

Abstrakt

Nanotechnologie v intenzivní péči: Intravaskulární biokompatibilita uhlíkových nanomateriálů – uhlíkové nanotuby a krevní destičky

Uhlíkové nanotuby patří v současnosti mezi nejdůležitější nanomateriály využívané v biologii a medicíně. Vyznačují se unikátními mechanickými a fyzikálně-chemickými vlastnostmi, jako je vysoká pevnost, pružnost a výborná vodivost při minimálních rozměrech. To z nich dělá velmi atraktivní materiály pro použití v různých oblastech biomedicíny, z nichž mnohá zahrnují přímý kontakt s krví a přítomnost nanotub v intravaskulárním prostředí. V organismu se však mohou ocitnout i z jiné příčiny – po průniku tkáněmi z kontaminovaného okolního prostředí. Výzkum intravaskulární biokompatibility těchto materiálů je tedy klíčový pro zajištění bezpečnosti jejich dalšího praktického použití.

V naší studii jsme se věnovali vlivu strukturálně odlišných uhlíkových nanotub na krevní destičky a porovnávali ho s efektem nanočástic amorfního uhlíku, fullerenu C_{60} , fullerenolu $C_{60}(OH)_{24}$ a polystyrenových nanokuliček o standardní velikosti. Agregometrií jsme prokázali, že uhlíkové nanotuby způsobují agregaci krevních destiček v lidské plasmě, přičemž míra agregace rostla s koncentrací nanotub. Polystyrenové nanokuličky a ani fulleren, jehož molekula má kulovitý tvar, agregaci krevních destiček nevyvolávaly. Analýza průtokovou cytometrií potvrdila, že kontakt s uhlíkovými nanotubami vede k aktivaci destiček, potvrzenou zvýšenou expresí aktivačních povrchových markerů CD62P a CD63 a dále uvolněním CD62P a CD63 pozitivních mikropartikulí. Elektronová mikroskopie (rastrovací a transmisní elektronová mikroskopie) potvrdila, že u krevních destiček po kontaktu s uhlíkovými nanotubami dochází k morfologickým změnám typickým pro aktivaci. Jejich tvar se mění z klidového diskovitého na aktivovaný - kulovitý s pseudopodiemi, membránovými nerovnostmi a dochází k uvolnění membránových mikropartikulí. Fluorescenční mikroskopie za použití indikátoru FURA-2AM prokázala, že kontak destiček s uhlíkovými nanotubami vede k rychlému zvýšení hladiny nitrobuněčného vápníku. Pozorované zvýšení nitrobuněčné koncentrace vápenatých iontů bylo inhibovatelné blokátory kalciových kanálů SKF 96365 a 2-APB. To naznačilo, že zvýšení hladiny nitrobuněčného vápníku není způsobeno pouhým mechanickým narušením buněčné membrány krevních destiček nanotubami. Při dalším zkoumání tohoto jevu jsme byli schopni dokumentovat průnik uhlíkových nanotub plasmatickou membránou destičky bez jejího

zjevného poškození a dále i interakci nanotub se strukturou densního tubulárního systému. Elektronová a imunoflourescenční mikroskopie prokázala, že tato interakce je zodpovědná za uvolnění nitrobuněčných zásob vápníku z densního tubulárního systému, které vede k otevření membránových vápníkových kanálů a aktivaci krevních destiček. Tento proces byl doprovázen shlukováním molekul STIM1 s molekulami proteinu Orai1 v cytoplasmatické membráně destiček, což prokázalo aktivaci mechanismu na zásobách závislého vstupu vápníku do buňky (store-operated Ca^{2+} entry (SOCE)).

Obecný efekt velikosti a náboje nanomateriálů na krevní destičky jsme dále zkoumali pomocí modelu polyamidoaminových (PAMAM) dendrimerů, materiálu, kde jsou obě tyto veličiny lehce modifikovatelné. Prokázali jsme, že dendrimery o větší velikosti s kladným nábojem, oproti dendrimerům menším a/nebo se záporným či neutrálním nábojem, způsobují agregaci destiček. Podstatou dendrimery způsobené agregace je narušení buněčné membrány krevních destiček.

V předložené práci dokazujeme, že uhlíkové nanotuby způsobují aktivaci a agregaci krevních destiček a jsou tedy značně protrombogenní. Navíc se nám podařilo objasnit molekulární mechanismus aktivace krevních destiček uhlíkovými nanotubami. Tato zjištění mají zásadní význam pro hodnocení biokompatibility uhlíkových nanomateriálů s krví a jejich použití v biologii a medicíně.