxic response of graphene nanoplatelets in vivo and in vitro. *Archives of Toxicology*, 2015, **89**(9), s. 1557-1568.
- [128] KESHAVAN, S., G. GUPTA, S. MARTIN, a B. FADEEL Multi-walled carbon nanotubes trigger lysosome-dependent cell death (pyroptosis) in macrophages but not in neutrophils. *Nanotoxicology*, 2021, s. 1-26.

- [129] SUN, B., X. WANG, Z. JI, R. LI, et al. NLRP3 inflammasome activation induced by engineered nanomaterials. *Small*, 2013, **9**(9-10), s. 1595-1607.
- [130] ZHANG, X.-j., S. CHEN, K.-x. HUANG, a W.-d. LE Why should autophagic flux be assessed? *Acta pharmacologica Sinica*, 2013, **34**(5), s. 595-599.
- [131] GUO, H., J. B. CALLAWAY, a J. P. TING Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*, 2015, **21**(7), s. 677-687.
- [132] HE, Y., H. HARA, a G. NUNEZ Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci*, 2016, **41**(12), s. 1012-1021.
- [133] BAUERNFEIND, F. G., G. HORVATH, A. STUTZ, E. S. ALNEMRI, et al. Cutting Edge: NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *The Journal of Immunology*, 2009, **183**(2), s. 787-791.
- [134] FRANCHI, L., T. EIGENBROD, a G. NÚÑEZ Cutting Edge: TNF- α Mediates Sensitization to ATP and Silica via the NLRP3 Inflammasome in the Absence of Microbial Stimulation. *The Journal of Immunology*, 2009, **183**(2), s. 792-796.
- [135] COMPAN, V., A. BAROJA-MAZO, G. LÓPEZ-CASTEJÓN, A. I. GOMEZ, et al. Cell volume regulation modulates NLRP3 inflammasome activation. *Immunity*, 2012, **37**(3), s. 487-500.
- [136] MUÑOZ-PLANILLO, R., P. KUFFA, G. MARTÍNEZ-COLÓN, Brenna L. SMITH, et al. K⁺ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity*, 2013, **38**(6), s. 1142-1153.
- [137] HE, Y., M. Y. ZENG, D. YANG, B. MOTRO, et al. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature*, 2016, **530**(7590), s. 354-357.
- [138] EVAVOLD, C. L., J. RUAN, Y. TAN, S. XIA, et al. The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity*, 2018, **48**(1), s. 35-44.e36.
- [139] GROSLAMBERT, M., B. F. PY Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway. *J Inflamm Res*, 2018, **11**, s. 359-374.
- [140] SHI, J., Y. ZHAO, Y. WANG, W. GAO, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature*, 2014, **514**(7521), s. 187-192.
- [141] FRANCHI, L., T.-D. KANNEGANTI, G. R. DUBYAK, a G. NÚÑEZ Differential Requirement of P2X7 Receptor and Intracellular K⁺ for Caspase-1 Activation Induced

- by Intracellular and Extracellular Bacteria*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**(26), s. 18810-18818.
- [142] LI, Z., J. GUO, a L. BI Role of the NLRP3 inflammasome in autoimmune diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, **130**, s. 110542.
- [143] NETEA, M. G., C. A. NOLD-PETRY, M. F. NOLD, L. A. B. JOOSTEN, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood*, 2009, **113**(10), s. 2324-2335.
- [144] GRITSENKO, A., S. YU, F. MARTIN-SANCHEZ, I. DIAZ-DEL-OLMO, et al. Priming Is Dispensable for NLRP3 Inflammasome Activation in Human Monocytes In Vitro. *Front Immunol*, 2020, **11**.
- [145] GAIDT, M. M., T. S. EBERT, D. CHAUHAN, T. SCHMIDT, et al. Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity*, 2016, **44**(4), s. 833-846.
- [146] SVADLAKOVA, T., F. HUBATKA, P. TURANEK KNOTIGOVA, P. KULICH, et al. Proinflammatory Effect of Carbon-Based Nanomaterials: In Vitro Study on Stimulation of Inflammasome NLRP3 via Destabilisation of Lysosomes. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 2020, **10**(3), s. 418.
- [147] RAPHEY, V. R., T. K. HENNA, K. P. NIVITHA, P. MUFEEDHA, et al. Advanced biomedical applications of carbon nanotube. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, **100**, s. 616-630.
- [148] BEI, H. P., Y. YANG, Q. ZHANG, Y. TIAN, et al. Graphene-Based Nanocomposites for Neural Tissue Engineering. *Molecules*, 2019, **24**(4).
- [149] KRATOCHVÍLOVÁ, I., J. ŠEBERA, P. ASHCHEULOV, M. GOLAN, et al. Magnetical and Optical Properties of Nanodiamonds Can Be Tuned by Particles Surface Chemistry: Theoretical and Experimental Study. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2014, **118**(43), s. 25245-25252.
- [150] MUKHERJEE, S. P., M. BOTTINI, a B. FADEEL Graphene and the Immune System: A Romance of Many Dimensions. *Front Immunol*, 2017, **8**, s. 673.
- [151] FADEEL, B., C. BUSSY, S. MERINO, E. VÁZQUEZ, et al. Safety Assessment of Graphene-Based Materials: Focus on Human Health and the Environment. *ACS Nano*, 2018, **12**(11), s. 10582-10620.
- [152] YUAN, X., X. ZHANG, L. SUN, Y. WEI, et al. Cellular Toxicity and Immunological Effects of Carbon-based Nanomaterials. *Particle and Fibre Toxicology*, 2019, **16**(1), s. 18.

- [153] BIANCO, A., H.-M. CHENG, T. ENOKI, Y. GOGOTSI, et al. All in the graphene family – A recommended nomenclature for two-dimensional carbon materials. *Carbon*, 2013, **65**, s. 1-6.
- [154] GUADAGNINI, R., B. HALAMODA KENZAOU, L. WALKER, G. POJANA, et al. Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests. *Nanotoxicology*, 2015, **9**(sup1), s. 13-24.
- [155] LIAO, K.-H., Y.-S. LIN, C. W. MACOSKO, a C. L. HAYNES Cytotoxicity of Graphene Oxide and Graphene in Human Erythrocytes and Skin Fibroblasts. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2011, **3**(7), s. 2607-2615.
- [156] JIAO, G., X. HE, X. LI, J. QIU, et al. Limitations of MTT and CCK-8 assay for evaluation of graphene cytotoxicity. *RSC Advances*, 2015, **5**(66), s. 53240-53244.
- [157] MOHAN, H., M. BARTKOWSKI, a S. GIORDANI Biocompatible Dispersants for Carbon Nanomaterials. *Applied Sciences*, 2021, **11**(22), s. 10565.
- [158] ATA, M. S., R. POON, A. M. SYED, J. MILNE, et al. New developments in non-covalent surface modification, dispersion and electrophoretic deposition of carbon nanotubes. *Carbon*, 2018, **130**, s. 584-598.
- [159] BLANCH, A. J., C. E. LENEHAN, a J. S. QUINTON Optimizing Surfactant Concentrations for Dispersion of Single-Walled Carbon Nanotubes in Aqueous Solution. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2010, **114**(30), s. 9805-9811.
- [160] RASTOGI, R., R. KAUSHAL, S. K. TRIPATHI, A. L. SHARMA, et al. Comparative study of carbon nanotube dispersion using surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2008, **328**(2), s. 421-428.
- [161] PODLESNY, B., B. OLSZEWSKA, Z. YAARI, P. V. JENA, et al. En route to single-step, two-phase purification of carbon nanotubes facilitated by high-throughput spectroscopy. *Scientific Reports*, 2021, **11**(1), s. 10618.
- [162] ZHAO, Q., X. LIU, S. VELDHUIS, a I. ZHITOMIRSKY Sodium deoxycholate as a versatile dispersing and coating-forming agent: A new facet of electrophoretic deposition technology. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2020, **588**, s. 124382.
- [163] SMULDERS, S., J. P. KAISER, S. ZUIN, K. L. VAN LANDUYT, et al. Contamination of nanoparticles by endotoxin: evaluation of different test methods. *Part Fibre Toxicol*, 2012, **9**, s. 41.

- [164] YANG, M., X. NIE, J. MENG, J. LIU, et al. Carbon Nanotubes Activate Limulus Amebocyte Lysate Coagulation by Interface Adsorption. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, **9**(10), s. 8450-8454.
- [165] MUKHERJEE, S. P., N. LOZANO, M. KUCKI, A. E. DEL RIO-CASTILLO, 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), s. e0166816.
- [166] HORIE, M., Y. TABELI, S. SUGINO, H. FUKUI, et al. Comparison of the effects of multiwall carbon nanotubes on the epithelial cells and macrophages. *Nanotoxicology*, 2019, **13**(7), s. 861-878.
- [167] CHU, Z., S. ZHANG, B. ZHANG, C. ZHANG, et al. Unambiguous observation of shape effects on cellular fate of nanoparticles. *Scientific Reports*, 2014, **4**, s. 4495.
- [168] TIAN, X., Z. YANG, G. DUAN, A. WU, et al. Graphene Oxide Nanosheets Retard Cellular Migration via Disruption of Actin Cytoskeleton. *Small*, 2017, **13**(3), s. 1602133.
- [169] SUN, B., X. WANG, Z. JI, M. WANG, et al. NADPH Oxidase-Dependent NLRP3 Inflammasome Activation and its Important Role in Lung Fibrosis by Multiwalled Carbon Nanotubes. *Small*, 2015, **11**(17), s. 2087-2097.
- [170] BROWN, D. M., I. A. KINLOCH, U. BANGERT, A. H. WINDLE, et al. An in vitro study of the potential of carbon nanotubes and nanofibres to induce inflammatory mediators and frustrated phagocytosis. *Carbon*, 2007, **45**(9), s. 1743-1756.
- [171] SCHINWALD, A., K. DONALDSON Use of back-scatter electron signals to visualise cell/nanowires interactions in vitro and in vivo; frustrated phagocytosis of long fibres in macrophages and compartmentalisation in mesothelial cells in vivo. *Part Fibre Toxicol*, 2012, **9**, s. 34.
- [172] GHANBARI, F., P. NASARZADEH, E. SEYDI, A. GHASEMI, 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), s. 2047-2055.
- [173] DRASLER, B., M. KUCKI, F. DELHAES, T. BUERKI-THURNHERR, et al. Single exposure to aerosolized graphene oxide and graphene nanoplatelets did not initiate an acute biological response in a 3D human lung model. *Carbon*, 2018, **137**, s. 125-135.
- [174] MALANAGAHALLI, S., D. MURERA, C. MARTÍN, H. LIN, et al. Few Layer Graphene Does Not Affect Cellular Homeostasis of Mouse Macrophages. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 2020, **10**(2), s. 228.

- [175] MURERA, D., S. MALAGANAHALLI, C. MARTÍN, G. REINA, et al. Few layer graphene does not affect the function and the autophagic activity of primary lymphocytes. *Nanoscale*, 2019, **11**(21), s. 10493-10503.
- [176] QU, G., S. LIU, S. ZHANG, L. WANG, et al. Graphene Oxide Induces Toll-like Receptor 4 (TLR4)-Dependent Necrosis in Macrophages. *ACS Nano*, 2013, **7**(7), s. 5732-5745.
- [177] CHEN, G. Y., H. J. YANG, C. H. LU, Y. C. CHAO, et al. Simultaneous induction of autophagy and toll-like receptor signaling pathways by graphene oxide. *Biomaterials*, 2012, **33**(27), s. 6559-6569.
- [178] ZANONI, I., Y. TAN, M. DI GIOIA, A. BROGGI, et al. An endogenous caspase-11 ligand elicits interleukin-1 release from living dendritic cells. *Science*, 2016, **352**(6290), s. 1232-1236.
- [179] MARTINON, F., L. AGOSTINI, E. MEYLAN, a J. TSCHOPP Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr Biol*, 2004, **14**(21), s. 1929-1934.
- [180] DAVID, C. A. W., M. BARROW, P. MURRAY, M. J. ROSSEINSKY, et al. In Vitro Determination of the Immunogenic Impact of Nanomaterials on Primary Peripheral Blood Mononuclear Cells. *International journal of molecular sciences*, 2020, **21**(16), s. 5610.
- [181] GROSSE, S., J. STENVIK, a A. M. NILSEN Iron oxide nanoparticles modulate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in primary human monocytes. *Int J Nanomedicine*, 2016, **11**, s. 4625-4642.
- [182] SWARTZWELTER, B. J., F. BARBERO, A. VERDE, M. MANGINI, et al. Gold Nanoparticles Modulate BCG-Induced Innate Immune Memory in Human Monocytes by Shifting the Memory Response towards Tolerance. 2020, **9**(2), s. 284.
- [183] MEUNIER, E., A. COSTE, D. OLAGNIER, H. AUTHIER, et al. Double-walled carbon nanotubes trigger IL-1beta release in human monocytes through Nlrp3 inflammasome activation. *Nanomedicine*, 2012, **8**(6), s. 987-995.
- [184] MUKHERJEE, S. P., K. KOSTARELOS, a B. FADEEL Cytokine Profiling of Primary Human Macrophages Exposed to Endotoxin-Free Graphene Oxide: Size-Independent NLRP3 Inflammasome Activation. *Adv Healthc Mater*, 2018, **7**(4).
- [185] PALOMÄKI, J., E. VÄLIMÄKI, J. SUND, M. VIPPOLA, et al. Long, Needle-like Carbon Nanotubes and Asbestos Activate the NLRP3 Inflammasome through a Similar Mechanism. *ACS Nano*, 2011, **5**(9), s. 6861-6870.

- [186] YIMIN, M. KOHANAWA A Regulatory Effect of the Balance between TNF- α and IL-6 in the Granulomatous and Inflammatory Response to *Rhodococcus aurantiacus* Infection in Mice. *The Journal of Immunology*, 2006, **177**(1), s. 642-650.
- [187] LUND, M. E., J. TO, B. A. O'BRIEN, a S. DONNELLY The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *Journal of Immunological Methods*, 2016, **430**, s. 64-70.
- [188] TEDESCO, S., F. DE MAJO, J. KIM, A. TRENTI, et al. Convenience versus Biological Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying in Vitro Polarization? , 2018, **9**.
- [189] LEBRE, F., J. B. BOLAND, P. GOUVEIA, A. L. GORMAN, et al. Pristine graphene induces innate immune training. *Nanoscale*, 2020, **12**(20), s. 11192-11200.
- [190] ÖNER, D., M. MOISSE, M. GHOSH, R. C. DUCA, et al. Epigenetic effects of carbon nanotubes in human monocytic cells. *Mutagenesis*, 2017, **32**(1), s. 181-191.
- [191] KINARET, P. A. S., G. SCALA, A. FEDERICO, J. SUND, et al. Carbon Nanomaterials Promote M1/M2 Macrophage Activation. *Small*, 2020, **16**(21), s. 1907609.
- [192] CLARKE, A. J., A. K. SIMON Autophagy in the renewal, differentiation and homeostasis of immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 2019, **19**(3), s. 170-183.
- [193] WAN, B., Z. X. WANG, Q. Y. LV, P. X. DONG, 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), s. 118-127.
- [194] ZHANG, Y., M. J. MORGAN, K. CHEN, S. CHOKSI, et al. Induction of autophagy is essential for monocyte-macrophage differentiation. *Blood*, 2012, **119**(12), s. 2895-2905.
- [195] CHENG, S. C., J. QUINTIN, R. A. CRAMER, K. M. SHEPARDSON, et al. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*, 2014, **345**(6204), s. 1250684.
- [196] MOUJABER, O., U. STOCHAJ The Cytoskeleton as Regulator of Cell Signaling Pathways. *Trends Biochem Sci*, 2020, **45**(2), s. 96-107.
- [197] HOHMANN, T., F. DEHGHANI The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork. *Cells*, 2019, **8**(4).

- [198] WANG, J., P. WANG, Y. HE, X. LIU, et al. Graphene oxide inhibits cell migration and invasion by destroying actin cytoskeleton in cervical cancer cells. *Aging (Albany NY)*, 2020, **12**(17), s. 17625-17633.
- [199] KOBAYASHI, M., F. USUI, T. KARASAWA, A. KAWASHIMA, et al. NLRP3 Deficiency Reduces Macrophage Interleukin-10 Production and Enhances the Susceptibility to Doxorubicin-induced Cardiotoxicity. *Scientific Reports*, 2016, **6**(1), s. 26489.
- [200] SUN, Y., J. MA, D. LI, P. LI, et al. Interleukin-10 inhibits interleukin-1 β production and inflammasome activation of microglia in epileptic seizures. *Journal of Neuroinflammation*, 2019, **16**(1), s. 66.
- [201] BUTCHER, S. K., C. E. O'CARROLL, C. A. WELLS, a R. J. CARMODY Toll-Like Receptors Drive Specific Patterns of Tolerance and Training on Restimulation of Macrophages. *Front Immunol*, 2018, **9**, s. 933.
- [202] EHRCHEN, J., L. STEINMÜLLER, K. BARCZYK, K. TENBROCK, et al. Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes. *Blood*, 2006, **109**(3), s. 1265-1274.
- [203] SULAHIAN, T. H., P. HÖGGER, A. E. WAHNER, K. WARDWELL, et al. HUMAN MONOCYTES EXPRESS CD163, WHICH IS UPREGULATED BY IL-10 AND IDENTICAL TO p155. *Cytokine*, 2000, **12**(9), s. 1312-1321.
- [204] FISCHER-RIEPE, L., N. DABER, J. SCHULTE-SCHREPPING, B. C. VÉRAS DE CARVALHO, et al. CD163 expression defines specific, IRF8-dependent, immunomodulatory macrophages in the bone marrow. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2020, **146**(5), s. 1137-1151.
- [205] LAYSECA-ESPINOSA, E., L. F. PÉREZ-GONZÁLEZ, A. TORRES-MONTES, L. BARANDA, et al. Expression of CD64 as a potential marker of neonatal sepsis. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2002, **13**(5), s. 319-327.
- [206] IOAN-FACSINAY, A., S. J. DE KIMPE, S. M. HELLWIG, P. L. VAN LENT, et al. Fc γ RI (CD64) contributes substantially to severity of arthritis, hypersensitivity responses, and protection from bacterial infection. *Immunity*, 2002, **16**(3), s. 391-402.
- [207] BUCKLE, A. M., N. HOGG The effect of IFN- γ and colony-stimulating factors on the expression of neutrophil cell membrane receptors. *J Immunol*, 1989, **143**(7), s. 2295-2301.

- [208] KWIECIEŃ, I., M. POLUBIEC-KOWNACKA, D. DZIEDZIC, D. WOŁOSZ, et al. CD163 and CCR7 as markers for macrophage polarization in lung cancer microenvironment. *Central-European journal of immunology*, 2019, **44**(4), s. 395-402.