

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Nanočástice a jejich vliv na imunitní systém:
Studium prozánětlivého potenciálu vybraných karbonových nanomateriálů

Tereza Švadláková

Autoreferát disertační práce
Doktorský studijní program: Lékařská imunologie

Hradec Králové

2022

Disertační práce byla vypracována v rámci *prezenčního* studia doktorského studijního programu Lékařská imunologie na Ústavu klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Autor: **Mgr. Tereza Švadláková**
Ústav klinické imunologie a alergologie, Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel: **prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.**
Ústav klinické imunologie a alergologie, Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel konzultant: **prof. Ing. Zdeněk Fiala, CSc.**
Ústav preventivního lékařství, Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Oponenti: **prof. MUDr. Jiří Stulík, CSc.**
Ústav molekulární patologie
Fakulta vojenského zdravotnictví Hradec Králové,
Univerzita obrany Brno

doc. RNDr. Tomáš Roušar, PhD.
Katedra biologických a biochemických věd
Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Lékařská imunologie dne 15. 6. 2022 v zasedací místnosti Ústavu klinické imunologie a alergologie, budova č. 17, areál Fakultní nemocnice Hradec Králové od 10:00 hod.

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

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 134).

prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská imunologie
Garant studijního programu

Obsah

Souhrn	4
Summary	5
1. Úvod.....	6
1.1. Nanomateriály a nanočástice.....	6
1.2. Karbonové nanomateriály	6
1.3. Imunotoxicita CNMs	7
2. Cíle práce.....	10
3. Materiál a metodika	11
3.1. CNMs a jejich charakterizace	11
3.2. Testování prozánětlivého účinku CNMs	11
3.3. Hodnocení modulace imunitní funkce.....	12
3.4. Statistické hodnocení	12
4. Výsledky.....	13
4.1. Charakterizace CNMs.....	13
4.2. Intracelulární lokalizace a cytotoxicita CNMs	13
4.3. Alternativní aktivace NLRP3 u primárních monocytů.....	14
4.4. Kanonická aktivace NLRP3.....	15
4.5. Modulace produkce cytokinů u THP-1 makrofágů.....	16
4.6. Modulace produkce cytokinů u izolovaných monocytů.....	17
4.7. Modulace fagocytární odpovědi.....	19
4.8. Modulace diferenciací izolovaných monocytů.....	20
5. Diskuze.....	21
6. Závěr	26
7. Použitá literatura	27
8. Přehled publikační aktivity autorky.....	32

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 pláteků (GPs), které obvykle vznikají jako meziprodukt při zpracování dalších grafenových derivátů a do organismu mohou pronikat např. vdechnutím. 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 lysozomů. V případě GPs nebylo detekováno žádné narušení buněčné integrity ani akutní prozánětlivá aktivita. Potenciální inhibice zánětu byla vyvrácena souběžnou expozicí GPs s reprezentativním prozánětlivým stimulem. Naopak byla pozorována zesílená reaktivita, na jejímž základě byl dále hodnocen nepřímý prozánětlivý účinek pomocí stanovení modulační 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 vnějším rozměrech v nanoměřítku [1]. Díky tomu získávají NMs i NPs nové unikátní vlastnosti odlišné od ekvivalentního materiálu v makroskopickém měřítku. Příkladem je obrovský reakční povrch, který umožňuje široké uplatnění v průmyslu i medicíně [2; 3]. NMs (i NPs) mohou být původem přírodní, nebo syntetické (průmyslově vyráběné). Na základě jejich složení dále rozlišujeme organické, anorganické, případně kompozitní (kombinované) a karbonové NMs. Výrobou, chováním a využitím nanoobjektů včetně NMs, NPs a různých nanostruktur, se zabývá nanotechnologie [4].

1.2. Karbonové nanomateriály

Základním stavebním prvkem karbonových nanomateriálů (CNMs, Carbon-Based Nanomaterials) je uhlík. Jedná se o velmi odolné a pevné struktury schopné vodit teplo a elektrický proud [5]. Jedním z nejvýznamnějších zástupců CNMs je grafen [6].

Grafen se skládá z jeden atom silné vrstvy sp^2 -hybridizovaných atomů uhlíku, které jsou vzájemně uspořádané do 2D matrice připomínající včelí plástev. Díky tomuto uspořádání se jedná o jeden z nejpevnějších a nejodolnějších materiálů vůbec [7]. Lze ho získat např. mechanickým nebo chemickým odlupováním (exfoliací) z grafitu, ve kterém představuje jednotlivé vrstvy. Výsledkem produkce jsou obvykle několikavrstvé grafenové plátky (GPs, Graphene platelets) [8]. Nemodifikovaný (čistý) grafen je silně hydrofobní a nelze ho stabilně resuspendovat ve vodném médiu. Z toho důvodu se různě modifikuje (funkcionalizuje) za vzniku pestré palety derivátů, z nichž nejvýznamnější jsou grafen oxid (GO) a redukovaný GO. Grafen také slouží jako výchozí matrice dalších CNMs, kdy jeho rolováním vznikají nanotrubičky a nebo zabalením fullereny [7].

Karbonové nanotrubičky (CNT, Carbon Nanotubes) jsou duté tubulární objekty vytvořené z cylindricky uspořádané vrstvy grafenu. Dle počtu těchto vrstev rozlišujeme jednostěnné (SW, Single-Walled) CNTs o průměru do 10 nm a délce až desítky μm , dále dvoustěnné (DW, Double-Walled) a mnohostěnné (MW, Multi-Walled) CNTs s vnitřním průměrem 0,4 až několik nm a vnějším průměrem až 100 nm [6; 9]. Vysoký poměr stran a přítomnost sp^2 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 [10].

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 [11]. Zároveň rostou obavy o jejich bezpečnosti. Během úmyslné i neúmyslné interakce člověka s CNMs může docházet k negativním účinkům, kterými se obecně zabývá nanotoxikologie [12].

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 [12; 13]. 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 [14]. Příkladem je tvorba proteinové korony, kdy dochází ke spontánnímu a rychlému navázání biologických složek na povrch CNMs. 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 [15].

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), kde jsou pohlcovány alveolárními makrofágy nebo zůstávají zachycené v extracelulárním prostředí [16; 17]. 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 ingesci [18; 19].

Předpokladem využití CNMs v medicíně je intravenózní podání, kdy dochází ke 100% biologické dostupnosti. Následující translokace opět závisí na výchozích vlastnostech daných CNMs. Obecně lze říct, že interakce mezi CNMs a organismem je výsledkem dynamického procesu neustálých změn, které CNMs prodělávají postupem v různých biologických soustavách. [20].

1.3. Imunotoxicita CNMs

Jedním z nejdůležitějších aspektů toxicity nanočástic je jejich interakce s imunitním systémem. Vyjma faktu, že je imunitní systém naší hlavní obranou proti cizím mikroorganismům a částicím, podílí se také 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 [21]. Porušením homeostázy může docházet ke vzniku chronických abnormalit a následnému rozvrácení celého systému. Vzhledem k faktu, že složky imunitního systému jsou zastoupeny v krevním oběhu, ve tkáních a na sliznicích, je vzájemný kontakt s nanočásticemi téměř nevyhnutelný.

Díky své odolnosti mohou CNMs, zejména ty nemodifikované, přetrvávat v organismu po velmi dlouhou dobu [16; 17]. Na druhou stranu různé povrchové úpravy, jako je např. oxidace, otevírají cestu k případné enzymatické degradaci [22]. 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 [23]. Následkem může být vznik imunotoxicity, která zahrnuje cytotoxické, imunosupresivní nebo imunostimulační reakce [24].

Prvním krokem imunitní odpovědi na přítomné CNMs je jejich rozpoznávání. To může být silně ovlivněno přítomností biologické 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). 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). 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 [25]. Typický ligand a zároveň nejčastější kontaminant je lipopolysacharid (LPS), který se na CNMs váže pomocí hydrofobních a elektrostatických interakcí [26; 27]. Takto kontaminované CNMs, které mohly být původně biokompatibilní, se stávají více imunogenní a potenciálně cytotoxické [27]. Zároveň mohou představovat „Trojského koně“ pro látky, které by se za fyziologických podmínek do buňky nedostaly [28]. V důsledku dochází i k chybné interpretaci dat imunologických a cytotoxických testů a je proto nutné přítomnost biologické kontaminace LPS neustále kontrolovat.

Zmíněné TLRs potenciálně rozeznávají i sterilní CNMs, a to nescificky pomocí hydrofobních interakcí [29]. Různé povrchové modifikace pak mohou ovlivnit interakce s dalšími receptory, např. scavenger receptory [30]. Na základě dalších faktorů, jako jsou velikost, tvar a složení proteinové korony, dochází k aktivaci různých signálů vedoucích k pohlcení CNMs nejčastěji formou fagocytózy a receptorem zprostředkované endocytózy [30-33]. Klíčovou roli v pohlcování a následném zpracování CNMs hrají profesionální fagocyty, převážně monocyty a makrofágy [34].

Monocyty jsou velké jednojaderné leukocyty kulatého až améboidního tvaru. Vznikají z myeloidních prekurzorů v kostní dřeni a u zdravého dospělého člověka tvoří 2 až 8 % všech leukocytů v krvi. Mezi jejich hlavní funkce patří diferenciaci v makrofágy a dendritické buňky, fagocytóza, prezentace antigenu, produkce prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů a imunomodulace. 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 [35].

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 [25]. Z funkčního hlediska lze makrofágy dělit dle stavu aktivace na klasicky aktivované M1 a alternativně aktivované M2. M1 makrofágy představují efektorové buňky prozánětlivé odpovědi vrozené imunity charakteristické vysokou produkcí cytokinů IL-6, TNF- α a IL1- β a dále zvýšenou tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS, Reactive Oxygen Species) a oxidu dusnatého (NO) [36]. Naproti tomu M2 makrofágy, které se vyznačují tvorbou převážně protizánětlivých cytokinů IL-10 a TGF- β , navozují angiogenezi, remodelaci a opravu poškozených tkání. Celkově tlumí probíhající zánět, ale jejich činnost může vést až k fibróze nebo pronádorové aktivitě [37].

Při studiu cytotoxicity se často využívá lidská leukemická monocytární linie THP-1. 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 [38].

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 [39; 40]. Vhodnou kultivací je lze polarizovat na M1 a M2 subtypy [41]. Ke studiu konkrétních metabolických drah bývají často využívány i jejich geneticky modifikované varianty [42].

Mezi základní mechanismy imunotoxického působení CNMs patří vyvolání zánětu. Prozánětlivá odpověď vzniká nejčastěji v důsledku působení oxidačního stresu a v přítomnosti kontaminace. Nelze opomenout ani mechanické poškození, k němuž dochází během transportu CNMs do buněk i během intracelulárních interakcí [43]. Fagocyty 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 [25]. Velmi důležitá je autofagie, při které jsou obvykle recyklovány vlastní makromolekulární komponenty za účelem buněčného přežívání [44]. Obdobně jako u endocytózy dochází k degradaci vlastního obsahu pomocí fúze s lysozomy [44]. Zároveň je to jedna z cest eliminace intracelulárních patogenů a nanočástic [45; 46]. Veškeré tyto procesy mohou být kdykoli přítomností CNMs narušeny ať už specifickými interakcemi vycházejícími z funkcionalizace částic, nebo mechanickým narušením intracelulárních membrán. Výsledkem je soubor signálů vedoucí k rozvoji zánětu, ve kterém hraje klíčovou roli inflamazom.

Inflamazomy jsou makromolekulární komplexy jejichž prostřednictvím je aktivována kaspáza-1, která 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) [25]. Dosud nejlépe charakterizovaný inflamazom je NLRP3 (NOD-Like Receptor Family Pyrin Domain Containing 3). K jeho aktivaci dochází třemi různými cestami, a to kanonickou, nekanonickou a alternativní. Kanonická aktivace probíhá převážně u makrofágů a zahrnuje dva signály [47]. První signál pochází z reakce na různé PAMPs nebo endogenní molekuly (TNF- α) a vede k aktivaci NF- κ B, jehož prostřednictvím se zvyšuje exprese NLRP3 a pro-IL-1 β . Vlastní sestavení NLRP3 zprostředkovává až druhý signál, kterým jsou např. DAMPs (uvolněné katepsiny, ROS) [48]. Během nekanonické cesty může být NLRP3 aktivován prostřednictvím endogenních kaspáz-4 a 5, které specificky váží LPS z gramnegativních bakterií a svojí aktivací štěpí cytoplazmatickou část pannexinu-1, který představuje membránový kanál pro ATP (Adenosine Triphosphate). ATP se v tomto případě chová jako autokrinní stimulátor a v důsledku nerovnoměrné tvorby GSDMD-N a purinoreceptorových pórů může dojít až k prasknutí buňky a vylití veškerého obsahu ven, tzv. pyroptóze [47]. Nejméně probádaná alternativní aktivace NLRP3 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. Důležitou roli tu zastává signalizační kaskáda skrze adaptorový protein FADD (FAS Associated Death Domain) a kaspázu-8, ale přesný mechanismus aktivace je neznámý [49; 50].

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 metodika

3.1. CNMs a jejich charakterizace

Hodnocení prozánětlivého účinku probíhalo u nemodifikovaných MWCNTs 659258; Merck, Německo), nemodifikovaných GP1 zakoupených od firmy PlasmaChem (PL-P-G750, GmbH, Německo) a nemodifikovaných GP2 laskavě poskytnutých prof. Adriele Prina-Mello z centra CRANN (The Centre for Research on Adaptive Nanostructures and Nanodevices, Trinity College Dublin, Irsko). Morfologie všech CNMs byla hodnocena pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM; Philips 208 S Morgagni, FEI, CA, USA). Velikost, náboj a stabilita v suspenzi byly hodnoceny pomocí stanovení hydrodynamického průměru (H_D) a zeta potenciálu (ζ ; Zetasizer Nano-Ultra, Malvern Panalytical Ltd, UK). Detailní charakterizace zahrnující rentgenovou spektroskopii, Ramanovu spektroskopii a termogravimetrickou analýzu 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). Přítomnost biologické kontaminace všech tří CNMs byla hodnocena na základě detekce TLR2 a TLR4 agonistů s využitím buněčné eseje založené na komerčně dostupných reportérových buněčných liniích HEK-BlueTM-2, respektive HEK-BlueTM-4 (InvivoGen, Francie).

3.2. Testování prozánětlivého účinku CNMs

K testování cytotoxického a prozánětlivého účinku CNMs byly využívány buněčné modely vycházející z lidské leukemické monocytární line THP-1 (ECACC, Salisbury, UK) a lidských primárních monocytů izolovaných z periferní krve dárců. Kultivace probíhala v plném kultivačním médiu RPMI 1640 (u monocytů bylo použito autologní sérum) za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO₂). Buňky THP-1 byly před vlastním testováním 72 h diferencovány na THP-1 makrofágy pomocí PMA (Merck, Německo). Expozice THP-1 makrofágů i primárních monocytů CNMs probíhala v 96jamkových nebo 6jamkových destičkách po dobu 24 a 48 h. Životnost byla hodnocena na základě stanovení množství uvolněné laktát dehydrogenázy (LDH) do supernatantů (CyQUANTTM LDH Cytotoxicity Assay, Invitrogen, USA). V supernatantech byly též stanoveny hladiny IL-6, TNF- α a IL-10 pomocí sendvičové ELISA metody (Bio-Techne R&D Systems s.r.o., MN, USA). Intracelulární lokalizace CNMs byla hodnocena pomocí TEM.

K hodnocení kanonické aktivace NLRP3 byly použity geneticky modifikované linie THP-1, konkrétně THP1-null (pozitivní kontrola aktivace inflamazomu NLRP3), THP1-defNLRP3 a THP1-defASC (negativní kontroly aktivace inflamazomu NLRP3) a THP1-HMGB1-LuciaTM (hodnocení pyroptózy pomocí luminiscenční detekce HMGB1::Lucia). Postup probíhal dle pokynů dodavatele buněk (InvivoGen, Francie). Potenciální mechanismus aktivace byl hodnocen s využitím konfokální mikroskopie (SP-2, Leica Microsystems, Německo) uvolněného katepsinu B v cytoplazmě. K měření byla použita souprava CV-Cathepsin Detection Kit, (Enzo Life Sciences, Inc., NY, USA). Alternativní aktivace NLRP3 byla sledována u primárních monocytů. Ve všech případech byla aktivita NLRP3 hodnocena na základě stanovení produkce IL-1 β v supernatantech exponovaných buněk. K detekci byla použita buněčná esej založená na reportérových buňkách HEK-BlueTM IL-1 β (InvivoGen, Francie).

3.3. Hodnocení modulační funkce

K testování modulačních účinků CNMs byly opět využity lidské primární monocyty a THP-1 makrofágy. Nejprve byl sledován modulační vliv na prozánětlivou odpověď vůči různým patogenům. Měření probíhalo tak, že byly obě populace nejprve na 24 h vystaveny CNMs. Ty byly posléze odstraněny a buňky byly dalších 24 h inkubovány s vybranými teplem usmrčenými (Heat-Killed) bakteriemi, konkrétně *Escherichia coli* sérotyp 0111:B4 (HKEB), *Staphylococcus aureus* (HKSA) a *Pseudomonas aeruginosa* (HKPA) zakoupené od firmy InvivoGen (Francie). Buňky předem neexponované CNMs sloužily jako kontrola. Z odebraných supernatantů byla hodnocena životnost buněk pomocí LDH a produkce cytokinů IL-6, TNF- α a IL-10. K detekci IL-6 byla použita buněčná esej založená na reportérových buňkách HEK-Blue™ IL-6 (InvivoGen, Francie). TNF- α a IL-10 byly stanoveny s využitím sendvičové ELISA metody.

Dále byl hodnocen potenciální vliv na fagocytární aktivitu buněk. THP-1 makrofágy a primární monocyty byly opět předem 24 h kultivovány s CNMs. Po odstranění nepohlcených CNMs byly k buňkám na 3 h přidány fluorescenčně značené pHrodo™ Red *E. coli* BioParticles™ (EC; Life Technologies, CA, USA). Detekce fagocytovaných EC probíhala pomocí fluorescenční mikroskopie (Nanolive 3D Cell Explorer-fluo, Nanolive, Švýcarsko) a průtokové cytometrie (Navios™, Beckman Coulter, CA, USA).

Nakonec byla hodnocena diferenciací primárních monocytů v makrofágy. Po 24 h inkubace s CNMs byly nepohlcené NMs odmyty a buňky se nechaly dalších 7 dní diferencovat. Výsledný fenotyp byl stanoven na základě cytometrické analýzy povrchových znaků CD163 a CD64 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Morfologie byla sledována pomocí optické mikroskopie (Nikon Eclipse TS2, Nikon, Japonsko) a holotomografické mikroskopie (Nanolive 3D Cell Explorer-fluo, Nanolive, Švýcarsko).

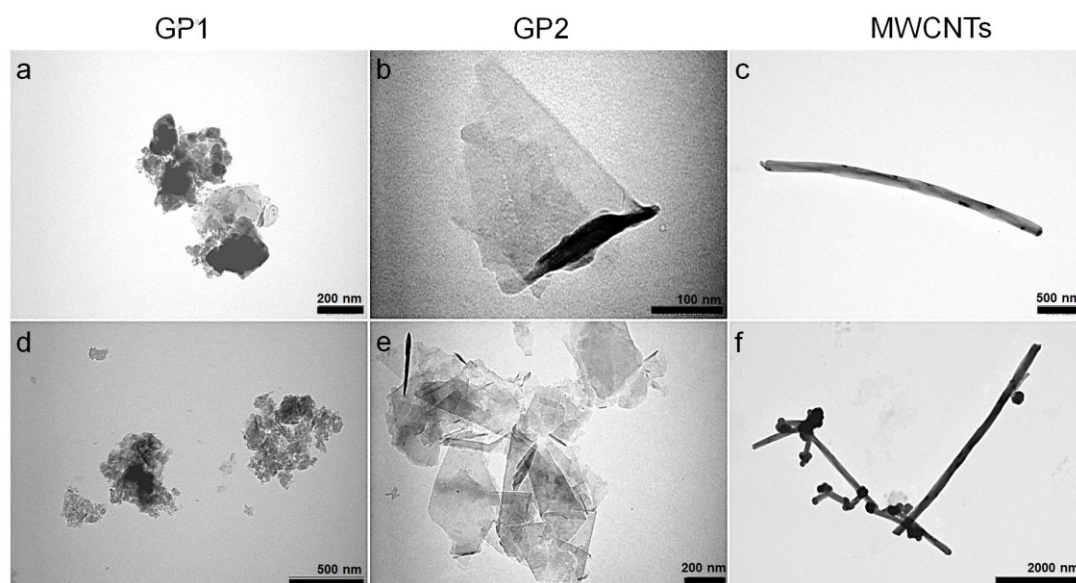
3.4. Statistické hodnocení

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 modulační 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

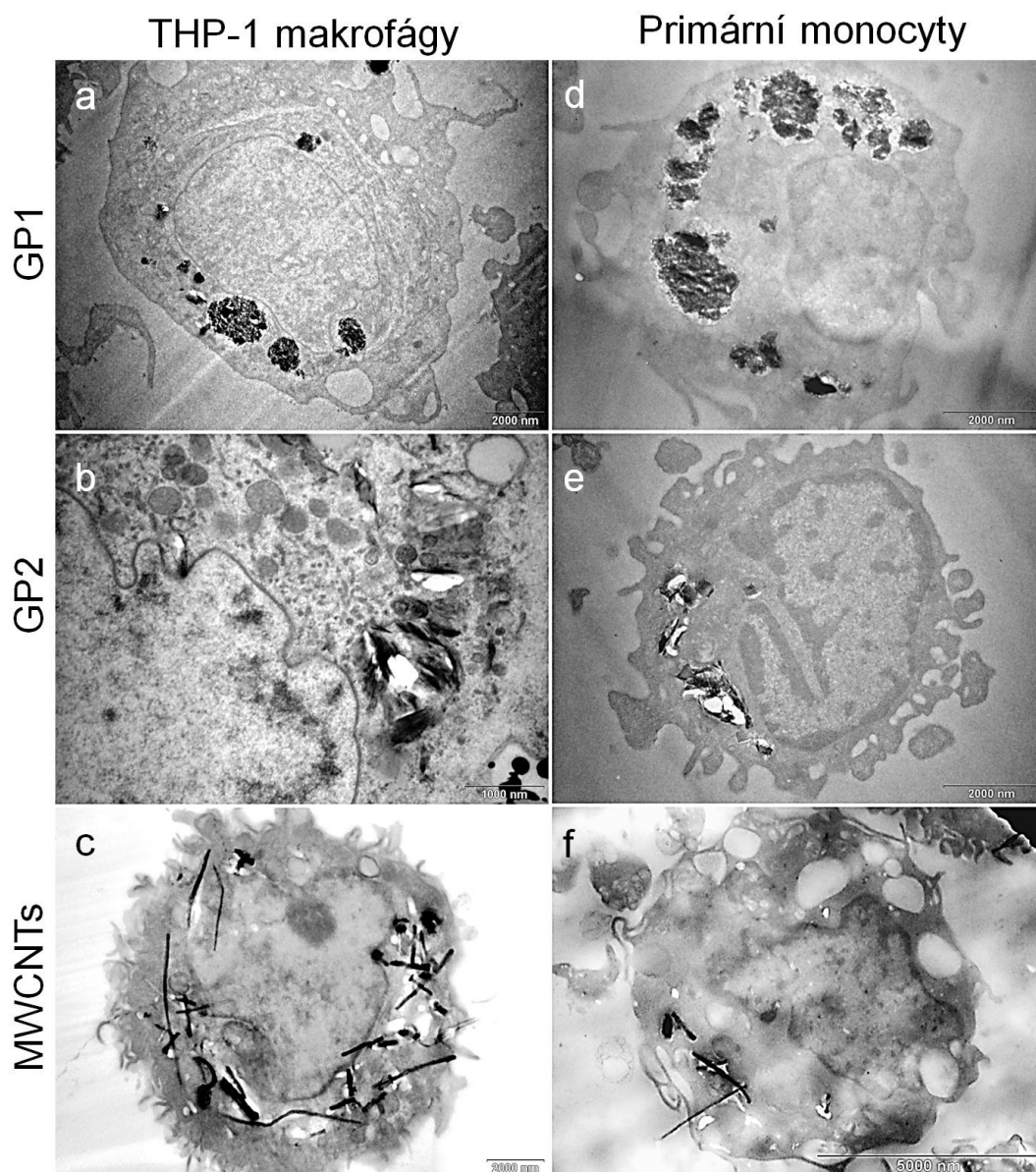
Snímky TEM ukázaly že všechny tři CNMs mají heterogenní tvar, velikost a v případě MWCNTs i délku. Oba GPs tvořily menší nepravidelné agregáty (obrázek 1d,e), přičemž výrazně menší GP1 (laterální velikost 80–200 nm) tvořil spíše vločky podobné hrudkám, což ukazuje na výrazně nižší kvalitu. Naopak GP2 tvořil velké pláty o laterální velikosti přibližně 250–400 nm s okraji připomínající tvar čepele (obrázek 1b). MWCNTs tvořily až 10 μm dlouhé trubice o průměru přibližně 80–200 nm a s hladkým povrchem (obrázek 1c). Kromě samostatných trubic byly pozorovány i menší agregáty obsahující různě zalomené trubice. Místa zlomu a kraje často tvořily kulovité útvary (obrázek 1f). Velikost GPs v suspenzi byla následně potvrzena stanovením hydrodynamického průměru D_H . Průměrné hodnoty D_H po naředění v milliQ vodě byly u GP1 179 ± 103 nm a u GP2 332 ± 85 nm. Po naředění GPs kultivačním médiem se hodnoty zvýšily jen minimálně. Polydisperzní index PdI menší než 0,3 odpovídal homogenní distribuci materiálů. Stabilita byla ověřena měřením ζ -potenciálu, který činil u MWCNTs $-39,1 \pm 6,7$ V, u GP1 $-42,5 \pm 6,9$ V a u GP2 $-34,7 \pm 7$ V. 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. U MWCNTs (30 $\mu\text{g/ml}$) i obou GPs (60 $\mu\text{g/ml}$) byla potvrzena absence biologické kontaminace.



Obrázek 1: Reprezentativní TEM snímky GP1, GP2 a MWCNTs

4.2. Intracelulární lokalizace a cytotoxicita CNMs

Všechny typy CNMs byly po 24 h inkubace s primárními monocyty a THP-1 makrofágy nalezeny v cytoplazmě. Částice GP1 se vyskytovaly převážně ve formě větších agregátů uzavřených v endozomech, zatímco GP2 tvořily menší agregáty a byly více rozptýlené. Kromě uzavřených váček 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 (obrázek 2).

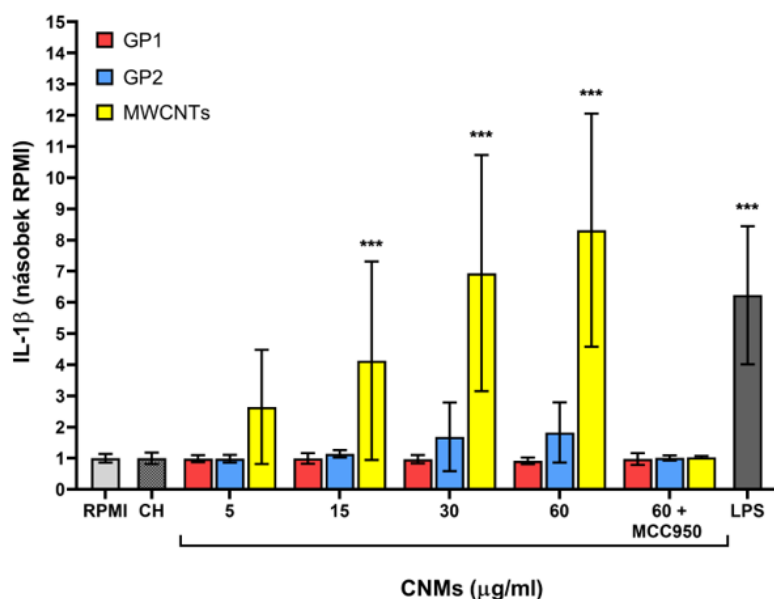


Obrázek 2: Intracelulární lokalizace (a, d) GP1, (b, e) GP2 a (c, f) MWCNTs u THP-1 makrofágů a izolovaných monocytů po 24 h expozice pomocí TEM

GP1 ani GP2 nezpůsobily statisticky významné uvolnění LDH do cytoplazmy v žádné testované koncentraci (5–60 $\mu\text{g/ml}$) ani u THP-1 makrofágů ani u primárních monocytů. MWCNTs způsobily mírné zvýšení LDH při nejvyšší koncentraci 60 $\mu\text{g/ml}$, přičemž statisticky významné (~10 %, $p < 0,001$) bylo pouze u primárních monocytů. Žádný z testovaných CNMs nestimuloval produkci IL-6, TNF- α ani IL-10.

4.3. Alternativní aktivace NLRP3 u primárních monocytů

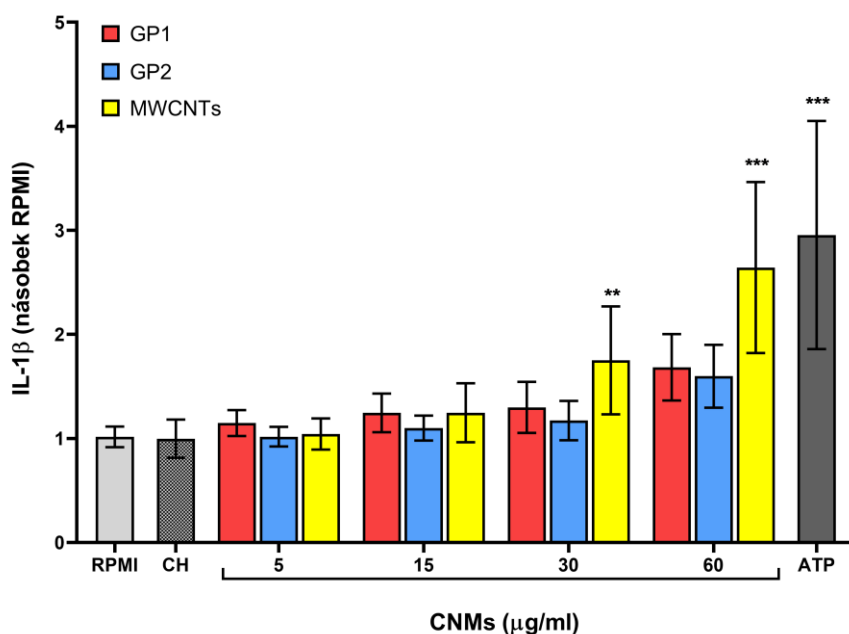
Po 24h inkubaci monocytů s MWCNTs byla detekována na koncentraci závislá produkce IL-1 β ($p < 0,001$). V případě GPs došlo k mírné variabilní produkci IL-1 β po expozici GP2, ovšem bez statistické významnosti. Specifická aktivace NLRP3 byla potvrzena úplnou inhibicí aktivace pomocí MCC950 (obrázek 2).



Obrázek 3: 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

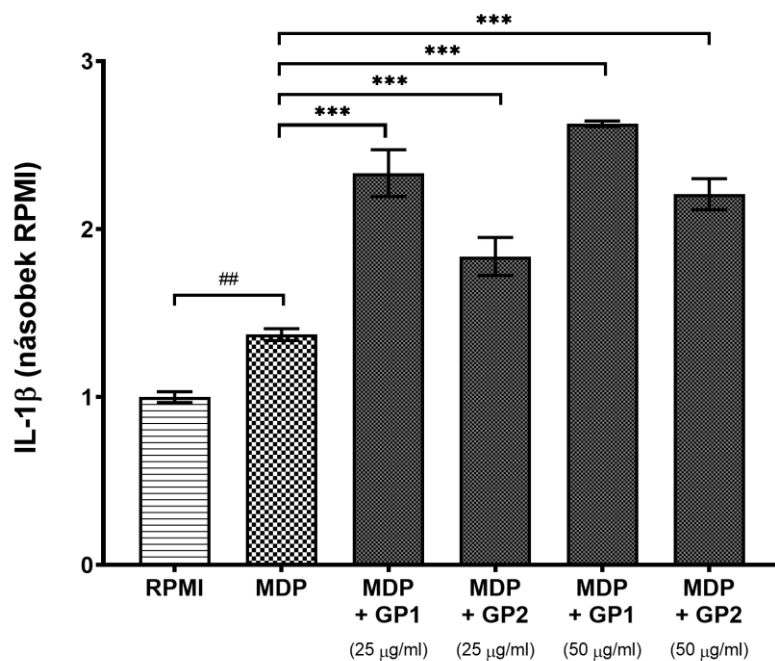
4.4. Kanonická aktivace NLRP3

Jak je vidět na obrázku 4, oba GPs indukovaly pouze nízkou statisticky nevýznamnou produkci IL-1 β . Naopak MWCNTs indukovaly výraznou produkci IL-1 β od koncentrace 30 $\mu\text{g/ml}$.



Obrázek 4: 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

Specifita NLRP3 byla potvrzena absencí produkce IL-1 β po expozici CNMs kontrolním buňkám THP1-defNLRP3 a THP1-defASC. případná inhibice NLRP3 byla vyloučena souběžnou kultivací THP-1 null s GPs a muramyl dipeptidem (MDP, 10 μ g/ml). 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 (obrázek 5).



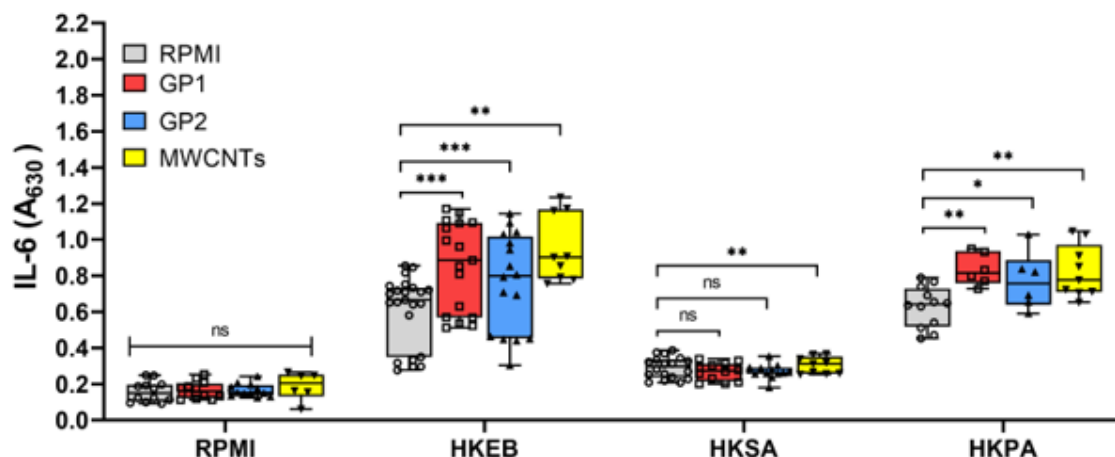
Obrázek 5: Produkce IL-1 β u THP1-null po expozici MDP, GP1 a GP2; ## $p < 0,01$ zdůrazňuje statistickou významnost ve srovnání s RPMI a *** $p < 0,001$ zdůrazňují statistickou významnost ve srovnání s MDP; Data jsou prezentována jako podíl produkce IL-1 β exponovaných buněk a neexponované kontroly (RPMI) a zobrazena jako průměr \pm standardní odchylka

Ve srovnání s nestimulovanou kontrolou nebyl v přítomnosti GPs detekován únik katepsinu B do cytoplazmy. Naopak v přítomnosti MWCNTs bylo pozorováno uvolnění katepsinu B do cytoplazmy po 24 h inkubace. Výsledek odpovídal nálezům aktivace NLRP3. Dle výsledků inkubace CNMs s THP1-HMGB1-LuciaTM nedocházelo u žádné z testovaných koncentrací CNMs (15–60 μ g/ml) k uvolnění HMGB1 do supernatantu, tudíž u žádného z CNMs nebyla prokázána pyroptóza.

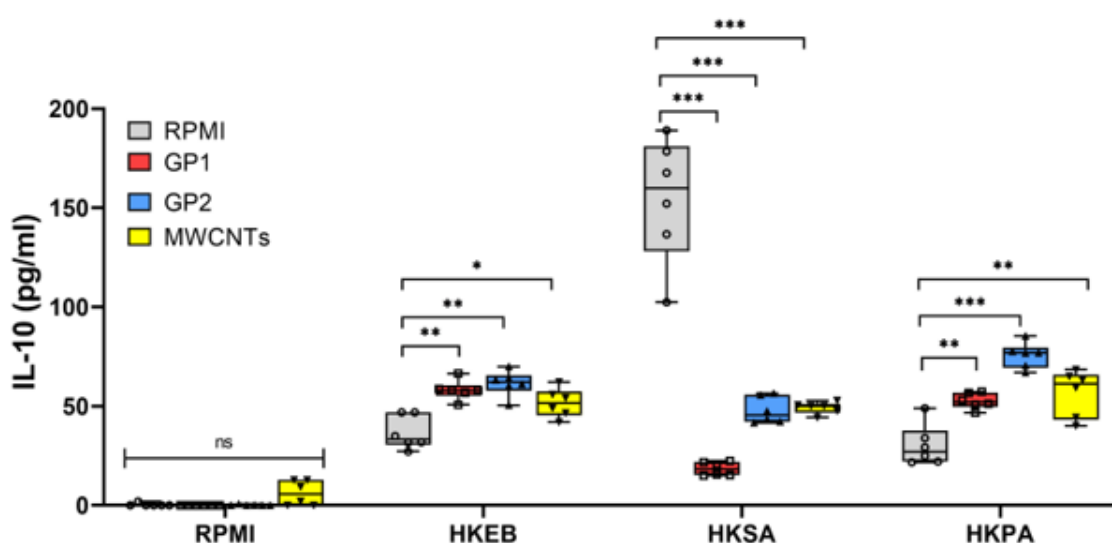
4.5. Modulace produkce cytokinů u THP-1 makrofágů

Modulační účinky byly zkoumány pro nejvyšší necytotoxické koncentrace MWCNTs (30 μ g/ml) a GPs (60 μ g/ml). Produkce cytokinů byla detekována po stimulaci třemi typy teplem usmrcených bakteriálních kultur (HKEB, HKSA a HKPA). V porovnání s předem neexponovanou kontrolou vedla předchozí expozice MWCNTs k významnému zvýšení produkce IL-6 (obrázek 6), TNF- α i IL-10 s výjimkou reakce na HKSA, kdy došlo k výrazné inhibici produkce IL-10 (obrázek 7). Podobně reagovaly buňky předem exponované GP1 a GP2, kde ovšem nedocházelo k žádné modulaci produkce TNF- α . 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 6: 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

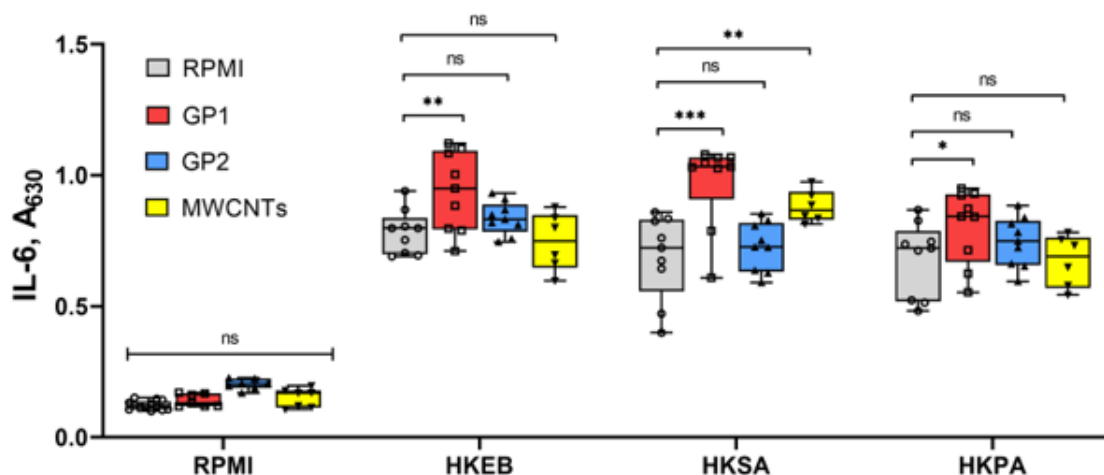


Obrázek 7: Produkce IL-10 u THP-1 makrofágů stimulovaných GP (60 $\mu\text{g/ml}$), MWCNTs (30 $\mu\text{g/ml}$) a bakteriemi HKEB, HKSA a HKPA (1×10^7); Data jsou prezentována jako krabicový graf od minima do maxima se všemi body. Hodnoty *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ a * $p < 0,05$ značí statistickou významnost ve srovnání s odpovídající kontrolou (RPMI); ns – nesignifikantní

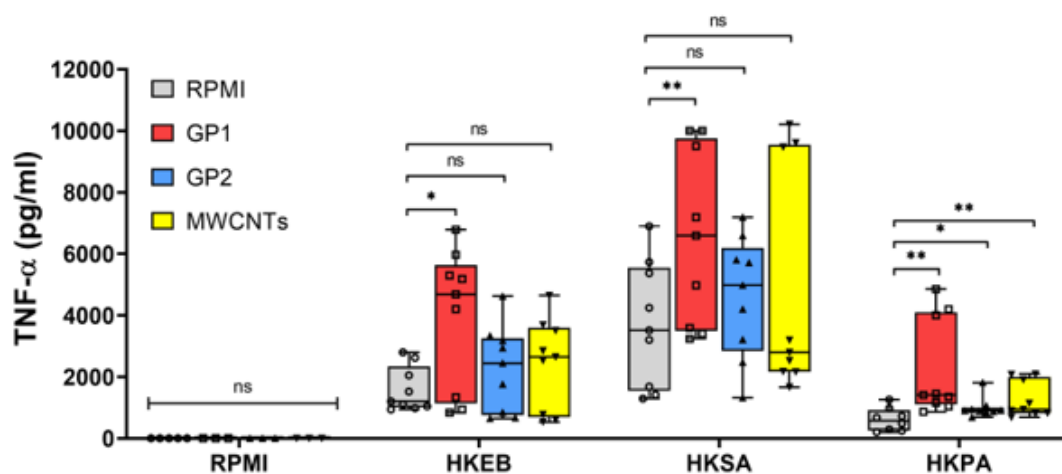
4.6. Modulace produkce cytokinů u izolovaných monocytů

Testování probíhalo analogicky 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 8), TNF- α (obrázek 9) i protizánětlivého cytokinů IL-10 (obrázek 10) 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

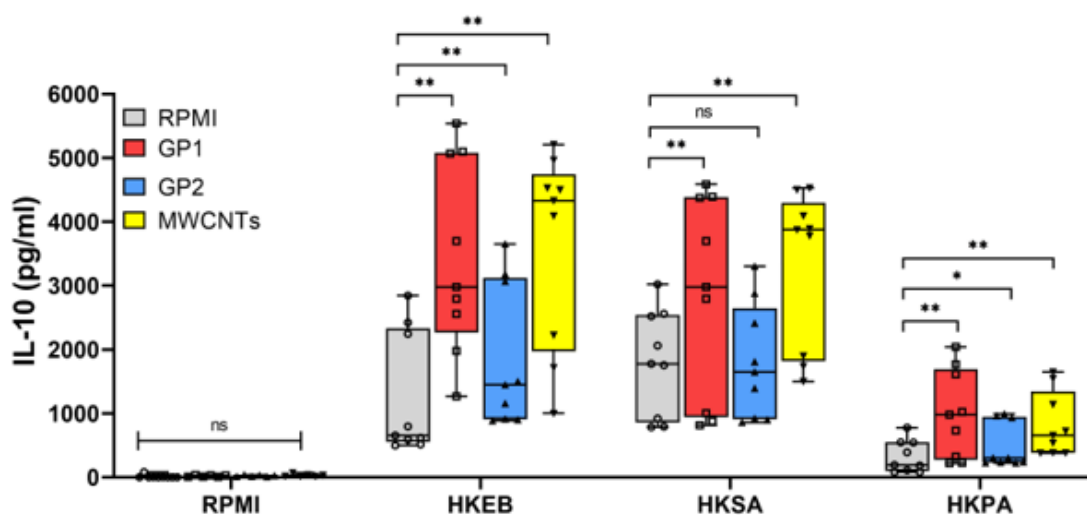
vliv byl pozorován u GP2, kdy došlo k pozitivní modulaci pouze v případě odpovědi na HKPA zvýšením produkce IL-10 a TNF- α a v případě HKEB produkcí IL-10. Zároveň bylo potvrzeno, že samotné CNMs neindukují významnou tvorbu žádného z uvedených cytokinů. Přítomnost GPs také zabránila mírné cytotoxicitě (~10 %) způsobené expozicí bakteriím.



Obrázek 8: 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 9: 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 10: Produkce IL-10 u izolovaných monocytů stimulovaných GPs (60 µg/ml), MWCNTs (30 µg/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.

4.7. Modulace fagocytární odpovědi

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. V porovnání s neexponovanou kontrolou, přítomnost GP1, GP2 a MWCNTs potenciálně snižovala fagocytární schopnost THP-1 makrofágů. Na rozdíl od THP-1 makrofágů neprobíhala fagocytóza u všech izolovaných monocytů. Bylo zjištěno, že 62–72 % předem nestimulovaných monocytů EC nepohlcovalo. Naopak, monocytů předem stimulovaných GP1, GP2 (60 µg/ml) a MWCNTs (30 µg/ml) fagocytovaly z 82–99 %. Výsledné hodnoty střední intenzity fluorescence (MFI, Median Fluorescence Intensity) shrnuje tabulka 1

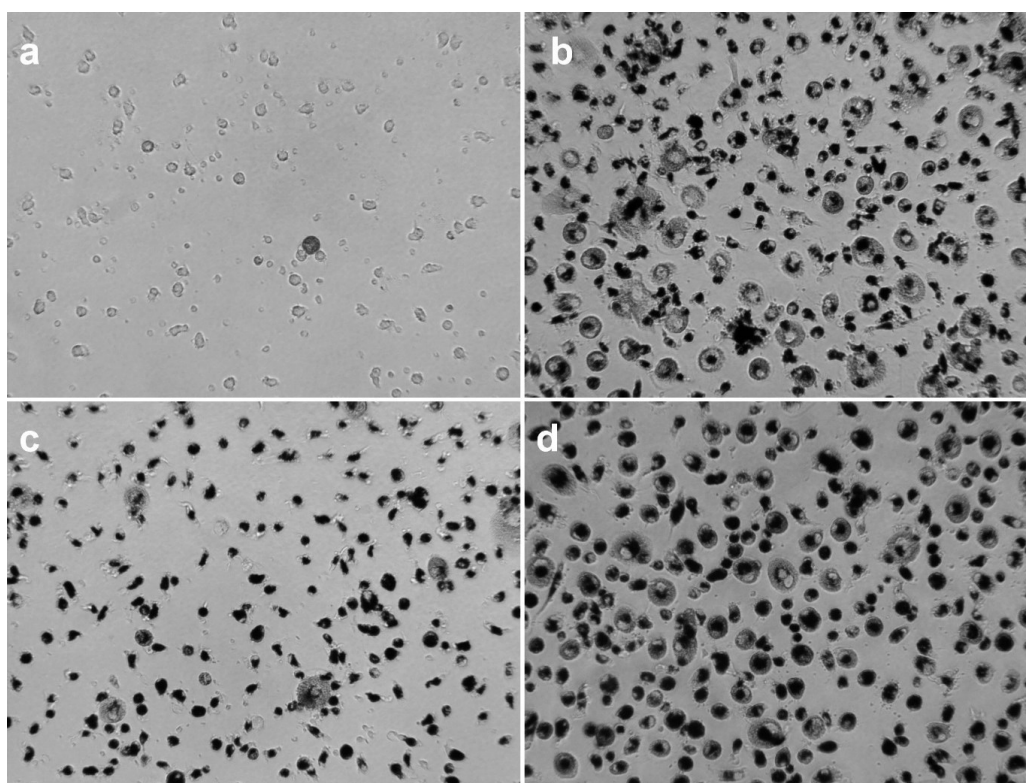
Tabulka 1: Fagocytóza pHrodo® EC (MFI jako min max hodnoty)

	Kontrola	GP1	GP2	MWCNT	
min	10674	4852	4575	6062	THP-1
max	25844	12889	10222	6630	
min	1367	1015	884	777	Monocyty
max	2727	2988	3296	2619	

Vzhledem k odlišnému poměru fagocytujících buněk nebylo možné s jistotou stanovit rozdíl mezi předem stimulovanými a kontrolními monocytů. 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. Mikroskopická analýza dále potvrdila, že už po 24 h se začala lišit morfologie neexponované kontroly a předem stimulovaných buněk. Monocyty, 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.

4.8. Modulace diferenciacie 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 11). Z mikroskopie bylo též patrné, že CNMs zůstávaly po celou dobu diferenciaci uvnitř buněk převážně v perinukleární oblasti. 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 (tabulka 2). V důsledku vysoké variability nebylo možné stanovit převládající typ polarizace.



Obrázek 11: Morfologie diferencovaných makrofágů po 7denní kultivaci, a – kontrola, b – GP1, c – GP2, d – MWCNTs, zvětšení 20krát.

Tabulka 2: 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

V této práci byly pro hodnocení prozánětlivých účinků vybrány nemodifikované CNMs, konkrétně MWCNTs a dva typy GPs. Za tímto účelem byly zvoleny buněčné modely založené na primárních lidských monocyttech 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 [34]. Kupříkladu nemodifikované GPs byly po inhalaci přednostně nacházeny v alveolárních makrofázích, dokonce i po 90 dnech od expozice [16]. *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 [51; 52]. 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 2). 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.

Dle dosavadních studií má na cytotoxické působení CNMs největší vliv tvar částic [53]. 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 [45; 54-56]. Destruktivní efekt spojený s vyvoláním akutního a chronického zánětu byl mnohokrát prokázán pro různé typy CNTs [57-59]. Z distribuce GP1, které byly většinou pevně uzavřené ve velkých endozomech, bylo naopak patrné, že k žádnému mechanickému poškození nedocházelo (obrázek 2a, d). Závěry potvrdila absence uvolněného LDH jak u THP-1 makrofágů, tak u monocytů. 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. [60]. 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 [61; 62]. Na druhou stranu, přítomnost MWCNTs vyvolala aktivaci NLRP3 inflamazomu jak kanonickou cestou (obrázek 4) u THP1-null modelu, tak alternativní cestou (obrázek 3) u primárních monocytů. K aktivaci došlo pravděpodobně v důsledku narušení lyzozomů, kdy uvolněný katepsin B zafungoval jako stimulátor potřebný pro sestavení inflamazomu. Stejný mechanismus byl pozorován ve studii zaměřené na nanodiamanty [63]. Zároveň však byla vyloučena pyroptóza. Délka MWCNTs v naší práci dosahovala maximálně 10 μm , přičemž konce byly často zaoblené (obrázek 1c, f). Z toho vyplývá, že by nemělo docházet v přílišné míře k frustrované fagocytóze, která je také známa jako jedna z příčin cytotoxicity CNTs [64]. Patrná delokalizace trubic na snímcích TEM, evidentní též u GP2, mohla být z části způsobena i procesem řezání na ultramikrotomu. Mírný únik LDH

(~10 %) po expozici MWCNTs byl pozorován pouze u primárních monocytů, ale až při nejvyšší koncentraci 60 µg/ml. Primární monocyty si obvykle svoji životnost při aktivaci NLRP3 zachovávají [65]. Podobný stav, nazvaný hyperaktivace, byl pozorován u primárních makrofágů odvozených z kostní dřeně a dendritických buněk [66; 67]. Studie ukázaly, že některé molekuly charakteru DAMP, jako oxidované lipidy, mohou tento stav bez narušení životnosti navodit [67]. Nakonec, použití geneticky modifikovaných THP-1 buněk a specifických inhibitorů u monocytů potvrdilo výlučnou specifitu inflamazomu NLRP3 v imunotoxickém účinku MWCNTs.

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-1β (obrázek 5). Tento nálezný vyvrátil předpoklad inhibice NLRP3 a zároveň potvrdil možnou roli CNMs jako Trojského koně [28]. 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 [68]. Z obrázku 5 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 [27]. 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 biomedicíně, předpokládá se jejich intravenózní podání a tedy 100% biologická dostupnost. 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-1β [63; 69-71]. 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 [72]. 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 6–10).

THP-1 makrofágy diferencované pomocí PMA byly v minulosti hodnoceny jako vhodná alternativa k primárním makrofágům [73; 74]. Na druhou stranu jejich nádorový 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 [75]. Obecně nižší reaktivita v porovnání s monocyty 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. Objevili, že přítomnost GPs zvyšovala produkci IL-6 a TNF- α pomocí mechanismu vrozené trénované imunity [76]. 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 [77-79]. Autofagie reprezentuje jednu z cest eliminace CNMs a teoreticky by mohla představovat mechanismus modulace monocytů [45; 46; 80]. 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 [79]. V našem případě po expozici CNMs a následně bakteriím nebyla pozorována žádná zvýšená úmrtnost ani THP-1 makrofágů ani primárních monocytů, 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 [81]. Všechny tři testované CNMs nejenže nezpůsobily cytotoxicitu u primárních monocytů, ale vylepšily jejich přežití a stimulovaly jejich rychlou diferenciaci v makrofágy (obrázek 11). 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 [35; 82]. 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 [83; 84]. Vliv CNMs na cytoskelet se již mnohokrát potvrdil. Například velké GPs narušily cytoskeletální síť v myších makrofázích a epiteliálních buňkách [54]. Pláty GO narušily migraci epiteliálních buněk A549 a HeLa přímou reakcí s aktinem [55; 85]. Efekt by mohl být též nepřímý v důsledku nespécifického mechanického útlaku intracelulárních komponent. Z obrázku 2 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 8–10). 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 [86]. Díky velké laterární 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 [87; 88]. Prokázalo se, že nadměrná nebo opakovaná stimulace primárních monocytů vede za určitých okolností k utlumení zánětlivé odpovědi, což se podílí na udržení vnitřní homeostázy [89]. 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. V porovnání s nestimulovanou kontrolou však bylo překvapující, v jaké míře byly CD163 a CD64 exprimovány (tabulka 2). Analýza vycházela ve všech případech ze stejného počtu buněk, tudíž se nejednalo o zkreslení v důsledku snížení počtu kontrolních monocytů-makrofágů v průběhu diferenciaci. 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 [90; 91]. 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 [92]. Naopak CD64 představuje znak asociovaný s výraznou prozánětlivou aktivitou, např. během sepse [93]. 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 [94]. Expresce CD64 bývá zvyšována během akutního zánětu působením IFN- γ [95]. Z obecného hlediska je stanovení polarizace na základě CD znaků velmi náročné, jelikož se dané znaky v různých poměrech vyskytují u obou subpopulací [96]. Navíc studie porovnávající 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 [97]. 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 svojí fagocytární funkci. Vlivem zahájení diferenciaci 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 1). I zde se samozřejmě mohlo projevit zhášení fluorescence. 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 [30]. Potenciální narušení fagocytární aktivity nicméně nestálo za modulací produkce cytokinů.

Závěrem lze říct, že přestože žádné z testovaných CNMs nepůsobily přímo cytotoxičky, 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 [83].

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 endosomech. V porovnání s tím byl potvrzen prozánětlivý účinek MWCNTs, které díky svému tvaru poškozovaly lysosomy 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 monocyttech. 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 časově 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] HULLA, J. E., S. C. SAHU, a A. W. HAYES Nanotechnology: History and future. *Hum Exp Toxicol*, 2015, **34**(12), s. 1318-1321.
- [5] RAO, N., R. SINGH, a L. BASHAMBU Carbon-based nanomaterials: Synthesis and prospective applications. *Materials Today: Proceedings*, 2021, **44**, s. 608-614.
- [6] NEGRI, V., J. PACHECO-TORRES, D. CALLE, a P. LÓPEZ-LARRUBIA Carbon Nanotubes in Biomedicine. *Topics in Current Chemistry*, 2020, **378**(1), s. 15.
- [7] GEIM, A. K., K. S. NOVOSELOV The rise of graphene. *Nature Materials*, 2007, **6**(3), s. 183-191.
- [8] PARK, S., R. S. RUOFF Chemical methods for the production of graphenes. *Nat Nanotechnol*, 2009, **4**(4), s. 217-224.
- [9] 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.
- [10] HUANG, B. Carbon nanotubes and their polymeric composites: the applications in tissue engineering. *Biomanufacturing Reviews*, 2020, **5**(1), s. 3.
- [11] TADYSZAK, K., J. K. WYCHOWANIEC, a J. LITOWCZENKO Biomedical Applications of Graphene-Based Structures. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 2018, **8**(11), s. 944.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] LUEBKE, R. Immunotoxicant screening and prioritization in the twenty-first century. *Toxicol Pathol*, 2012, **40**(2), s. 294-299.
- [22] KURAPATI, R., A. BIANCO Peroxidase mimicking DNAzymes degrade graphene oxide. *Nanoscale*, 2018, **10**(41), s. 19316-19321.

- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] KREJSEK, J., C. ANDRÝS, a I. KRČMOVÁ. *Imunologie člověka*. Hradec Králové: Garamon s.r.o, 2016. ISBN 978-80-86472-74-4.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] LENDECKEL, U., S. VENZ, a C. WOLKE Macrophages: shapes and functions. *ChemTexts*, 2022, **8**(2), s. 12.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] 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.
- [42] 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.

- [43] 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.
- [44] 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).
- [45] 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.
- [46] 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.
- [47] HE, Y., H. HARA, a G. NUNEZ Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci*, 2016, **41**(12), s. 1012-1021.
- [48] 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.
- [49] 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.
- [50] 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**.
- [51] 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.
- [52] 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.
- [53] 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.
- [54] 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.
- [55] 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.
- [56] 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.
- [57] 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.
- [58] 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.
- [59] 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.
- [60] 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.
- [61] 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.
- [62] 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.
- [63] 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.

- [64] 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.
- [65] 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.
- [66] 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.
- [67] 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.
- [68] 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.
- [69] MEUNIER, E., A. COSTE, D. OLAGNIER, H. AUTHIER, et al. Double-walled carbon nanotubes trigger IL-1 β release in human monocytes through Nlrp3 inflammasome activation. *Nanomedicine*, 2012, **8**(6), s. 987-995.
- [70] 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).
- [71] 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.
- [72] 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.
- [73] 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.
- [74] 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.
- [75] 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**.
- [76] 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.
- [77] 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.
- [78] 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.
- [79] 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.
- [80] 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.
- [81] 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.
- [82] 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.
- [83] MOUJABER, O., U. STOCHAJ The Cytoskeleton as Regulator of Cell Signaling Pathways. *Trends Biochem Sci*, 2020, **45**(2), s. 96-107.
- [84] HOHMANN, T., F. DEGHANI The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork. *Cells*, 2019, **8**(4).
- [85] 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.

- [86] 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.
- [87] 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.
- [88] 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.
- [89] 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.
- [90] 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.
- [91] 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.
- [92] FISCHER-RIEPE, L., N. DABER, J. SCHULTE-SCHREPPING, B. C. VÉRAS DE CARVALHO, et al. CD163 expression defines specific, IRF8-dependent, immune-modulatory macrophages in the bone marrow. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2020, **146**(5), s. 1137-1151.
- [93] 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.
- [94] 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.
- [95] BUCKLE, A. M., N. HOGG The effect of IFN-gamma and colony-stimulating factors on the expression of neutrophil cell membrane receptors. *J Immunol*, 1989, **143**(7), s. 2295-2301.
- [96] 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.
- [97] 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.

8. Přehled publikační aktivity autorky

Původní vědecké práce v impaktovaném časopise

Svadlakova, T.; Kolackova, M.; Vankova, R.; Karakale, R.; Malkova, A.; Kulich, P.; Hubatka, F.; Turanek-Knotigova, P.; Kratochvilova, I.; Raska, M.; Krejsek, J.; Turanek, J. Carbon-Based Nanomaterials Increase Reactivity of Primary Monocytes towards Various Bacteria and Modulate Their Differentiation into Macrophages. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* 2021, 11, 2510. **IF 5,076** (2020)

Malkova, A.; **Svadlakova, T.**; Singh, A.; Kolackova, M.; Vankova, R.; Borsky, P.; Holmannova, D.; Karas, A.; Borska, L.; Fiala, Z. In Vitro Assessment of the Genotoxic Potential of Pristine Graphene Platelets. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* 2021, 11, 2210. **IF 5,076** (2020)

Borsky, P.; Fiala, Z.; Andrys, C.; Beranek, M.; Hamakova, K.; Kremlacek, J.; Malkova, A.; **Svadlakova, T.**; Krejsek, J.; Palicka, V.; Rehacek, V.; Kotingova, L.; Borska, L. C-reactive protein, chemerin, fetuin-A and osteopontin as predictors of cardiovascular risks in persons with psoriasis vulgaris. *Physiol Res* 2021. **IF 1,88** (2020)

Borsky, P.; Chmelarova, M.; Fiala, Z.; Hamakova, K.; Palicka, V.; Krejsek, J.; Andrys, C.; Kremlacek, J.; Rehacek, V.; Beranek, M.; Malkova, A.; **Svadlakova, T.**; Holmannova, D.; Borska, L. Aging in psoriasis vulgaris: female patients are epigenetically older than healthy controls. *Immun Ageing* 2021, 18(1), p. 10. **IF 6,40** (2020)

Malkova, A.; Borska, L.; Smejkalova, J.; Hamakova, K.; Kremlacek, J.; **Svadlakova, T.**; Borsky, P.; Holmannova, D.; Fiala, Z. Genotoxic effect of simultaneous therapeutic exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and UV radiation. *J Appl Toxicol* 2021, 41(6), p. 907-914. **IF 3,446** (2020)

Svadlakova, T.; Hubatka, F.; Turanek Knotigova, P.; Kulich, P.; Masek, J.; Kotoucek, J.; Macak, J.; Motola, M.; Kalbac, M.; Kolackova, M.; Vankova, R.; Vicherkova, P.; Malkova, A.; Simeckova, P.; Volkov, Y.; Prina-Mello, A.; Kratochvilova, I.; Fiala, Z.; Raska, M.; Krejsek, J.; Turanek, J. Proinflammatory Effect of Carbon-Based Nanomaterials: In Vitro Study on Stimulation of Inflammasome NLRP3 via Destabilisation of Lysosomes. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* 2020, 10(3), p. 418. **IF 4,034** (2019)

Holmannova, D.; Borsky, P.; Borska, L.; Andrys, C.; Hamakova, K.; Rehacek, V.; **Svadlakova, T.**; Malkova, A.; Beranek, M.; Palicka, V.; Krejsek, J.; Fiala, Z. Metabolic Syndrome, Clusterin and Elafin in Patients with Psoriasis Vulgaris. *Int J Mol Sci* 2020, 21(16). **IF 4,556** (2019)

Holmannova, D.; Borska, L.; Andrys, C.; Borsky, P.; Kremlacek, J.; Hamakova, K.; Rehacek, V.; Malkova, A.; **Svadlakova, T.**; Palicka, V.; Krejsek, J.; Fiala, Z. The Impact of Psoriasis and Metabolic Syndrome on the Systemic Inflammation and Oxidative Damage to Nucleic Acids. *J Immunol Res* 2020, 2020, p. 7352637. **IF 3,327** (2019)

Borsky, P.; Fiala, Z.; Andrys, C.; Beranek, M.; Hamakova, K.; Malkova, A.; **Svadlakova, T.**; Krejsek, J.; Palicka, V.; Borska, L.; Rehacek, V. Alarmins HMGB1, IL-33, S100A7, and S100A12 in Psoriasis Vulgaris. *Mediators Inflamm* 2020, 2020, p. 8465083. **IF 3,758** (2019)

Knötigová, P.T.; Mašek, J.; Hubatka, F.; Kotouček, J.; Kulich, P.; Šimečková, P.; Bartheldyová, E.; Machala, M.; **Švadlákova, T.**; Krejsek, J.; Vaškovicová, N.; Skoupý, R.; Krzyžánek, V.; Macaulay, S.; Katzuba, M.; Fekete, L.; Ashcheulov, P.; Raška, M.; Kratochvílová, I.; Turánek, J. 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 **IF 4,396** (2018)

Původní vědecké práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise

Holmannová, D.; Císařová, B.; Borský, P.; Fiala, Z.; Andrýs, C.; Hamaková, K.; **Švadlákova, T.**; Krejsek, J.; Palička, V.; Kotingová L.; Borská L. Goeckerman Regimen Reduces Alarmin Levels and PASI Score in Paediatric Patients with Psoriasis. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2021, *64(4)*, p, 204-212.

Přednášky na odborných sdělení

Švadlákova, T.; Turánek, J.; Mašek, M.; Kulich, P.; Hubatka, F.; Knötigová, P.T.; Málková, A.; Ledvina, M.; Koláčková, M.; Vicherková, P.; Fiala, Z.; Krejsek, J. Carbon-based nanomaterials and immune system: Effect of carbon nanotubes and graphene platelets on NLRP3 activation. 14. Fakultní konference student DSP, 22. 10. 2018, Hradec Králové

Plakátová sdělení na odborných sdělení

Svadlakova, T.; Hubatka, F.; Masek, J.; Kulich, P.; Ledvina, M.; Malkova, A.; Fiala, Z.; Borska L.; Turanek, J. Activation of NLRP3 inflammasome as a key indicator of carbon nanotubes proinflammatory potential. IUIS 2019, 19.–23. 10. 2019, Peking, Čína

Svadlakova, T.; Malkova, A.; Kulich, P.; Masek, J.; Hubatka, F.; Knotigova, P.T.; Fiala, Z.; Borska L.; Turanek, J. Potential cytotoxic risk and chronic inflammation after exposure to graphene platelets. EUROTOX 2018, 2.–5. 9. 2018, Brusel, Belgie