



(Imuno)toxická nanomateriálů.

Vybrané výsledky projektu Nanobio

Mgr. Tereza Švadlákova, Ph.D.

Mgr. Martina Koláčková, Ph.D.

Mgr. Radka Vaňková, Ph.D.

Mgr. Michaela Rosecká

prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.

prof. RNDr. Ctirad Andrýs, Ph.D.

Ústav klinické imunologie a alergologie

Fakultní nemocnice Hradec Králové a Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Imunotoxicita (nejen) uhlíkových nanomateriálů

Vstup do organismu

Rozpoznání složkami imunitního systému

- Profesionální fagocyty
- Role kontaminace

Intracelulární distribuce

- Zánět

Eliminace



Vstup do organismu

Biomedicínské aplikace – reakční povrch

- Zobrazovací metody, biosenzory, nosiče léčiv, adjuvancia aj.
- Intravenózní podání – 100% dostupnost

Pracovní prostředí

- **Plicní**, orální a kožní expozice

Distribuce na základě vnitřních i vnějších faktorů

- Proteinová korona (biokorona)

Kontakt se složkami imunitního systému nevyhnutelný

- **Imunotoxicita – cytotoxické, imunosupresivní, imunostimulační reakce**

Rozpoznání

Nespecifické rozpoznání

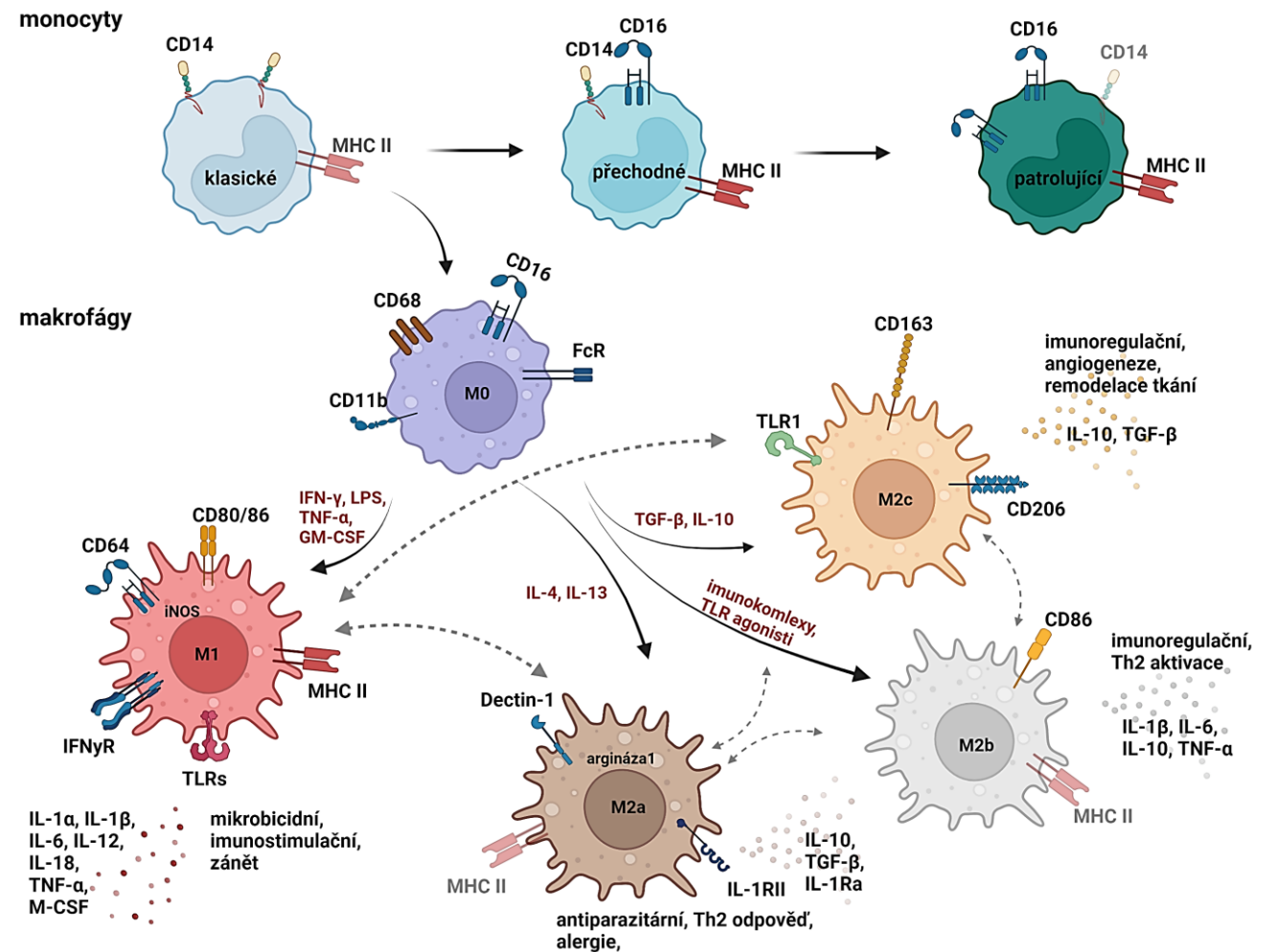
- Interakce povrchu částic s vl membránou

Klíčová úloha profesionálních fagocytů

- **Monocyto-makrofágový systém**

Endocytóza

- Receptorem zprostředkovaná
- Fagocytóza
- Frustrovaná fagocytóza
- uhlíkové nanotrubičky (CNT)

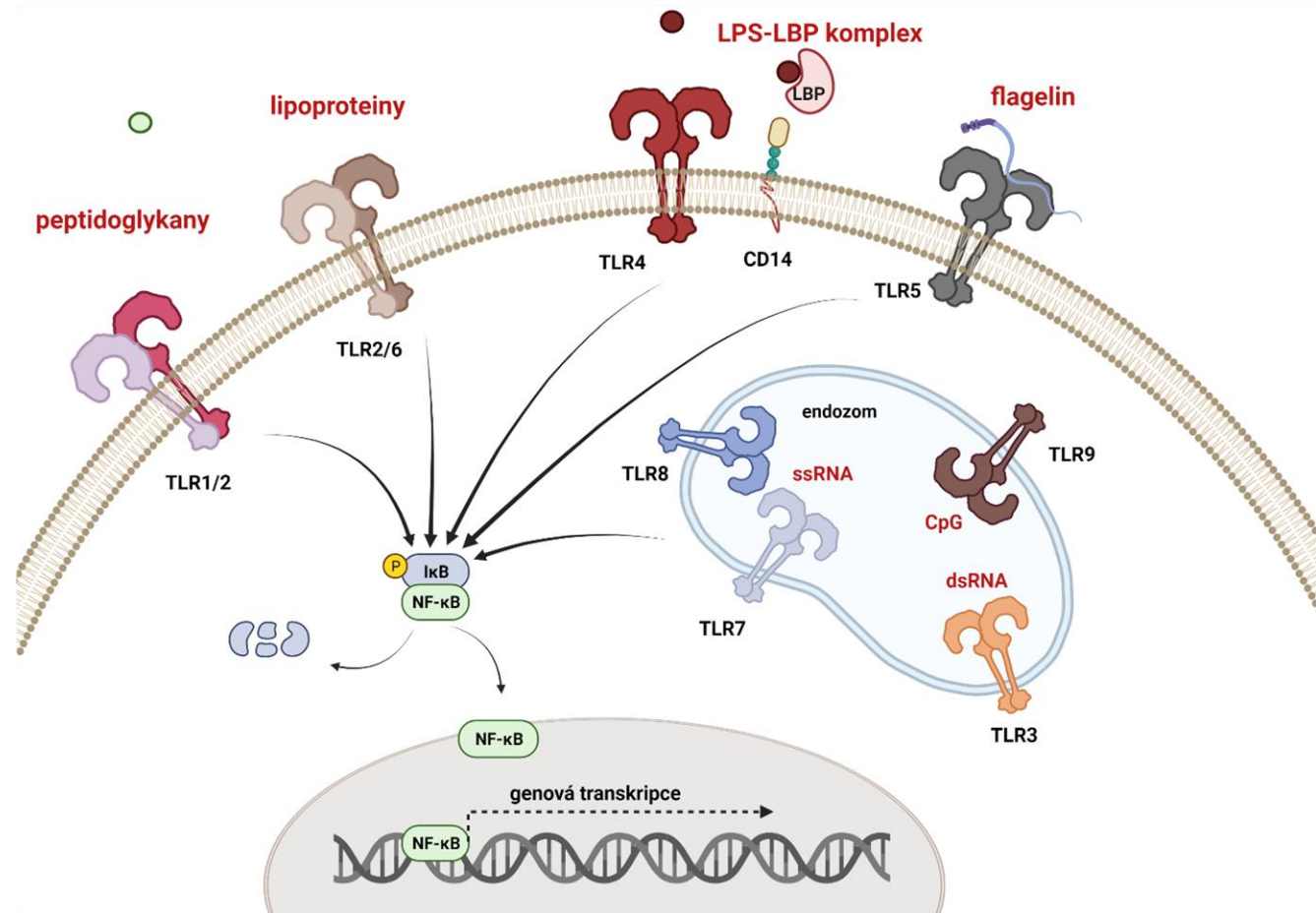


Role kontaminace

Přítomnost patogenních vzorů (PAMPs) na povrchu částic

- Interakce s membránovými receptory
 - **PRRs** (Pattern recognition receptors)
- Ovlivnění fagocytózy
- „Trojský kůň“

Lipopolysacharid (LPS)



Intracelulární distribuce

Snaha eliminace částice

- Uzavření do endozomů/lysozomů
 - Únik
- Autofagie
 - Narušení/blokace autofagického toku

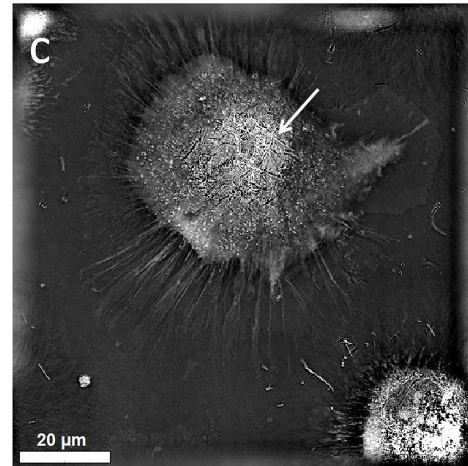
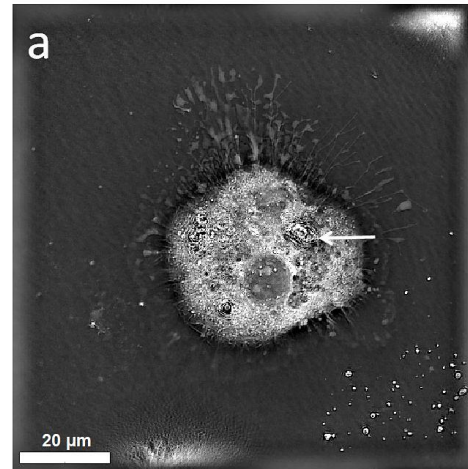
Interakce s organelami

- Mitochondrie, ER

Intracelulární receptory

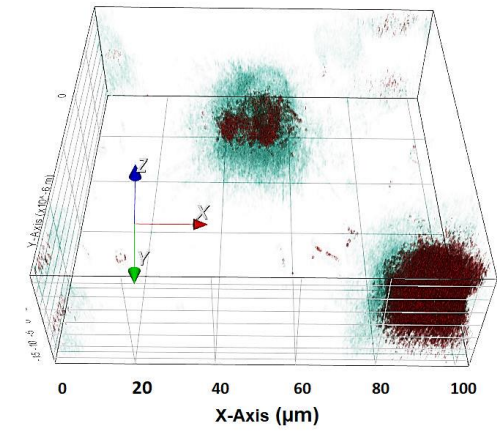
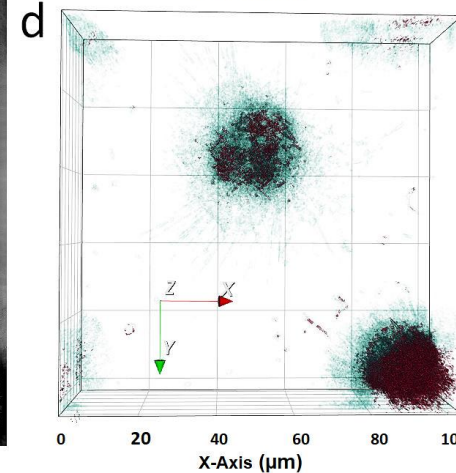
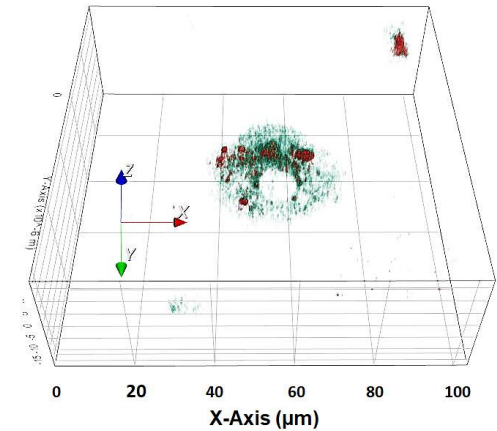
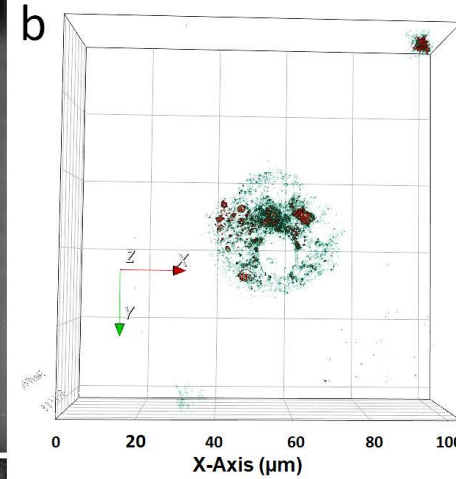
- Biokorona, kontaminace

ROS, Záněť



RI (2D), Šipky; GPs/MWCNTs

(Svadlakova et al., 2022; upraveno)

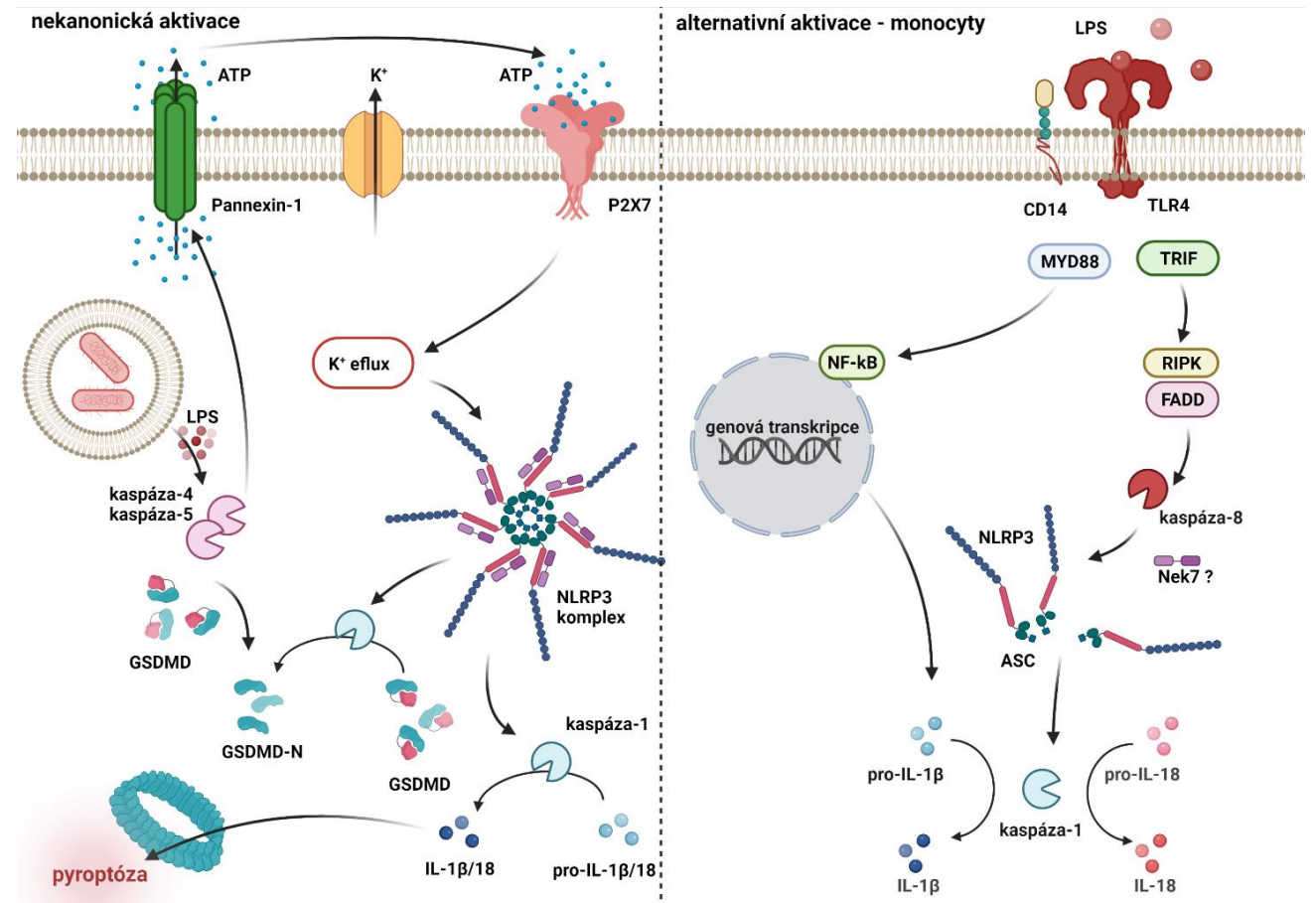


RI (3D), digitální barvení; ■ cytoplazma, ■ GPs/MWCNTs

Zánět

Inflamazom

- Intracelulární makromolekulární komplex
- Sterilní zánět
- Aktivace kaspázy-1 » IL-1 β /IL-18
- **NLRP3**



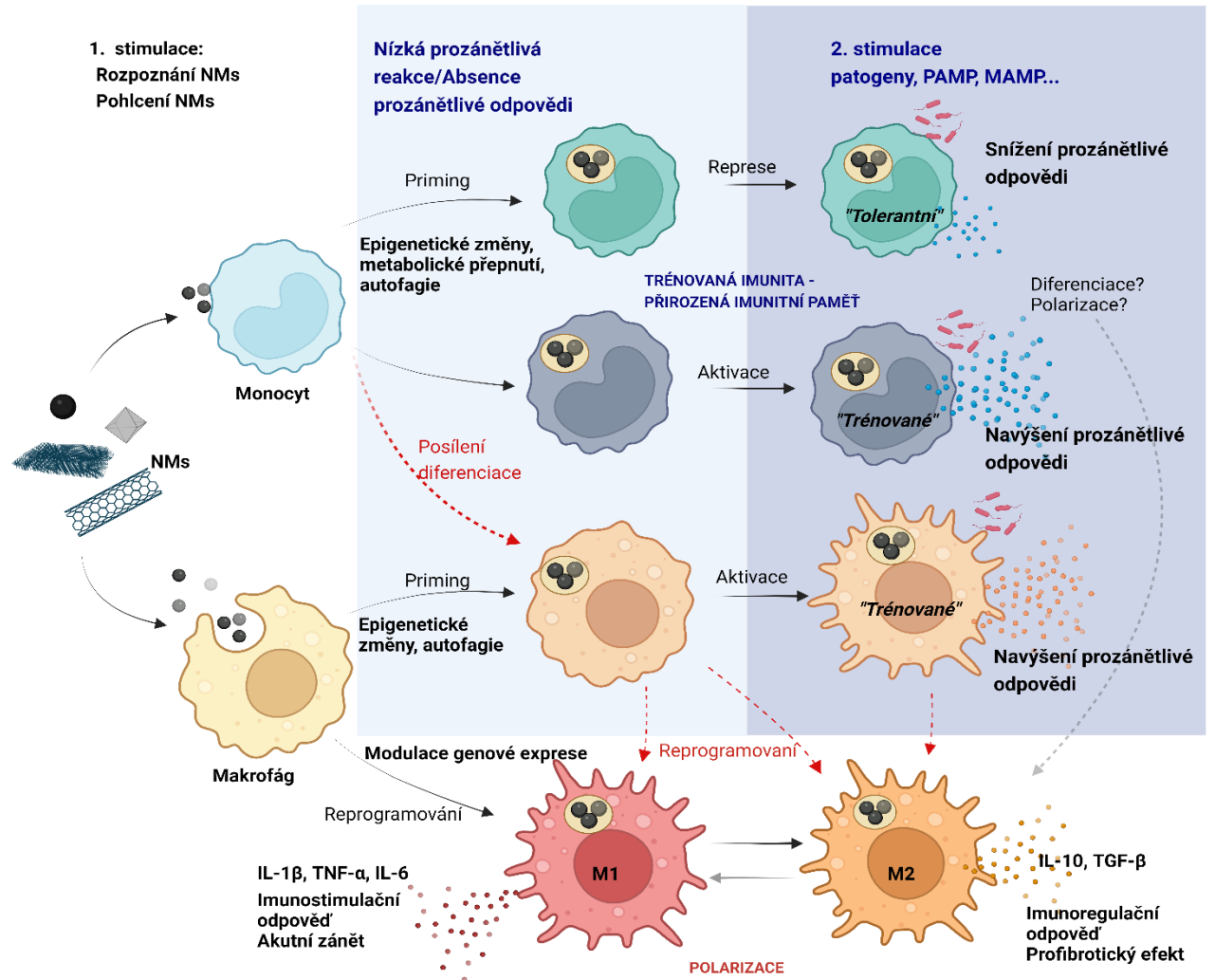
Modulace

Ovlivnění fyziologických funkcí

- Fagocytóza
- Produkce cytokinů
- Migrace

Tvorba přirozené imunitní paměti

„Adjuvanční“ efekt



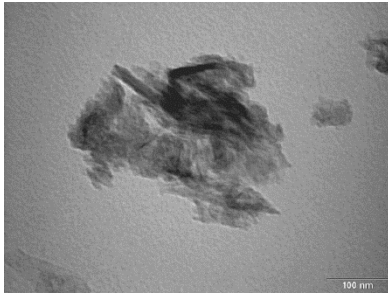
VYBRANÉ EXPERIMENTÁLNÍ VÝSLEDKY

in vitro

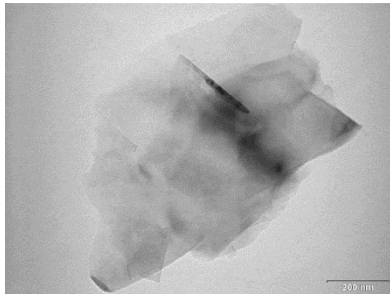
Grafenové plátky (GP), vícevrstvé uhlíkové nanotrubičky (MWCNT), Oxid titaničitý (P25)



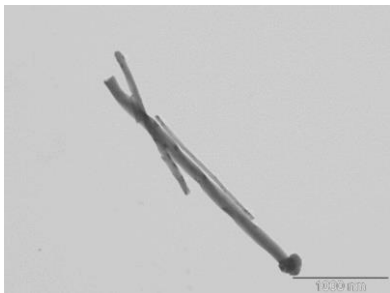
Základní charakterizace



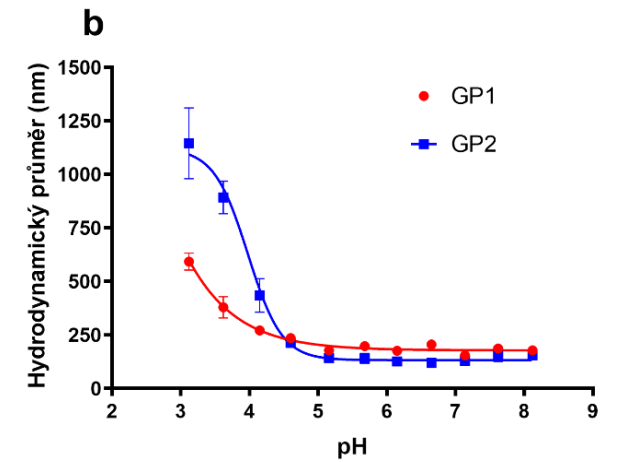
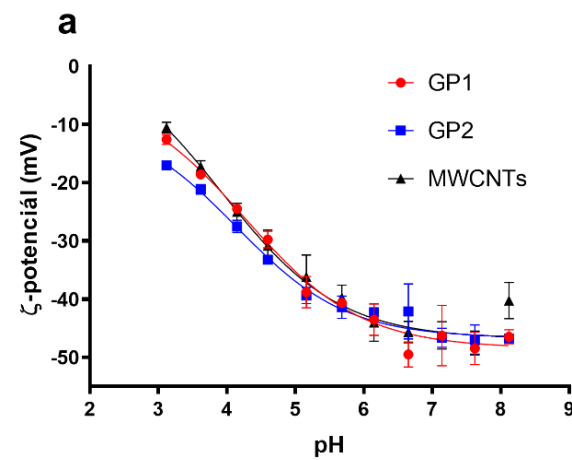
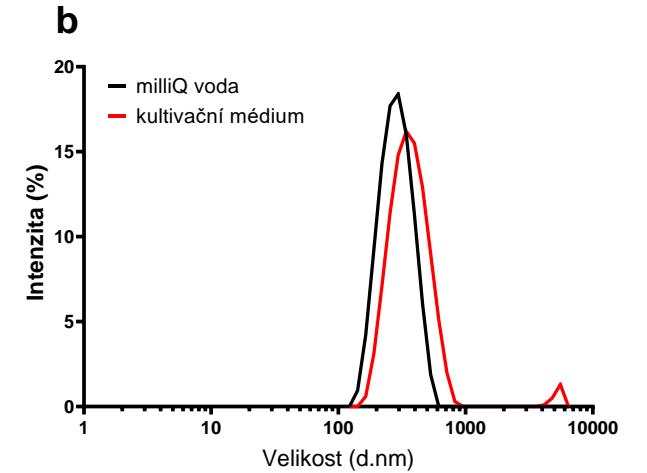
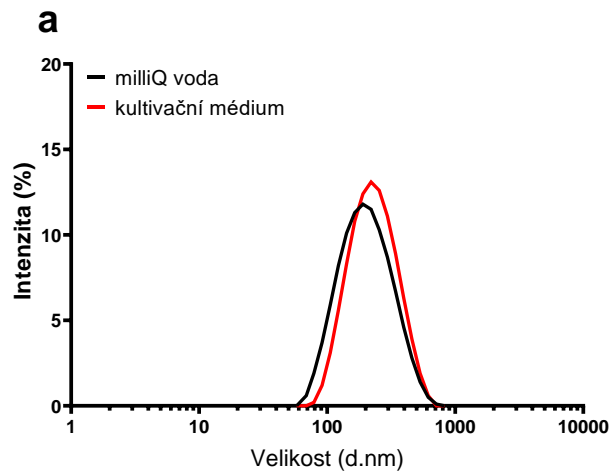
GP1: nemodifikované,
(PL-P-G750; PlasmaChem GmbH)



GP2: nemodifikované, (darováno –
CRANN, TCD)

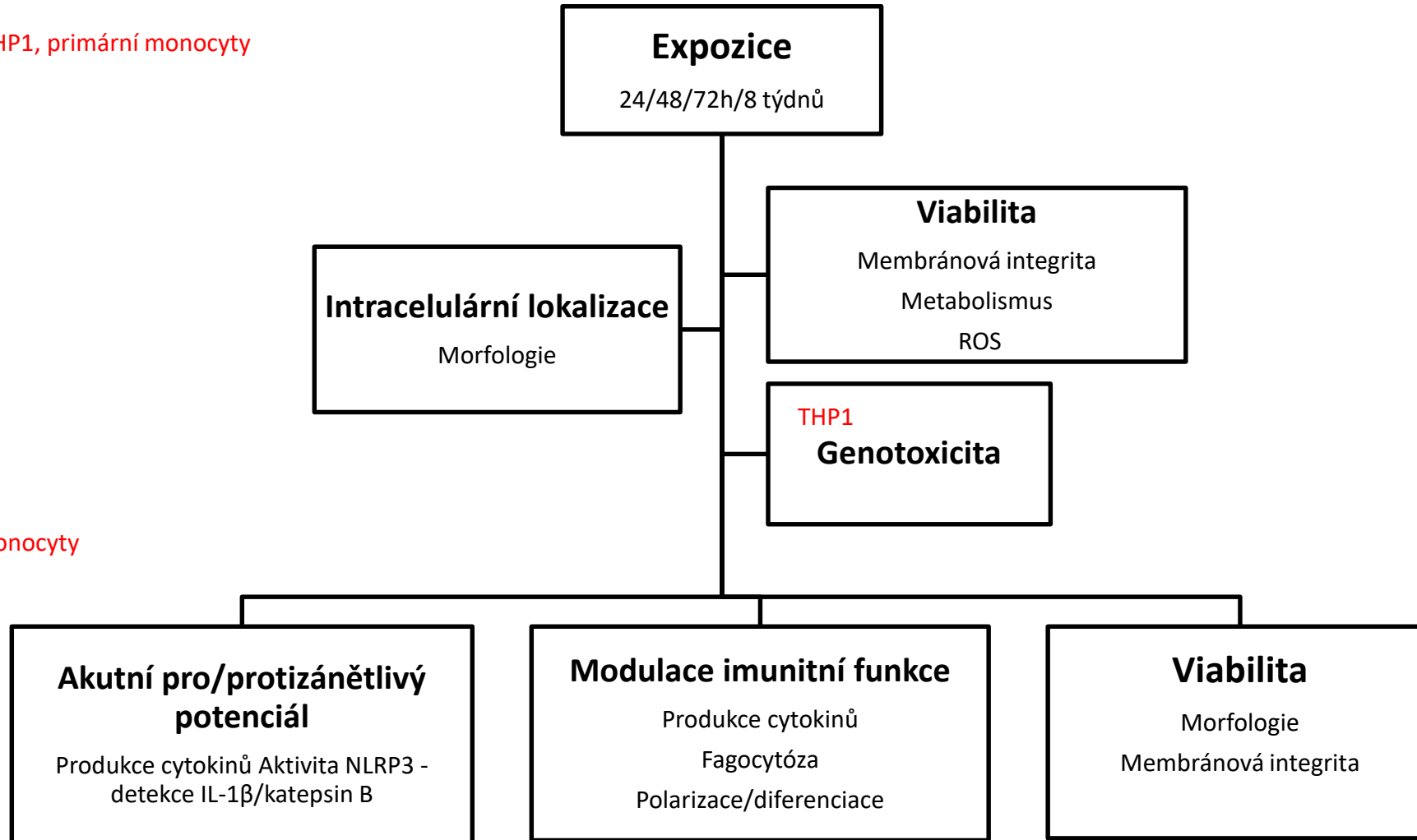


MWCNT:
(659258; Merck)



Průběh in vitro testování

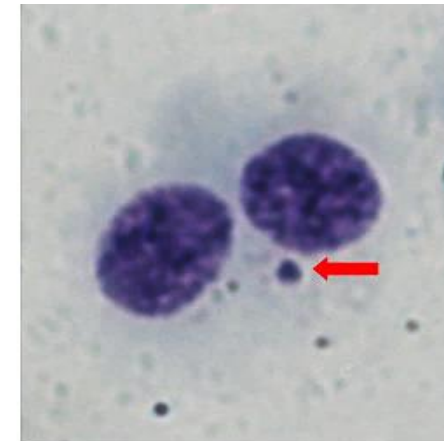
A549, C57BL/6, THP1, primární monocyty



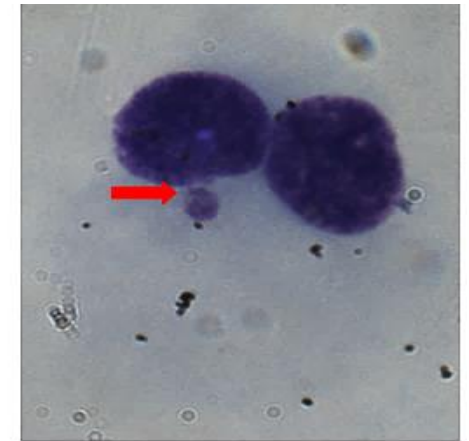
THP1, primární monocyty

Viabilita

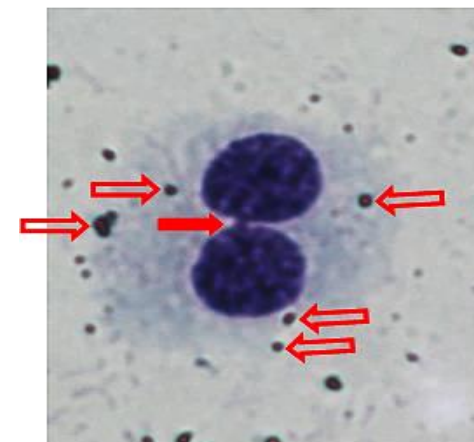
- Absence významné akutní cytotoxické reakce po expozici GPs téměř na všech buněčných modelech, vyjma C57BL/6 (20 – 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 30 % cytotoxicita; Bavorova et al. 2022)
- Snížení migrace a spontánní motility **A549** po dlouhodobé expozici GP, bez ovlivnění proliferace (Šestáková et al. 2022)
- MWCNT testovány pouze v rámci imunotoxických reakcí – mírná cytotoxicita ~ 10 % pouze při nejvyšší test. koncentraci 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- **Tvorba mikrojadér** u suspenzních THP-1 po expozici GP – na koncentraci závislá genotoxicita (Malkova et al. 2021)



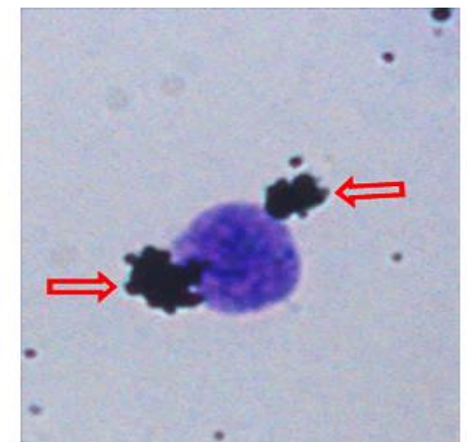
a



b



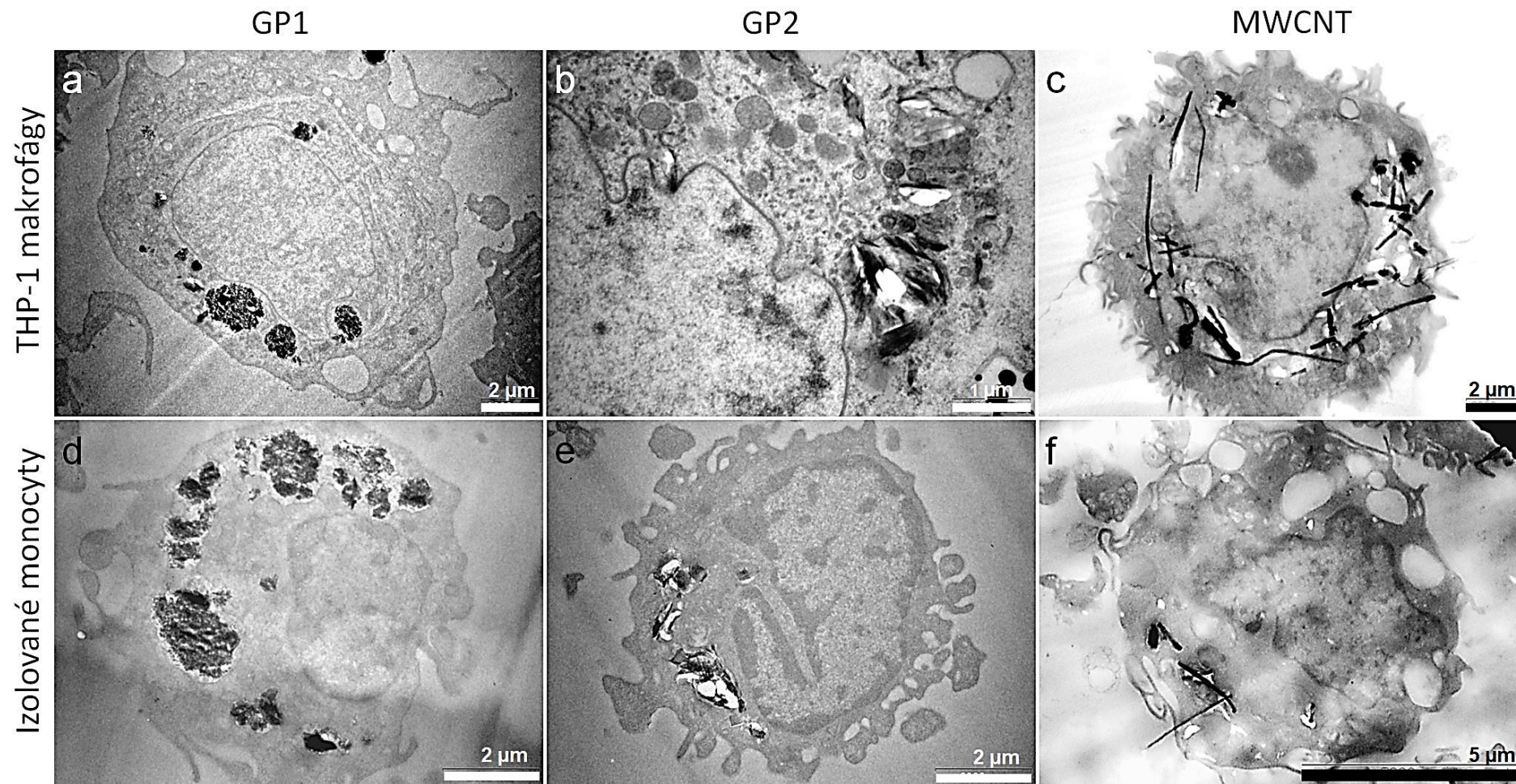
c



d

(Malkova et al., 2021; upraveno)

Monocyto-makrofágový systém: Morfologie



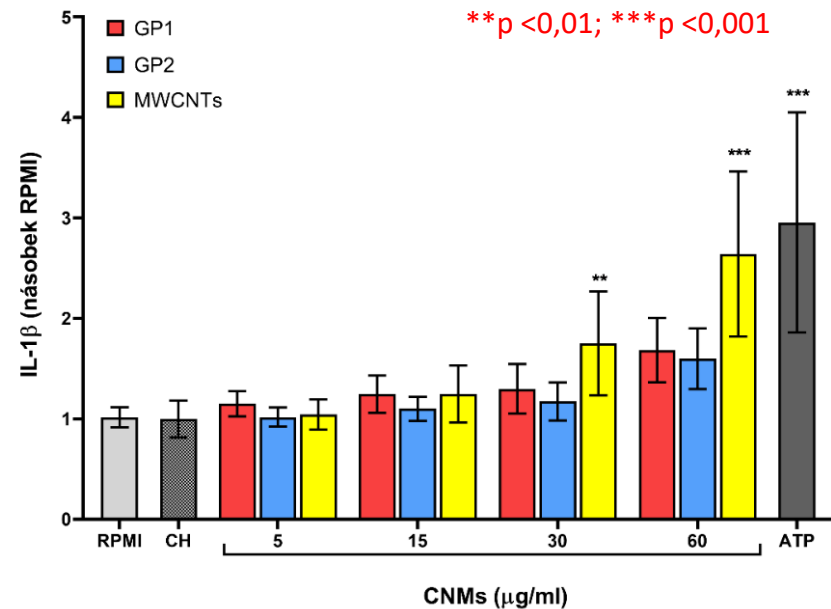
Monocyto-makrofágový systém: Akutní prozánětlivý efekt

THP1-null (stabilní exprese NLRP3, ASC a pro-kaspázy 1)

- Absence produkce IL-6, TNF- α , IL-10 po 24 i 48 h

Aktivace **NLRP3** kanonickou cestou

- Pouze po expozici MWCNTs

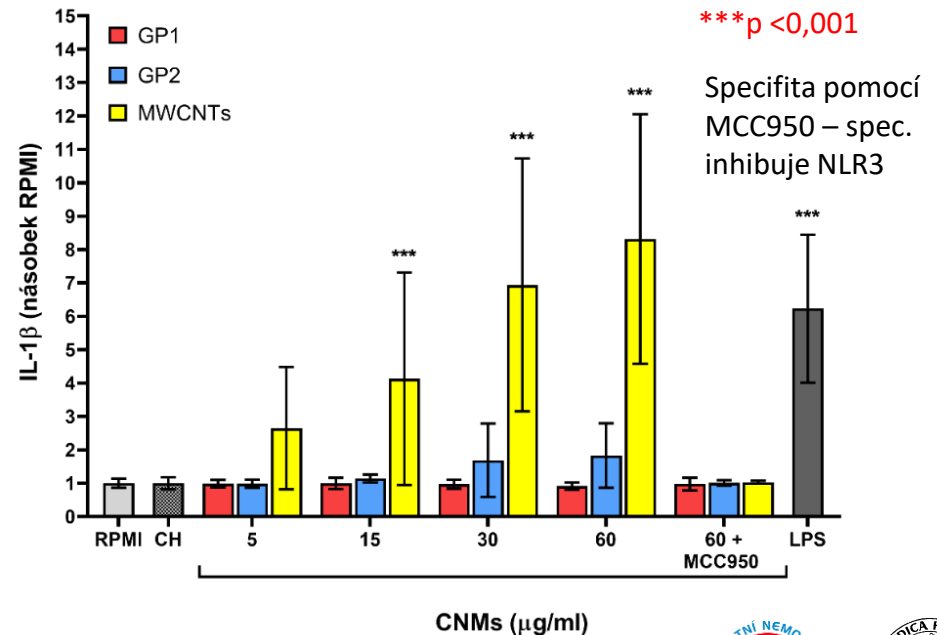


Primární monocyty

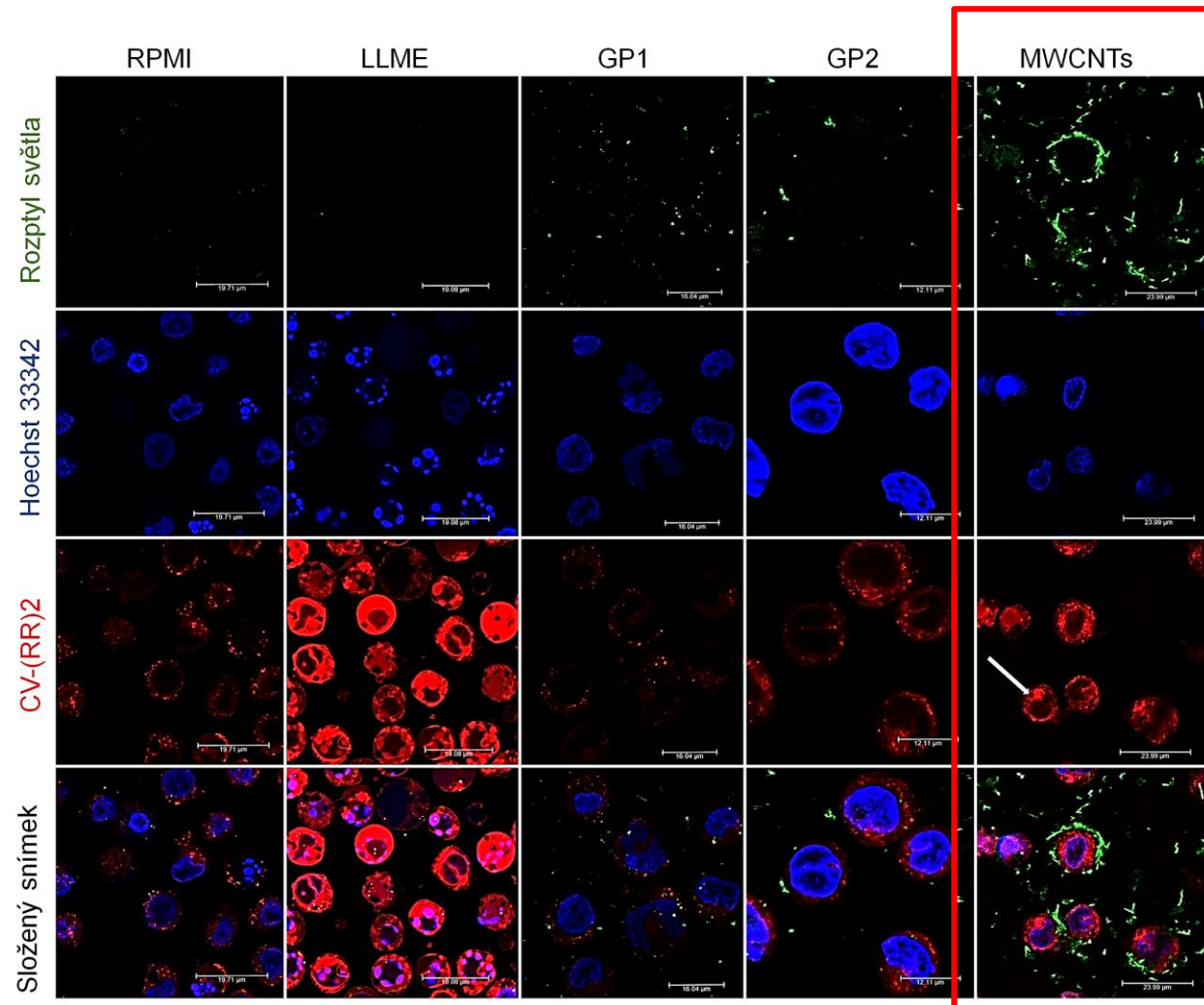
- Absence produkce IL-6, TNF- α , IL-10 po 24 i 48 h

Aktivace **NLRP3** alternativní cestou ?

- Produkce IL-1 β pouze po expozici MWCNTs

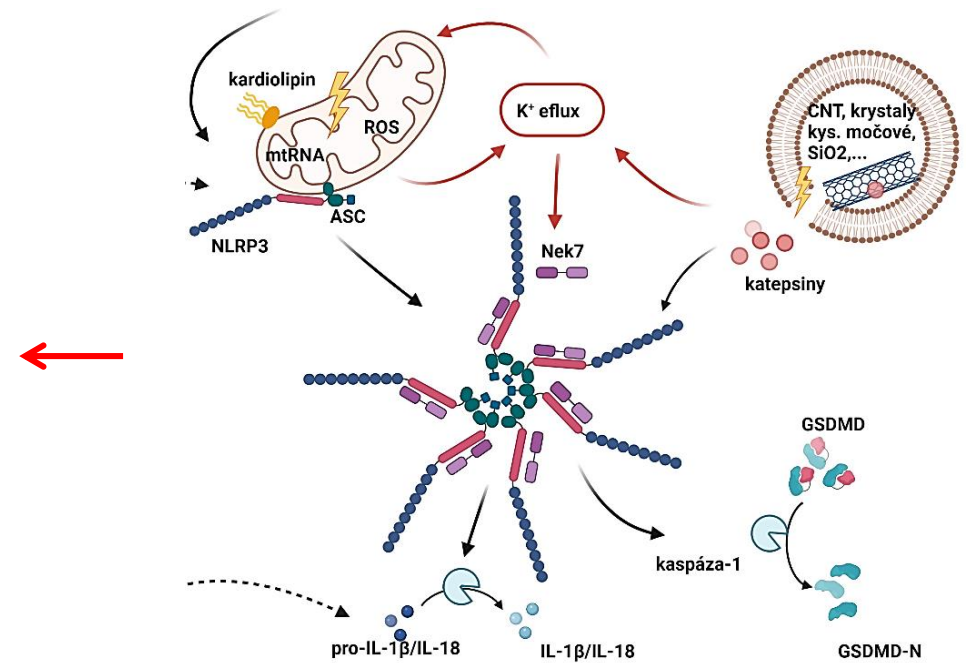


Monocyto-makrofágový systém: Akutní prozánětlivý efekt



Únik katepsinu B do cytoplazmy

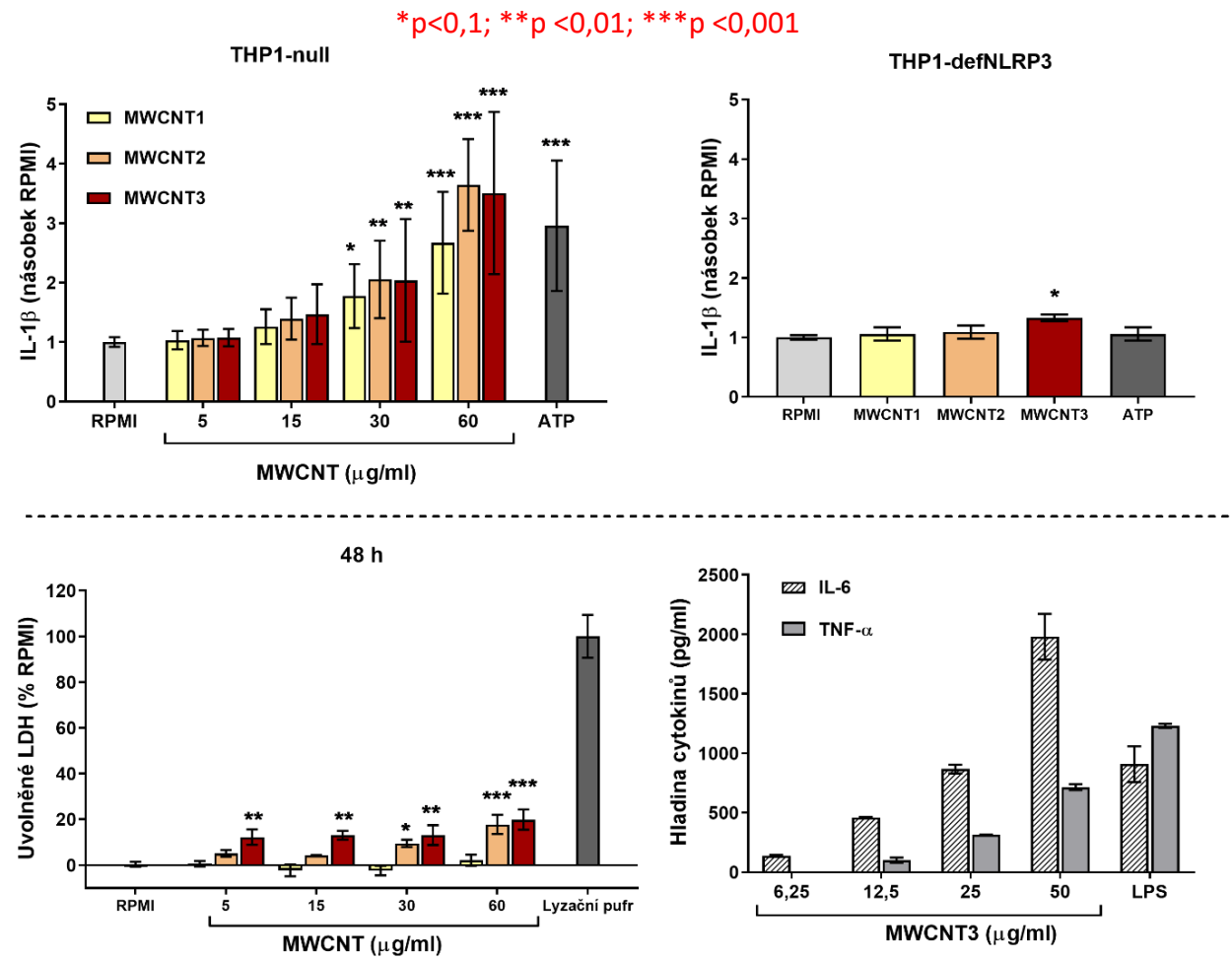
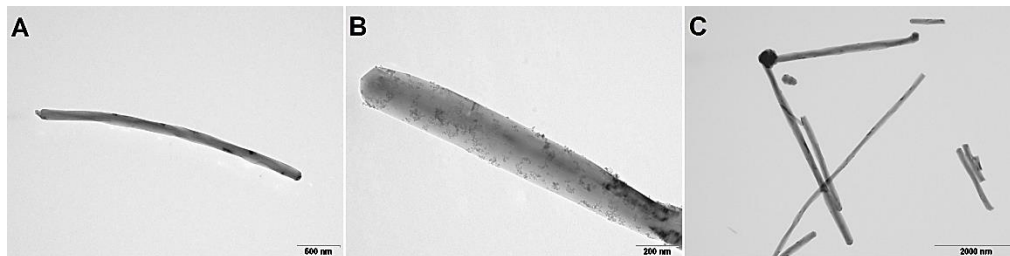
- Mechanismus aktivace NLRP3
- **MWCNTs**



Monocyto-makrofágový systém: Akutní prozánětlivý efekt

Klíčový význam NLRP3 pro hodnocení prozánětlivého efektu NMs

- Různý cytotoxický efekt u různě modifikovaných CNT
- IL-6 a TNF- α pozitivní pouze v 1 případě (MWCNT3 (c) - karboxylované)
- NLRP3 jako „univerzální senzor“

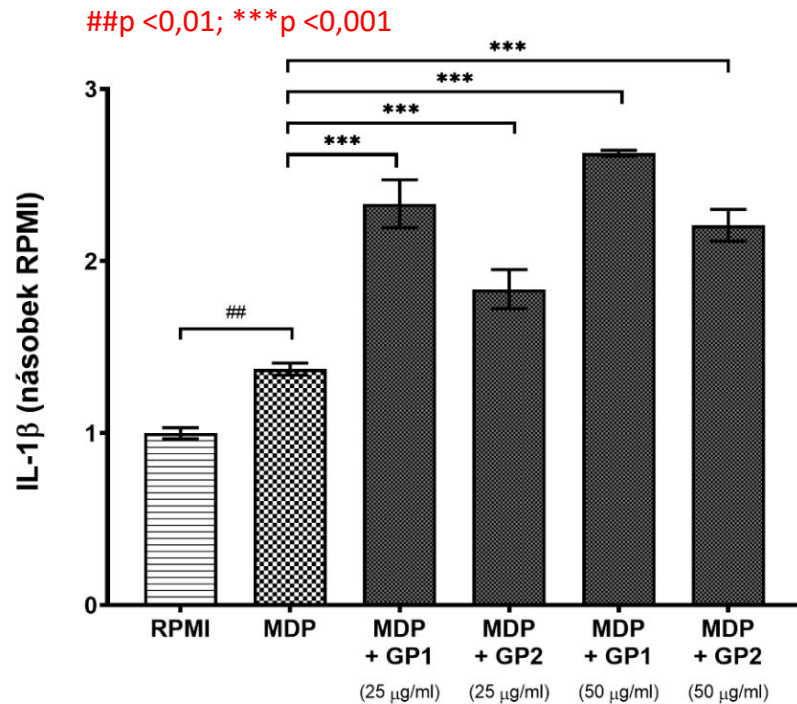


(Svadlakova et al., 2019; upraveno)

Monocyto-makrofágový systém: Modulační efekt

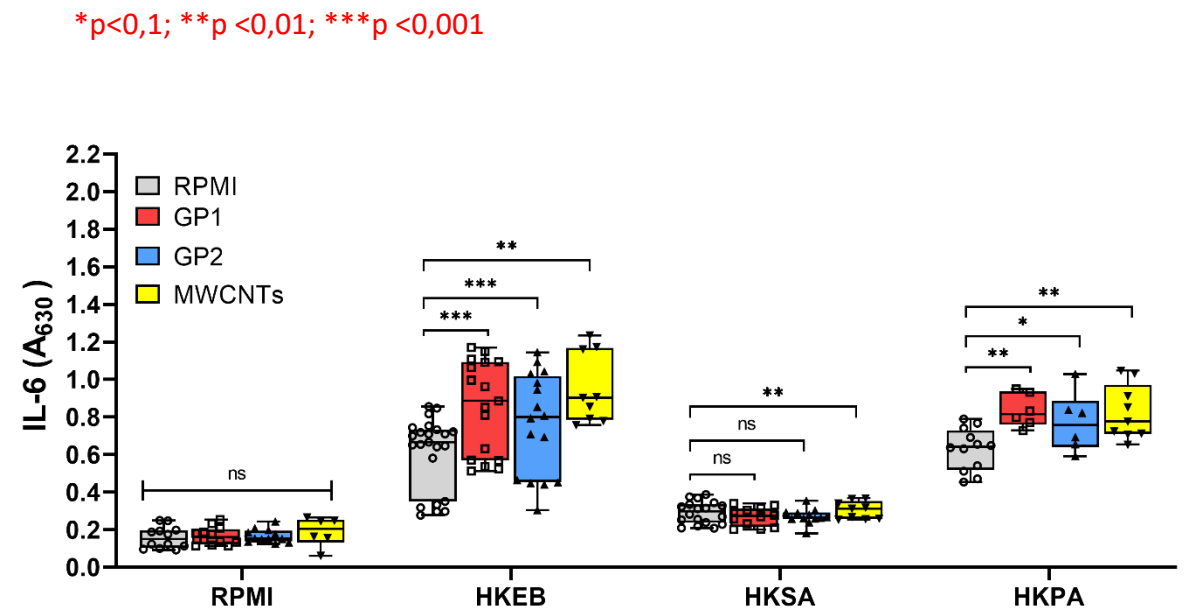
NLRP3 – akutní účinek

- Aditivní účinek muramyl dipeptidu (MDP) a GP
- Vyloučení případné inhibice



Modulace cytokinové odpovědi – IL-6, TNF α , IL-10

- Postexpoziční změna produkce vůči dalším stimulům (heat killed bacteria – *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*)

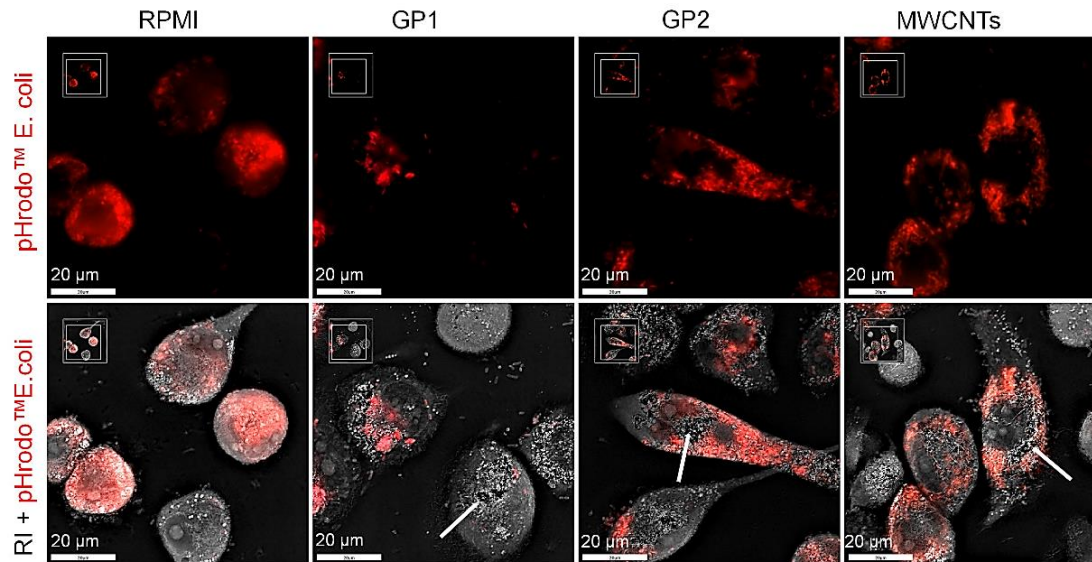


Monocyto-makrofágový systém: Modulační efekt

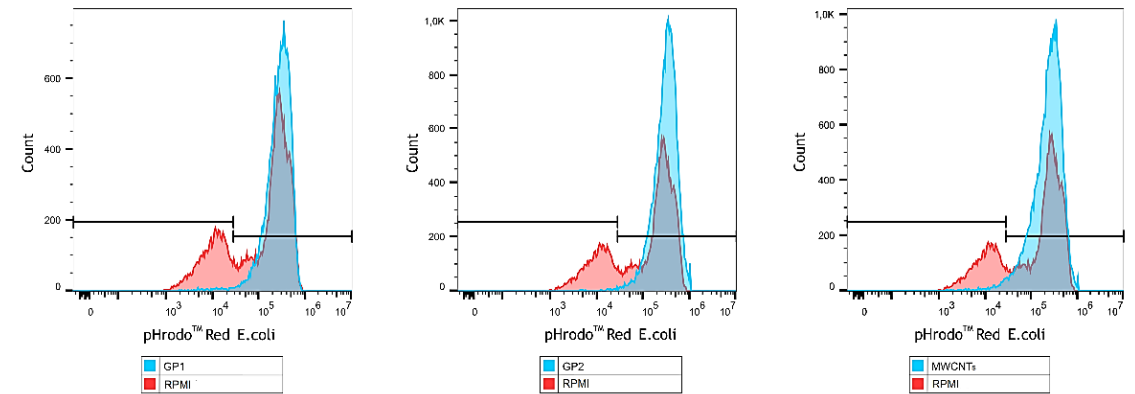
Fagocytóza

- Mírné postexpoziční snížení fagocytární aktivity (pHrodo[®] *E. coli*) u THP-1 makrofágů
- Významný rozdíl v celkovém počtu fagocytujících monocytů u RPMI kontroly (62 – 72 %) a exponovaných m. (82 – 99 %)

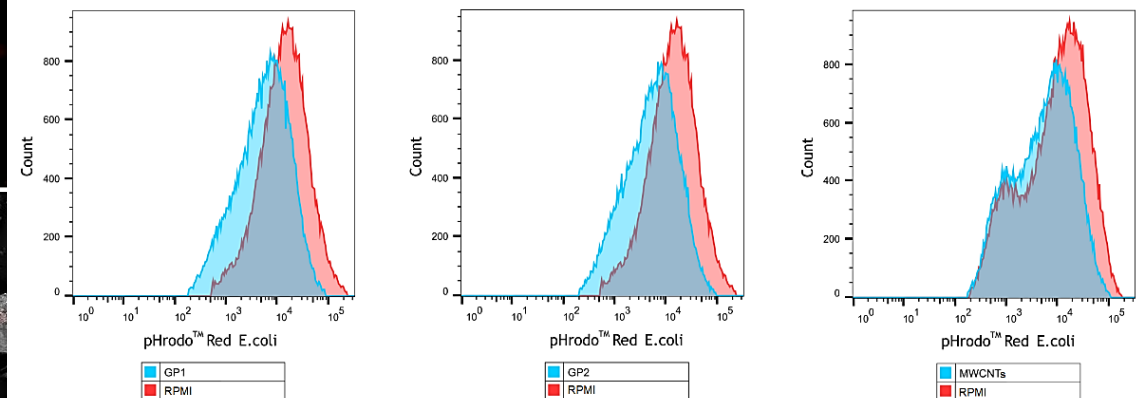
THP-1



Monocyty



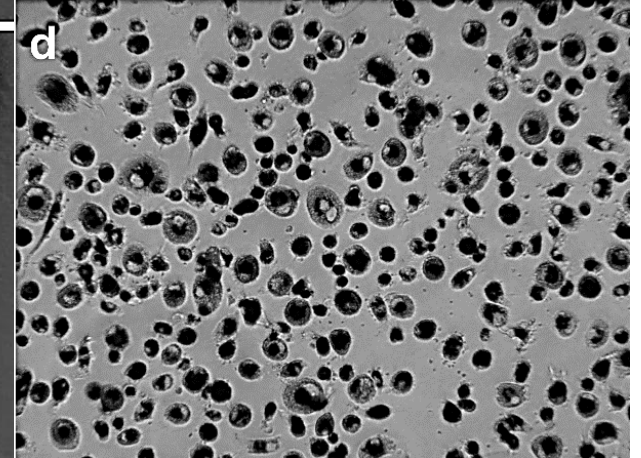
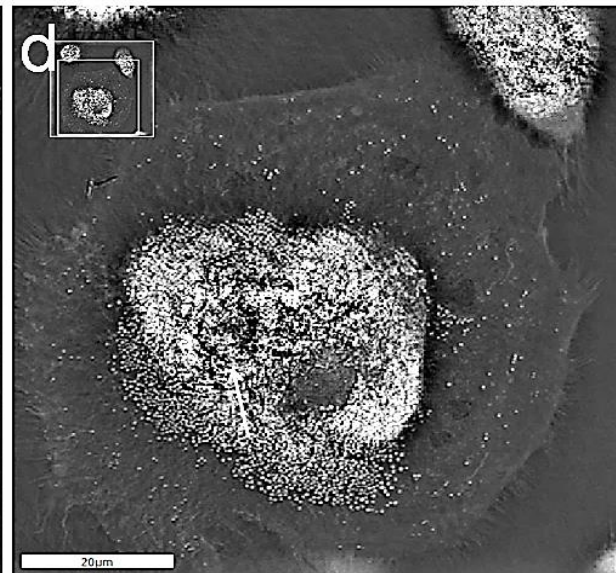
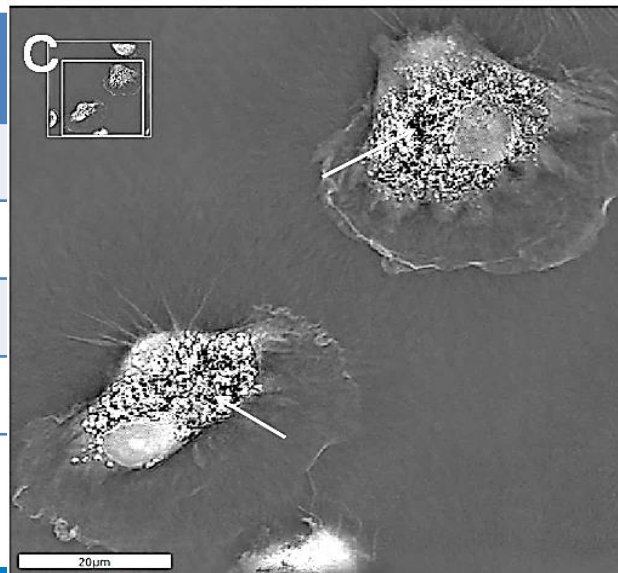
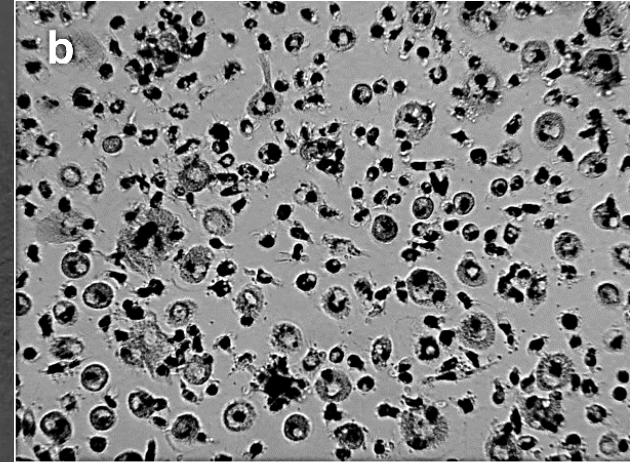
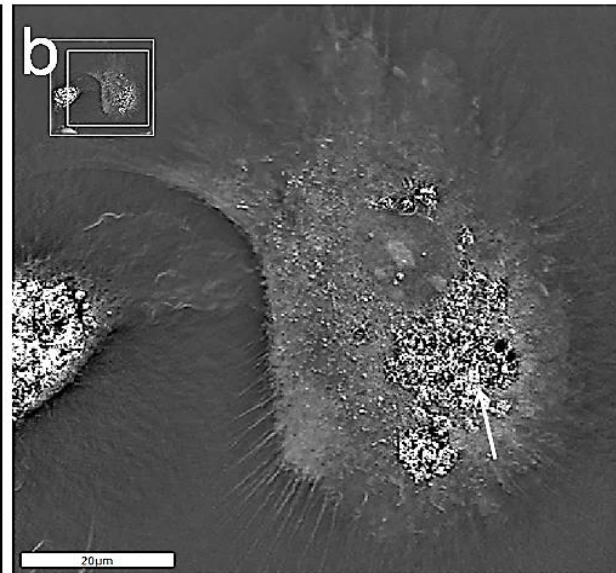
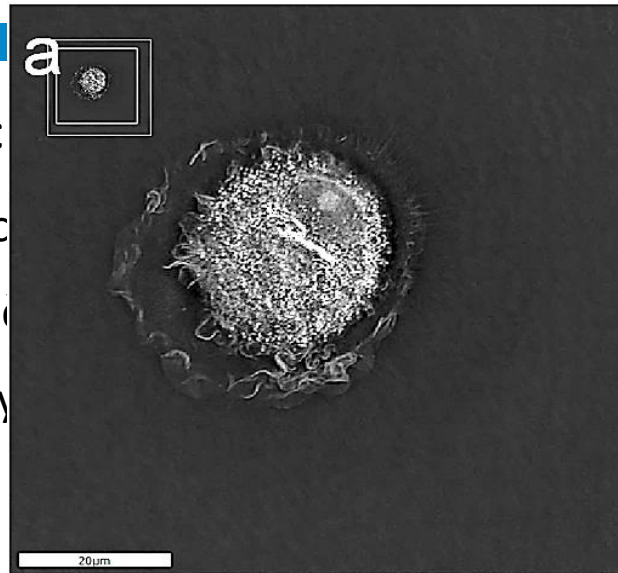
THP-1



Monocyto-makrofágový systém: Modulační efekt

Viabilita - diferenc

- Lepší přežití monoc
- Zahájení diferencia
morfologické změny
oproti (c) GP2 a (a)



	RPMI (a)
CD64	5,8
	7
CD163	2,6
	5,9

Závěry a limitace

Významný vliv použité buněčné linie – nádorové/primární

Významný vliv dělení buněk

Významný vliv velikosti a tvaru testovaných nanočástic, sterility

Nutnost individuální optimalizace dostupných metodik v závislosti na charakteru NMs



Reference

ŠVADLÁKOVÁ, Tereza. *Nanočástice a jejich vliv na imunitní systém: Studium prozánětlivého potenciálu vybraných karbonových nanomateriálů*. Dizertační práce, vedoucí Krejsek, Jan. Hradec Králové: Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Ústav klinické imunologie a alergologie, 2022.

SVADLAKOVA, T., M. KOLACKOVA, R. VANKOVA, R. KARAKALE, et al. Carbon-Based Nanomaterials Increase Reactivity of Primary Monocytes towards Various Bacteria and Modulate Their Differentiation into Macrophages. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* 2021, 11, 2510.

SVADLAKOVA, T., F. HUBATKA, P. TURANEK KNOTIGOVA, P. KULICH, et al. Proinflammatory Effect of Carbon-Based Nanomaterials: In Vitro Study on Stimulation of Inflammasome NLRP3 via Destabilisation of Lysosomes. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 2020, 10(3), 418.

MALKOVA, A., T. SVADLAKOVA, A. SINGH, M. KOLACKOVA et al. In Vitro Assessment of the Genotoxic Potential of Pristine Graphene Platelets. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* 2021, 11, 2210.

BAVOROVA, H., T. SVADLAKOVA, Z. FIALA, R. PISAL et al. The Dose- and Time-Dependent Cytotoxic Effect of Graphene Nanoplatelets: In Vitro and In Vivo Study. *Nanomaterials* 2022, 12(12), p, 1978.

SVADLAKOVA, T., F. HUBATKA, J. MASEK, P. KULICH, et al. Activation of NLRP3 inflammasome as a key indicator of carbon nanotubes proinflammatory potential. IUIS 2019, 19.–23. 10. 2019, Peking, Čína





Za řešitelský tým Ústavu klinické imunologie a alergologie a nadšené dárce monocytů

Děkuji za pozornost

www.fnhk.cz