



39. TEISINGERŮV DEN PRŮMYSLOVÉ TOXIKOLOGIE

Zdeněk Fiala, Tereza Švadláková, Drahomíra Holmannová

Toxicita nanomateriálů. Vybrané výsledky projektu NANOBIO

Projekt NANOBIO

Struktura a hlavní výstupy

Vybrané výsledky projektu NANOBIO

- Uhlíkové nanomateriály. Toxicita
- Imunotoxicita nanomateriálů

Nanočástice/nanomateriály (NMs) – téměř všechny technologie - produkce dlouhodobě narůstá -
- zdroje: přírodní, vedlejší produkty lidské činnosti, záměrně vyráběné (ENPs)

Expozice NMs - rychlá inhalační, perorální i dermální absorpce do systémové cirkulace - rychlá distribuci do orgánů a tkání - ovlivňování fyziologických mechanismů

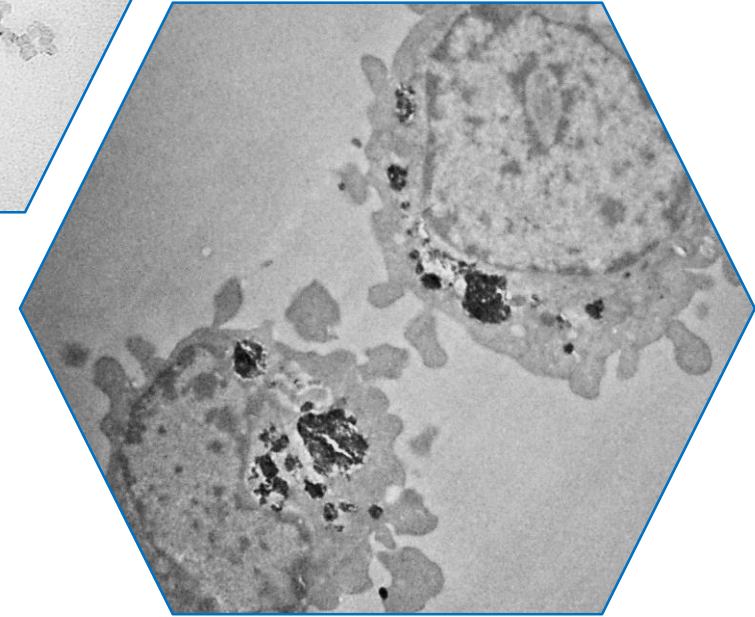
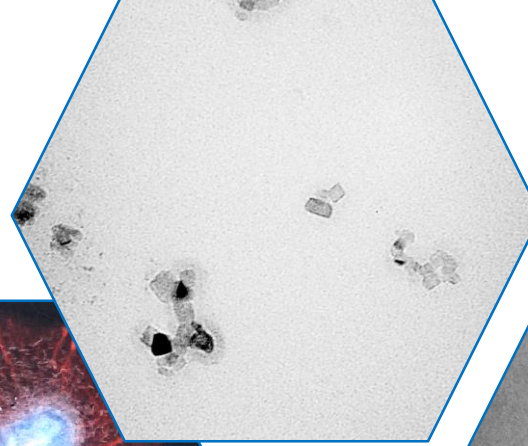
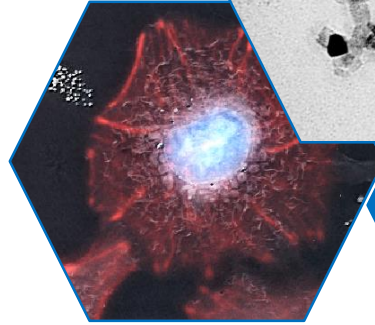
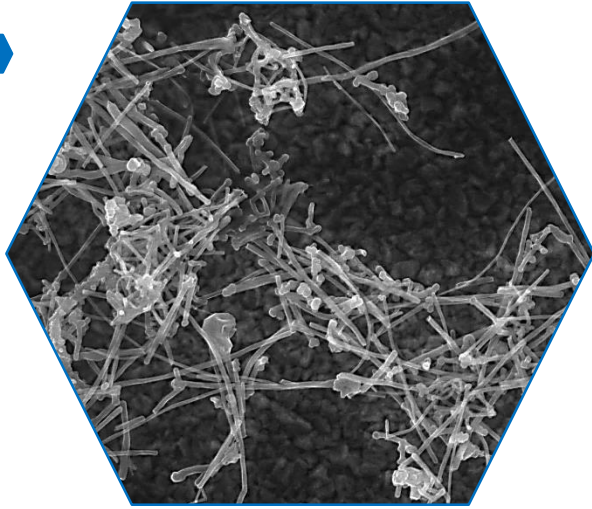
Vědomosti o nebezpečnosti NMs omezené a neodpovídají dynamice nano-materiálového vývoje a výroby

Testování NMs - specifické chemicko-fyzikální vlastnosti nanočástic - variabilita chování ve vnitřním prostředí - snížení validity standardně používaných testů toxicity

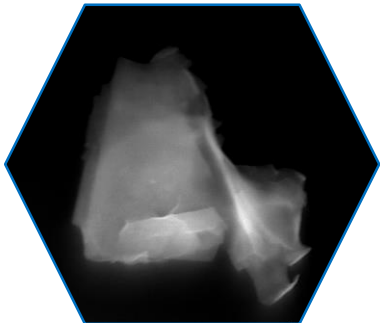
NANOBIO - projekt EFRR (Evropský fond pro regionální rozvoj), „Posílení mezioborové spolupráce ve výzkumu nanomateriálů a studiu jejich účinků na organismus“; ITI Hradec Králové-Pardubice; 2018-2022

Zastoupení oborů v NANOBIO - chemici, biochemici, toxikologové, imunologové, fyziologové, biologové, histologové a biofyzici

Klíčová spolupráce v NANOBIO - Molecular & Translational Medicine, Trinity College, Dublin; Výzkumný ústav veterinárního lékařství (Oddělení farmakologie a imunoterapie) Brno



NANOBIO



Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

Lékařská fakulta v Hradci Králové

Fakultní nemocnice Hradec Králové

Centrum materiálů a nanotechnologií Univerzita Pardubice



NANOBIO

<https://www.youtube.com/watch?v=gRo3fOFICCY>

NANOBIO - Experimentální modely a testované NMs



In vitro buněčné populace/linie

A549

THP-1

primární monocyty

C2C12 myoblasty

neurální kmenové buňky

pluripotentní kmenové buňky

kožní fibroblasty

Testované NMs

Uhlíkové materiály

Grafenové plátky
Uhlíkové nanotrubičky
(MWCNTs)
Nanodiamanty

Kovy

PEG zlato

Oxidy kovů

TiO₂ částice
(P25, 4-8 nm)

Oxidy polokovů

SiO₂ vlákna
SiO₂ částice

In vivo myši samci C57BL/6; inhalační, perorální, dermální; akutní a chronické expozice grafenu

NANOBIO - Vybrané optimalizované metodiky



BIOLOGIE

Cytotoxicita: Kumulovaný počet populačních zdvojení (PDL), barvení jader DAPI – obrazová cytometrie

Metabolická aktivita: WST-1 assay, alamarBLUE

BIOFYZIKA

Intracelulární lokalizace: TEM

HISTOLOGIE

Cytotoxicita: LDH assay, WST-1 assay, xCELLigence

Genová exprese: Real-time qPCR

Histologická analýza tkáňových řezů – hematoxin-eosin

Charakterizace a příprava suspenze NMs

Stabilita suspenze: ζ -potenciál, hydrodynamický průměr... (UKIA, VÚVeL, CEMNAT)

Morfologie: Transmisní elektronová mikroskopie (VUVeL, Biofyzika)

Biologická kontaminace: Rep. buněčná esej HEK-Blue™-2 Cells/-4 cells (UKIA)

ÚKIA

Produkce cytokinů: ELISA, rep. buněčné eseje HEK-Blue™

Aktivita NLRP3: buněčná esej THP1-null/HEK-Blue™ IL-1 β , LDH assay

Fagocytóza: pHrodo™ Red E. coli BioParticles™ - fluor. holotomografická mikroskopie, průtoková cytometrie

PREVENTIVNÍ LÉKAŘSTVÍ

Cytotoxicita a genotoxicita: Mikronucleus test (dělicí se bb), Trypan blue exclusion assay – optická mikroskopie

Genotoxicita: Comet assay, test chromozomálních aberací



NANO BIO - Hlavní výstupy (LF/FN)

Publikace. Sedm původních článků (IF 3.041-8.1) a tři články přehledové (IF 2.921-5.346); kumulativní IF všech článků 53.230

Metodický manuál. Zdeněk Fiala, Ctirad Andrýs a kol.: Soubor optimalizovaných metodik pro testování cytotoxicity, genotoxicity a imunotoxicity nanočástic (LF HK 2022, 76 s.). Testy cytotoxicity, genotoxicity, imunotoxicity, genové kvantifikace, buněčné proliferace, adheze, viability a morfologie; metodiky histologické analýzy a metodiky transmisní elektronové mikroskopie (tištěná i elektronická verze)

Monografie. Editoři: Zdeněk Fiala a Drahomíra Holmannová (16 spoluautorů): Uhlíkové nanomateriály. Biomedicínské aplikace a toxicita; 340 stran, KAROLINUM 2024 (tištěná i elektronická verze).

Prezentace. EUROTOX (European Societies of Toxicology, 2018, Brusel) a IUIS (International Union of Immunological Societies, 2019, Peking)



Vybrané výsledky projektu NANOBIO

Uhlíkové nanomateriály. Toxicita

Analýza 674 studií; majorita SWCNT, MWCNT, grafen, GO a rGO; ~ 65% důkazů toxicity

Respirační toxicita. Některé CNMs indukují oxidační stres, poškozující zánět, modifikují genovou expresi, profibrotický a karcinogenní potenciál (data *in vitro*, *in vivo*, pracovní expozice)

Kardiovaskulární toxicita. Některé CNMs indukují poškození srdečního svalu a cév, oxidační stres, poškozující zánět (data *in vitro*, *in vivo*, pracovní expozice)

Gastrointestinální toxicita a hepatotoxicita. Omezený počet studií. Některé CNMs indukují poškození trávicího systému včetně jater (*in vitro*, *in vivo*)

Kožní a oční toxicita. Omezený počet studií s nekonzistentními závěry:

- 1) Některé CNMs indukují oxidační stres a poškozující zánět (kůže, oko; lokální i systémová expozice; GO, MWCNT, SWCNT)
- 2) Některé CNMs biokompatibilní = biomedicínské aplikace: scaffoldy a krycí materiály s CNMs podporují proliferaci a diferenciaci buněk (včetně keratinocytů a kožních fibroblastů) a zvyšují neoangiogenezi = podpora hojení akutních i chronických ran (ND, rGO) (data *in vitro*, *in vivo*)

Toxicita vůči močovému ústrojí. Omezený počet studií s nekonzistentními závěry. Princip předběžné opatrnosti: Některé CNMs mohou poškozovat tkáň vylučovacího ústrojí a ovlivňovat funkci ledvin (*data in vitro, in vivo*)

Neurotoxicita. Omezený počet studií s nekonzistentními závěry. Princip předběžné opatrnosti: Některé CNMs mohou indukovat neurotoxické účinky včetně prenatální neurotoxicity (*data in vitro, in vivo*)

Imunotoxicita. Omezený počet studií s nekonzistentními závěry:

- 1) Některé CNMs indukují poškozující zánět nebo poškozující modulace funkcí imunitních buněk; kumulace některých CNMs v organismu (zejména v plicích) ovlivňuje imunitní obranu proti běžným patogenům (*data in vitro, in vivo*)
- 2) Některé CNMs biokompatibilní (cílené využití imunomodulačního potenciálu) (*data in vitro, in vivo*)

Genotoxicita. Některé CNMs indukují genomové změny - zvýšené riziko karcinogeneze a genetických poruch v dalších generacích (*data in vitro, in vivo*)

Reprodukční a vývojová toxicita. Některé CNMs ovlivňují expresi pohlavních hormonů, poškozují pohlavní buňky a způsobují vývojové deformity (*data in vitro, in vivo*)

Analýza nejistot

Nedostatek informací o expozici člověka

Nedostatek informací o mechanismech účinků

Omezené počty experimentálních studií s nekonzistentními závěry (majorita *in vitro* studií)

Obtížné srovnání výsledků experimentálních studií:

Variabilita expozičních koncentrací: *in vitro* studie; < 100 µg/ml až > 100 mg/ml

Variabilita expozičních jednotek: *in vitro* studie µg/ml, mg/L, µg/cm², počet částic/ml

in vivo studie mg/kg tělesné hmotnosti, mg/den,

počet částic/l, µg/l, ppm/100 µl, mg/myš

Variabilita expoziční doby experimentálních studií s dominancí akutních a subakutních forem expozice

Variabilita zdrojů CNMs : různé zdroje CNMs jedné a té samé látky mohou mít rozdílné

fyzikálně-chemické vlastnosti a tím i rozdílnou toxicitu

Prostředí disperze CNMs (rozpouštědla, stabilizátory, antimikrobiální agens)

Změny CNMs v čase – modifikace a kontaminace povrchů CNMs v prostředí = změny toxicity

Doporučení pro další výzkum toxicity CNMs

Další experimentální studie (*in vitro*, *in vivo*). GIT toxicita a hepatotoxicita, toxicita vůči močovému ústrojí, neurotoxicita, imunotoxicita, genotoxicita, reprodukční a vývojová toxicita

Podrobnější charakteristiky CNMs. Nutnost podrobnějších charakteristik včetně způsobu přípravy (výrobce), chemického složení, funkcionalizace, velikosti, tvaru, povrchového náboje a disperzního prostředí

Odhady skutečné expoziční dávky CNMs. Riziko nehomogenní distribuce v testovacích systémech *in vitro* (aglomerace, agregace, sedimentace, disperze). Skutečná expoziční dávka (která se dostane k buňkám a vyvolá biologický účinek) se nemusí rovnat dávce podané (**nutnost dozimetrie**)

Delší expoziční doby. Orientace na subchronické a chronické expozice nižším dávkám. Akutní expozice vyšším dávkám mohou účinky nadhodnocovat - saturace metabolických enzymů, vazebných míst, receptorů a transportních proteinů a přetížení adaptačních a reparačních mechanismů

Validace nových a/nebo modifikovaných testů toxicity. Fyzikálně-chemické vlastnosti disperzí CNMs a variabilita jejich chování v biologických systémech snižují validitu standardně používaných testů toxicity

Mechanismy účinků CNMs. Studium patofyziologických mechanismů a molekulárně biologických interakcí CNMs s biologickými systémy

Kvantifikace expozice člověka CNMs. Standardizace analytických nástrojů pro vzorkování, detekci, kvantifikaci a charakterizaci částic CNMs. Zpřesňování odhadů průměrné denní expozice z majoritních expozičních cest (inhalace a požití).

Sledování kontaminace, koexpozic a změn CNMs v čase. Při hodnocení reálných pracovních a mimopracovních expozic nutno brát v úvahu: vliv biologických a chemických kontaminantů, charakter nosného média (ovzduší, voda, potraviny, půda, předměty) a modifikaci povrchů částic v čase

Hodnocení zdravotních rizik CNMs. Epidemiologické studie pracovních a mimopracovních expozic

Směsi CNMs. Paralelně s testováním jednotlivých CNMs nutno věnovat pozornost i reálným vzorkům směsí ve kterých se vyskytují CNMs



www.lfhk.cuni.cz
www.fnhk.cz

Kontakty

prof. Ing. Zdeněk Fiala, CSc.,
Odborný garant projektu za LF
fiala@lfhk.cuni.cz

prof. RNDr. Ctirad Andrýs, Ph.D.
Odborný garant za FN
ctirad.andrys@fnhk.cz

Mgr. Tereza Silbernaglová
Projektový manažer za LF a FN
silbernaglova@lfhk.cuni.cz



Vybrané výsledky projektu NANOBIO

Imunotoxicita nanomateriálů

NANOTOXIKOLOGIE zahrnuje výzkum částic < 100nm, které jsou generovány **ze tří základních zdrojů:**

Přírodní NPs	NPs jako vedlejší produkty lidské činnosti	Záměrně vyráběné NPs (ENPs/ENMs)
Lesní požáry	Spalovací motory	Kovy a jejich oxidy, polovodiče, uhlíkaté materiály , polymery
Vulkanická činnost	Tepelné elektrárny	Nano - Jehly, trubky, kruhy a desky
Viry	Spalovny odpadů	Kosmetika, zdravotnické prostředky, elektronické a optické výrobky, zobrazovací zařízení
Biogenní magnetit nano-Fe ₃ O ₄ (magnetotaktické bakterie, měkkýši, včely, holubi; pomáhá při orientaci vzhledem k magnetickému poli Země)	Dýmy a páry průmyslových technologií (např. sváření)	
	Smažení, fritování, grilování	