

**Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava**

**Univerzitní studijní programy**

**Nanotechnologie**



Disertační práce

**Mikro a nanometrické částice v lidských nádorových a hypertrofických tkáních**

(Micro and nano-sized particles in human cancer and hypertrophic tissues)

**Mgr. Kristina Čabanová**

Školitel: doc. Mgr. Jana Kukutschová, Ph.D.

Studijní program: Nanotechnologie

Ostrava, 2017

# **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení: **Mgr. Kristina Čabanová**

Název disertační práce: **Mikro a nanometrické částice v lidských nádorových a hypertrofických tkáních**

Name of the doctoral thesis: Micro and nano-sized particles in human cancer and hypertrophic tissues

Fakulta: **Univerzitní studijní program**

Studijní program: **Nanotechnologie**

Školitel: **doc. Mgr. Jana Kukutschová, Ph.D.**

Rok obhajoby: **2017**

Klíčová slova: **lidské nádorové tkáně, lidské hypertrofické tkáně, Ramanova mikrospektroskopie, skenovací elektronová mikroskopie, částice kovů**

Keywords: human cancer tissue, human hypertrophic tissues, Raman microspectroscopy, scanning electron microscopy, metal-based particles

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat Mgr. Kateřině Dědkové, Ph.D. a Světlaně Kozubové za analýzy na skenovacím elektronovém mikroskopu, prof. Ing. Janě Seidlerové, CSc. za analýzu na atomovém absorpčním spektroskopu, Ing. Mgr. Kamile Hrabovské, Ph.D. za analýzu na vibračním magnetometru a Mgr. Oldřichu Motykovi, Ph.D. za pomoc se statistickým vyhodnocením. Dále bych pak chtěla poděkovat doc. MUDr. Janě Dvořáčkové, Ph.D., Mgr. Haně Bielníkové, prof. MUDr. Pavlu Komínkovi, Ph.D., MBA a MUDr. Lence Čábalové, z Fakultní nemocnice Ostrava, za dodání a zpracování vzorků. V neposlední řadě Mgr. Pavlíně Peikertové, Ph.D. a doc. Mgr. Janě Kukutschové, Ph.D. za odborné rady při psaní této práce. Tato práce vyšla za přispění projektu č. LO1203 "Regionální materiálově technologické výzkumné centrum - program realizovatelnosti" financovaný Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR a byla podporována projektem č. SP2017/75 (Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR).

### **Prohlášení**

Prohlašuji tímto, že jsem disertační práci vypracovala samostatně. Veškerou literaturu a ostatní prameny, z nichž jsem čerpala, řádně cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Ostravě 2. 10. 2017

Mgr. Kristina Čabanová



## Prohlášení o využití výsledků práce

Prohlašuji, že:

- jsem byla seznámena, že na moji disertační práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména § 35 – užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního a § 60 – školní dílo.
- beru na vědomí, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen „VŠB – TUO“) má právo nevýdělečně ke své vnitřní potřebě disertační práci užít (§ 35 odst. 3).
- souhlasím s tím, že disertační práce bude v elektronické podobě uložena v Ústřední knihovně VŠB – TUO k nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího diplomové práce. Souhlasím s tím, že údaje o kvalifikační práci budou zveřejněny v informačním systému VŠB – TUO.
- bylo sjednáno, že s VŠB – TUO v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona.
- bylo sjednáno, že užít své dílo – disertační práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB - TUO, která je oprávněná v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB – TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše).
- beru na vědomí, že odevzdáním své práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1988 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů, bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Ostravě dne 2. 10. 2017

.....

jméno a příjmení studenta

Zd. Štěpánka 1782/9, Ostrava 708 00

adresa trvalého pobytu studenta

## **Abstrakt**

Disertační práce pojednává o detekci mikro a nanometrických částic na bázi kovů v lidské hypertrofické tkáni z oblasti skořep nosních u pacientů s chronickou rýmou, v lidské nádorové plicní tkáni a v cytologických vzorcích sputa. Studované tkáně a tekutiny byly primárně charakterizovány metodou Ramanovy mikrospektroskopie, vybrané vzorky byly pak následně podrobeny analýze na skenovacím elektronovém mikroskopu, kdy zjištěné výsledky byly vyhodnoceny statistickými metodami. Navíc byl proveden odběr silničního prachu v závislosti na zatíženosti dopravy (2 lokality) v průběhu osmi měsíců, jakož možný potenciální zdroj částic zatěžující dýchací systém člověka. Těmito metodami se podařilo detekovat přítomnost pevných částic/shluků částic převážně na bázi kovů. Velká část z nich byla zjištěna ve velikosti pod 1  $\mu\text{m}$ . Mnohé z těchto částic/shluků částic patří svým chemickým složením podle IARC mezi agens „prokazatelně karcinogenní pro člověka“. Takto získané informace a postupy by mohly dále posloužit pro lékařskou praxi. Charakterizované metody detekce částic v lidské tkáni by se tak mohly výhledově stát součástí speciálního vyšetření u některých autoimunitních onemocnění nebo u nemocí, které byly diagnostikovány jako idiopatické, tedy vzniklé z neznámých příčin.

## **Abstract**

The doctoral thesis deals with the detection of micro and nano-sized metallic particles in human hypertrophic tissues from carrier beams in patients diagnosed with chronic rhinitis, human lung cancer tissues and cytological specimens of sputum. The studied tissues and fluids were first characterized by the Raman microspectroscopy method, the selected samples were then analyzed by scanning electron microscopy, where the results were evaluated by statistical methods. In addition, road dust was collected depending on the traffic load (2 locations) in eight months, and analyzed as a potential source of particulate matter entering human respiratory system. These methods were able to detect the presence of solid particles / particle aggregates predominantly metal-based. Many of these were found in a size below 1  $\mu\text{m}$ . Many of these particles / clusters of particles can be according to chemical composition classified by IARC as "probably carcinogenic to humans". The information and procedures thus obtained could further serve for medical practice. Characterized methods of particle detection in human tissues could thus prospectively become a part of a special examination in some autoimmune diseases or in diseases that have been diagnosed as idiopathic, resulting from unknown causes.

## Obsah

1. ÚVOD.....	9
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	11
2.1 Nanomateriály.....	11
2.2 Zdroje emitující nanomateriály do prostředí .....	15
2.3 Vliv nanomateriálů/nanočástic na organismus .....	20
2.4 Vstup nanočástic do organismu .....	21
2.5 Dýchací soustava .....	22
2.6 Osud nanočástice v organismu .....	26
2.7 Použití Ramanovy mikrospektroskopie v analýze tkání.....	35
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	40
3.1. Studované vzorky .....	40
3.1.1. Hypertrofická tkáň z oblasti skořep nosních.....	40
3.1.2. Vzorky hypertrofické tkáně – cytologické odběry sputa .....	41
3.1.3. Vzorky bronchogenních karcinomů (adenokarcinomy).....	42
3.1.4. Vzorky sedimentovaného prachu z cesty .....	42
3.2. Použité metody .....	44
3.2.1 Ramanova mikrospektroskopie.....	45
3.2.2 Skenovací elektronová mikroskopie .....	47
3.2.3 Atomová absorpční spektroskopie s elektrotermální atomizací .....	48
3.2.4 Měření magnetizačních křivek vzorků.....	48
3.2.5 Statistická analýza.....	49
4. VÝSLEDKY A DISKUZE .....	51
4.1 Hypertrofické tkáně z oblasti skořep nosní.....	51
4.2 Vyhodnocení souboru hypertrofických tkání .....	65
4.3 Vyhodnocení souboru cytologických odběrů sputa.....	71
4.4 Bronchogenní karcinomy - adenokarcinomy.....	74
4.5 Sedimentovaný prach z cesty.....	83
5. ZÁVĚR.....	89
6. BIBLIOGRAFIE .....	92
SEZNAM ZKRATEK.....	115
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	117
SEZNAM TABULEK.....	120
PŘÍLOHY .....	121
Příloha 1 .....	121

# 1. ÚVOD

Průmysl a doprava jsou antropogenními procesy, které se neustále vyvíjí a bez kterých je fungování lidstva již prakticky nemožné. Ovšem tento vývoj jde ruku v ruce s určitými environmentálními a zdravotními riziky. Právě doprava a lokálně také průmysl přispívají významnou měrou ke znečištění ovzduší prachovými částicemi. Mezi další zdroje patří ale také domácnosti. Z průmyslu zde patří především pyrometalurgie, chemický a energetický průmysl a spalovny odpadu. V dopravě se jedná o dieselové motory, které přispívají do ovzduší převážně elementárním uhlíkem (velikostně převážně pod  $1\mu\text{m}$ ). Ale také nespalovací procesy v dopravě značně přispívají svými emisemi prachových částic ke znečištění prostředí, zejména pak ovzduší. Patří sem především otěry pneumatik, vozovky a brzdové otěry. Všechny tyto frikční procesy jsou spojeny s uvolňováním otěrových částic do prostředí. Při velkém počtu vyprodukovaných frikčních kompozitů na světě je tedy otázkou, co a v jakém množství je uvolňováno při brzdění do svého okolí a jaký to může mít vliv na člověka. Větší částice sedimentují, ale ty malé zůstávají ve vzduchu, mohou putovat na velké vzdálenosti a přispívat tak ke kontaminaci většího území. Tyto částice jsou přímo v dýchací zóně člověka a jejich první cesta vstupu do lidského organismu může být právě přes dýchací cesty. Dlouhodobý vliv prachových částic, které se vyskytují v ovzduší, na člověka může být jednou z příčin vzniku nějakého z patologických stavů. V lidské populaci obecně přibývá onemocnění horních a dolních cest dýchacích, velmi často takových, u kterých není zcela známá příčina vzniku. Mnohé z těchto původně akutních onemocnění přechází do chronického stádia a způsobují tak pacientovi dlouhodobý diskomfort v běžném životě. Mohou mít za následek až vznik vážnějších patologických stavů, jakými jsou chronické rýmy, angíny nebo dokonce nádorová onemocnění. Obecně incidence nádorových onemocnění u člověka vzrůstá a to i přes zlepšující se zdravotnickou péči, zdravější životní styl a dostatek fyzické aktivity. Alarmující je především to, že se toto onemocnění velmi často týká osob v produktivním věku nebo dokonce malých dětí.

Cílem této práce bylo:

- 1) Zjistit přítomnost částic na bázi kovů v tkáních z různých částí dýchacího systému, pozměněných důsledkem nějakého patologického stavu.
- 2) Nalézt nejvhodnější způsoby úpravy biologického materiálu pro účely jednotlivých chemických a mikroskopických analýz.
- 3) Použitím vybraných a hlavně dostupných metod stanovit chemické a fázové složení těchto detekovaných částic a jejich velikost.
- 4) Identifikace možného rizika v souvislosti s přítomností detekovaných látek v resuspendovaném silničním prachu z povrchu cesty, který se podílí na každodenní expozici člověka v oblastech s vyšší hustotou silniční dopravy.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

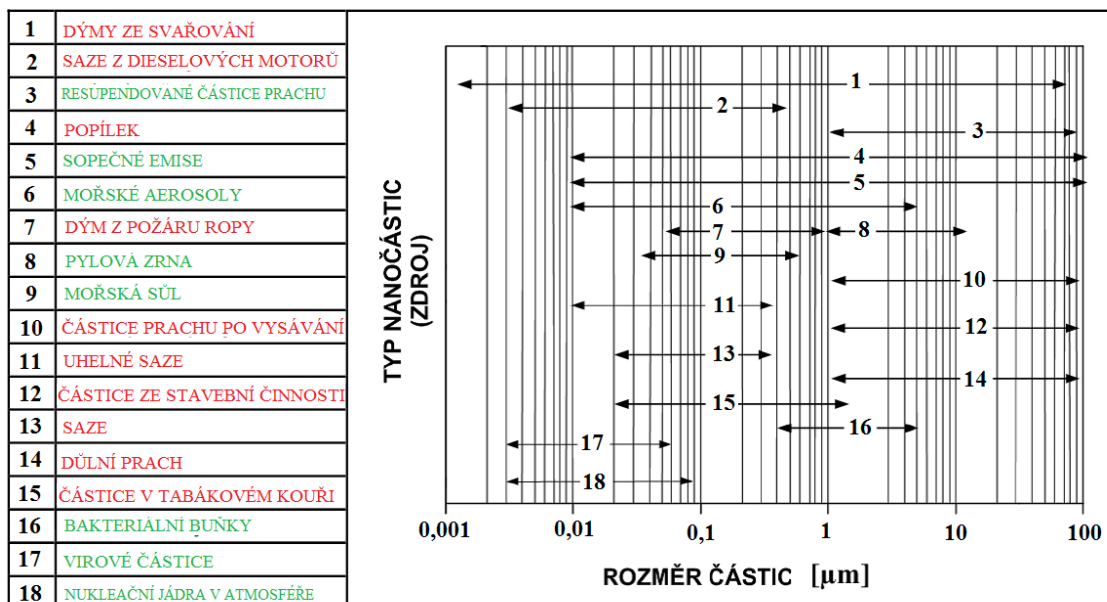
### 2.1 Nanomateriály

Nanomateriály, neboli materiály tvořené částicemi nebo objekty, jejichž rozměry se pohybují v řádech nanometrů, se od materiálů s většími částicemi odlišují svými charakteristickými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Mezinárodní organizace pro normalizaci (ASTM) definuje termín ~nanomateriál~ jako „materiál s jakýmikoliv vnějšími rozměry velikosti v řádu nanometrů nebo s vnitřní strukturou nebo povrchovou strukturou v řádu nanometrů“. Pojem velikost v řádu nanometrů~ je definován jako velikostní rozpětí obvykle od 1 nm do 100 nm [1]. Přestože je nanomateriál takto definován, mnohé materiály, které nespĺňují toto velikostní rozpětí, mohou být díky svým unikátním vlastnostem zařazeny pod nanomateriály. Důležitými parametry, které činí nanomateriály specifickými jsou nejen velikost částic, ale také velikost povrchu částic s tím související reaktivita a také i samotné chemické složení. Dle doporučení Evropské komise ze dne 18. října 2011 se nanomateriálem rozumí přírodní materiál, materiál vzniklý jako vedlejší produkt nebo materiál cíleně vyrobený obsahující izolované částice nebo jako agregát či aglomerát, ve kterém je u 50 % nebo více částic ve velikostním rozdělení jeden nebo více vnějších rozměrů v rozmezí velikosti obvykle 1–100 nm. Ve zvláštních případech a opravňují-li k tomu obavy týkající se životního prostředí, zdraví, bezpečnosti nebo konkurenceschopnosti, může být hranice 50 % ve velikostním rozdělení nahrazena hranicí mezi 1 a 50 % [1,2].

*Nanomateriály lze rozdělit dle několika hledisek:*

#### **a) Podle původu:**

- Přírodní nanomateriály – zdrojem je převážně vulkanická činnost a požáry. Přírodní nanomateriály jsou také v jemném mořském aerosolu, písku a půdních koloidech. Jako částice v rozměrech „nano“ se také vyskytují viry, DNA, proteiny, pyl, aj. [3,4], (obrázek 1).
- Nanomateriály vzniklé jako vedlejší produkt – většinou prostřednictvím antropogenních činností, jako jsou spalovací procesy, pyrometalurgie, doprava, svařování, grilování, kouření a další (obrázek 1). Tyto „antropogenní“ nanomateriály nemají zcela definovanou velikost a ne vždy je známo jejich přesné chemické složení [5].



Obrázek 1: Orientační velikostní rozmezí částic přírodního (zeleně) a antropogenního původu (červeně), převzato a upraveno podle [6]

- Cíleně připravené nanomateriály (angl. engineered) – mohou se uvolňovat do prostředí při jejich cílené přípravě, ale také během jejich používání či likvidaci konečných produktů spotřebitelem. Patří zde výroba elektroniky, obalových hmot, pigmentů, kosmetických produktů, léčiv, potravin a textilií. U těchto nanomateriálů je většinou definovaná velikost i složení [5]. Jejich produkce se každým rokem zvyšuje a převyšuje množství několik tun ročně. Skutečné množství světových produkčních objemů nanomateriálů není možné jednoznačně určit, je tedy velmi těžké zjistit, jaké je přesné zatížení životního prostředí těmito nanomateriály [6,7].

#### b) Podle tvaru:

**Nanočástice** - (angl. Nanoparticles, NPs) vykazují ve všech rovinách velikost částic obvykle pod 100 nm, tedy v měřítku  $1 \cdot 10^{-9}$  m a vykazují odlišné vlastnosti než částice větších rozměrů (chemická reaktivita, rozpustnost) [6]. Nanočástice jsou také pravděpodobně nejhojněji se vyskytujícími nanomateriály v prostředí.

**Kvantové tečky** - (angl. quantum dots, QD) jsou polovodivé nanokrystaly o velikosti několika nanometrů. Mohou existovat buď samostatně, nebo mohou být uspořádány do klastrů. Nejčastější je uspořádání, kdy jeden typ polovodiče vytváří jádro QD (core, např. CdSe) a několik vrstev atomů druhého typu polovodiče vytváří obal kolem tohoto jádra (shell, např. ZnS). QD tohoto typu se označují jako „core/shell“ struktury [8].



**Nanovlákná** - (angl. nanofibers) se vyznačují tloušťkou v rozmezí 10 – 100 nm, jejich délka je zpravidla o dva a více řádů vyšší. Dá se říci, že představují spojení mezi světem částic s rozměry v nanometrech s oblastmi běžných mikronových a větších celků [9,10]. Nanovlákná se v praxi téměř nikdy nevyskytují samostatně, ale jsou uspořádána do vyšších strukturních a prostorových celků, se kterými lze reálně manipulovat [11].

**Fullerény** - (angl. fullerenes) jsou molekuly tvořené atomy elementárního uhlíku mající uzavřenou strukturu. Stěny této struktury tvoří pravidelné pěti- a šestiúhelníky. Tyto struktury se též nazývají klastry. Stabilní jsou pouze ty fullerény, u nichž se ve struktuře nenacházejí žádné dva pětiúhelníky vedle sebe. Nejmenším stabilním klastrem je fullerén C<sub>60</sub> [12,13].

**Nanotrubičky** - (angl. carbon nanotubes) jsou podlouhlé útvary, jejichž stěny jsou tvořeny atomy uhlíku (podobná kulovitým fullerénům) o průměru 1 až 100 nm a o délce do 100 μm. Mohou být jedno- či vícevrstevné. Mají velkou pevnost v tahu, vysokou elektrickou i tepelnou vodivost, vysokou tepelnou odolnost a vysokou mechanickou poddajnost [12,14].

Toto základní dělení pak doplňují mnohé další, již existující a popsané struktury nanomateriálů, např. nanopráškové materiály, grafenové vločky, nanovrstvy, nanopovlaky, polymerní nanokompozity, polymerní nanomateriály, a další [2,15].

Nanočástice se mohou vyskytovat jako jednotlivé částice, či agregáty a aglomeráty, kdy z pohledu definice se částicí „rozumí malá část hmoty s definovanými fyzikálními hranicemi“, aglomerátem se pak rozumí „shluk slabě vázaných částic nebo agregátů, jejichž výsledný vnější povrch je podobný součtu povrchů jednotlivých složek“ a agregátem „se rozumí částice složená z pevně vázaných nebo sloučených částic“ [1].

Jako pevné (prachové) částice, neboli PM (angl. particulate matter) se označují částice, které jsou díky své malé hmotnosti z velké části rozptýlené ve vzduchu. Tyto částice jsou hodnoceny podle jejich velikosti a to do jisté míry umožňuje odhadnout jejich původ, transport a následný osud v ovzduší a také jejich případnou depozici v organismu (převážně v plicích), dojde-li k jejich průniku do organismu. Velikost částic PM se pohybuje v rozsahu 5ti řádů od několika nanometrů do 100 μm. V oboru environmentálních věd a také oboru tzv. „aerosol science“ lze částice rozdělit do následujících velikostních frakcí podle jejich chování v prostředí a schopnosti průniku do respiračního traktu člověka:

- **Hrubé** (angl. coarse) prachové částice o aerodynamickém průměru od 2,5 do 10 μm (PM<sub>2,5-10</sub>). Tyto částice mohou pronikat do horních částí dýchacích cest a plic [16,17].
- **Jemné částice** (angl. fine particles, FP) částice s aerodynamickým průměrem ≤ 2,5 μm (PM<sub>2,5</sub>). Při vdechnutí tyto jemné částice pronikají hlouběji do plic a mohou

se tak dostat až do alveolárních oblastí plic [16,17].

- Za **ultrajemné částice** (angl. ultrafine particles, UFP) jsou považovány částice s aerodynamickým průměrem menším než 100 nm. Přispívají jen málo k celkové hmotnosti PM v ovzduší, ale početně představují většinu celkového počtu částic a většinu jejich souhrnné povrchové plochy [18]. Podle Hindse (1999) tvoří UFP více než 85% celkového počtu PM<sub>2.5</sub>. Jsou rozlišovány dvě velikostní kategorie ultrajemných částic: 1) nukleační mód, neboli částice o velikosti pod 30 nm a 2) Aitkenův mód, neboli částice o velikostech cca 20 - 100 nm [18].

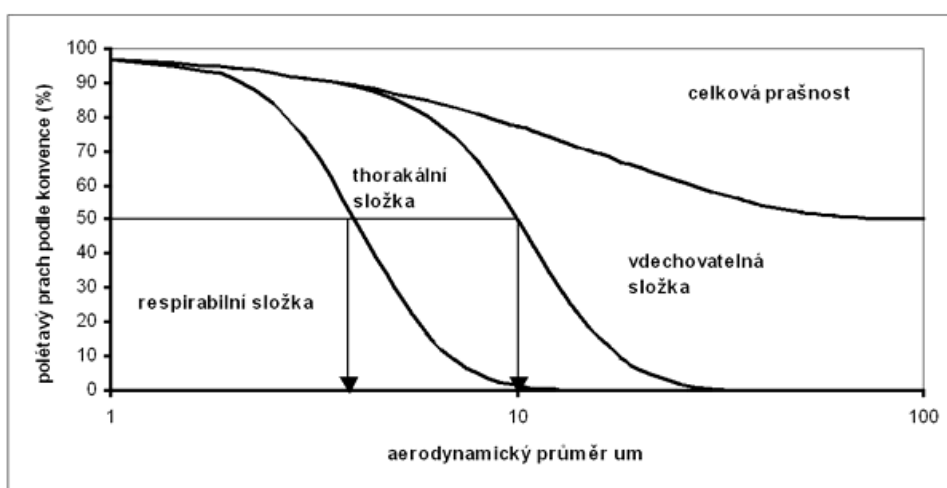
Větší částice vznikají obvykle koagulací, aglomerací, akumulací či kondenzací částic menších [19]. Přehled velikostí částic, které mohou vznikat přírodní cestou, nebo antropogenní činností je uveden na obrázku 1.

Podle jednotlivých oblastí respiračního traktu, do kterých jsou dané velikosti částic schopny proniknout, rozlišujeme několik velikostních frakcí (obrázek 2):

**Inhalovatelná** (angl. inhalable) frakce (< 100  $\mu\text{m}$ ) - částice, které jsou schopny vstoupit do dýchacího traktu nosem nebo ústy.

**Thorakální** (angl. thoracic) frakce (< 10  $\mu\text{m}$ ) - částice, které mohou po vdechnutí pronikat až za hrtan.

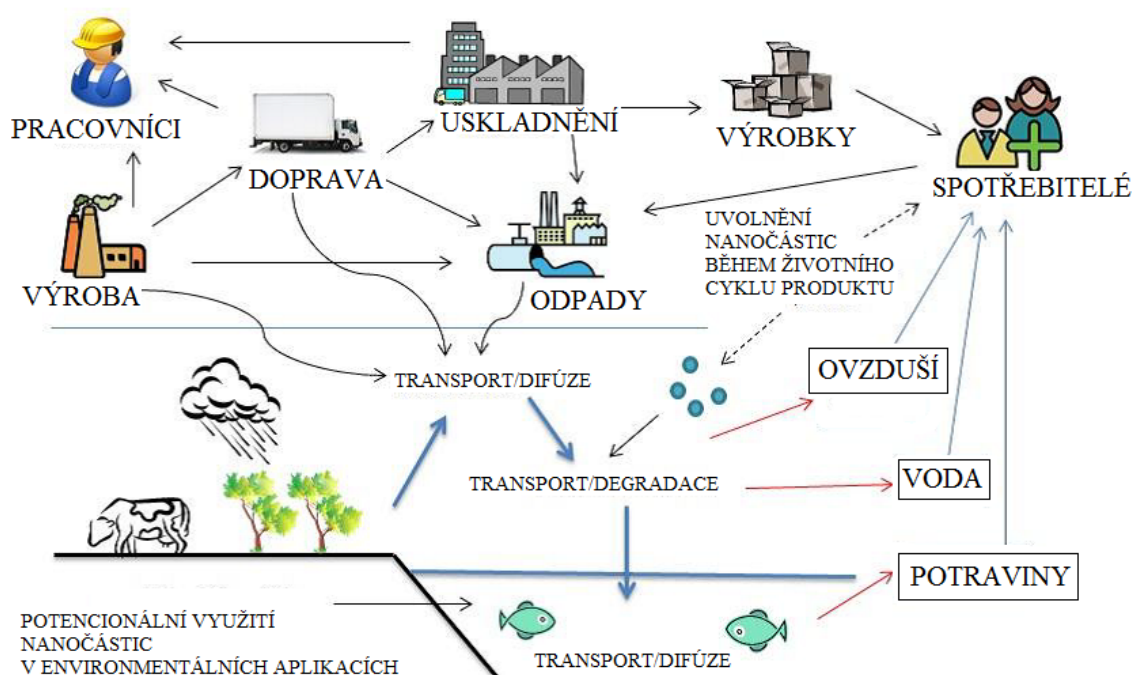
**Respirabilní** (angl. respirable) frakce (< 5  $\mu\text{m}$ ) - částice, které mohou po vdechnutí pronikat do dýchacích cest, kde již není řasinkový epitel a mohou být transportovány až do alveolární části plic, tj. do plicních sklípků [6,20,21].



Obrázek 2: Vdechovatelná, thorakální a respirabilní konvence, znázorněna jako procenta z polétavého prachu. Z grafu vyplývá, že 50% polétavého prachu s průměrem  $D = 10 \mu\text{m}$  je v thorakální frakci a 50 % polétavého prachu s průměrem  $D = 4 \mu\text{m}$  je v respirabilní frakci, převzato z [20].

## 2.2 Zdroje emitující nanomateriály do prostředí

Jak již bylo zmíněno, jedním z důležitých faktorů ovlivňujících případná environmentální rizika nanočástic jsou zdroje, ze kterých se mohou nanočástice do prostředí uvolňovat. Může to být prostřednictvím přirozených přírodních procesů, jako jsou mořský příboj, písečné bouře, vulkanické erupce, požáry apod. [12], tak jako vedlejší produkty při nejrůznějších antropogenních procesech a rovněž cíleně připravené nanočástice/nanomateriály se mohou do prostředí uvolňovat v kterékoliv fázi svého životního cyklu [7]. Z obrázku 3 je patrné, že nanočástice/nanomateriály se mohou uvolňovat do prostředí při procesech výroby, přepravy, i při samotném kontaktu spotřebitele s produkty, ale také při likvidaci produktů, které nanočástice obsahují (např. skládkování nebo spalování). Tedy k přímému kontaktu s lidským organismem může dojít téměř ve všech fázích životního cyklu nanočástic/nanomateriálů. V rámci hodnocení možných environmentálních rizik a ekotoxicity je nutno rovněž brát zřetel na kontakt nanočástic/nanomateriálů v jednotlivých fázích s ostatními živými organismy.



Obrázek 3: Životní cyklus nanomateriálů/nanočástic v životním prostředí, upraveno podle [12].

Mezi antropogenní činnosti, které produkují relativně velké množství nanočástic patří bezesporu pyrometalurgie (zpracování rudy, výroba železa, zpracování železa), skládkování jemnozrnného odpadu, spalování fosilních paliv a další vysokoteplotní procesy [22]. Především Ostravsko je v rámci ČR významnou průmyslovou oblastí, kde se s těmito zdroji mikro- a nanometrických částic lze setkat. Dalo by se říci, že tyto průmyslové zdroje jsou

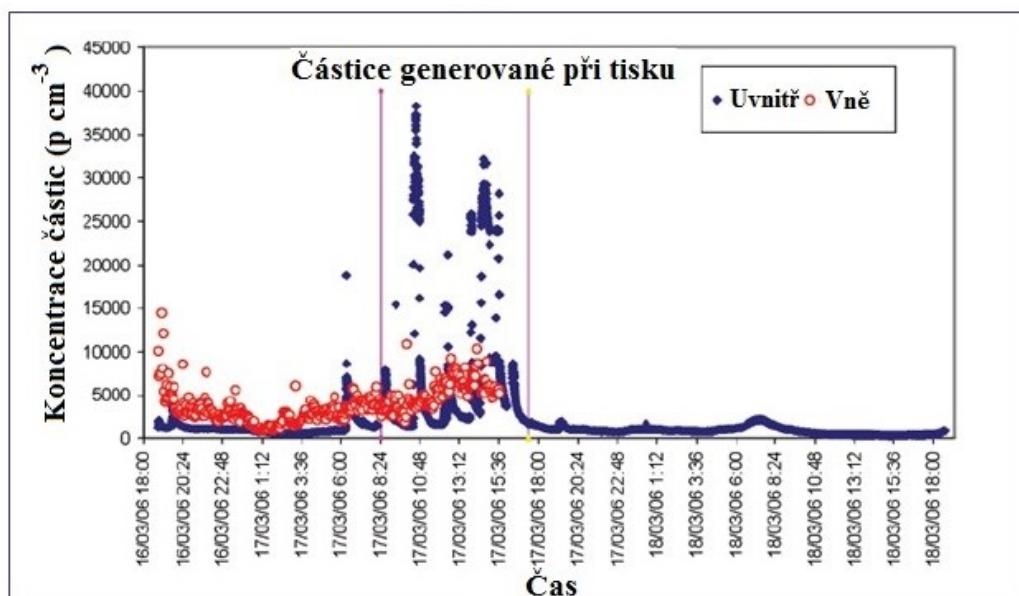
spíše stacionárního charakteru, je proto možná relativní evidence a regulace množství emitovaných nanočástic. Naopak doprava, která je dalším významným zdrojem emisí nanočástic, je mobilního charakteru, a proto je skutečné množství emitovaných nanočástic do prostředí velmi obtížně kontrolovatelné [6]. Silniční doprava, především v městských oblastech, je zdrojem částic, které se vyskytují v širokém spektru objemů, hmotností i velikostí [23-25]. Mnohé studie ukazují, že koncentrace počtu částic významně narůstá právě na rušných silnicích a prudce klesá se zvyšující se vzdáleností od silnice [26-29]. Je známo, že diesellové motory emitují do ovzduší elementární uhlík ve formě sazí o velikostech okolo 50 nm [6,30]. Bylo ovšem už také prokázáno, že prostřednictvím brzdění automobilů vznikají otěrem brzdových desek o brzdový kotouč nanočástice ve velikostech od 20 nm. Majoritní složkou těchto částic jsou převážně saze a oxidy železa, ale i další kovové materiály [31]. Současně při brzdění automobilů dochází také k otěrům pneumatik o povrch vozovky, kdy vznikají částice ve velikostech od 6 nm. Tyto částice jsou komplexem látek, převážně sloučenin zinku, organických polymerů, ale také kovů, jako jsou Li, Na, Ca, Fe a Ti [32]. Tyto všechny uvedené produkované částice jsou součástí sedimentovaného silničního prachu.

### ***Sedimentovaný silniční prach***

Tento prach patří mezi komplexy látek o nehomogenním složení, které se pravděpodobně dostávají do lidského organismu, a mohou tak způsobovat jeho poškození. Silniční prach se nalézá na povrchu téměř všech silnic a jedná se chemicky o směs kovů a jejich sloučenin, elementárního uhlíku, minerálních látek a organických látek [33,34]. Konkrétní zdroje silničního prachu jsou rozmanité a jsou velmi obtížně identifikovatelné, lze je však rozdělit do dvou základních kategorií: přírodní a antropogenní. Mezi přírodní zdroje patří především přítomné okolní půdy a organické zbytky z těl zvířat a rostlin. Zatímco antropogenní lze rozdělit na stacionární zdroje (tepelné elektrárny, průmysl, stavební a demoliční činnost, spalování odpadů a lokální vytápění) a mobilní zdroje, jako je automobilová doprava [35,36]. Podle mnoha studií jsou nejvíce zastoupenými prvky v silničním prachu Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Sb, Sn, Sr, Ti, Zn a Zr [34,37-42]. Oblasti s největším ekologickým zatížením, pokud jde o sedimentovaný prach, jsou větší města nebo města s přítomností průmyslu. Bylo provedeno několik studií s cílem posoudit složení silničního prachu, a tím i provést identifikaci zdrojů znečištění. Kromě produktů spalovacích procesů přispívá doprava k složení silničního prachu především prostřednictvím opotřebení pneumatik a brzd, jakož i opotřebení povrchu vozovky [35,42,43]. V současné době je věnována nemalá pozornost částicím, které vznikají při opotřebení brzd a jejich vlivu na životní prostředí. V současné době se využívá stále více kotoučových brzd na obou nápravách

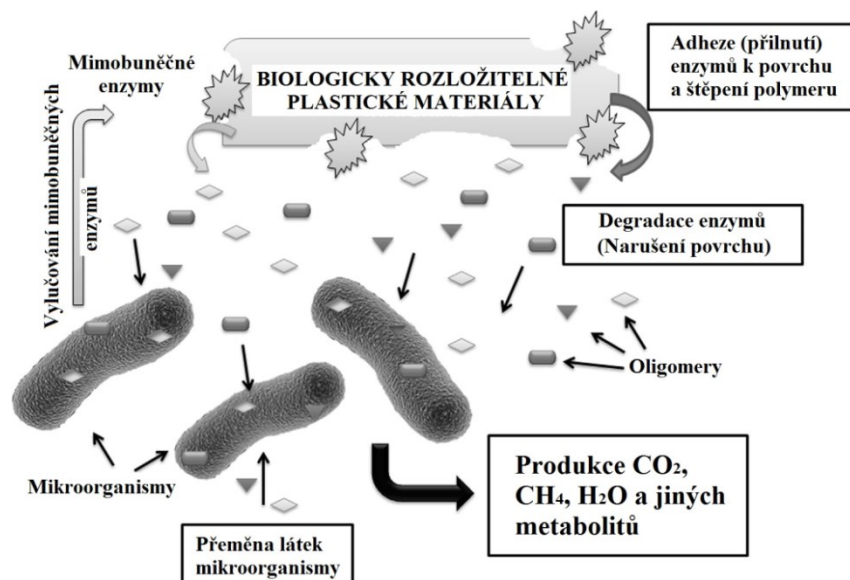
vozidel, než původních bubnových brzd na zadní nápravě, a to převážně kvůli jejich vyšší účinnosti [44]. Rozdíl mezi nimi je mimo jiné také v uvolňování částic vznikajících otěrem složek brzdového systému (bubnové brzdy udržují otěrové částice vzniklé opotřebením uzavřené uvnitř bubnu brzdy, zatímco částice vzniklé otěrem kotoučových brzd jsou uvolňovány přímo do prostředí). Kukutschova a kol. (2011) a Garg a kol. (2000) uvádějí, že úbytek hmotnosti brzdové desky je uvolňován ve formě aerosolu (průměr 35%), který je z 63% složen z částic o průměrné velikosti pod 10  $\mu\text{m}$  [31,45]. Sanders a kol. (2003) zjistili, že během laboratorního testu na dynamometru 50% generovaných otěrových částic pocházejících z brzdového obložení, putovalo do ovzduší [46]. Existují studie, které se zaměřují na charakterizaci sedimentovaného silničního prachu. Například podle Gunawardany a kol. (2012) silniční prach z povrchu silnic v jihovýchodním Queenslandu (městská oblast v Austrálii) je složen ze směsi minerálních sloučenin (cca 60%), organických látek (asi 2%) a potenciálně toxických znečišťujících látek (cca 30%) - Cd, Cr, Cu, Ni, Pb a Zn [38]. Také byly provedeny studie zaměřené na stanovení složení silničního prachu na silnicích, které se od sebe lišily objemem dopravy [39,47]. Tyto studie však nezohledňovaly možné sezónní výkyvy obsahu těžkých kovů. V České republice, konkrétně v Ostravě, byla již provedena předběžná studie zaměřená na chemické a fázové analýzy silničního prachu [33].

Nejen průmysl a doprava jsou známými zdroji nanočástic, nanočástice se uvolňují také při každodenních lidských činnostech. Z mnoha lze vybrat například grilování a smažení potravin, kdy při těchto běžných činnostech jsou uvolňovány částice pod 100 nm. Největší množství emitovaných nanočástic popsal Buonanno a kol. (2009) při grilování klobás a slaniny, méně při grilování potravin s nižším obsahem tuku a při srovnání různých druhů olejů byly emise nanočástic nejvyšší při smažení na olivovém oleji [34]. Také bylo prokázáno, že při používání sušiček se uvolňují do prostředí částice ve velikostech od 10 do 100 nm [35]. Také laserové tiskárny mohou emitovat při tisku nanočástice (obrázek 4) [36]. Na obrázku 4 lze pozorovat nárůst koncentrace částic během tisku ve srovnání s venkovním prostředím. Z těchto křivek je patrné, že laserové tiskárny jsou potenciálním zdrojem emisí nanometrických částic.



Obrázek 4 : Koncentrace nanočástic emitovaných v kanceláři během provozu laserové tiskárny ve srovnání s koncentrací ve vnějším prostředí, ( $p \cdot \text{cm}^{-3}$ - počet částic na  $\text{cm}^{-3}$ ), upraveno podle [36].

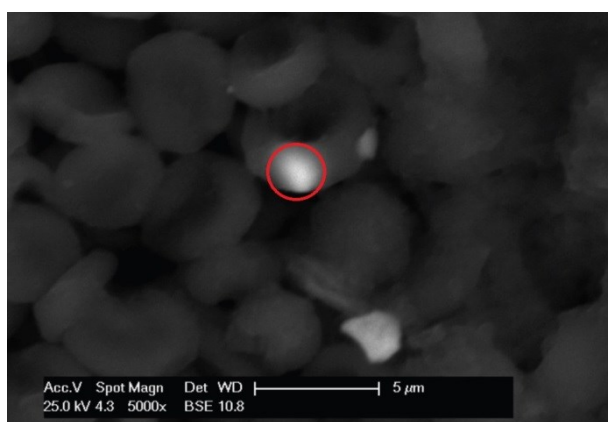
Velká škála a také množství nanomateriálů je však v poslední době cíleně připravováno pro účely různých aplikací. Syntetické nanomateriály jsou například přidávány do obalových hmot, kosmetických přípravků a léčiv, převážně z důvodu zlepšení kvality a trvanlivosti produktu. Mnohé studie však upozorňují na potřebu hlubšího výzkumu právě v této oblasti využití nanomateriálů. V případě obalových materiálů je především poukazováno na nedostatek informací z hlediska možné migrace nanočástic z obalů do potravin a z toho plynoucí nedostatečné znalosti o možné toxicitě a ekotoxicitě těchto nanočástic (obrázek 5) [37-39]. Z nanomateriálů přidávaných do obalových hmot se jedná například o  $\text{SiO}_2$ , uhlíkaté nanotrubičky, chitosan ve formě nanočástic, nanokrystaly škrobu, nanovlákná na bázi celulózy, jílů a silikáty [37]. Co se týká kosmetického a farmaceutického průmyslu jedná se zde o přímý kontakt s organismem, kdy nejvíce jsou v těchto odvětvích využívány nanočástice  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CeO}_2$ , fullereny (C60) a ZnO [37,40,41].



Obrázek 5: Obecný obrázek biodegradace plastů, upraveno podle [37].

### Pracovní expozice

Významnou expozicí nanočásticím je bezesporu ta profesionální. Je většinou dlouhodobá a častěji s sebou nese vyšší rizika spojená s možným vlivem nanočástic na organismus [42]. Jak už bylo řečeno, průmysl, převážně těžký je jedním z významných zdrojů emisí mikronových a submikronových částic (včetně těch nejmenších), proto je jasné, že pracovníci v tomto odvětví jsou jejich působení denně vystaveni. Jedním z významných odvětví, kde je pracovní expozice nanometrickým částicím zvýšená je svařování a broušení kovů. Bylo již prokázáno, že při těchto činnostech se uvolňují do prostředí nanočástice [43,44]. Příkladem může být zjištění částice na bázi wolframu v červené krvince glioblastomu mozku u svářeče (obrázek 6) [45].



Obrázek 6: SEM analýza erythrocytu, při bodové analýze světlých bodů uvnitř buňky byl zjištěn majoritní obsah wolframu v glioblastomu mozku u 62 let starého pacienta pracujícího jako svářeč, převzato z [45].

Vývoj, výroba a aplikace nanomateriálů se neustále rozšiřuje, proto jsou výzkumníci, vývojáři a dělníci jako první vystaveni potenciálně toxickému vlivu nanomateriálů. Příkladem mohou být pracovníci, kteří denně přicházejí do styku s bílým pigmentem  $\text{TiO}_2$ . Ve studii Pelclové a kol. (2015) bylo prokázáno, že se v dýchacím traktu těchto pracovníků vyskytovaly částice/shluky  $\text{TiO}_2$ . Bylo také zjištěno, že v průběhu výroby bílého pigmentu  $\text{TiO}_2$ , byli pracovníci vystaveni částicím  $\text{TiO}_2$  a tyto částice mohly přetrvávat v plicích exponovaných zaměstnanců po dobu nejméně několik hodin po skončení směny [46]. Podobně tomu bylo i při výrobě a aplikaci uhlíkatých nanotrubic, kdy se potvrdilo, že pracovníci v tomto odvětví jsou vystaveni účinku těchto nanomateriálů mnohem intenzivněji než běžný spotřebitel [47]. Současně bylo na zvířecích modelech prokázáno, že uhlíkaté nanotrubičky dokázaly proniknout přes plicní bariéru, dostat se až do plic a způsobit tak neobvykle rychlý vznik intersticiální fibrózy [47,48].

### **2.3 Vliv nanomateriálů/nanočástic na organismus**

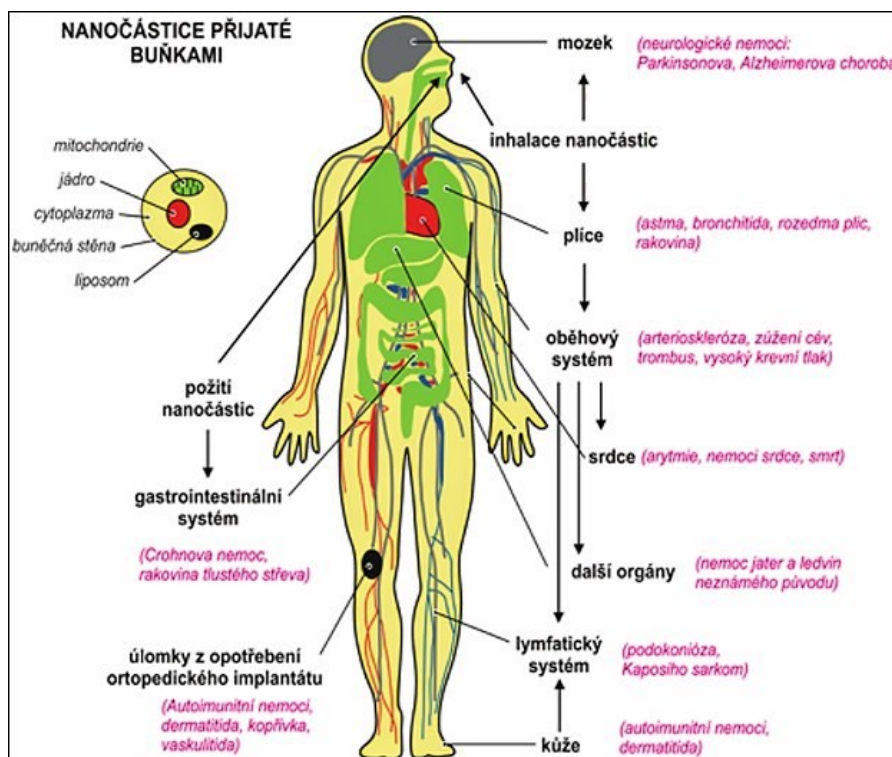
Spolu s rozvojem oboru nanotechnologií přichází také možná environmentální a zdravotní rizika. Tato rizika nejsou ještě zcela vydefinována a objasněna a stále jsou předmětem intenzivního zkoumání. Určení nebezpečnosti různých typů nanomateriálů je velmi složité [12]. V současné době platí pro nanomateriály/nanočástice stejná bezpečnostní opatření jako pro klasické chemické látky. Tato opatření však nejsou dostatečná, neberou totiž v úvahu odlišné vlastnosti nanomateriálů/nanočástic, kterými jsou především jejich malá velikost a velký měrný povrch. Pokles velikosti částic je spojen s nárůstem celkového povrchu a zvýšením volné Gibbsovy energie, která odráží reaktivitu daných částic [49]. Díky svým malým rozměrům mohou pravděpodobně nanočástice volně pronikat buněčnými stěnami a být transportovány v rámci organismu kamkoli do cílového orgánu. Prostřednictvím své vysoké reaktivity pak mohou ovlivňovat průběhy některých fyziologických procesů [12,50]. Určení nebezpečnosti nanomateriálů/nanočástic představuje komplexní několika stupňový proces. Mezi parametry, které zde hrají hlavní roli, patří expozice danému nanomateriálu, míra expozice daného materiálu, translokace k cílovému místu v rámci organismu a vylučování nanomateriálu z organismu [6]. Expozici můžeme označit jako proces, kdy látka překoná vnější bariéru organismu a pronikne do něj, s následným možným vyvoláním intoxikace [51]. Při posuzování expozice je třeba uvažovat následující faktory: prostředí, ve kterém se částice nacházejí (voda, půda, vzduch, biomasa), tvar částic, expoziční kontext (pracovníci, uživatelé nebo spotřebitelé), dávka částic a doba expozice, tedy jak dlouhou dobu



je daný organismus vystaven působení určité dávky výše jmenovaného faktoru [6,52]. Vzhledem k počtu výše uvedených parametrů, které se podílejí na biologickém účinku nanomateriálů, je patrné, že existuje značná variabilita výsledných parametrů pro každý (již existující) nanomateriál. Z toho hlediska vede jednoduché hodnocení nebezpečnosti nanomateriálů (při zanedbání stanovení některého z parametrů) k možnému nemalému podhodnocení rizik.

## 2.4 Vstup nanočástic do organismu

Velmi důležitým faktorem, který má vliv na toxicitu nanočástic je způsob jejich vstupu do organismu [3,6]. Nanočástice mohou přijít do přímého kontaktu s organismem a vstupovat do něj přes dýchací systém (inhalace), zažívací ústrojí, tj. požitím (perorální expozice), kůží a sliznicemi (dermální expozice), přímo do krevního řečiště poškozenou tkání či vpichem (intravenózní expozice) [4-6]. Podle obrázku 7 si můžeme názorně představit jednotlivé možné cesty vstupu do lidského organismu, také pravděpodobný transport uvnitř těla a možný vznik onemocnění.



Obrázek 7: Obecné schéma možného příjmu nanometrických částic do lidského organismu, jejich předpokládané translokační dráhy uvnitř lidského těla a onemocnění, které s tím mohou souviset, převzato z [53].

## 2.5 Dýchací soustava

Nejsnadnější a nejčastější cestou vstupu nametrických částic do organismu je prostřednictvím inhalační expozice, tedy dýchací soustavou. Ta za normálních podmínek zajišťuje výměnu plynů mezi krví a vnějším prostředím. K dýchací soustavě patří dýchací cesty, které lze rozdělit na dvě základní podskupiny, tj. horní cesty dýchací a dolní cesty dýchací.

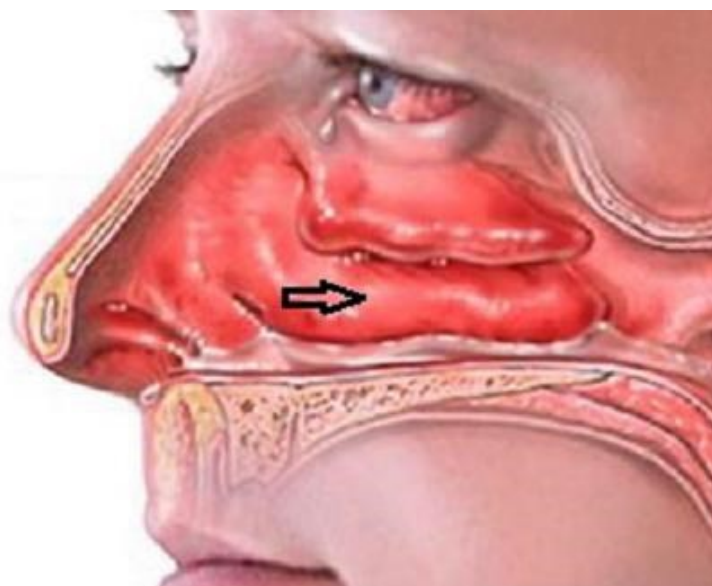
### 2.5.1. Horní cesty dýchací

Zahrnují nosní dutinu, vedlejší nosní dutiny a (noso)hltn. Sliznice nosní dutiny se dělí na čichovou a respirační oblast. Čichový epitel je roztroušen na způsob šachovnice mezi respiračním epitelem. Respirační epitel obsahuje řasinkové a pohárkové buňky a seromucinózní žlázy. Buňky řasinkového epitelu se podílí na odstraňování prachových částic z vdechovaného vzduchu. Vzduch proudí do nosní dutiny přes nozdry, které vedou do vlastní nosní dutiny přes chlopeň. Nosní chlopeň (*valvula nasi*) je utvářena dolní částí laterální nosní chrupavky, předním okrajem dolní lastury a nosním septem. Nejužší částí nosní dutiny je právě v úrovni nosní chlopně a v oblasti přední části dolní skořepy [54].

Při vdechování částic větších než 10  $\mu\text{m}$  dochází k jejich zachycení sliznicí na skořepě nosní. Částice mohou být ze sliznice přemístěny rytmickým pohybem záchytných bičíků do úst, tzv. mukociliární eskalátor. Částice menší, zvláště ty s rozměrem pod 100 nm, zůstávají v proudícím vzduchu jdoucím do průdušek lalokových a segmentálních a následně difundují stále jemnějšími průduškami do plicních sklípků [55,56].

### ***Hypertrofie dolní skořepy nosní***

Jedním z patofyziologických nálezů horních cest dýchacích způsobujících nosní obstrukci (neprůchodnost) je hypertrofie dolní nosní skořepy (obrázek 8). Jedná se o častou příčinu řešitelné obstrukce nosního dýchání. Nejčastěji se jedná o hypertrofii měkkých tkání na podkladě chronické hypertrofické rinitidy a dalších příčin chronického slizničního zánětu.



Obrázek 8: Hypertrofie sliznice dolní skořepy nosní, převzato z [57].

Léčba nosní neprůchodnosti je dlouhodobě předmětem diskuzí. U nemocných, kde je známa příčina hypertrofie dolní skořepy (alergici, medikamentózní rinitida) je snaha o kauzální léčbu - vyřazení alergenu ze životního prostředí nemocného, desenzibilizaci, vyřazení dekonjestiv (přípravky obsahující vodný roztok soli) z denního užívání. V mnoha případech přesná příčina hypertrofie dolní skořepy není známá a léčí se tedy jen důsledek nemoci, nikoli nemoc samotná. U pacientů, kde konzervativní léčba nepřináší dostatečný efekt, je indikována léčba chirurgická. Je používáno velké množství chirurgických metod, jednou z nich je:

#### ***Resekce sliznice dolní skořepy (mukotomie)***

Odstranění sliznice dolní skořepy. Dle rozsahu se jedná o parciální mukotomii, která spočívá nejčastěji v odstranění hypertrofického zadního konce skořepy, nebo o rozšířenou mukotomii, tj. odstranění předního konce a dolního okraje skořepy. Tento endoskopický výkon, při kterém je zachován celý vzorek odstraněné tkáně, bývá prováděn pomocí chirurgických nůžek. Standardně jsou tyto odebrané vzorky tkáně histologicky vyšetřeny. Vzhledem k tomu, že příčinou oněch patologických stavů může být i přítomnost pevných částic dráždicích tkáň je vhodné tyto vzorky hypertrofické tkáně analyzovat na přítomnost a charakterizaci pevných částic. Tato analýza není součástí standardního vyšetření a běžně se neprovádí [58,59].

#### **2.5.2. Dolní cesty dýchací**

Zahrnují hrtan, průdušnici a celý bronchiální strom (průdušky a průdušinky). Hrtan je chrupavkami vyztužená trubice, kterou prochází vzduch do průdušnice a následně do plic. Hrtan se také podílí na obranné reakci dýchacích cest, tj. kašli. Kašel pomáhá odstraňovat hlen nahromaděný v dolních cestách dýchacích nebo cizorodá tělesa (včetně prachových

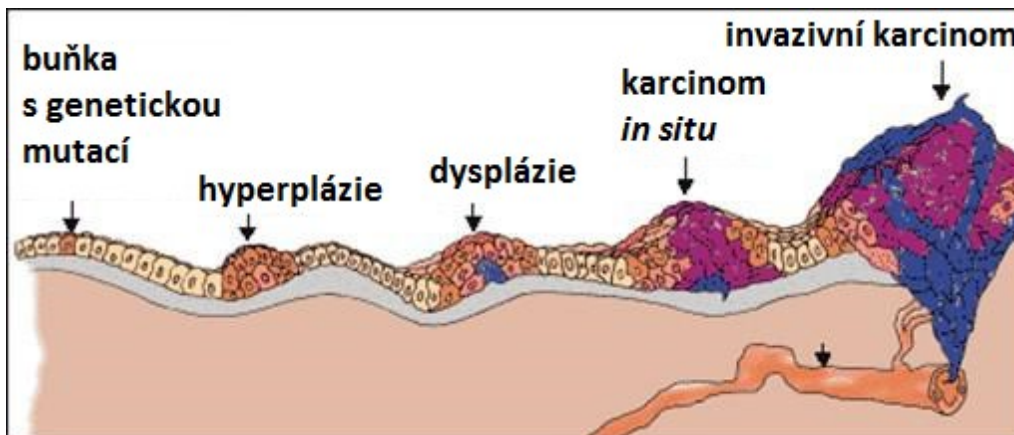
částic). Průdušnice navazuje na prstenčitou chrupavku hrtanu a svým průběhem přibližně sleduje zakřivení páteře. Na povrchu průdušnice se nachází víceřadý cylindrický epitel s řasinkami (respirační epitel). Průduška, která vstupuje do plic plicní brankou, se u člověka 25krát větví a tvoří tak průduškový strom. Hlavní průdušky se dělí na lalokové průdušky, ty se dělí na segmentální průdušky, rozdělující se na subsegmentální průdušky, které se následně větví na terminální průdušinky. Každá plíce má zhruba trojúhelníkovitý tvar, levá plíce je menší než pravá. Plíce jsou rozčleněné na laloky, u člověka má pravá plíce laloky tři, menší levá má dva. Histologická stavba je zde podobná jako u trachey. Bronchioly mají průměr menší než 1 mm. Na jejich povrchu se nachází jednovrstevný cylindrický až kubický epitel. Vyskytují se zde také tzv. Clarovy buňky, které produkují surfaktant. Kolem alveolů je bohatá síť kapilár. Dále se zde nacházejí alveolární makrofágy (prašné buňky), které jsou součástí monocyto-makrofágového systému (dříve nazývaný retikuloendoteliální systém, RES). Makrofág je buňka, která hraje velmi důležitou roli v imunitní reakci. Je součástí přirozené imunity živého systému. Jedná se o zástupce mononukleárů, tj. buněk s jedním, nesegmentovaným jádrem. [60].

### ***Plicní karcinomy***

Mezi závažná onemocnění dolních cest dýchacích bezesporu patří nádory plic a průdušek. Nezhoubné nádory plic a průdušek jsou poměrně vzácné. Jsou uloženy buď v plicní tkáni, nebo v průduškách. Naopak zhoubné nádory plic a průdušek jsou nejčastější ze všech nádorů v oblasti dýchacích cest [61].

Existuje řada důkazů, že nádor je obecně odvozen od jedné buňky, která se dramaticky mění po sérii genetických změn. Zdravá buňka má definovaný tvar a strukturu a prosperuje mezi uspořádanými okolními buňkami. Odpovídá na podněty ze svého okolí a dává vznik dceřiným buňkám jen tehdy, jestliže rovnováha stimulačních a inhibičních signálů z okolí je posunuta ve prospěch buněčného dělení. Avšak v procesu replikace DNA a dělení buňky existuje stálá hrozba vzniku mutací (náhodných změn genetické informace buňky), které mohou tento regulační cyklus porušovat. Jedna mutace může způsobit, že buňka, která vypadá standardně z hlediska morfologie, avšak je méně citlivá na vnější signály a může se příležitostně začít nekontrolovaně dělit. Akumulace genetických změn v důsledku genetické nestability může způsobit, že se dceřiná buňka stane zcela nevnímavou k externím signálům a vykazuje znaky malignity (zhoubnost). Podstatou zhoubného bujení je nekontrolovatelný růst buněk. Znamená to, že buňka ztrácí přesný tvar a hranice, nereaguje na růstově inhibiční signály a získává schopnost nekontrolovaně se dělit (obrázek 9). Vznikající masa nejen stlačuje a poškozují zdravou tkáň ve svém okolí, ale může dále překonávat bariéry jednotlivých orgánů

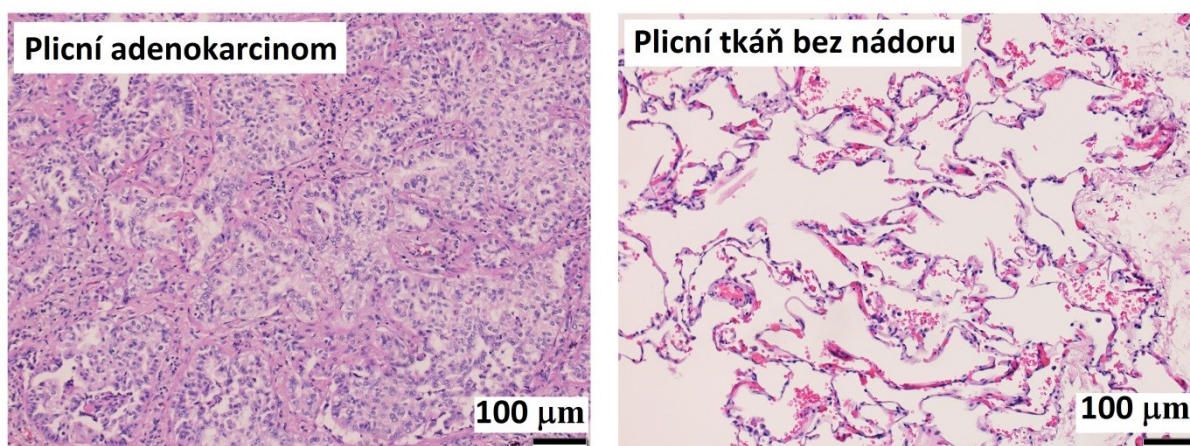
a metastazovat, což znamená, že kolonizuje vzdálené tkáně. Nádor se tak stává zhoubným (maligním) [62].



Obrázek 9: Podstata nádorové transformace, převzato z [63].

Jedním z nejčastějších onemocnění plic zhoubným nádorem jsou bronchogenní karcinomy. Označují se tak nádory průdušek i nádory, které vznikají v plicním parenchymu. Jejich klinický obraz je velmi podobný a proto je nelze od sebe přesně oddělit. Větší význam má kategorizace podle histologického typu (přesného rozboru nádorové tkáně) podle současné klasifikace používané americkou institucí (National cancer institute - NCI) na:

- a) nemalobuněčný karcinom: spinocelulární karcinom, adenokarcinom (obrázek 10), velkobuněčný karcinom, smíšený karcinom,
- b) malobuněčný karcinom [61].



Obrázek 10: Tkáň plicního adenokarcinomu a plicní tkáň bez nádoru, nabarvená speciální barvicí technikou hematoxilin-eozin, zobrazená v optickém mikroskopu, určená pro histologické hodnocení (oddělení patologie, fakultní nemocnice Ostrava).

Na vzniku nádorů se mohou podílet některé faktory zevního prostředí, tzv. teratogeny. Podle jejich povahy je můžeme rozdělit na fyzikální, chemické a biologické. Mezi nejzávažnější fyzikální faktory patří ionizující záření, radioaktivita, hluk, chlad, vinbrace, teplo, elektrický proud, laser a další. Mezi chemické faktory patří především farmaka a drogy. Biologické faktory zahrnují mikroorganismy, rostliny a živočichy. Obecně se na vzniku nádorů mohou podílet nejen látky, které mají schopnost vyvolat změnu genetické informace (vlastní karcinogeny), ale také kokarcinogeny (promotory), látky, které mají schopnost již existující genetické změny prohloubit a tak urychlovat vznik nádoru [62].

Mezinárodní agentura pro výzkum zhoubných novotvarů, angl. International Agency for Research on Cancer (IARC) při světové zdravotnické organizaci (WHO) uvádí seznam látek, které jsou zařazeny do skupin, podle jejich působení na lidský organismus z hlediska jejich karcinogenity. Patří k nim [64]:

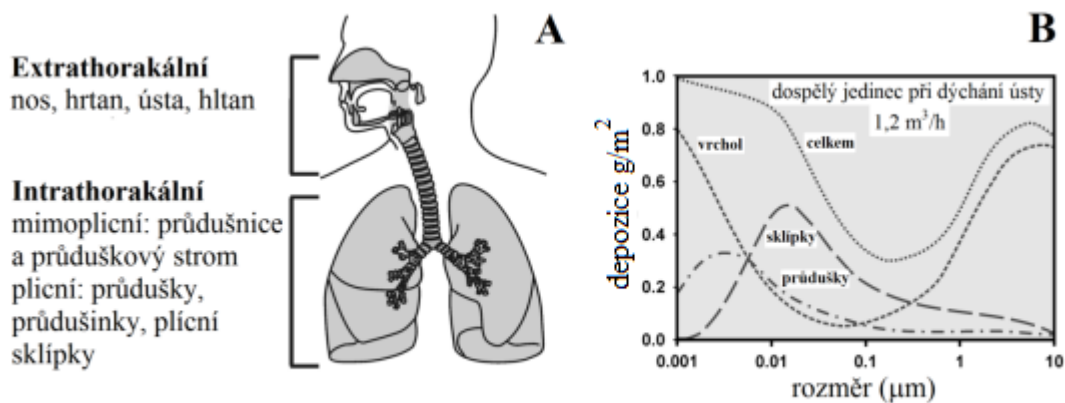
- látky prokazatelně karcinogenní pro člověka (*skupina 1*),
- látky pravděpodobně karcinogenní pro člověka (*skupina 2A*),
- látky možná karcinogenní pro člověka (*skupina 2B*),
- látky neklasifikovatelné z hlediska karcinogenních účinků na člověka (*skupina 3*),
- látky pravděpodobně nekarcinogenní pro člověka (*skupina 4*).

Podle této klasifikace lze odhadnout míru karcinogenity jednotlivých látek, které jsou do této kategorie zařazeny [65].

## 2.6 Osud nanočástic v organismu

V plicích je příjem nanočástic do organismu uskutečňován v alveolech. Zde se částice mohou ukládat a současně jsou postupně odstraňovány pomocí fagocytózy. Částice s průměrem od 1 do 100 nm vykazují mnohem větší podíl depozice v oblasti plic než částice s větším průměrem [66-68]. Plicní bariéra plní významnou funkci při ochraně dýchacích cest před vdechovanými částicemi, přesto bývají plíce nejvíce postiženým orgánem z hlediska množství deponovaného materiálu. Na obrázku 11 je uvedeno schéma extrathorakálního (mimohrudního) a intrathorakálního (hrudního) prostoru, ve kterém se mohou deponovat inhalované částice.





Obrázek 11: Rozdělení dýchacích cest (A) a ukládání částic (depozice) v těle dospělého jedince při klidovém dýchání ústy vyjádřena jako funkce velikostí částic; (B) data u průdušek jsou dány součtem depozice v průduškách a plicních sklípcích průdušinkách, upraveno podle [69].

Existují výrazné rozdíly v depozici částic v jednotlivých plicních regionech (obrázek 11B), tedy čím jsou částice menší, tím hlouběji v plicích jsou uloženy [5, 69]. Tyto rozdíly rozložení prachu v plicích mohou mít významné důsledky v působení na zdraví a na příslušné eliminační mechanismy [5,70-74].

Lidské tělo má různé obranné mechanismy k odstranění těchto nežádoucích cizích objektů. Jedná se o dva základní způsoby: chemické rozpouštění částic, které jsou rozpustné a fyzikální translokace, což znamená transport z jednoho místa do druhého, pro nerozpustné částice nebo částice s nízkou rozpustností [75]. Takto mohou být nerozpustné částice nebo částice s nízkou rozpustností, které jsou uloženy v plicním systému, pomocí transportu přesunuty na jiné místo v těle. Znáмым příkladem je již zmíněný mukociliární eskalátor, který je schopen odstranit částice až do velikosti 5  $\mu\text{m}$ , které se obvykle nacházejí v horní oblasti plic, zejména tedy v tracheobronchiální oblasti, kde je ještě přítomen řasinkový epitel. Také tracheobronchiální sliznice je pokryta buňkami s kmitajícími ciliemi, které tvoří eskalátor a současně vylučují hlen, který obalí částice a přesune je do nosu nebo do úst, kde mohou být vysmrkány nebo spolknuty. Obvykle je tento mechanismus účinný a eliminuje částice z dýchacího traktu za méně než 24 hodin, v některém případě i nanočástice [76]. V alveolární oblasti makrofágy (patří do skupiny buněk, které chrání organismus před cizorodými látkami a bakteriemi) zachycují nerozpustné částice fagocytózou. Je to mechanismus, kterým makrofágy částice obklopí, pohltní je a pak i s nimi pomalu postupují k mukociliární eskalátoru, aby je eliminovali. Jedná se však pravděpodobně o relativně pomalý proces s delším eliminačním poločasem, kdy koncentrace cizorodé látky (částice) klesne právě na polovinu svého ustáleného stavu, u člověka je to přibližně 700 dní [71].

Účinnost fagocytózy je však silně závislá na tvaru a velikosti částic. Zatímco pro hrubší

částice, v rozsahu cca 1-3  $\mu\text{m}$ , je fagocytóza pomocí makrofágů velmi účinná, neaglomerované částice uložené v alveolární oblasti nejsou makrofágy účinně fagocytovány [77,78]. To může vést k velké akumulaci těchto malých částic, jejich expozici a větší interakci s alveolárními epiteliálními buňkami. Podle některých studií mohou ultrajemné částice procházet epitelem a dostat se až do intersticia plic (vmezeřená tkáň různých orgánů, objevuje se v ní infiltrace bílými krvinkami) [79-81]. Zajímavé je, že tento fenomén byl krom hlodavců zaznamenán častěji u vyšších druhů, jako například u psů a opic [81,82]. Translokace inhalovaných ultrajemných částic v krevním řečišti by mohla ovlivnit funkci endotelu a podpořit trombózu a další patologické stavy v krevním systému, včetně zvýšené koagulace krve [76,83-87]. Tento jev byl prokázán u křečků [83,88], ale situace u člověka zůstává nejednoznačná. Je známo, že existují dva další mechanismy, které přispívají ke snížení koncentrace ultrajemných částic (v rozměrech nano) v plicích [5,71]. Jednak je to prostřednictvím krevního oběhu, do kterého mohou jemné částice přecházet přímo z plicní tkáně a putovat tak celým tělem do okolních orgánů. Tyto velmi jemné prachové částice mohou také procházet různými bariérami plicní ochrany, dostat se do krevního systému a být distribuovány do kterékoli části těla, kde se mohou akumulovat a způsobit různé druhy poškození.

Také některé velmi malé částice mohou být transportovány přímo do centrálního nervového systému podél smyslových drah (senzorických axonů). Katz a kol. (1984) popsal neuronový transport částic ve velikosti od 20 do 200 nm z nosní dutiny do centrální nervové soustavy (CNS), kdy inhalace 35 nm radioaktivně značených částic uhlíku potkany, vedla k významné akumulaci těchto částic v čichových buňkách už sedm dnů po expozici [89]. Několik dalších studií prokázalo, že po expozici potkanů prachu nebo dýmů ze svařování, který obsahuje mangan, mohou některé částice na bázi manganu projít přímo z nosu do CNS přes čichové nervy, překonat hematoencefalickou bariéru a hromadit se v mozkové tkáni. Takové studie byly také provedeny na různých rozpustných kovech a vedly ke stejným závěrům [75,90-95]. Tyto výše uvedené mechanismy transportu částic by mohly hrát významnou roli ve vysvětlení příčiny a ve vývoji určitých onemocnění srdce nebo centrální nervové soustavy. Je třeba ale tyto jevy jasně prokázat i na člověku [5,71]. Donaldson a kol. (2005) prezentovali významné zjištění, že plicní toxicita pravděpodobně souvisí s oxidativním stresem způsobeným přítomností přechodných kovů, organických sloučenin, nebo částic s velkým specifickým povrchem. Tento oxidativní stres může vést k aktivaci epiteliálních buněk [47]. Za normálních podmínek existuje v organismu rovnováha mezi reaktivními formami kyslíku (angl. Reactive oxygen species – ROS) a antioxidanty. Pokud je tato rovnováha z nějakého důvodu narušena, vzniká tzv. oxidativní stres [6,96]. Toxické účinky některých nanočástic (například fullerenu)



na buňkách jsou také spojené s mechanismem oxidativního stresu. Studie na zvířatech exponovaných ultrajemným částicím prokázaly plicní zánět s histopatologickými změnami a translokaci částic do extrapulmonárních tkání [75].

Jedny z prvních studií o porovnání jemných (250 nm) a ultrajemných (20 nm) částic TiO<sub>2</sub> publikoval Ferin (1992) a Oberdörster (1994) [50,79]. V těchto inhalačních studiích byly potkanům podávány přibližně stejné koncentrace jemných a ultrajemných částic (respektive  $22,3 \pm 4,2$  a  $23,5 \pm 2,9$  mg/m<sup>3</sup> [50], přesto byla pozorována větší plicní depozice ultrajemných částic. Zároveň byl pozorován významný nárůst zánětlivých znaků při podávání ultrajemných částic. Především bylo zjištěno poškození plicního epitelu, obstrukce Kohnových pórů (póry mezi alveoly), výskyt projevů intersticiální fibrózy a zvýšení mediátorů zánětu (změny makrofágových funkcí). Také v lymfatické tkáni bylo nalezeno větší množství částic o velikosti 20 nm, což by mohlo potvrdit průnik nanočástic do intersticiálních prostorů. Doba plicní clearance (množství krve, které se za jednotku času očistí od určité látky prostřednictvím eliminačního mechanismu plic) byla prodloužena a translokace těchto částic v plicním intersticiu byla vyšší. Tyto výsledky ukazují, že inertní částice se mohou stát biologicky aktivními při výskytu v nanometrických velikostech. Až do těchto studií byl TiO<sub>2</sub> považován za inertní a netoxický prach, který sloužil jako inertní kontrola. Pro posouzení rizika expozice nanočásticím provedl také Nakajima (2011) studii, kdy bylo 10 myší po dobu 30-ti dnů vystaveno částicím TiO<sub>2</sub> (forma anatas) ve speciálním nanočásticovém expozičním zařízení, vytvořeném pro tento výzkum. Po expozici byla pomocí Ramanovy spektroskopie prokázána přítomnost nanočástic na bázi titanu uvnitř buněk v plicích [97]. Také Zhang (2005b) uvádí, že Donaldson (2001) a jeho tým prokázali, že nanočásticové formy (< 50 nm) oxidu titaničitého, oxidu hliníku a sazí zvýšily parametry plicního zánětu 10 krát více než při podání jemných částic stejného chemického složení [73,98].

Velmi významné jsou i další studie distribuce nanočástic v plicích. Například Kreyling (2002) ve své práci testoval radiologicky značené částice iridia <sup>192</sup>Ir o průměru 15 a 80 nm (při 2,5 µg/cm<sup>3</sup>), které nechal inhalovat mladými potkany po dobu 1 hodiny. Hrudní depozice frakcí inhalovaných částic <sup>192</sup>Ir 15 a 80 nm byly 0,49 a 0,28 µg/cm<sup>3</sup>. Obě dávky iridiových nanočástic se ukázaly jako nerozpustné. Byla zjištěna translokace iridiových částic i do sekundárních orgánů zvířat, především do jater, srdce a mozku. Translokováná frakce částic o velikostech 80 nm byla přibližně o řád menší než u částic o velikosti 15 nm. Autoři dospěli k závěru, že tyto nanočástice byly translokovány do orgánů, pravděpodobně prostřednictvím cirkulace nanočástic plicními cévami [76].

Současně také provedl inhalační studii u potkanů Oberdörster (2002), kdy zkoumal distribuci nerozpustných ultrajemných částic uhlíku <sup>13</sup>C jako aerosol s průměrem 20 - 29 nm. Dvě

skupiny zvířat byly umístěny do expoziční komory a vystaveny nanočásticím o koncentracích 0,80 a 170 ug/cm<sup>3</sup>. Do 24 hodin po expozici nebyla ve zvířecích orgánech (plíce, srdce, mozek, čichové bulby- část mozku obratlovců, která se vychlipuje z přední strany hemisfér koncového mozku) pozorována zvýšená koncentrace nanočástic <sup>13</sup>C. Vědci však vyzorovali velkou akumulaci <sup>13</sup>C v játrech u obou skupin zvířat v době 18 a 24 hodin po expozici. Autoři vysvětlují tuto zvýšenou koncentraci <sup>13</sup>C v játrech translokací nanočástic z dýchacího systému do oběhového systému a poté do jater [99].

Následně Oberdörster (2004) publikoval dlouhodobější inhalační studii, kdy u potkanů zjišťoval distribuci stejných elementárních částic uhlíku <sup>13</sup>C v mozku. Ve speciálních expozičních komorách byli hlodavci vystaveni po dobu 6 hodin koncentracím 0, 150 a 170 ug/cm<sup>3</sup> a poté byli v 1., 3., 5. a 7. den usmrceni. Analýza mozkové tkáně, tkáně mozečku a čichového bulbu zvířat ukázala významný záchyt částic <sup>13</sup>C u exponovaných potkanů. Avšak potkani usmrceni 1. den po expozici měli částice pouze v čichových bulbech. V dalších tkáních byly částice u hlodavců usmrcených až 7. den. Na základě těchto zjištění, autoři předpokládali transport částic z dýchacích zón zvířat do čichových bulb a pak následnou translokaci dál přes axonální dráhy. Zároveň usuzovali na přesun částic <sup>13</sup>C z plic do krevního řečiště a pak průchodem přes hematoencefalickou bariéru až do mozkové tkáně. Tato studie významně přispěla k pochopení možného transportu částic přes dýchací cesty až do mimoplicních orgánů [100].

Kukutschová a kol. (2009) použili pro testy pulmonální toxicity brzdy pomleté na frakci pod 5 μm. U potkanů vystavených malým dávkám (0,5 a 1 mg) těchto částic se projevila pouze mírná odpověď organismu bez poškození plicní tkáně. Kdežto dávky 3 mg vyvolaly mnohem intenzivnější odezvu, zmnožení alveolárních makrofágů, spolu s translokací částic do lymfatické tkáně a regionálních uzlin. Určité množství částic zůstalo deponováno v alveolární tkáni a byla pozorována zánětlivá reakce. Podle autorů nebylo zcela jasné, který element/frakce pomleté desky byl zodpovědný za zánětlivou reakci [101].

Bylo již prokázáno, že nanočástice/ultrajemné částice na bázi kovů se mohou prostřednictvím zvýšení oxidačního stresu, zánětlivé reakce a abnormální apoptózy podílet na vzniku nádorových změn. Podle mnohých studií, při kterých byly nanočástice a ultrajemné částice podávány inhalačně a intratracheálně po dobu delší než dva roky, se prokázaly karcinogenní účinky takto podávaných částic [102,103]. Převážně u cíleně připravovaných nanočástic bylo prokázáno, že působí genotoxicky, cytotoxicky a mutageně v biologickém systému. Je to přičítáno několika faktorům, například přímé interakci s cíleně připravovanými nanočásticemi (angl. engineered nanoparticles - eNPs) s genetickým materiálem, uvolňování toxických iontů z rozpustných eNPs, interakci s cytoplazmatickými/jadernými proteiny, zvýšení oxidačního

stresu, poruchy funkce kontrolního bodu buněčného cyklu, inhibice antioxidační obrany, a mnoha dalším [104]. Příkladem může být studie, kdy autoři aplikovali fullereny C<sub>60</sub> na kůži myši. Ve výsledku nebyl žádný vliv na syntézu DNA, ale v epidermis (pokožce) byl zaznamenán mírný nárůst aktivity ornitin-decarboxylázy (enzym s úlohou v podpoře nádorů) [105].

Ovšem nejen cíleně připravované nanočástice, ale také částice vzniklé jako sekundární produkt některých antropogenních činností mohou mít podobné účinky. Například některé výzkumy poukazují na to, že částice s nízkou rozpustností, jako jsou saze a oxid titaničitý, mohou způsobovat fibrózy, neoplastické léze a plicní nádory u potkanů. Množství nanočástic potřebné k vyvolání těchto účinků je mnohem menší, než množství částic s větší velikostí [106].

Také další studie prokázaly, že například nanočástice niklu způsobují rychlé a dlouhotrvající hypoxie v lidských plicních epitelových buňkách (H460) [107-113]. Giertz (2010) vypracoval studii, jejímž cílem bylo zjistit škodlivé účinky kovových částic v tkáních jater, ledvin, plic a srdce u krys po injekční aplikaci Hankova roztoku (roztok, který obsahuje částice slitiny Ti a nerezové oceli, vzniklé třením těchto dvou kovů). Velikost částic se pohybovala v případě slitiny Ti v rozmezí od 50 do 200 μm a u nerezových ocelí v rozmezí od 100 do 500 μm. Tkáně byly následně analyzovány pomocí mikroskopu s energiově disperzním spektrometrem (EDS). V tkáních byla zjištěna přítomnost hliníku a yttria současně s granulomem (chronický zánět), makrofágy epiteloidního vzhledu společně s obrovskými buňkami, které byly znakem zánětlivé odpovědi organismu [114].

Jak už bylo uvedeno výše, existuje mnoho studií, které se zabývají testováním účinků nano- a submikronových kovových částic na zvířecích modelech. Vzhledem k tomu, že je testovaný organismus pro potřeby dalších analýz většinou na závěr studie usmrcen, lze tyto experimenty z etických důvodů provádět pouze na laboratorních zvířatech. Na základě získaných dat, si tak lze vytvořit jakýsi přehled o osudu nanočástic v živém organismu. Samozřejmě přínosné jsou studie, ve kterých je sledovaným živým organismem přímo člověk. Patří mezi ně evidence nanomateriálů v lidském těle, které byly do organismu vpraveny cíleně, s konkrétním účelem, převážně léčebným. Je známo jejich chemické složení a také jejich velikost.

Jednou z nich je přehledová studie Chena a kol. (2016), ve které shrnují celosvětové poznatky o aplikaci nanomateriálů v diagnostice a léčbě rakoviny v oborech jako jsou: optické zobrazovací techniky, ultrazvuk, fotoakustické zobrazování, zobrazování magnetickou rezonancí (MRI) a radionuklidové zobrazování. Nanočástice se tedy mohou využít k přesnému zobrazení poškozené tkáně, či posouzení biologie a mikroprostředí nádoru.

Mohou být také využity k přímé destrukci poškozené tkáně. Příkladem jsou nanočástice zlata (GNPs), což jsou snadno syntetizované struktury, které silně absorbují světlo za účelem generování tepelné energie, která indukuje fototermální destrukci maligní tkáně [115].

Singh a kol. (2015) ve svém obsáhlém článku zhodnotili použití a účinnost právě nanočástic zlata při diagnostice a léčbě rakoviny gastrointestinálního traktu [116]. Cíleně připravené nanočástice, mohou být využity také jako nosiče léčiv. Například Bagalkot a kol. (2015) vytvořili modelové hybridní lipo-latexové (LiLa) nanočástice, které selektivně zaměřili na makrofágy zánětlivého fenotypu M1 pomocí fagocytárních signálů. Následně prokázali jejich účinnost prostřednictvím zobrazování a podávání léků v oblasti zánětlivých onemocnění aterosklerózy a obezity [117].

Nanočástice, které se mohou vyskytovat v lidském organismu, a u kterých je přibližně známo jejich chemické složení, nikoliv však přesná velikost, jsou například nanočástice uvolňující se při vzájemném otěru kloubních implantátů. Allen a kol. (1994) studovali účinky uhlíkových povlaků na tkáňové buňky (makrofágy, fibroblasty a osteoblastové buňky), které obklopují totální kloubní náhradu. Neexistoval žádný důkaz, že právě povlaky z uhlíku (angl. diamond like carbon – DLC), uložené na různých typech kloubních náhrad, způsobily cytotoxicitu *in vitro*. Buňky kultivované na potažených substrátech vykazovaly normální buněčný růst a morfologii [118]. Ovšem v případě kovových ortopedických implantátů je vysoké riziko uvolňování kovových iontů při tření jednotlivých komponent (kov na kov, angl. metal on metal, MoM). Kinetika drobných kovových částic (nanočástic) vznikajících při otěru a s tím souvisejících produktů koroze, není zcela objasněna [119]. Předpokládá se, že kovové částice (submikronové, nanočástice) jsou požitý makrofágy nebo jsou pomocí lymfatického systému přepraveny do retikuloendoteliálního systému [120]. Vysoce citlivé metody detekce mohou prokázat hladiny cirkulujících kovových iontů v tělních tekutinách. Mnozí autoři detekovali pomocí spektroskopických metod ionty kobaltu a chromu v séru a moči u pacientů s ortopedickými implantáty na bázi slitiny kobaltu a chromu (kovový implantát) [121-123]. Uvolňování těchto kovových iontů ovšem může souviset s velkým množstvím nežádoucích účinků, zvláště pokud se jedná o kovové ionty. Tyto částice by mohly, díky své vysoké reaktivitě, při dlouhodobém působení prostřednictvím oxidačního stresu působit toxicky na lidský organismus [123,124].

Osud nanočástic v lidských tekutinách také studoval Myllynen a kol. (2006). Zaměřil se na přenos tzv. pegylovaných nanočástic zlata (PEG, s vrstvou polyetylen glykolu) pomocí perfundované lidské placenty. Při průtoku placentou byly použity nanočástice ve velikostech 15 a 30 nm a byly odebírány výtoky mateřské i plodové vody. Recirkulační perfuze s použitím 10 nebo 15 nm nanočástic trvala 6 hodin. Koncentrace zlata ve vzorcích byla

analyzována pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Jako referenční sloučeninu autoři použili antipyrin, který rychle překonal placentu. Při otevřených perfuzích byly detekovány nanočástice v mateřském, ale ne ve fetálním odtoku vody, což by mohlo naznačovat nedostatek placentárního přenosu. Během šesti hodinové perfúze nebyly ve fetálním oběhu zjištěny žádné částice. Pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) byly nanočástice vizualizovány v placentární tkáni hlavně v trofoblastické buněčné vrstvě. Autoři tedy prostřednictvím své studie zjistili, že pegylované nanočástice zlata o velikosti 10-30 nm během šesti hodin nepřekročily perforovanou lidskou placentu v detekovatelných množstvích do fetálního oběhu. Ovšem zda při dlouhodobější cirkulaci jsou pegylované nanočástice zlata nakonec schopny projít placentou a zda mohou následně ovlivňovat placentární funkce, je třeba dále zkoumat [125].

Podobnou studii, zaměřenou však na složení plodové vody prezentovali Barošová a kol. (2014). Zjistili přítomnost částic na bázi kovů (Cu, Si, Ba, Al, Fe, Bi, Ti, Ni, Cr, Sb, Sn, Zn, a Mn) v lidských plodových vodách u normálních těhotenství a u těhotenství s diagnostikovanými vrozenými vývojovými vadami. Částice byly zjištěny v obou typech vzorků (plodových vod) a většina z nich se vyskytovala ve formě aglomerátů do velikosti desítek mikrometrů, skládající se převážně ze submikronových částic [126].

Existují však již také studie, které zjišťují přítomnost nanomateriálů ve zdravých lidských tkáních a tkáních pozměněných vlivem nějakého onemocnění. Převážně se jedná o částice, u kterých není předem známé jejich chemické složení ani jejich velikost. Přesto se předpokládá vliv těchto částic na lidský organismus a z toho vyplývající podíl na vzniku onemocnění. Prokázat přesný mechanismus účinku těchto velmi malých pevných částic na lidský organismus je velmi komplikovaná záležitost. Zelenik a kol. (2012) například zjistili výskyt nanočástic Fe, Cr, Ni, Al, Zn a Cu v patrových mandlích u pacientů s chronickou tonzilitidou a spinocelulárním karcinomem [127]. Také Dvořáčková a kol. (2015) detekovala v 64 vzorcích lidské tkáně z oblasti patrových mandlí u pacientů s chronickým zánětem, částice na bázi kovů. Nejčastěji byly zjištěny částice Fe, Cr, Ni a Al ve velikostech od 500 nm do 25  $\mu$ m. Většina z těchto částic tvořila agregáty [45]. Současně Čábalová a kol. (2015) detekovali v hypertrofické nosní sliznici u pacientů s chronickou rhinosinusitidou, mikronové a nanočástice na bázi kovů, převážně s obsahem Fe, Mn, Ba a Ti. Částice menších rozměrů byly zjištěny v tkáni z oblasti vzdálenější od nozder [128].

Ani v jedné z těchto studií však neprokázali přímou závislost mezi nanočásticemi v tkáních a vznikem či výskytem onemocnění. Naopak jsou již známé dlouhodobé epidemiologické studie, které se zabývaly účinky ultrajemných částic, obsažených převážně v prachu, na kardiovaskulární a respirační systém člověka. Například epidemiologické studie dobrovolníků

prokázaly, že obsah inhalovaných ultrajemných částic má přímý vliv na kardiovaskulární systém, na změny srdečního rytmu a arteriálního průměru [129-132]. V další epidemiologické studii byly zjištěny významné vztahy, z nichž vyplývá, že zvýšení znečištění ovzduší jemnými částicemi, zejména v důsledku emisí z dopravy, vedlo ke zvýšení morbidity a úmrtnosti v populaci, která je citlivější k respiračním a srdečním problémům [133]. Kontrolované klinické laboratorní studie prokázaly ukládání ultrajemných částic v celém plicním systému spolu s kardiovaskulárními problémy [5,71,72,134]. V těchto studiích však nejsou zjištěny konkrétní chemické a fázové složení jednotlivých složek prachu a jeho přesná velikost. Je tedy jasné, že je nutný hlubší a dlouhodobý výzkum v oblasti vlivu pevných nanočástic na lidský organismus, s významným propojením těchto dvou typů studií.

Samostatným odvětvím jsou studie expozice ultrajemným částicím a nanočásticím v pracovním prostředí. V tomto případě může být známé chemické složení sledovaných částic, ne vždy však jejich velikost. Patří sem například studie horníků v uhelných dolech, kteří jsou dlouhodobě vystaveni působení ultrajemných prachových částic. Tyto studie prokázaly akumulaci takovýchto částic převážně v játrech a slezině horníků [47]. Významné bylo zjištění, že byla akumulace prachu vyšší u horníků, kteří již předtím vykazovali závažné plicní problémy. Podle Donaldsona a kol. (2005) by navíc poškozené plíce nebo plíce s velkým množstvím deponovaných prachových částic, mohly zapříčinit přestup ultrajemných částic do krevního systému [47]. Je tedy známo, že vysoce jemné prachy o stejných rozměrech jako nanočástice tak pronikají tělem prostřednictvím inhalace a jsou uloženy v plicích. Plíce nemusejí nutně uspět při odstraňování těchto nežádoucích částic, které pak způsobují plicní zánět. To může vést k vývoji plicních onemocnění specifických pro povahu prachu, který je způsobil, příkladem může být pneumokonióza (silikóza, azbestóza), rakovina plic, onemocnění ze sváření, astma z povolání, berýlióza atd. [135-137].

Zajímavou studií z hlediska pracovní expozice je studie Pelclové a kol. (2015). V této studii autoři prokázali v dýchacím traktu pracovníků s bílým pigmentem ( $\text{TiO}_2$ ) výskyt částic/shluků  $\text{TiO}_2$ . Bylo také zjištěno, že v průběhu výroby bílého pigmentu byli pracovníci vystaveni částicím  $\text{TiO}_2$  a tyto částice mohli přetrvávat v plicích exponovaných zaměstnanců po dobu nejméně několik hodin po skončení směny [46].

Ostiguy a kol. (2003, 2005) uvedl ve svých studiích, že manganismus, neboli otrava manganem, souvisí s akumulací manganu v mozku, i když přesný mechanismus této akumulace není doposud prokázán [94,95]. Manganismus se většinou týká právě profesní expozice, a to převážně u profese svářeč. Za zmínku stojí také studie Brema a kol. (2006), v které autoři zjišťovali přítomnost částic železa (magnetitu –  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ve vzorcích lidské

mozkové nádorové tkáně - meningeomy, ve srovnání s mozkovou tkání bez nádorů – hipokampální tkáň od pacientů s meziální epilepsií. V rámci studie autoři zjistili, že lidská mozková nádorová tkáň obsahovala o řád vyšší koncentrace ferimagnetických částic než tkáň bez nádorů (hipokampální) [138]. Vzhledem k tomu, že autoři této studie neuvedli pracovní anamnézy jednotlivých pacientů, nedá se jasně říci, zda se jednalo také o pracovní expozici, nicméně se to nedá ani vyloučit.

Mechanismus účinku prachu je v pracovním prostředí úplně stejný, jako v běžném životě. Rozdíl je pouze v tom, že zaměstnanci jsou většinou vystaveni působení částic prakticky denně a v daleko větším rozsahu. Dochází tedy mnohem dříve k možným zdravotním komplikacím, které mohou být způsobeny právě vlivem částic různé velikosti a chemického složení.

## **2.7 Použití Ramanovy mikrospektroskopie v analýze tkání**

Ramanova spektroskopie je již dlouho využívána v celé řadě biomedicínských aplikací, resp. diagnostiky. Jedná se například o odlišení normální, zdravé tkáně od tkáně nemocné, identifikace jednotlivých buněk, detekce přítomnosti cizích vměstků po implantaci a změny v tkáních po interakci s některými chemickými činidly apod. [139,140]. Tato technika se také používá při „*in vivo*“ a při diagnostickém zobrazování různých typů rakoviny u člověka [141]. Mohou tak být určeny hranice mezi normální a patologickou tkání, založené na jednotlivých biochemických spektrech [142]. Navíc Ramanova mikroskopie může být použita pro sledování intracelulárních nanočástic a současně může poskytovat informace o biochemických interakcích uvnitř buňky [143]. Nicméně jedna nevýhoda spočívá v tom, že samotné biomolekuly emitují pouze nízké intenzity signálu [142,144]. Movasaghi a kol. (2007) a vytvořili pomocí Ramanovy spektroskopie databázi molekulárních „fingerprintů“, která je dobrým vodítkem při určování chemické struktury biologických tkání [145]. Talari a kol. (2015) tuto databázi navíc doplnili o pásy typické pro nádorovou tkáň [146]. Výhodou Ramanovy spektroskopie je pak schopnost diagnostikovat časný nástup nemoci, rychle, neinvazivně a jednoznačně [147].

Podle Kline a kol. (1997) je vizualizace chemických sloučenin (lipidů a proteinů) v lidské prsní tkáni pomocí Ramanovy spektroskopie technikou vhodnou pro neinvazivní zobrazení a klasifikaci nádoru prsu [148], současně se Ramanova spektroskopie také používá u lidské prsní tkáně pro odlišení benigních a maligních lézí, a to také pomocí stanovení chemického složení [149].

Ramanova spektroskopie je ovšem také široce používána jako důležitý klinický nástroj pro

diagnostiku rakoviny „*in vivo*“ v reálném čase. Ramanova spektra mohou být získána z celých orgánů a tkání, ale také na buněčné a molekulární úrovni Ramanovy spektroskopie může rozlišovat maligní tkáně od normálních tkání a může například během operace hodnotit nádorové okraje nebo sentinelové lymfatické uzliny. Na úrovni buněk mohou být Ramanova spektra použita k monitorování intracelulárních procesů probíhajících v krevním oběhu. Na biomolekulární úrovni mohou povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (tzv. SERS – angl. surface enhanced Raman spectroscopy) pomáhat detekovat biomarker na povrchu nádoru, stejně jako hodnotit účinnost protirakovinových léčiv. Ramanovy mapy dále odhalují nehomogenní rozložení různých sloučenin, zejména bílkovin, lipidů, mikrokalcifikací a jejich metabolických produktů v rakovinných tkáních prsu. Všechny tyto informace mohou pomoci k lepšímu porozumění celého mechanismu rakoviny prsu [150].

Hu a kol. (2008) srovnávali pomocí Ramanovy mikrospektroskopie vzorky tkání normální žaludeční sliznice a sliznice nádorové. Zjistili zřejmé spektrální změny v oblasti  $1156\text{ cm}^{-1}$  a  $1587\text{ cm}^{-1}$  mezi zdravou a nádorovou tkání. Podle autorů je pás v oblasti  $1587\text{ cm}^{-1}$  intenzivnější ve zdravé tkáni a může být přisuzován valenční vibraci lipidů nebo retinolu (vitamín A). Naopak v nádorové tkáni jsou intenzivnější pásy v oblasti  $1156\text{ cm}^{-1}$  a  $1522\text{ cm}^{-1}$  a mohou naznačovat vyšší obsah karotenoidů v maligní sliznici [151]. Min a kol. (2005) Ramanovu spektroskopii použili k odlišení zdravé plicní tkáně od plicní tkáně postižené nádorem. Využili laser vlnové délce 1064 nm a tkáň byla v nativním stavu bez jakékoliv úpravy. Zjištěná Ramanova spektra vykazovala jasný rozdíl mezi zdravou a nádorovou plicní tkání. Nádorová plicní tkáň vykazovala oproti zdravé plicní tkáni silný pás v oblasti  $1659\text{ cm}^{-1}$  [152]. Rakovina děložního hrdla je třetím nejčastějším onemocněním rakoviny po celém světě. Mortalita související s rakovinou děložního čípku však může být významně snížena, pokud je onemocnění zjištěno v předmaligním stádiu. Rashid a kol. (2014) prokázali, že Ramanova mikrospektroskopie by mohla být užitečná pro včasnou detekci pre-maligních změn v cervikální tkáni. Pomocí vytvořených spektrálních map dokázali rozlišit tkáň děložního čípku až do několika vrstev (vazivové tkáň, bazální, para/bazální a povrchové vrstvy). V normálních oblastech abnormálních vzorků byly pozorovány také biochemické změny spojené s onemocněním, kde nebyly patrné morfologické změny. Tato studie tedy ukázala, že Ramanova mikrospektroskopie by mohla být užitečná pro včasnou detekci premaligních změn také v cervikální tkáni [153].

Již od devadesátých let se také pomocí Ramanovy spektroskopie provádí histochemická analýza normálních lidských artérií a artérií s aterosklerotickými pláty. Bylo zjištěno, že u normálních tepen lze v Ramanových spektrech detekovat dominantní pásy skupiny proteinů okolo  $1658\text{ cm}^{-1}$  a  $1252\text{ cm}^{-1}$  a u sklerotických tepen jsou navíc pásy cholesterolu pod



1000  $\text{cm}^{-1}$  [154,155]. Ramanova spektroskopie se také využívá pro diagnostiku a popis morfologie aterosklerózy přímo v koronárních tepnách [156]. Plazmonické nanomateriály, bývají jako látky dodávající léčivo nebo bio-zobrazovací činidla zaváděny intravenózně do biologických systémů. Nicméně, potenciál aglomerace těchto nanočástic v biologických systémech by mohly dramaticky ovlivnit jejich farmakokinetický profil a toxický potenciál. Je tedy důležité screeningově vyhodnotit aglomeraci takto podávaných nanočástic [157]. Jenkins a kol. (2015) vytvořily nové metody monitorování těchto částic, které umožňují rychlé stanovení stavu aglomerace plazmonických nanomateriálů v biologických systémech, konkrétně v krvi. Jednou z nich je právě konfokální Ramanova mikroskopie (cRM), která se využívá především pro rozlišení nanočástic zlata (AuNP) a jejich aglomerátů v krvi [157].

Již na konci dvacátého století byla pomocí Ramanovy spektroskopie měřena moč, ke které byla cíleně přidána glukóza, aceton nebo močovina, současně také byla analyzována glukóza, aceton a močovina v moči u pacientů s onemocněním *diabetes mellitus* (cukrovka). Koncentrace glukózy, acetonu a močoviny v moči, která obsahuje uměle přidánu určitou složku, byla stanovena intenzitou pásu při 1130  $\text{cm}^{-1}$ , 789  $\text{cm}^{-1}$  nebo 1016  $\text{cm}^{-1}$  [158]. Ramanova spektroskopie se v té době začala používat také k analýze močových kamenů a byla snaha tuto metodu zařadit do rutinní analýzy těchto biologických vzorků. Močové kameny byly klasifikovány pomocí Ramanových spekter jejich hlavních složek. Jedná se například o spektra oxalátů vápenatých, fosforečnanů, kyseliny močové, urátů a cystinu. Autoři se nezaměřili pouze na spektra lidských močových kamenů, ale v rámci rozšíření informací analyzovali také močové kameny u zvířat, především u psů, koček a koní [159].

Spektroskopická charakterizace moči byla také využita jako významný nástroj při identifikaci několika patologických stavů, včetně rakoviny. Brindha a kol. (2017) ve své studii pomocí Ramanovy spektroskopie charakterizovali vzorky moči od zdravých subjektů a od pacientů s premaligními a maligními stavy. Dospěli k závěru, že flavoproteiny močoviny, tryptofan a fenylalanin jsou zodpovědné za pozorované spektrální změny mezi normálními a abnormálními skupinami. Dokázali tak, že detekcí metabolitů z moči pomocí Ramanovy spektroskopie lze zjistit chorobné stavy organismu, včetně nádorového onemocnění [160].

Soriana-Ursúa a kol. (2014) testovali pomocí Ramanova spektrometru mozkovou tkáň laboratorních myší, po aplikaci sloučenin bóru a kyseliny borité. Zjistili odlišnosti mezi intenzitou spekter mozkové tkáně bez přítomnosti sloučenin bóru a kyseliny borité a mozkové tkáně s přítomností těchto látek, a to v různých koncentracích. Navíc zjistili, že vysoké dávky kyseliny borité vedly k určitým toxikologickým účinkům, které se projevovaly jako změny chování, zejména ve smyslu zhoršené orientace se v prostoru [161].

Konvenční metody pro studium interakce nanočástic s živými buňkami se opírají o techniky označování, které buď selektivně zabarvují částice, nebo je selektivně značkují značkovacími molekulami. V práci Ahlindera a kol. (2013) byla použita Ramanova zobrazovací technika, bez rozsáhlé přípravy vzorků, pro kvantifikaci prostorové distribuce nanočástic na bázi oxidů kovů uvnitř živých plicních epitelálních buněk (A549). Buňky byly vystaveny působení nanočástic  $\text{TiO}_2$  (oxid titaničitý) nebo  $\text{FeO}$  (OH), (goethitu) v různých inkubačních časech (4 nebo 48 hodin). Autoři s pomocí multivariační analýzy dat hyper-spektrálních Ramanových obrazů určili biodistribuci nanočástic uvnitř živých buněk. Až 40% spekter z buněčného jádra vykazovalo Ramanovy pásy, které souvisely s přítomností nanočásticoxidů kovů bez ohledu na krátké (4 h) nebo dlouhé (48 h) expoziční časy. Závěry byly kvalitativně potvrzeny pomocí skenovací elektronové mikroskopie [162].

Také Salehi a kol. (2014) použil neinvazivní zobrazovací techniku, jakou je konfokální Ramanova mikroskopie, pro sledování nanočástic oxidu titaničitého ( $\text{TiO}_2$ ) v živých buněčných liniích MCF-7 (buňky diferencovaného epitelu prsní žlázy) a TERT (imortalizovaná lidská keratinocytová buněčná linie z oblasti dutiny ústní). Intenzita průniku nanočástic  $\text{TiO}_2$  do buněk odhalila časovou závislost na postupné difúzi nanočástic v celé buňce. Se sledováním difúze cytochromu C do cytoplazmy byla zároveň monitorována buněčná apoptóza (tj. programovaná smrt buňky). Konečná koncentrace  $\text{TiO}_2$  uvnitř mitochondrie byla  $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Z tohoto výsledku autoři usoudili, že přítomnost částic  $\text{TiO}_2$  v buňce není přímou indikací k apoptóze buňky. Tím také prokázali, že pomocí konfokální Ramanovy mikroskopie je možné sledovat průnik částic  $\text{TiO}_2$  do buňky a sledovat jejich apoptický stav [163].

Ramanova spektroskopie a mikrospektroskopie má však také využití při analýze a kontrole potravin a léků, molekulárního objevu léků, návrhu inovativních systémů dodávek léků a kontroly kvality hotových výrobků, včetně těch, které se týkají nanomateriálů. Ramanova spektroskopie se stala extra citlivou metodou, která je použitelná nejen pro analýzu potravin a léků v časně a pozdní fázi farmaceutického vývoje, procesní analýzy a mikrostrukturní analýzy systémů dodávání léků, ale také pro intracelulární a intercelulární zobrazování. Inovací může být také spojení Ramanova spektrometru se sondou z optických vláken. Toto spojení má velký potenciál v aplikacích, jako je monitorování a kontrola jakosti v průmyslovém zpracování potravin, bezpečnost potravin v zemědělské rostlinné výrobě a pohodlná kontrola farmaceutických výrobků, a to i přes obalový materiál [164,165].

Ramanova spektroskopie nachází využití také ve forenzní vědě. Bumrah a kol. (2016) ve své

recenzi poskytlí přehled o vývoji v analýze drog a jiných nelegálních látek pomocí Ramanovy spektroskopie, převážně pro forenzní účely. Ve svém přehledu poukazují na potenciální přínos Ramanovy spektroskopie v kvalitativní a kvantitativní analýze stopových množství zneužitelných léků a jiných nelegálních látek na různých matricích, jako jsou textilie, bankovky, vlákna apod. Jako významné v tomto odvětví autoři zmiňují především nedestruktivní a velmi jednoduchou přípravu analyzovaných vzorků [166].

Závěrem lze uvést, že Ramanova spektroskopie nabízí velké množství aplikačních možností spolu s nepřekonatelnou citlivostí. Nicméně, tato metoda má i jistá omezení, co se týče hloubky průniku světla, proto vhodnějším způsobem, jak využít její atributy například v klinickém prostředí, je spojit Ramanovu spektroskopii s endoskopií [167]. Podle Zavaleta a kol. (2011) by tak mohl Ramanův laser zaměřený na nádor přímo během rutinního kolonoskopického vyšetření nabídnout nový způsob, jak citlivě detekovat dysplastické léze a zároveň obcházet omezenou hloubku průniku Raman a zabránit systémové toxicitě [167].

Jak již tedy bylo uvedeno v předchozích podkapitolách, Ramanova mikrospektroskopie je technikou, která je již dlouhou dobu využívána v biomedicíně pro analýzu zdravých a nemocných tkání, buněk a biomolekul. Také pro charakterizaci potravin, léků a v neposlední řadě je používána pro detekci mikronových a nanometrických částic známého složení ve zvířecích a lidských tekutinách a tkáních. V dostupné literatuře však nejsou zmínky, nebo je jich pouze velmi málo, o detekci pevných částic předem neznámého chemického a fázového složení ve zdravé a nemocné lidské tkáni, převážně v mikronových a submikronových rozměrech. Z toho důvodu byla předložená disertační práce zaměřena právě na toto téma detekce předem neznámých částic v lidské tkáni. Jedná se však o velmi rozsáhlou oblast, a proto byla práce tématicky vymezena pouze na nanočástice /ultrajemné částice deponované v tkáních lidských horních a dolních cest dýchacích. Prostřednictvím inhalační expozice totiž pevné částice mohou nejspíše a nejméně komplikovaně vstoupit do organismu a tkáň, se kterou přijdou jako první do styku, je právě tkáň dýchacích cest.

### **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

#### **3.1. Studované vzorky**

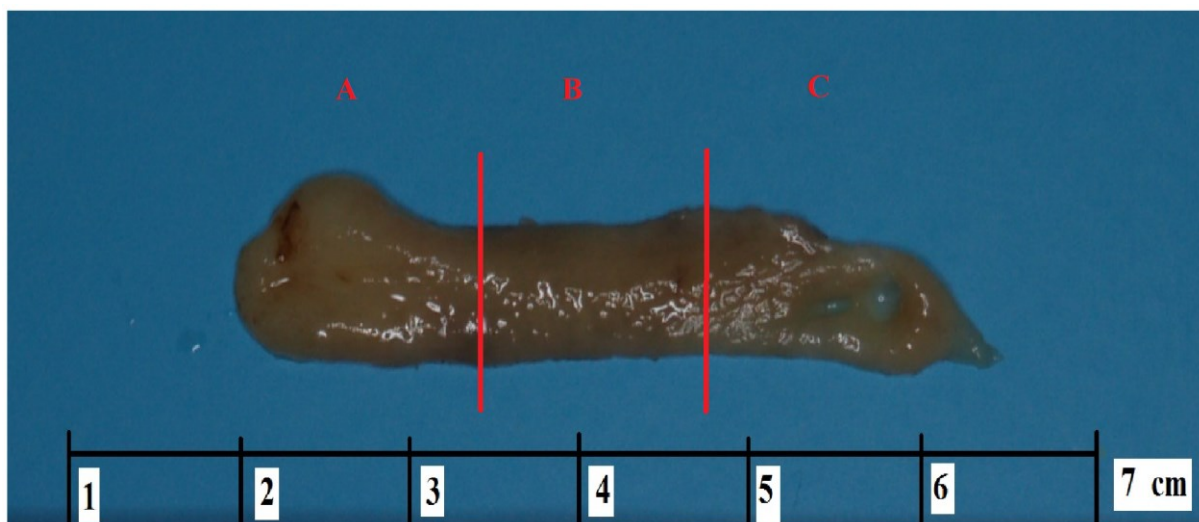
Předkládaná disertační práce je zaměřena na detekci a následnou charakterizaci částic v hypertrofovaných tkáních horních cest dýchacích v oblasti nosní skořepy a částic v nádorových tkáních z oblasti dolních cest dýchacích metodami dostupnými na Centru nanotechnologií, Vysoká škola báňská – Technická Univerzita Ostrava (VŠB – TUO).

Tato práce byla realizována v rámci spolupráce s Fakultní nemocnicí Ostrava (FNO) a schválena Etickou komisí FNO - ENT - Nanočástice, (2 RVO - FNOs / 2013) a evidována na ClinicalTrials.gov (NCT02270125). Disertační práce je také v souladu s Helsinskou deklarací, správnou klinickou praxí a příslušnými regulačními požadavky. Informovaný souhlas byl získán od všech pacientů, kteří poskytli vzorky tkání.

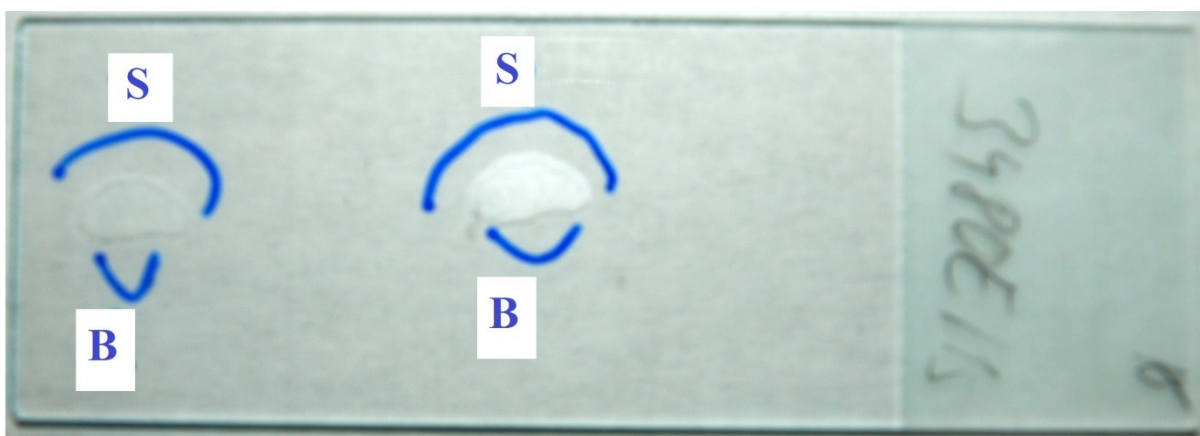
Všechny vzorky, upravené podle potřeb vybraných analytických metod, byly předány k analýzám na Centru nanotechnologií, VŠB – TUO.

##### **3.1.1. Hypertrofická tkáň z oblasti skořep nosních**

Vzorky měkké hypertrofické tkáně v oblasti dolní skořepy nosní byly odebrány na Otorinolaryngologické klinice FNO při standardním chirurgickém výkonu (resekce sliznice dolní skořepy – viz níže). Ve spolupráci s Ústavem patologie FNO byly vzorky tkáně následně zpracovány fixací v 10% vodném roztoku formaldehydu a svislým rozdělením na tři přibližně stejně velké části v závislosti na vzdálenosti od nozder (obrázek 12, části A, B, C). Jednotlivé části byly odvodněny pomocí směsi 96% lihobenzín, izopropylalkohol, xylen a prosyceny parafínem v automatu Tissue-Tek VIP (Sakura). Následně byly „zality“ parafínem do plastových košíčků (bločků). Z každého takto připraveného bločku byly nakrájeny dva řezy o tloušťce 2-4  $\mu\text{m}$ , které byly „nataženy“ na podložní sklíčko a následně byl odstraněn parafín pomocí směsi xylen, lihobenzín (96 %) a lihobenzín (70 %). Na závěr byly takto připravené řezy tkání vysušeny v termostatu při teplotě 37 °C a předány k analýzám. Dva takto připravené paralelní řezy jsou zobrazeny na obrázku 13. Celkem bylo analyzováno 40 vzorků hypertrofické tkáně a dva vzorky referenční (kontrolní) tkáně z oblasti skořep nosních.



Obrázek 12: Vzorek hypertrofické měkké tkáně z oblasti skořepy nosní rozdělen na tři části v závislosti na vzdálenosti od nozder.



Obrázek 13: Vzorek tkáně z oblasti skořepy nosní - dva řezy natažené na mikroskopickém sklíčku. Modře je vyznačena oblast sliznice (S) a báze (B).

### 3.1.2. Vzorky hypertrofické tkáně – cytologické odběry sputa

Principem odběru cytologického materiálu je získání jednotlivých buněk, které tvoří tkáň. V našem případě byly vzorky získány stěrem buněk z povrchu sliznice v oblasti skořep nosních. Stěry byly provedeny u některých vzorků z povrchu hypertrofické tkáně před samotným chirurgickým výkonem (resekce sliznice dolní skořepy) na Otorinolaryngologické klinice FNO. Sterilním odběrovým štětečkem byl setřený obsah nanesen rovnoměrně na povrch podložního sklíčka. Po zaschnutí byl takto připravený vzorek použit k analýze. Celkem bylo takto připraveno a následně analyzováno 9 vzorků. Vzorek na obrázku 14 je cytologický stěr, který je již pokryt tenkou vrstvou zlata (ta je potřebná pro následnou analýzu

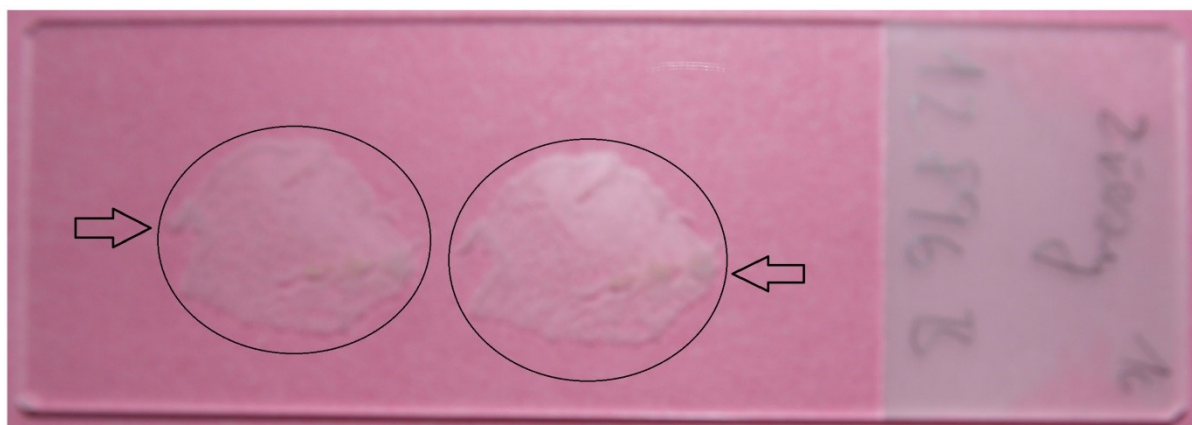
na skenovacím elektronovém mikroskopu). Buňky jsou pouze v oblasti bílých skvrn a bublinek. Souvislá fialová a růžová plocha je pouze naprášená vrstva zlata.



Obrázek 14: Vzorek cytologického stěru buněk z povrchu sliznice v oblasti skořep nosních nanesených na povrch mikroskopického sklíčka. Buňky jsou v oblasti bílých skvrn na sklíčku.

### 3.1.3. Vzorky bronchogenních karcinomů (adenokarcinomy)

Vzorky nádorové plicní tkáně (obrázek 15) byly odebrány na Ústavu patologie FNO a dále bylo postupováno stejně, jako při přípravě vzorků hypertrofické tkáně (viz kapitola 4.1.1).



Obrázek 15: Vzorek nádorové tkáně z oblasti plic - adenokarcinom, dva řezy nataženy na mikroskopickém sklíčku.

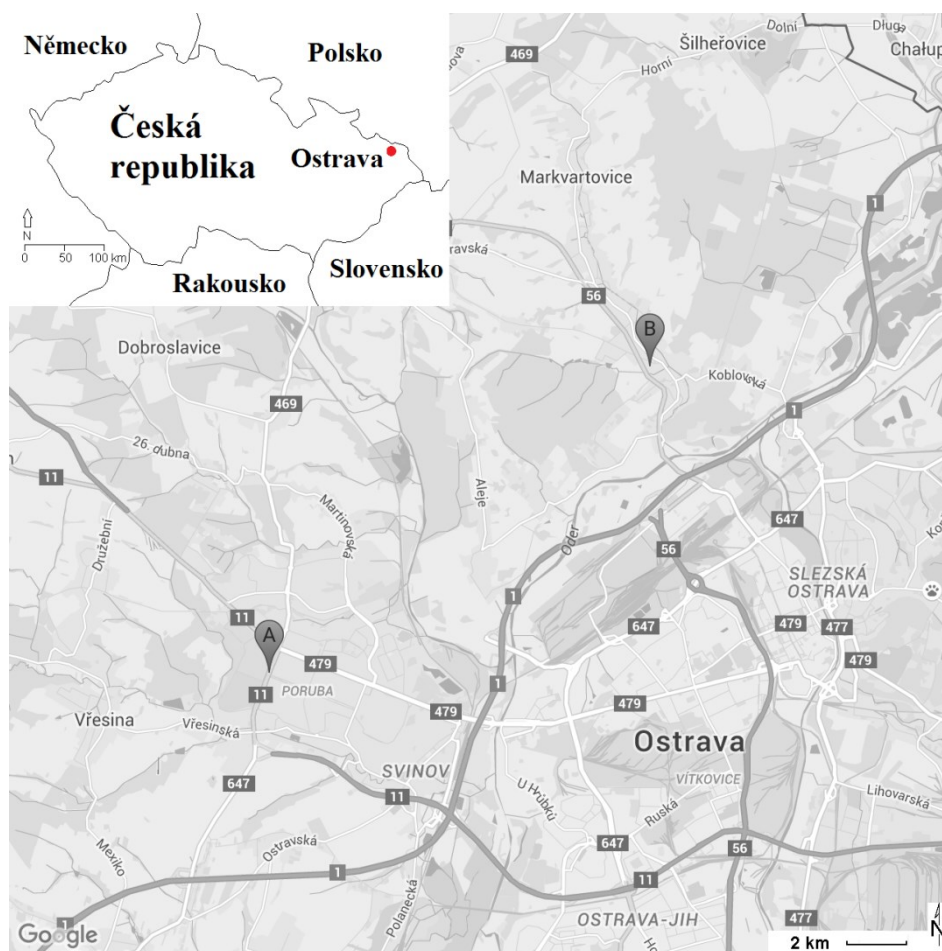
### 3.1.4. Vzorky sedimentovaného prachu z cesty

Navíc byl také studován sedimentovaný prach z povrchu silnic, jako jeden z potenciálních zdrojů znečištění. Částice silničního prachu mohou být následně resuspendovány do vzduchu a může dojít poměrně snadno k jejich inhalaci.

Byly studovány dvě skupiny sedimentovaných vzorků prachu, které byly odebírány z povrchu silnice po dobu osmi měsíců během jednoho roku, a to od března do října roku 2015. První skupina vzorků byla získána z povrchu městské křižovatky, městské části Ostrava - Poruba. Městská část Poruba leží na západě města Ostravy a patří k poměrně hustě obydleným městským obvodům skládajícím se téměř výhradně z bytových domů s ústředním vytápěním a s minimálním přímým vlivem těžkého průmyslu. Druhá skupina sedimentovaných vzorků prachu byla odebírána na povrchu příměstské silnice v obci Ludgeřovice, která leží nedaleko města Ostravy. Vybraná oblast v Ludgeřovicích je dopravně téměř nezatížená, většina znečištění může pocházet pravděpodobně z lokálních systémů vytápění - kotle spalující buď plyn, nebo tuhá paliva (celoroční provoz - ohřev vody). Detailní mapa lokalit, kde byly vzorky odebírány je vidět na obrázku 16. Odběrná místa byla vybrána především z důvodu známého objemu provozu v těchto místech. V místě odběru v Ostravě (městská lokalita) bylo v roce 2015 zaznamenáno průměrné provozní zatížení 20 000 vozidel za 24 hodin [168]. Kromě toho bylo toto odběrné místo v blízkosti rušné křižovatky a přechodu pro chodce, tudíž se předpokládalo časté brzdění automobilů. Naproti tomu místo odběru v Ludgeřovicích (příměstská lokalita) bylo na samém konci slepé ulice vedle dvou samostatných rodinných domů, kde je provoz minimální.

Vzorky prachu byly odebírány z povrchu vozovky o velikosti plochy cca 1 m<sup>2</sup>, smetáním a ukládáním do skleněné nádoby. Odběr byl prováděn jednou měsíčně, od 9:00 do 10:00 dopoledne. Den odběru byl volen v závislosti na meteorologických podmínkách. Odběr vzorků probíhal pouze v době bez dešťových přeháněk, kdy poslední déšť byl nejméně dva dny před samotným odběrem. Z každého místa byl získán vzorek o hmotnosti cca 450-500 g. Takto bylo získáno osm vzorků z městského a osm vzorků z příměstského místa odběru (odpovídající měsícům odběru). Každý vzorek byl homogenizován v rotačním mlýnu (Fritsch Pulversitte) rychlostí 250 otáček/min po dobu 15 minut a následně byl proset přes síto pro velikostní fraksi 200 μm. Velikost zrna byla zvolena dle standardního operačního postupu akreditované laboratoře Centra nanotechnologií VŠB – TUO.





Obrázek 16: Místa odběrů vzorků. A – Ostrava- Poruba, B – Ludgeřovice.

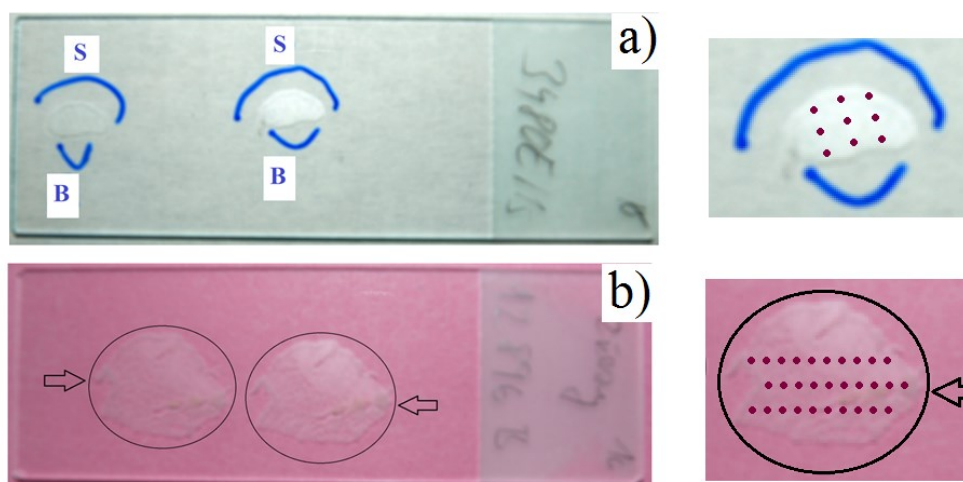
### 3.2. Použité metody

Všechny typy vzorků (tkáně a cytologické stěry) byly primárně analyzovány použitím Ramanova konfokálního mikroskopu XploRA™, (HORIBA JobinYvon, France), kdy nebyla potřeba žádná další úprava vzorků. Následně byly vybrané vzorky analyzovány také použitím skenovacího elektronového mikroskopu (Quanta FEG 450 s EDS analyzátozem APOLLO X a Philips XL30), kdy pro tuto analýzu byly vzorky pokoveny tenkou vrstvou zlata. Vzorky sedimentovaného prachu byly analyzovány pomocí atomové absorpční spektroskopie s elektrotermální atomizací (SPECTRO Ciros Vision EOP a UNICAM 969, Velká Británie). Po zjištění častějšího výskytu částic na bázi železa ve vzorcích plicní nádorové tkáně, byly navíc u těchto vzorků stanoveny magnetizační křivky pomocí magnetometru (EV9 VSM, MicroSense), které mohou odhalit možné magnetické vlastnosti vzorků. Soubor 40 hypertrofických tkání byl také statisticky vyhodnocen.



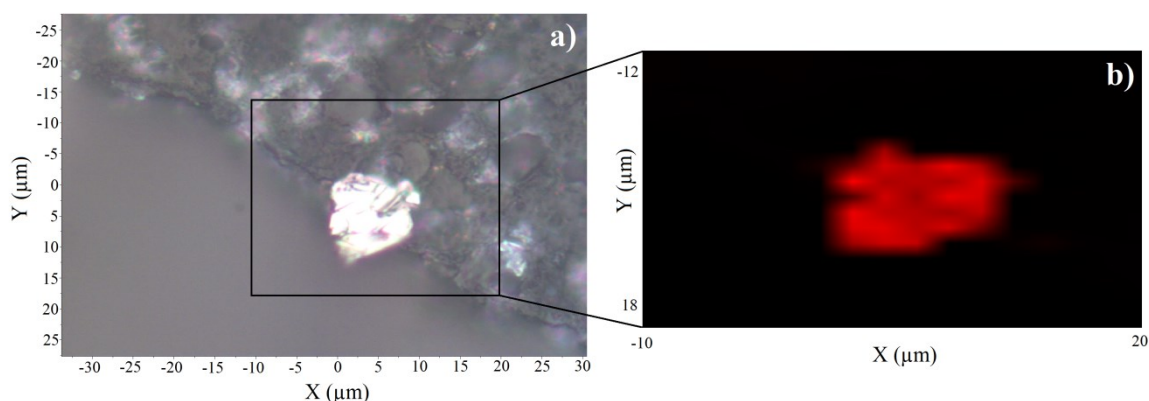
### 3.2.1 Ramanova mikrospektroskopie

Jedním z cílů této práce bylo navrhnout vhodnou metodiku pro efektivní detekci a charakterizaci pevných částic v lidských tkáních. Znalost chemického, ale také fázového složení je velmi podstatné pro predikci případného vlivu pevných částic na lidský organismus a možnou souvislost s některými diagnózami. Ramanova mikrospektroskopie jako nedestruktivní metoda umožňující bodovou analýzu vzorku (spojení Ramanovy spektroskopie s konfokálním mikroskopem) se jeví jako velmi vhodná metoda pro analýzy těchto vybraných tkání. V první fázi byl vzorek tkáně, bez jakýchkoliv úprav, analyzován po jednotlivých vybraných bodech (na základě vizuální odlišnosti) v celé ploše vzorku. Tato metoda byla časově velmi náročná, a tedy analýza většího množství vzorků pro statistické vyhodnocení byla téměř nemožná. Z tohoto důvodu byla hledána alternativa právě pro možnost statistického vyhodnocení. Pro tento účel byla zvolena analýza jen v určitém počtu vybraných jednotlivých bodů, vzdálených od sebe v přibližně stejné délce, ve tvaru jakési mřížky (obrázek 17). Počet bodů byl stanoven dle velikosti tkáně tak, aby byly body rozmístěny rovnoměrně po celé ploše vzorku. Analýza byla provedena pouze v těchto určených bodech. Díky motorizovanému stolku umožňujícímu pohyb vzorku ve všech třech směrech a také určení metrické vzdálenosti, byl nejdříve zjištěn rozměr tkáně a následně pak bylo provedeno rozdělení na jednotlivé body. Tato zvolená analýza pouze v jednotlivých bodech se jevila jako dostatečná pro analýzu většího souboru vzorků. Při srovnání zjištěných fází v tkáni analyzované v celém svém rozsahu a sloučenin zjištěných při analýze téže tkáně pouze v bodech, nebyl zjištěn významný kvalitativní rozdíl. Proto byla metoda analýzy lidské tkáně v bodech použita na všechny další analýzy metodou Ramanovy mikrospektroskopie.



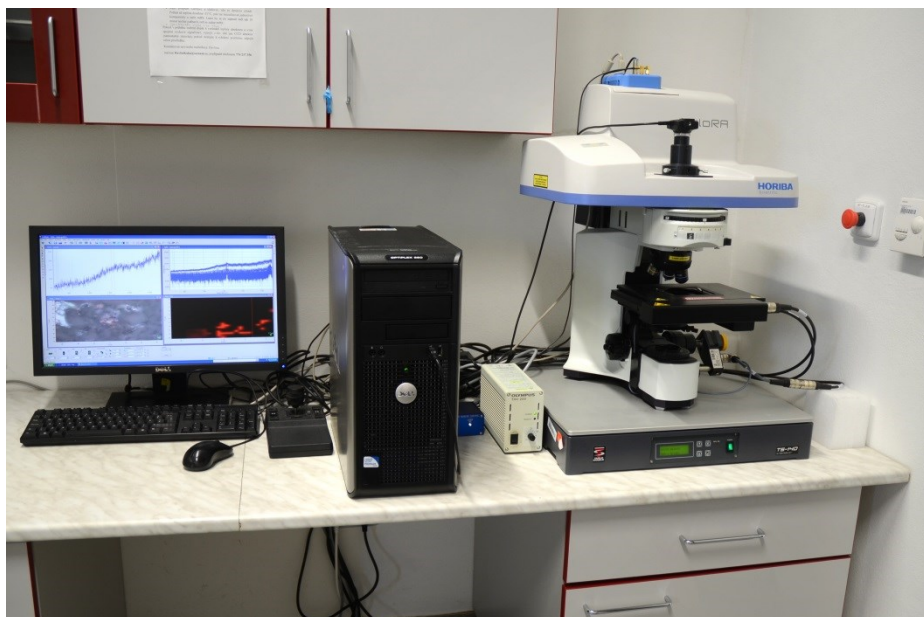
Obrázek 17: Sít' devíti bodů zvolena pro vzorek hypertrofické měkké tkáně z oblasti skořepy nosní a) a sít' třiceti bodů zvolená pro vzorek plicní nádorové tkáně -adenokarcinom b).

Za účelem zjištění velikosti a skutečného tvaru detekované částice byly navíc použitím mapování vytvořeny spektrální mapy, které názorně zobrazily přítomnou částici/shluk částic v tkáni (obrázek 18). Tato analýza představuje automatické měření v takzvané síti bodů (tzv. Ramanovo mapování), která pokrývá celou vybranou oblast a jejichž vzdálenost od sebe je zvolena individuálně, podle konkrétní měřené oblasti. Přestože analýza ve vybraných bodech urychlila Ramanovu mikroanalýzu, naměření spektrální mapy je však také velmi časově náročné, proto bylo provedeno jen ve vybraných bodech vzorku. Použití těchto popsaných metod Ramanovy mikrospektroskopie bylo popsáno již v publikaci Čabanová a kol. (2017) [169].



Obrázek 18: Ramanova spektrální mapa částice grafitu. Vlevo obrázek z optického mikroskopu a) a vpravo spektrální mapa, kde je vidět skutečná velikost a tvar částice (červená barva), okolní prostředí je znázorněno černě b).

Ramanova mikroanalýza byla provedena pomocí Smart Raman mikroskopického systému XploRA™ (HORIBA JobinYvon, Francie), (obrázek 19), a to v celém rozsahu vlnočtů od 100 do 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Byl použit objektiv se zvětšením 100 x, který je vhodný pro vzorky v podobě tenkých vrstev či tekutin zaschlých na podložním sklíčku. Byl použit laser o vlnové délce 532 nm s excitačním laserovým zdrojem 20 - 25mW. Průměr laserového svazku je přibližně 500 nm, což již umožňuje bodovou analýzu částic, či shluků částic. Zařízení XploRA™ umožňuje zvolit intenzitu laserového paprsku v rozmezí: 0,1, 1, 10, 25, 50 a 100%. Při detekci částic v lidské tkáni byla intenzita laseru zvolena spíše nižší (1%, 10% nebo 25%), a to převážně z důvodu zabránění poškození vzorků. Mřížka byla nastavena na 1200 vrypů/mm. Při měření Ramanových spektrálních map bylo nastavení stejné jako při jednotlivých bodových analýzách a mapy byly měřeny s posunem stolku 1  $\mu\text{m}$ . Naměřená Ramanova spektra a spektrální mapy byly upraveny s použitím softwaru LabSpec, který je součástí systému XploRA™.



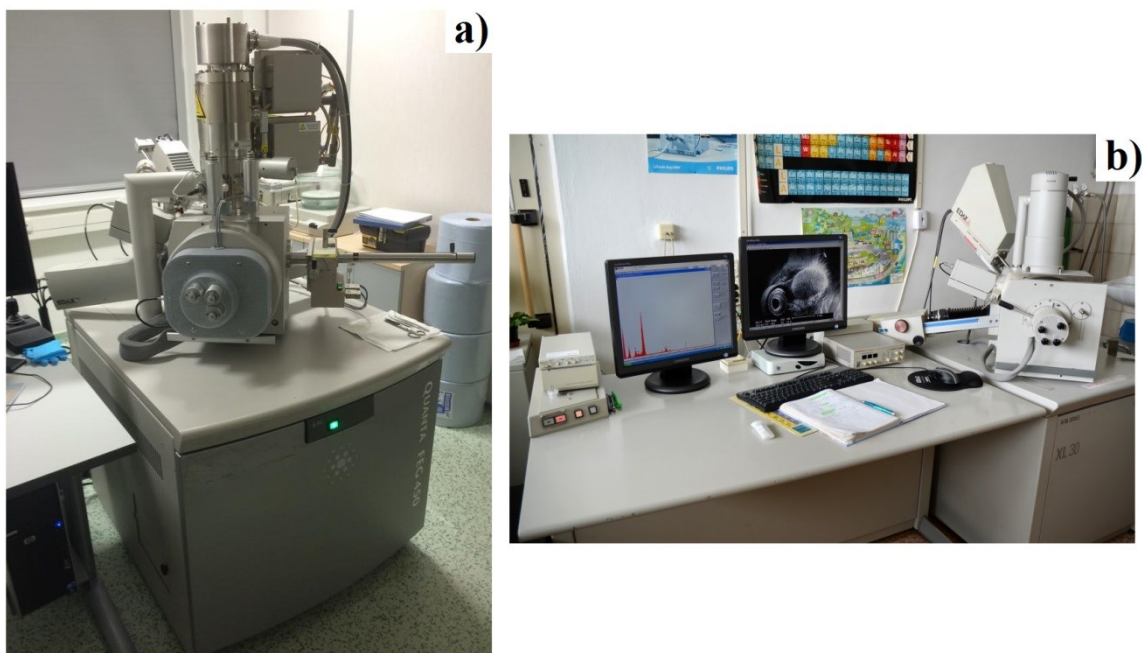
Obrázek 19: Ramanův mikrospektrometr XploRA™ (HORIBA JobinYvon, Francie)

### 3.2.2 Skenovací elektronová mikroskopie

Pro přesnější charakterizaci morfologie, velikosti a zjištění elementárního složení detekovaných pevných částic byla dále provedena doplňující analýza na skenovacím elektronovém mikroskopu Quanta FEG 450 (FEI) s EDS analyzátozem APOLLO X (EDS), (Obrázek 20a) a na skenovacím elektronovém mikroskopu Philips XL30 (obrázek 20b).

Oba typy mikroskopů používají pro měření dva zobrazovací detektory: SE - detektor sekundárních elektronů a BSE - detektor zpětně odražených elektronů. Navíc je součástí přístroje rentgenový (RTG) detektor na mikroanalýzu vzorků – (SEM – EDS).

Vzorky tkání nanesených na sklíčku nebyly tepelně ani elektricky vodivé, z toho důvodu bylo nutné vzorky pokrýt tenkou vrstvičkou kovu pro zajištění optimální vodivosti. Vzorky byly proto naprášeny zlatem v zařízení pro naprašování povrchů POLARON SC 7640. Takto upravené vzorky byly vloženy na pohyblivý stolek v komoře mikroskopu, který je součástí přístroje, a za vysokého vakua změřeny. Jelikož se jedná také o poměrně časově náročnou metodu, která byla provedena pracovníci z Centra nanotechnologií, VŠB - TUO byla použita jen pro vybrané vzorky (9 vzorků hypertrofické tkáně, 9 vzorků cytologických stěrů a 19 vzorků plicní tkáně), kdy se jednalo pouze o doplňková měření k Ramanově mikrospektroskopii.



Obrázek 20: Skenovací elektronový mikroskop Quanta FEG 450 (FEI) a) a skenovací elektronový mikroskop Philips XL30 b).

### 3.2.3 Atomová absorpční spektroskopie s elektrotermální atomizací

Pevné vzorky sedimentovaného prachu byly rozpuštěny ve směsi koncentrovaných kyselin ( $\text{HF} + \text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ ) při  $90\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu několika hodin až k úplnému rozkladu. Po celkovém rozkladu byly kapalné vzorky analyzovány atomovou emisní spektroskopií pro identifikaci s indukčně vázanou plazmou (AES-ICP), (SPECTRO Ciros Vision EOP, Německo). Koncentrace Sb a Sn v rozložených vzorcích byla stanovena atomovou absorpční spektroskopií s elektrotermální atomizací (AAS-GF), (UNICAM 969, Velká Británie). Měření bylo provedeno pracovníky z Centra nanotechnologií, VŠB- TUO. V prachových vzorcích byl předpokládán mnohem vyšší výskyt částic na bázi kovů než v tkáních, z toho důvodu byla tato metoda použita pouze na analýzu prachových vzorků.

### 3.2.4 Měření magnetizačních křivek vzorků

Vzorky plicní nádorové tkáně byly změřeny na vibračním magnetometru EV9 VSM, MicroSense (obrázek 21), který je široce používaným experimentálním zařízením ke stanovení magnetických vlastností nejrůznějších typů materiálů. Tato experimentální technika je založena na principu, kdy vibrující vzorek umístěný do externího magnetického pole generovaného elektromagnetem indukuje napětí, které je snímáno detekčními cívkami a jehož

velikost je přímo úměrná magnetickému momentu  $m$ , respektive magnetizaci  $M$ , měřeného vzorku. Vykreslení magnetického momentu jako funkci magnetického pole tvoří základní charakteristiky zkoumaného magnetického materiálu. Pro měření vzorků bylo nastaveno na měřicím přístroji VSM maximální magnetické pole  $15\,000\text{ Oe} = 1,5\text{T}$ . Měření probíhalo při teplotě  $20^\circ\text{C}$ .



Obrázek 21: Vibrační magnetometr EV9 VSM firmy MicroSense

### 3.2.5 Statistická analýza

Všechny statistické analýzy byly provedeny v programu R Core Team [170]. Mnohorozměrné analýzy pak konkrétně v balíku FactoMineR [171]. Pro všechny testy byla zvolena hladina signifikance  $\alpha = 0.05$ .

Pro soubor hypertrofických tkání z oblasti skořep nosních byla provedena hierarchická shluková analýza na hlavních komponentech (Hierarchical clustering on principal components, HCPC) za účelem charakterizace skupin vzorků se statisticky významně odlišujícími se vlastnostmi. Shlukování samotné bylo provedeno Wardovou metodou na pěti prvních hlavních komponentech stanovených mnohonásobnou korespondenční analýzou.

Pro plicní nádorovou a referenční tkáň byl proveden chí kvadrát test (test dobré shody) pro testování asociace jednotlivých kategoriálních proměnných, pro popsání obecných gradientů variability v datech, byla provedena Mnohonásobná korespondenční analýza (Multiple correspondence analysis, MCA).

Pro soubor vzorků sedimentovaných prachů byla provedena analýza hlavních komponent



(Principal component analysis, PCA) za účelem stanovení obecných vazeb mezi jednotlivými proměnnými (přítomnost jednotlivých detekovaných kovů, měsíc odběru a místo odběru vzorků). Pro zhodnocení vztahů mezi všemi dvojicemi jednotlivých proměnných byla PCA doplněna výpočtem korelační matice (Pearsonův korelační koeficient) a její grafickou reprezentací.

Z důvodu nestejných hodnotících proměnných a odlišných požadovaných výstupů byly na jednotlivé soubory vybrány rozdílné statistické analýzy.

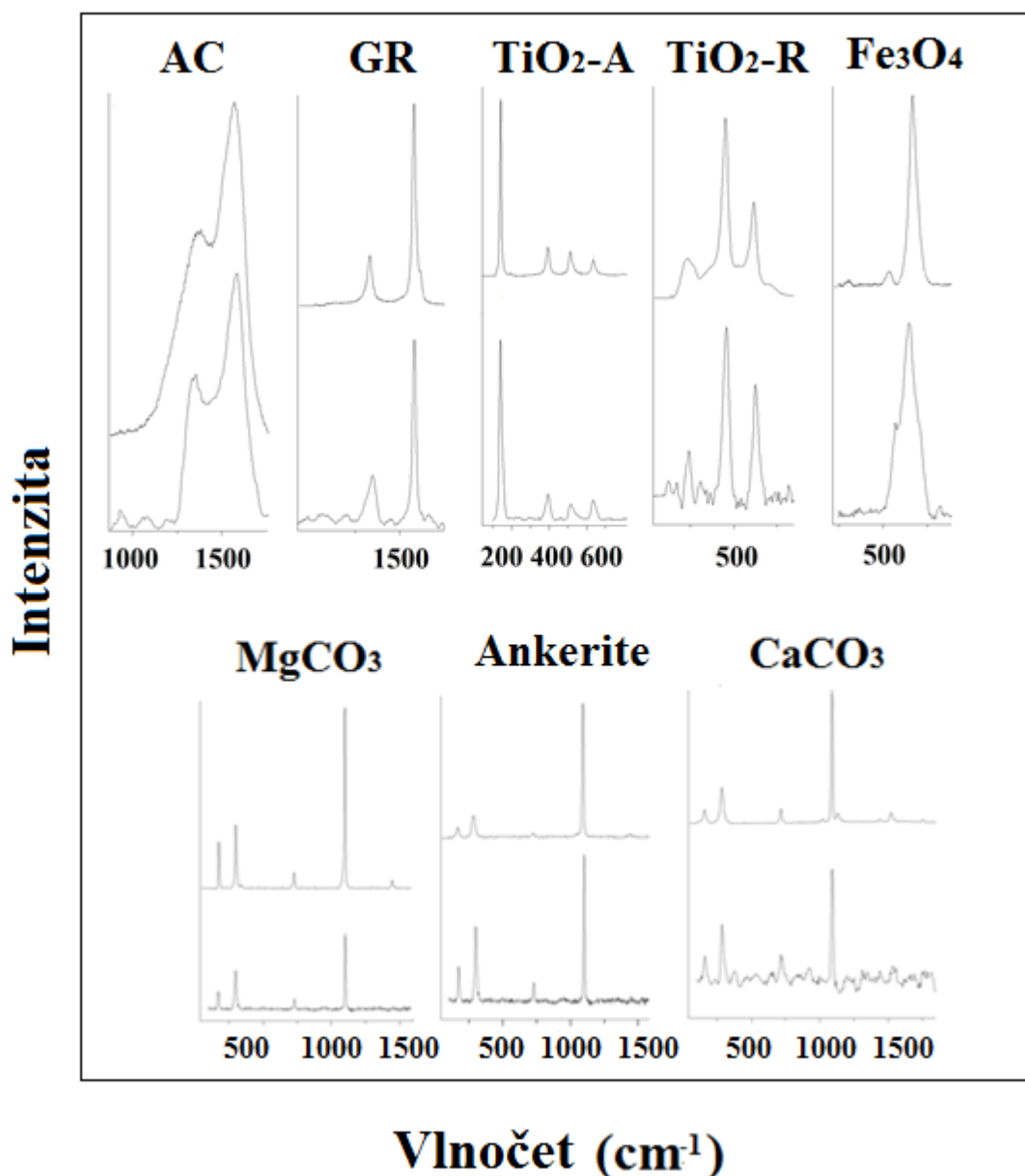
## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Hypertrofické tkáně z oblasti skořepy nosní

Analýza pomocí Ramanova mikrospektrometru u prvního souboru vzorků hypertrofické tkáně (M1 – M9) byla provedena v bodech rozmístěných rovnoměrně po celé ploše vzorku, tak jak bylo popsáno v kapitole 4.2.1. Počet měřených bodů (9) byl zvolen dle velikosti vzorku. Detekované sloučeniny jsou uvedeny v tabulce 1. Přehled vybraných spekter detekovaných fází je uveden na obrázku 22. Detekované sloučeniny byly identifikovány na základě srovnání se spektrální knihovnou programu LabSpec, který je součástí přístroje XploRA™. Na obrázku jsou vždy uvedena obě spektra, kde dolní spektrum odpovídá naměřenému spektru a horní spektrum odpovídá referenčnímu spektru ze spektrální knihovny. Pro kontrolu bylo také provedeno srovnání s dostupnou literaturou, což také potvrdilo shodu se spektry ze spektrální knihovny [172,173].

*Tabulka 1: Přehled detekovaných fází a prvků ve vzorcích hypertrofické tkáně (mukotomie) pomocí Ramanova mikrospektrometru a skenovacího elektronového mikroskopu. (AC – amorfní uhlík, GR – grafit, TiO<sub>2</sub>-A – anatas, TiO<sub>2</sub>-R – rutil).*

Vzorek	Pohlaví	Věk	Kouření	Povolání	Detekované fáze Raman	Detekované prvky SEM
M1	M	78	N	Důchodce (svářeč)	AC, ankerit, CaCO <sub>3</sub> , GR, TiO <sub>2</sub> -A	Ba, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Zn
M2	M	38	N	Programátor	CaCO <sub>3</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , TiO <sub>2</sub> -A, TiO <sub>2</sub> -R	Ba, Cu, Fe, Ti, Zn
M3	M	38	N	Zámečnick/ svářeč	AC, CaSO <sub>4</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , GR, TiO <sub>2</sub> -A	Ba, Cu, Cd, Cr, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Ti, Zn
M4	M	65	A	Strážník	AC, ankerit, GR, TiO <sub>2</sub> -A, TiO <sub>2</sub> -R	Ba, Fe, Ti
M5	Ž	26	N	Studentka	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , GR	Ba, Fe
M6	Ž	44	N	Montážní dělnice	AC, CaCO <sub>3</sub>	Fe
M7	M	28	N	Student	GR	Fe, Ti, Zn
M8	M	44	A	Řidič	CaCO <sub>3</sub> , GR	Fe
M9	Ž	58	N	Výtvarnice	GR, TiO <sub>2</sub> -A	Fe, Cu

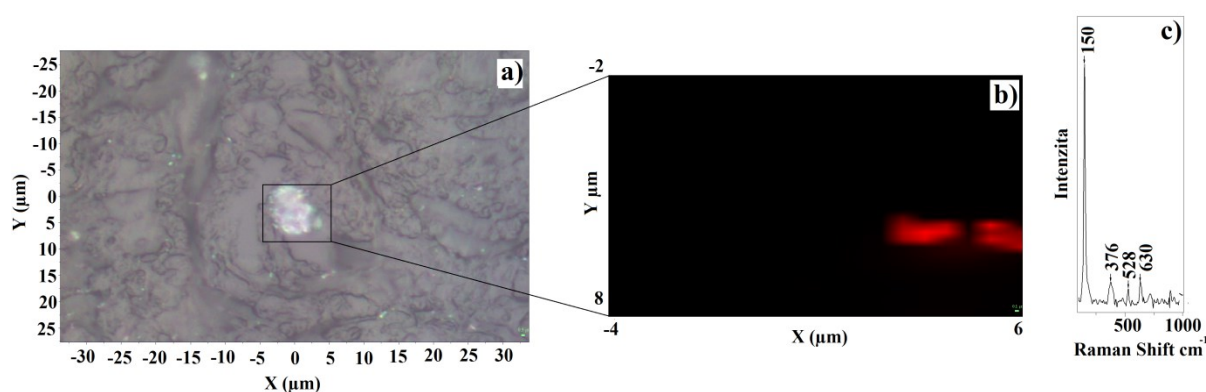


Obrázek 22: Vybraná spektra sloučenin nalezených ve vzorcích hypertrofických tkání, změřená pomocí Ramanovy mikrospektroskopie. (AC- amorfni uhlík, GR – grafit, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> – magnetit, TiO<sub>2</sub>-A – anatas, TiO<sub>2</sub>-R – rutil, MgCO<sub>3</sub> uhličitan hořečnatý, (CaFe(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) - ankerit, CaCO<sub>3</sub> - kalcit). Dolní spektrum je naměřené a horní spektrum je referenční spektrum z knihovny spekter.

S ohledem na zjištění přibližného tvaru a velikosti částic/shluků detekovaných ve vzorcích tkání pomocí Ramanova mikrospektrometru, bylo provedeno mapování zvolené oblasti. Při mapování je analyzovaná vybraná oblast vzorku mapována s krokem, který je určen na základě velikosti dané oblasti, většinou byl krok zvolen 1 μm. Tato metoda má jistou výhodu oproti měření pouze v jednotlivých bodech. Na obrázku 23a je znázorněn vzorek hypertrofické tkáně (mukotomie), který byl pořízen prostřednictvím světelného mikroskopu,



jenž je součástí přístroje XploRA™. Podle tohoto snímku by měla být nalezená částice/shluk částic velikost přibližně 10  $\mu\text{m}$ . Při bodové analýze bylo zjištěno, že částice/shluk částic obsahuje jednu z forem oxidu titaničitého, a to anatas (obrázek 23c). Avšak při mapování celé vybrané oblasti bylo zjištěno, že na ploše je ve skutečnosti více oddělených částic anatasu, jejichž velikost je mnohem menší než původních 10  $\mu\text{m}$  (obrázek 23b). Tedy snímek z optického mikroskopu je velmi nepřesný, kdy vizuálně odlišná částice neodpovídala cizorodému materiálu, ale pravděpodobně šlo o přirozenou součást tkáně, kdy přesné určení nebylo možné, jelikož zbylá oblast vykazovala značnou fluorescenci. Nevýhodou v případě mapování je, že jej zatím nelze použít na analýzu kompletně celého vzorku studovaných tkání, a to hlavně z časových důvodů, ale také díky nerovnému povrchu řezu tkáně, s čímž souvisí odlišná intenzita signálu po celé ploše vzorku.



Obrázek 23 : Ramanova spektrální mapa vybrané oblasti vzorku hypertrofické tkáně (mukotomie, vzorek M3), kde a) je tkáň pod světelným mikroskopem s vybranou oblastí, b) spektrální mapa vybrané oblasti (červeně - místa detekce  $\text{TiO}_2$  ve formě anatasu, černě - okolní tkáň) a c) naměřené spektrum  $\text{TiO}_2$  ve formě anatasu v červené oblasti spektrální mapy.

Jak již bylo zmíněno výše, použitím Ramanovy mikrospektroskopie se v hypertrofických tkáních podařilo detekovat přítomnost pevných částic/shluků. Patří mezi ně i oxid titaničitý ( $\text{TiO}_2$ ), který se vyskytuje v několika různých krystalických strukturách. Nejčastěji vyskytující se přirozená forma  $\text{TiO}_2$  je rutil. Anatas a brookit jsou další dva vzácnější polymorfy [64]. Oxid titaničitý je obecně široce používán jako pigment a představuje cca 70% z celkového objemu výroby pigmentu na světě. Používá se jako bělidlo do barev, plastů, papírů, inkoustu, potravin, zubních past, léčiv a kosmetických přípravků [174]. V hypertrofické tkáni pacientů byl pomocí Ramanovy mikrospektroskopie zjištěn anatas ve vzorcích M1-M4 a M9 a rutil ve vzorku M2 (tabulka 1, obrázek 22). Zároveň byla ve většině případů potvrzena SEM-EDS analýzou přítomnost titanu (tabulka 1). Podle IARC, je  $\text{TiO}_2$

klasifikován jako potenciálně karcinogenní pro lidi, skupina 2B [46,65]. Na obrázku 23 vidíme mapu částice oxidu titaničitého ve formě anatasu. Červeně zobrazená částice (obrázek 23b) je ve velikosti okolo jednoho mikrometru. Ale při detailnějším zkoumání je patrné, že mohlo jít i o částice mnohem menších rozměrů, které pravděpodobně vytvořily shluk. Z toho vyplývá, že částice oxidu titaničitého přítomné v tkáních se mohly původně vyskytovat i ve velikostech pod 1 $\mu$ m a vlivem okolních podmínek mohly tyto částice vytvořit aglomeráty (agregáty). Tato skutečnost byla potvrzena také SEM analýzou, pomocí které byly zjištěny v hypertrofické tkáni i částice titanu pod jeden mikrometr (vzorek M4), (tabulka 2).

Tabulka 2: Přehled velikostí částic, detekovaných pomocí SEM-EDS ve vzorcích hypertrofické tkáně (je uvedena nejmenší detekovaná velikost).

VZOREK	PRVKOVÉ SLOŽENÍ A VELIKOST ČÁSTIC ( $\mu$ m)DETEKOVANÝCH V JEDNOTLIVÝCH VZORCÍCH										
	Ba	Cd	Cu	Cr	Fe	Mn	Mo	Ni	Ti	Zn	Pb
M1	4	-	5	2,5	4	8	-	2,5	-	3	-
M2	2	-	$\leq 1$	-	2	-	-	-	$\leq 1$	10	-
M3	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	2	2	3	3	$\leq 1$	2	$\leq 1$	5
M4	3	-	-	-	2	-	-	-	$\leq 1$	-	-
M5	4	-	-	-	$\leq 1$	-	-	-	-	-	-
M6	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-
M7	-	-	-	-	8	-	-	4	-	7	-
M8	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-
M9	-	-	5	-	3	-	-	-	-	-	-

Nanočástice TiO<sub>2</sub> mají díky svým malým velikostem jedinečné vlastnosti, pro které jsou velmi často využívány ve farmaceutické a kosmetickém průmyslu. Nicméně velká plocha povrchu spolu s vysokým oxidačně-redukčním potenciálem způsobuje vysokou reaktivitu těchto nanočástic, což může mít negativní vliv na životní prostředí i na lidské zdraví [174]. Podle Chena a kol. (2014) mohou nanočástice TiO<sub>2</sub> způsobovat záněty, fibrózu a nádory plic a jsou kategorizovány jako potenciálně karcinogenní pro člověka [174]. Oberdörster a kol.(2000) navíc prokázali rozdílnou kinetiku eliminace částic TiO<sub>2</sub>, inhalovaných potkany ve dvou rozdílných velikostech (20 nm a 250 nm). Doba eliminace 20 nm částic TiO<sub>2</sub> z těla potkanů byla podstatně delší, než u částic TiO<sub>2</sub> ve velikosti 250 nm [80].

Pomocí Ramanovy mikrospektroskopie byla v hypertrofických tkáních zjištěna také přítomnost různých forem uhlíku, jednou z nich byl amorfni uhlík (obrázek 22). Jelikož byla volena nízká intenzita použitého laseru, nejedná se o „spálenou“ tkáň, ale jedná se o částice, které nemají přirozený původ v tkáních. Amorfni uhlík může být produktem nedokonalého spalování zejména fosilních paliv používaných v dopravě, uhelných elektrárnách či při vytápění domácností. Na produkci atmosférického elementárního uhlíku se také podílí spalování biomasy a přírodní požáry [175]. Sainfeld a Pandis (1998) definují amorfni uhlík jako saze formující se v momentě, kdy poměr uhlíku a kyslíku během spalování je menší než 1. Takto vzniklé saze se pak skládají z náhodně orientovaných krystalů o průměru 2 - 3 nm se strukturou podobající se grafitu [176]. Podle Cyrus et al. (2003) reprezentuje elementární uhlík spíše komplex uhlíkatých látek s řadou funkčních skupin (alkoholová, fenolová, karbonylová, karboxylová). Po celém světě existuje velké množství výrobních závodů na průmyslovou výrobu sazí (amorfniho uhlíku) [177]. V roce 2005 byla tato roční výroba odhadnuta na více než 10 tun [68,178]. Amorfni uhlík byl ve vzorcích hypertrofické tkáně detekován u obou svářečů (M1 a M3), montážní dělnice (M6) a strážníka (M4). Jedním z významných zdrojů amorfniho uhlíku – sazí je doprava. Saze jsou uvolňovány především při spalovacích procesech v dopravě [179,180], ale i nespalovací procesy (brzdny oter) přispívají značnou měrou k jejich uvolňování. Vzhledem k adsorpci mutagenních a karcinogenních látek na elementární uhlík, který je ve vysokých koncentracích zastoupen v emisích z dieselových motorů, byly proto dieselové výfukové plyny klasifikovány jako potenciální lidský karcinogen negativně působící především na plíce [65]. Americká agentura pro ochranu přírody (angl. Environmental Protection Agency - US EPA) navrhla referenční koncentraci pro dlouhodobou inhalaci částic z dieselových výfukových plynů  $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$  jako mezní hodnotu, která ještě nemá karcinogenní účinky [181,182].

Jak již bylo řečeno i brzdění přispívá k emisím obsahující amorfni uhlík. Jednou z hlavních složek většiny frikčních kompozitů pro brzdová obložení osobních automobilů je fenolická pryskyřice, ale i další často používané složky jsou na bázi uhlíku (např. grafit, koks, fenolická pryskyřice, nitrilová guma). Při brzdění se tzv. frikční vrstva desek, která je formována mechano-chemickými procesy, v konečné fázi mechanicky otírá a takto vzniklé oterové částice s významným obsahem amorfniho uhlíku jsou uvolňovány do prostředí [22,183].

Saze slouží také ve velké míře jako plnivo kaučukových pneumatik, což obnáší téměř 70% spotřeby z jejich celkové výroby. Při brzdění automobilů dochází rovněž k oteru mezi pneumatikou a povrchem silnice a tím může dojít také k uvolňování sazí do prostředí [184,185]. Vzhledem k tomu, že celkový počet motorových silničních vozidel, tj. osobních

automobilů, autobusů, nákladních automobilů a užitkových vozidel (krom motocyklů) na světě překročil v roce 2010 jednu miliardu [186], nelze množství sazí uvolněných do ovzduší prostřednictvím spalovacích a nespalovacích procesů v dopravě přehlížet. Saze jsou ale také využívány i mimo dopravu, například jako černé barvivo zejména v laserových tiskárnách [187]. Nelze jednoznačně tvrdit, že částice amorfního uhlíku mohly způsobit chronické záněty v oblasti měkké tkáně skořep nosních, ale vzhledem k velkému množství sazí, kterému jsme denně vystaveni, se potenciálně mohly tyto částice podílet na vzniku onemocnění. Bylo totiž již prokázáno, že ultrajemné částice z výfukových plynů automobilů s dieselvými motory (angl. diesel engine particles - DEPs) mohou na buněčných kulturách (PC-12 cells) indukovat oxidační stres a ovlivnit metabolismus dopaminu (nízkomolekulární neurotransmitter) [188].

Také grafit byl nalezen pomocí Ramanovy mikrospektroskopie v hypertrofických tkáních (tabulka 1) a to ve vzorcích M1, M3-M5 a M7-M9. Grafit je považován za chemicky inertní a termicky relativně stabilní materiál, který neobsahuje žádné těžké složky. U syntetického grafitu nejsou prokázány karcinogenní vlastnosti [189]. Žádná ze složek obsažených v syntetickém grafitu nebyla podle IARC identifikována, jako pravděpodobný, možný nebo potvrzený karcinogen [65]. To ovšem neznamená, že je grafit zcela neškodný, protože může vyvolat podráždění očí a při vdechnutí může způsobit podráždění dýchacích cest. Také může být škodlivý při požití a při absorpci přes kůži, může vyvolat její podráždění [190].

Mezi solemi vápníku, detekovanými pomocí Ramanovy mikrospektroskopie byl uhličitan vápenatý (M1, M2, M6 a M8). Ten je poměrně často používán v potravinářském průmyslu (především jako regulátor kyselosti nebo jako neutralizátor ve víně, zmrzlinách, sirupech, cukroví či práscích do pečiva, slouží také jako protihrudkující látka v solích, jako plnidlo žvýkaček, jako leštidlo v zubních pastách, jako nosič v různých bělidlech nebo jako stabilizátor kandovaného ovoce). V medicíně se užívá proti průjmům a k snižování pálení žáhy jako antacidum. Při nízkých koncentracích nejsou pozorovány nežádoucí účinky. Při nadměrné konzumaci však může způsobit např. nadýmání a zácpu [191-193]. Provedené studie na lidech prokázaly, že zvýšený obsah vápníku v krvi, může být spojený s projevy nevolnosti, slabosti a závratí a to převážně při dávce 145x vyšší než je denní doporučená dávka (800 mg) [194].

Síran vápenatý, nalezený ve vzorku M1, se používá v potravinářství, převážně k regulaci kyselosti výrobků, jako proti-spékavá a kypřící látka. Také je využíván k zakonzervování ovoce a zeleniny a jako zahušťovadlo marmelád. Zabraňuje ztrátám barevnosti. Používá se při výrobě sýrů jako niva, gorgonzola, cottage. Může se použít v zubních pastách jako abrazivum, kdy absorbuje vzdušnou vlhkost – vytvoří hydratovanou sůl a ztvrdne. U tohoto síranu nejsou

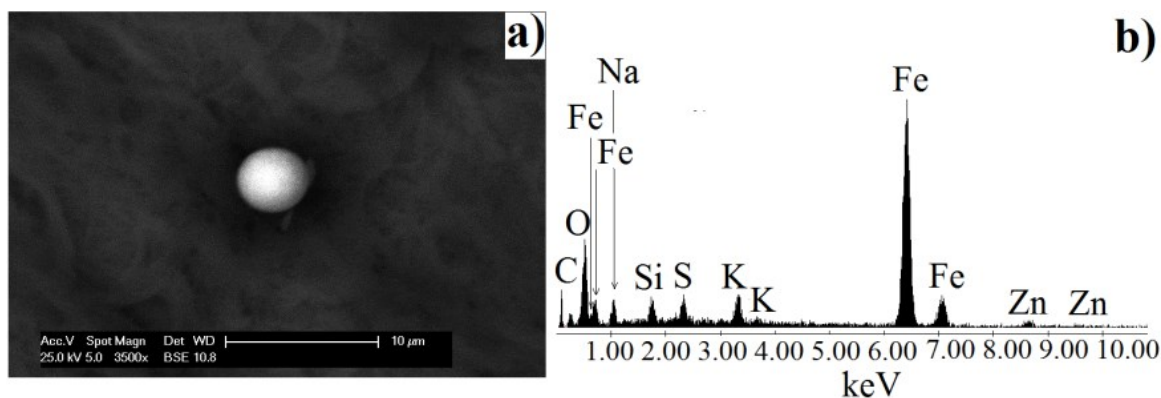
známé žádné vedlejší ani nepříznivé účinky na lidské zdraví [192,194,195]. Podle studie Nourihho a kol. (2015) je síran vápenatý relativně účinnou hemostatickou látkou při potlačování jaterního krvácení u potkanů [196].

Významnou sloučeninou zjištěnou v hypertrofické tkáni (vzorky M2, M3- svářeč a M5) prostřednictvím Ramanovy mikrospektroskopie byl magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), (tabulka 1). Magnetit je využívám jako surovina pro výrobu železa a oceli [197]. Současně je v průmyslu používán jako tavidlo elektrod používaných při ručním svařování obloukem. Při svařování dochází vlivem elektrického proudu k získání vysokých teplot a k tavení kyselého obalu elektrody, který obsahuje 50% magnetitu [198]. Je tedy možné, že se magnetit ve formě aerosolu dostává při svařování až do dýchací zóny pracovníka a může dojít k jeho vdechnutí. V této studii byl magnetit nalezen v hypertrofické tkáni svářeče, ale také u profese programátor a u studentky. Magnetit již byl prostřednictvím několika studií zjištěn v lidské mozkové tkáni [199], v nádorové mozkové tkáni [138] a v tkáni postižené neurodegenerativním onemocněním (Alzheimerova choroba) [200]. Magnetit je ale také díky svým magnetickým vlastnostem ve formě nanočástic často využíván cíleně v biomedicínských aplikacích [201].

Další sloučeninou železa, byl ankerit ( $\text{CaFe}(\text{CO}_3)_2$ ). Tento minerál železa je obsažen v uhlí [202] a při spalování uhlí v tepelných elektrárnách se ankerit uvolňuje do popílku, který může být přítomen v ovzduší, nebo může sedimentovat [203]. Jeho přítomnosti v hypertrofické tkáni horních cest dýchacích (M1, M4) by mohla souviset s častějším výskytem v blízkosti průmyslových komplexů, kde je pravidelně spalováno uhlí.

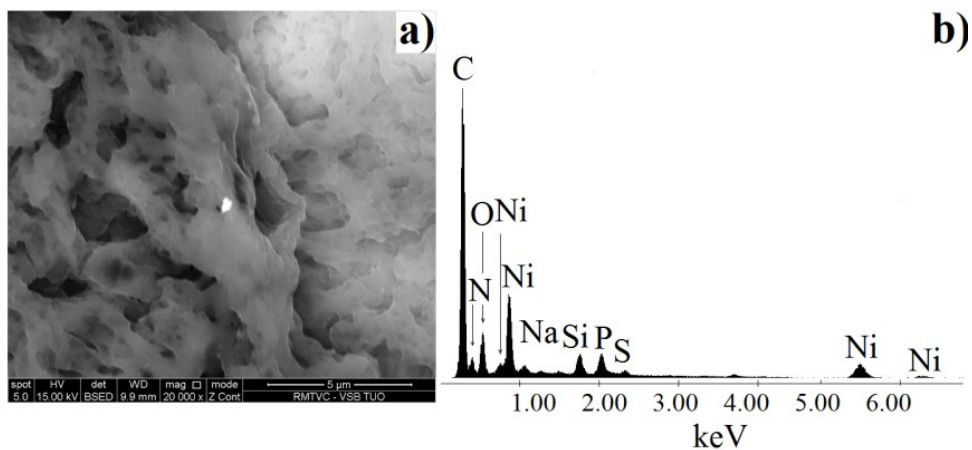
Pro upřesnění morfologie a prvkového složení detekovaných částic ve vzorcích hypertrofických tkání byla zvolena doplňující metoda skenovací elektronové mikroskopie (SEM-EDS). Výsledky jsou rovněž uvedeny v tabulce 1. Analýza na SEM – EDS byla provedena až po analýze na Ramanově mikrospektrometru, jelikož pokovení nutné pro SEM analýzu znehodnocuje vzorek pro následnou analýzu Ramanovou mikrospektroskopií. Ve všech vzorcích hypertrofické tkáně (tabulka 1) SEM-EDS analýza potvrdila výskyt železa. Převážně byly zjištěny částice pravidelného, kulovitěho tvaru, ve velikosti od 1 do 8  $\mu\text{m}$  (obrázek 24). Avšak byly detekovány i částice ve velikosti pod 1  $\mu\text{m}$  (tabulka 2). Apopa a kol. (2009) prokázali, že působení nanočástic železa může vyvolat prostřednictvím oxidačního stresu zvýšení prostupnosti endotelových buněk mikrotubulů [204]. Zároveň také částice sloučenin na bázi kovů, zejména železa, pravděpodobně zvyšují produkci reaktivních forem kyslíku (Reactive oxygen species - ROS), a mohou mít tak za následek prostřednictvím oxidativního stresu spuštění popřípadě zhoršení již probíhajícího onemocnění (zánětu). Ten může vzniknout narušením rovnováhy mezi ROS a antioxidanty [205-208]. Zdrojem

částic/shluků částic obsahujících železo je především pyrometalurgie a hutní průmysl. Ale také se může do prostředí uvolňovat z dopravy. Převážně z nespalovacích procesů v dopravě, při otěru brzdového kotouče o brzdové desky [101,183]. V průmyslových oblastech a v oblastech se zvýšenou frekvencí dopravy je vysoce pravděpodobné, že částice/shluky částic s majoritním obsahem železa mohou přijít poměrně často do styku s lidským organismem, třeba právě prostřednictvím inhalační expozice. Z výše uvedených informací tedy vyplývá, že jednak elementární (SEM-EDS), ale i fázová (Ramanova mikrospektrometrie) analýza potvrdily výskyt železa v hypertrofických tkáních pacientů M1-M5, (tabulka 1).

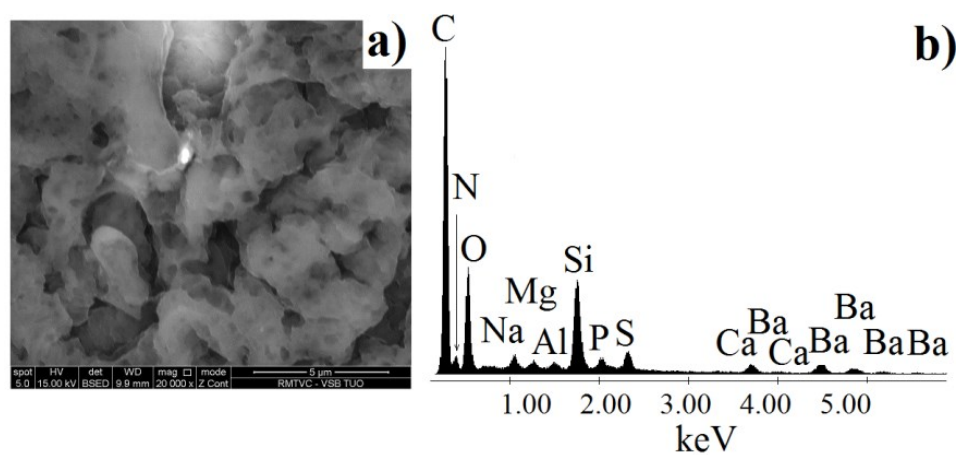


Obrázek 24: SEM-EDS obrázek částice s majoritním zastoupením železa, detekované v hypertrofické tkáni (a) s příslušným EDS spektrem (b) detekovaných ve vzorku M6.

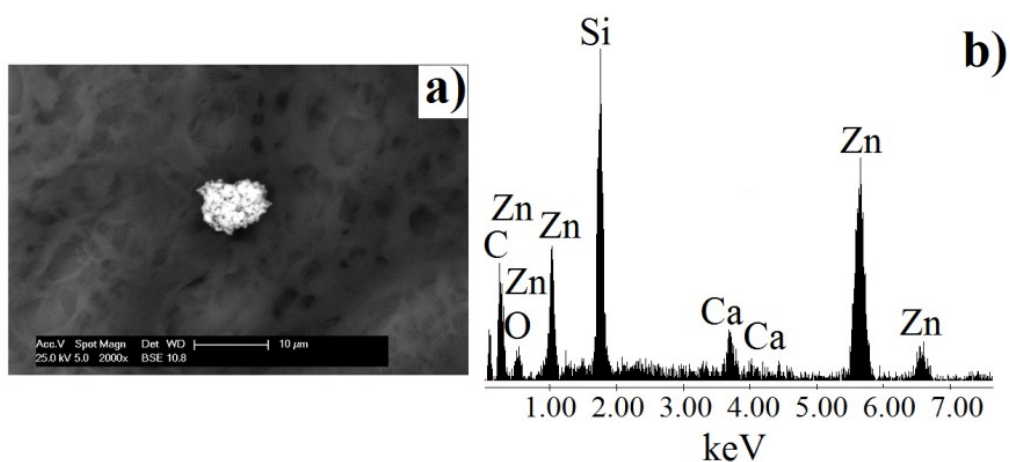
Metodou SEM-EDS byla v hypertrofické tkáni dále zjištěna přítomnost mnoha dalších kovů, například částice na bázi chromu, manganu, molybdenu a olova. Bylo ovšem zjištěno i velké množství kovových částic ve velikostech pod 1 μm (tabulka 2). Například nikl (obrázek 25), baryum (obrázek 26), zinek (obrázek 27), měď a kadmium. Detailní přehled všech detekovaných prvků je uveden v tabulce 1 a přehled nejmenších detekovaných velikostí částic je uveden v tabulce 2.



Obrázek 25: SEM-EDS obrázek částice, která obsahuje nikl, detekované v hypertrofické tkáni (a) s příslušným EDS spektrem (b) detekovaných ve vzorku M3.



Obrázek 26: SEM-EDS obrázek částice, která obsahuje barium, detekované v hypertrofické tkáni (a) s příslušným EDS spektrem (b) detekovaných ve vzorku M3.



Obázek 27: SEM-EDS obrázek shluku částic, obsahující z velké části zinek, detekovaných v hypertrofické tkáni (a) s příslušným EDS spektrem (b) detekovaných ve vzorku M2.

Největší množství kovových částic/shluků, bylo nalezeno ve vzorcích hypertrofické tkáně svářečů (tabulka 1 a 2) vzorky M1 a M3. Velká část z nich byla zjištěna ve velikosti pod 1  $\mu\text{m}$ . Toto větší množství nalezených kovů pravděpodobně souviselo s pracovní expozicí, převážně s již výše uvedenou profesí svářeče. Svářečské dýmy se totiž definují jako komplexní směs plynů a jemných částic oxidů kovů vznikající odpařováním a oxidací kovů během svařovacího procesu. Složení svářečských dýmů se liší v závislosti na použitých kovech. Dýmy vznikající při svařování obsahují Fe, Cr, Ni, Mn, Mo, V, Ti, Co, Cu, Ba a ochranné barvy na bázi Pb, Cd, Zn a Al [209]. Některé z těchto složek svářečských dýmů (Fe, Cr, Ni, Mn, Mo, Ti, Cu, Ba, P, Cd, Zn) byly nalezeny právě v hypertrofické tkáni svářečů (vzorky M1 a M3). Velká část těchto látek patří svým chemickým složením podle IARC, mezi agens „prokazatelně karcinogenní pro člověka“. Jedná se především o Cd, Cr<sup>IV</sup>, Fe (není rozlišena forma), Ni (sloučeniny) a saze. Do skupiny „možných karcinogenů pro člověka“ patří z nalezených částic Ni (kov, slitina), TiO<sub>2</sub> a Pb [64,65].

Kadmium je jeden z nejtoxičtějších kovů, který se projevuje vysokým zásahem do potravního a potravinového řetězce [210,211]. V lidském těle má vysoký kumulativní efekt, navíc je velmi pomalu a obtížně eliminováno. Hromadí se především v ledvinách, ale také v játrech [212]. Dalšími projevy chronického působení kadmia u člověka jsou osteoporóza, anémie, zvýšené riziko srdečních a cévních onemocnění a zvýšené riziko rakoviny [213].

Chrom má značnou biologickou důležitost. Patří mezi esenciální prvky a je v nepatrném množství konstantně obsažen v těle azasahuje do metabolismu cukrů a tuků. Jsou však významné rozdíly v jedovatosti sloučenin chromu, které jsou vázány na to, v jaké valenci se chrom vyskytuje. Účinky sloučenin Cr<sup>II</sup> a Cr<sup>III</sup> jsou malé, avšak účinky sloučenin Cr<sup>VI</sup> jsou velmi závažné. Při vdechování prachových částic s obsahem chromu je drážděna sliznice dutiny nosní. Poškozovaná sliznice však nebolí, projevuje se pouze jako rýma, postupně však dochází k tvorbě vředů na nosní přepážce a může dojít až k proděravění (perforaci) její chrupavčité části [212,214]. Hlavní použití chromu je v metalurgii při galvanické povrchové úpravě kovů a v chemickém průmyslu.

V této práci byly dále zjištěny, v hypertrofických tkáních z oblasti skořep nosních, částice s vyšším obsahem manganu ve velikostech 3 a 8  $\mu\text{m}$  (tabulka 2). Cesta vstupu manganu do organismu je především dýchacím ústrojím. Po vdechnutí může dojít přímo k difúzi ultrajemných částic přes alveoly rovnou do krevního řečiště, nebo pak u větších částic k fagocytóze, či k přesunu prostřednictvím mukociliárního eskalátoru do nosohltanu a následné vykašlání nebo spolknutí. V trávicím ústrojí je vstřebáván velice málo [60,212]. U člověka, krom vlivu na jiné orgány, vykazuje mangan charakteristické patologické poškození



gangliových buněk, vedoucí často až k jejich destrukci. Při dlouhodobé chronické otravě manganem může dojít až k onemocnění, které probíhá pod obrazem Parkinsonova syndromu [212,215,216]. Což bylo také potvrzeno studií na opicích, kterým byl po dobu 18 měsíců podáván  $MnCl_2$  [217]. Hlavním zdrojem emisí manganu do ovzduší jsou spalování uhlí a metalurgie. Významná je také pracovní expozice manganu, především se jedná o obsah manganu ve svářečských dýmech [218,219]. Tato skutečnost byla potvrzená také touto prací. Částice na bázi manganu byly zjištěny v souboru hodnocených tkání u obou pacientů, kteří pracují, nebo pracovali v profesi svářeč/zámečnick. U ostatních pacientů mangan zjištěn nebyl. Podobně také částice na bázi niklu, které byly rovněž zjištěny pouze u svářečů (tabulka 1). V jednom případě se částice nacházela ve velikosti pod  $1\mu m$  (tabulka 2), (obrázek 25). Podle Sundermana a kol. (1986) při svařování oceli nebo slitiny niklu je ve svářečském dýmu obsaženo až 1% částic na bázi niklu ve velikostech pod  $0,1\mu m$  [220]. Velikost částic/shluků přítomných v lidské tkáni hraje totiž velmi důležitou roli v jejich charakterizaci. Jednak z hlediska vstupu částic do organismu, jejich distribuce v lidském těle, ale také eliminace, tedy odstranění z organismu. S velikostí částic/shluků souvisí samozřejmě i jejich reaktivita a možná toxicita, jejímž klíčovým mechanismem může být již zmíněný oxidační stres [6]. Nikl tvoří sloučeniny, které jsou poměrně vysoce toxické pro vodní organismy. Přirozeně se vyskytuje v lidském těle ve stopovém množství v některých enzymech, ale může mít i lokální zánětlivé účinky, především se může podílet na vzniku kontaktní dermatitidy, většinou alergického původu [221]. Akutní otrava má za následek poškození zažívacího traktu, cév, ledvin, srdce a centrální nervové soustavy. Dlouhodobá expozice vysokým dávkám niklu způsobuje snížení váhy, poškození srdce a jater a zánety kůže [222]. Dokonce při dlouhodobé expozici byl již u člověka prokázán výskyt rakoviny plic, nosních dutin a vzácněji nosohltanu [223-225]. Nikl je také jednou ze složek cigaretového kouře, v kterém se vykytuje velmi toxický tetrakarbonyl niklu [226] a jak již bylo uvedeno výše je zařazen podle IARC a WHO mezi agens „prokazatelně karcinogenní pro člověka“, především jeho oxidy a sulfidy [65] [64]. Nikl se v malém množství využívá v potravinářství k výrobě ztužených tuků z rostlinných olejů [227]. Zdrojem je také těžba a zpracování niklu, spalování fosilních paliv a odpadu a aplikace čistírenských kalů do půdy. Díky jeho poměrně dobré stálosti vůči atmosférickým vlivům i vodě se často nanáší velmi tenká niklová vrstva na povrchy méně odolných kovů, nejčastěji železa. Používá se tedy k poniklování pracovních nástrojů, jako jsou šroubováky nebo klíče, ale také některých chirurgických nástrojů [227]. Podle mnoha analýz pracovního ovzduší lze předpokládat vyšší koncentraci niklu především ve slévárnách, a jak už bylo řečeno, při svařování [212,222].

Další částici, která byla nalezena v hypertrofické tkáni a má pravděpodobně původ v profesní

expozici, je částice/shluk částic na bázi molybdenu. Ten byl zjištěn pouze u zámečníka/svářeče. Molybden se vyskytuje v životním prostředí v relativně nízkých koncentracích, s výjimkou oblastí, se zvýšeným výskytem v půdě [212]. V pracovním prostředí dochází k expozici molybdenu ve slévárnách kovů a při zpracování molybdenových rud a také jako  $\text{MoS}_2$  se používá jako vstupní složka brzdových desek [228]. U dlouhodobě exponovaných osob prachu obsahujícímu kovový molybden a jeho oxidy byla popsána pneumokonióza, suchý kašel a dýchací bolesti [228].

SEM-EDS analýzou byl detekovaná částice/shluk částic s obsahem barya (obrázek 26). Baryum bylo zjištěno nejen u pacientů s profesí svářeč (vzorky M1 a M3), ale také u pacientů s profesí programátor, strážník a student (vzorky M2, M4 a M5). Původ detekovaných částic/shluků s obsahem barya nelze jednoznačně určit. Profesní expozici jako nejvýznamnější zdroj nemůžeme stoprocentně potvrdit, protože není zcela známá přesná, dlouhodobá pracovní anamnéza. Víme pouze, že baryum je součástí svářecích dýmů [209] a bylo detekováno i ve tkáni svářečů. Baryum se vyskytuje i běžně v přírodě, kde jsou jeho zdrojem matečné horniny. Obecně antropogenním zdrojem barya je průmyslová činnost, jako například uhelné elektrárny a spalovny odpadu [232]. Lze je detekovat i v půdách [233]. Možností je také kontaminace baryem prostřednictvím znečištění pocházejícího z dopravy. Konkrétně nespalovací procesy v dopravě (otěry z brzd), kde jedním z komponent, z kterých je složená brzdová destička, je opět baryt ( $\text{BaSO}_4$ ). Při brzdění se destička otírá a mohou se tak některé složky z brzd uvolňovat do prostředí [101] [183]. Ale baryt prostřednictvím Ramanova mikrospektrometru v tkáních detekován nebyl (tabulka 1), nebylo tedy možné dopravu jako pravděpodobný zdroj kontaminace tkání baryem potvrdit. Toxicita sloučenin barya závisí na jejich rozpustnosti. Volné ionty barya (rozpustné soli barya) jsou snadno absorbovány například plícemi a trávicím traktem, naopak nerozpustný síran barnatý není absorbován prakticky vůbec [229]. Vyjímkou může být nerozpustný uhličitán barnatý, který v žaludku reaguje s kyselinou chlorovodíkovou za vzniku rozpustného chloridu barnatého [230]. Po absorpci se baryum může deponovat v kostní tkáni a také v očním pigmentu [229]. Akutní a chronická expozice baryovým solím může u zvířat způsobovat intoxikaci ledvin, hypertenzi a srdeční poruchy. U člověka při akutní intoxikaci baryum způsobuje bolesti břicha, zvracení, průjemy, křeče, změnu pulzu a vede až k ochrnutí. Baryum je fyziologický antagonist draslíku, způsobuje tedy navíc hypokalémii [230]. Při dlouhodobém působení barya, například v rámci pracovní expozice, byla u člověka pozorována vyšší incidence hypertenze (vysoký tlak krevní), navíc přímé vdechování síranu barnatého může způsobovat benigní pneumokoniózu (barytózu) [231].

Také měď je jednou ze složek brzdových destiček a právě částice/shluk částic mědi ve velikosti  $< 1 \mu\text{m}$  (tabulka 2), byla detekována pomocí SEM analýzy ve vzorku hypertrofické tkáně u pacienta pracujícího jako programátor (vzorek M2), (tabulka 1). Měď je složkou každé tkáně a je uložena především v játrech, mozku, srdci, ledvinách a svalech [234]. Měď jako kovový prvek se vyskytuje přirozeně buď jako volný kov, nebo je spojen s jinými prvky ve sloučeninách, které obsahují různé minerály. Měď se používá hlavně jako kov nebo slitina. Sloučenina síran měďnatý se používá jako fungicid, algicid a výživový doplněk. Antropogenním zdrojem jsou zejména hutě na zpracování mědi a průmysl na zpracování rud. Měď je ovšem také přidávána do brzd z důvodu teplotní stabilizace (odvod tepla) [101]. Částice mědi v atmosféře sedimentují nebo se odstraní srážením, ale mohou být resuspendovány do atmosféry ve formě prachu [235]. Při akutní expozici prašným aerosolům mědi může vzniknout horečka z kovů [212]. Chronická otrava z mědi byla prokázána u dobytka (krav), kdy se ke krmení přidával doplněk obsahující měď. Po předčasném úhynu bylo při pitvě zjištěno zvýšené množství mědi v játrech. Současně se zjistily příznaky chronické toxicity mědi, včetně jaterního ikteru (žloutenka), jaterní fibrózy (zmnožení vaziva v jaterní tkáni) a hemoglobinurické nefrózy (poškození ledvin) [236]. Podle studií na zvířatech existují důkazy o tom, že expozice mědi ve vzduchu nebo vysoké hladiny mědi v pitné vodě mohou poškodit imunitní systém. Zhoršená buněčná a humorálně zprostředkovaná imunitní funkce byla pozorována u myší. Studie na potkanech, myších a norcích prokázaly, že vystavení vysokým hladinám mědi ve stravě může mít za následek snížení embrya a růstu plodu [235].

Zinek hraje důležitou roli jako esenciální stopový prvek pro vývoj, růst a diferenciaci všech živých organismů [237]. V přírodě se zinek vyskytuje pouze ve sloučeninách. Do životního prostředí se většinou dostává jako výsledek důlní činnosti, čištění (rafinace) zinku a olova či kadmia, taky v důsledku výroby oceli, spalování uhlí a odpadů [238]. Zinek se ovšem také přidává do brzdových desek a pneumatik automobilů [31,184,185]. Uvádí se, že zinek je čtvrtým průmyslově nejvíce vyráběným kovem [212] a je velmi toxický pro vodní organismy [239]. Zinek byl detekován prostřednictvím SEM-EDS jako částice/shluk částic ve velikosti kolem  $10 \mu\text{m}$  (obrázek 27). Při detailním zvětšení se však jednalo skutečně o shluk částic mnohem menších rozměrů (obrázek 26). Mohlo jít o skupinu pevně (agregát) nebo slabě (aglomerát) vázaných primárních částic, u kterých se shlukováním snižuje biologická aktivita. Aglomeráty/agregáty se však mohou při změně podmínek prostředí, například v živém organismu, rozpadat a znovu vznikat, čímž se může měnit jejich biologická dostupnost a s tím související toxicita [6,240]. Jak je vidět, tak velmi důležitou roli v charakterizaci částic/shluků

přítomných v lidské tkáni hraje jejich velikost. Jednak z hlediska vstupu částic do organismu, jejich distribuce v lidském těle, ale také eliminace, tedy odstranění z organismu. S velikostí částic/shluků souvisí také reaktivita a možná toxicita, jejímž klíčovým mechanismem je již zmíněný oxidační stres [6]. V oblasti přední části dolní skořepy je nejužší část nosní dutiny [54], v tomto místě na sliznici ulpívá nejvíc částic v rozmezí 1-10  $\mu\text{m}$ , což také vyplývá z našeho měření (tabulka 2). Tyto částice mohou být pomocí mukociliárního eskalátoru přemístěny do úst a následně spolknuty nebo mohou zůstat uloženy v tkáni horních cest dýchacích [60,241].

### **Referenční vzorky**

Z etických důvodů nebylo možné získat referenční vzorky zdravé tkáně z oblasti skořep nosních od běžných pacientů. Proto byly analyzovány vzorky tkáně z oblasti skořep nosních pocházejících z mrtvě narozených dětí. U těchto vzorků byl předpoklad, že nebudou obsahovat téměř žádné pevné částice a tudíž bude možné je použít jako referenční. Ve skutečnosti po analýze na Ramanově mikrospektrometru byla zjištěna přítomnost těchto sloučenin:  $\text{TiO}_2$  ve formě anatasu,  $\text{TiO}_2$  ve formě rutilu, grafitu, magnesitu ( $\text{MgCO}_3$ ), sloučenin Al a sloučenin Cu. Podle Barošové a kol. (2015) jsou v plodové vodě přítomny částice kovů a právě tyto částice různého chemického složení, detekovala autorka v plodové vodě u dětí s vrozenou vývojovou vadou, ale i v plodové vodě zdravých těhotenství [126]. Především  $\text{TiO}_2$ -anatas a  $\text{TiO}_2$ -rutil detekované v plodové vodě se svým chemickým složením shodují s částicemi nalezenými v tkáních z oblasti skořep nosních u mrtvě rozených dětí. Amniovou tekutinu plod dýchá a polyká po celou dobu svého vývoje v těle matky. Je tedy docela pravděpodobné, že částice detekované v nosních tkáních plodu pocházely z amniové tekutiny. Podle těchto získaných výsledků lze říci, že pravděpodobně již v prenatalním období je lidský organismus vystaven vlivu pevných částic různého chemického složení prostřednictvím kontaminace plodové vody.

I přes analýzu malého množství vzorků hypertrofické tkáně, byly zjištěny velmi významné skutečnosti o přítomnosti částic a sloučenin na bázi kovů v lidské tkáni. Mnohé z těchto detekovaných pevných částic by mohly na základě své velikosti a chemického složení působit závažné poškození lidského organismu. Proto byl na Ramanově mikrospektrometru analyzován větší soubor vzorků hypertrofické tkáně z oblasti skořep nosních. Důvodem bylo možné zjištění více informací o přítomných pevných částicích v lidské tkáni. Také byl předpoklad, že statistické vyhodnocení takového většího souboru dat by mohlo přinést zajímavé souvislosti mezi jednotlivými proměnnými.

## 4.2 Vyhodnocení souboru hypertrofických tkání

Pomocí Ramanova mikrospektrometru metodou analýzy v bodech (9 bodů) byl změřen soubor 40 vzorků hypertrofické tkáně, které také obsahují i předešlých 8 vzorků (M1-8). Je patrné, že ze srovnání analýzy v celé ploše vzorku a srovnání analýzy v 9 bodech plyne, že vytvořená metodika pěkně koreluje s celkovou analýzou. Věk, kouření, pohlaví a pracovní anamnéza jednotlivých pacientů a podrobný výpis všech zjištěných sloučenin je uveden v tabulce 3.

*Tabulka 3: Přehled detekovaných fází ve vzorcích hypertrofické tkáně prostřednictvím Ramanovy mikrospektroskopie, s uvedeným pohlavím, věkem, kouřením a pracovní anamnézou. (AC-amorfní uhlík, GR-grafit, TiO<sub>2</sub>-A-anatas, TiO<sub>2</sub>-R-rutil, sl.Si-sloučenina křemíku, sl.Al-sloučenina hliníku).*

Vzorek	Pohlaví	Věk	Kouření	Povolání	Detekované sloučeniny
M1	M	78	N	Svářeč	AC, ankerite, CaCO <sub>3</sub> , GR, TiO <sub>2</sub> -A
M2	M	38	N	Programátor	CaCO <sub>3</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , TiO <sub>2</sub> -A, TiO <sub>2</sub> -R
M3	M	38	N	Svářeč	AC, CaSO <sub>4</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , GR, TiO <sub>2</sub> -A
M4	M	65	A	Strážník	AC, ankerite, GR, TiO <sub>2</sub> -A, TiO <sub>2</sub> -R
M5	Ž	26	N	Studentka	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , GR
M6	Ž	44	N	Montážní dělnice	AC, CaCO <sub>3</sub>
M7	M	28	N	Student	GR
M8	M	44	A	Dělník	CaCO <sub>3</sub> , GR
M9	Ž	58	N	Výtvarnice	GR, TiO <sub>2</sub> -A
M10	M	37	N	Manažer	GR, TiO <sub>2</sub> -A
M11	M	42	A	Zedník	GR
M12	Ž	45	N	Manažerka	GR, TiO <sub>2</sub> -A
M13	M	40	N	Úředník	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , TiO <sub>2</sub> -A
M14	M	32	N	Strážník	AC, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , GR, TiO <sub>2</sub> -A
M15	Ž	53	N	Prodavačka	ankerit, GR, TiO <sub>2</sub> -A
M16	M	44	A	Řidič	CaCO <sub>3</sub> , GR, TiO <sub>2</sub> -A, TiO <sub>2</sub> -R

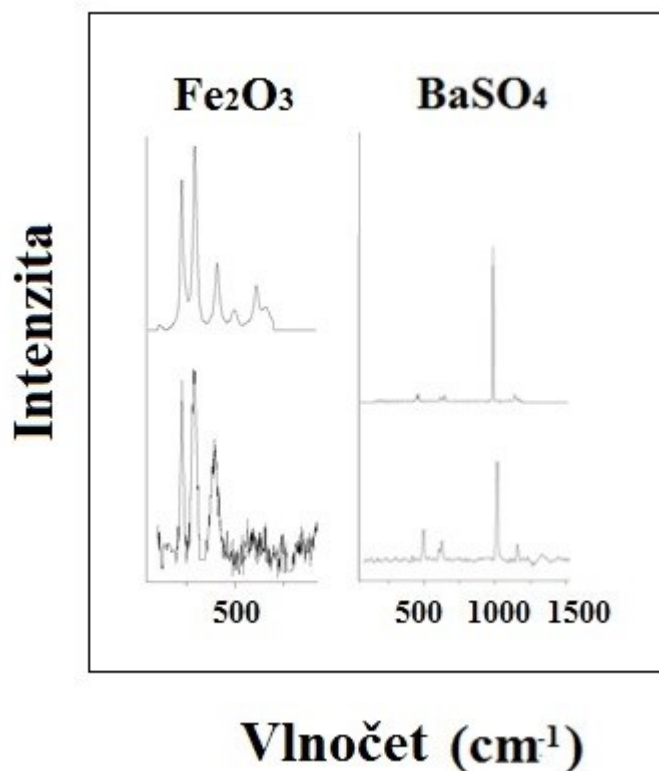
M17	Ž	42	N	Skladnice	ankerit, BaSO <sub>4</sub> , TiO <sub>2</sub> -A
M18	M	34	A	Speditér	AC, CaCO <sub>3</sub> , GR, SiO <sub>2</sub> , TiO <sub>2</sub> -A
M19	M	48	N	Číšník	ankerit, CaCO <sub>3</sub> , Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , SiO <sub>2</sub> , TiO <sub>2</sub> -A
M20	M	35	A	Klempíř	ankerit, CaCO <sub>3</sub> , GR, SiO <sub>2</sub>
M21	M	31	N	Operátor výroby	ankerit, GR
M22	M	28	N	Valcír kovů	TiO <sub>2</sub> -A
M23	M	28	N	Operátor	TiO <sub>2</sub> -A
M24	M	54	N	Policista	AC, GR
M25	M	44	N	Jednatel	AC, sl.Si, TiO <sub>2</sub> -A, TiO <sub>2</sub> -R
M26	M	42	N	Výpravčí	AC, CaCO <sub>3</sub> , GR
M27	M	25	N	Student	AC
M28	M	42	A	Policista	AC, ankerit, BaSO <sub>4</sub> , GR
M29	M	25	A	Nezaměstnaný	AC, GR, TiO <sub>2</sub> -A
M30	M	39	A	Svářeč	AC, sl Al, (Ca, Mg)CO <sub>3</sub>
M31	Ž	20	N	Student	GR, TiO <sub>2</sub> -A, TiO <sub>2</sub> -R
M32	M	31	N	Administrátor	AC, sl.Al, ankerit
M33	M	43	N	Obráběč	AC, GR, TiO <sub>2</sub> -A
M34	Ž	41	N	Švadlena	GR, TiO <sub>2</sub> -A
M35	Ž	65	N	Manažerka	CaCO <sub>3</sub> , TiO <sub>2</sub> -R
M36	M	36	N	PC technik	GR, TiO <sub>2</sub> -A
M37	M	44	N	Vedoucí výroby	-
M38	M	34	N	Elektrotechnik	-
M39	M	55	N	Podnikatel	-
M40	M	54	N	Exekutor	-

Po analýze celého souboru 40 vzorků hypertrofické tkáně byly navíc detekovány některé sloučeniny, například sloučenina železa, hematit ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), (obrázek 28), která byla zjištěna ve vzorcích M13, M14 a M19. Mimo to, že je hematit zdrojem pro výrobu železa a oceli, využívá se také jako pigment při výrobě skla, v barvách a kosmetice [197]. Hematit je také používán jako tavidlo elektrod využívaných při ručním obloukovém svařování [198]. V této studii však nebyl zjištěn ani u jednoho pacienta pracujícího v profesi svářeč, ale pouze u pacientů pracujících v profesích: úředník, strážník a číšník (M13-14, M19). Zdroj železa pravděpodobně nebyl součástí pracovní expozice. Kdežto sloučenina hliníku u svářeče detekována byla (vzorek M30) a je tedy možné, že právě hliník mohl z pracovní expozice pocházet. Svářeči hliníku jsou totiž jednou z nejvíce profesionálně exponovaných skupin [212]. U takto dlouhodobě exponovaných svářečů mohou být koncentrace hliníku v moči až 100krát a v krvi až 10 až 20krát vyšší než u neexponovaných osob [242, 243]. Typickým příkladem chronické intoxikace hliníkem je Alzheimerova choroba [244]. Soli hliníku již byly také zjištěny ve zvýšené míře v lidské prsní tkáni, kdy se předpokládá souvislost jejich přítomnosti se zvýšeným výskytem prsních cyst a rakoviny prsu [245]. Podle nařízení vlády 361/2007 Sb. patří hliník a jeho oxidy mezi prach s převážně nespecifickým účinkem a jeho přípustný expoziční limit (PEL) je stanoven na  $10 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$  [246]. Podle IARC u výrobců hliníku dochází k vysokému riziku vzniku rakoviny plic [65].

Další sloučeninou detekovanou v souboru hypertrofických tkání byl  $\text{SiO}_2$ , který má díky své rozmanitosti mnoho fází a polymorfních forem a velké možnosti v praktickém využití. Je to minerál hojně přítomný v písku a šterku. Ve velké míře je součástí sedimentového prachu hromadícího se na povrchu silnice [33]. Obsah krystalického  $\text{SiO}_2$  v prachu, řadí tento prach mezi fibrogenní látky, které jsou schopny svým působením v dýchacích cestách vyvolat plicní fibrózu [246]. Sloučenina  $\text{SiO}_2$  byla zjištěna u profese číšník (M18), speditér (M19) a klempíř (M20).  $\text{SiO}_2$  je také přidáván do bazického obalu elektrod, které se používají při ručním obloukovém svařování, kdy tato vrstva tavidla (obal) elektrod se při svařování spaluje a vzniká tak svářecí dým [198]. Přesto nebyl  $\text{SiO}_2$  zjištěn u žádného ze svářečů v souboru (tabulka 3), což by mohlo pracovní prostředí vyloučit jako jeho hlavní zdroj.

V rozšířeném souboru hypertrofických tkání byl zjištěn baryt ( $\text{BaSO}_4$ ), (obrázek 28), což potvrdilo domněnku uvedenou výše, že kontaminace tkáně baryem prostřednictvím znečištění pocházejícího z dopravy je možná. Převážně brzdové desky obsahují baryt a během brzdícího procesu se tak mohou některé složky z brzd uvolňovat do prostředí [101, 183]. Baryt byl zjištěn u profesí: skladnice (M17) a policista (M28), při kterých mohli být pracovníci

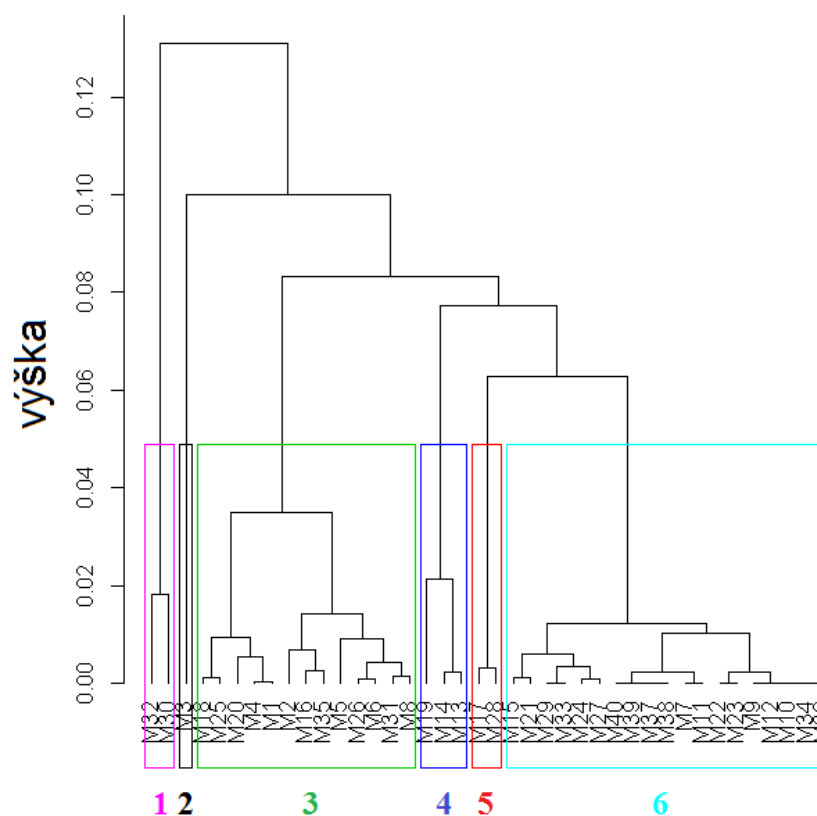
vystavení vlivu znečištění pocházející z dopravy. Bohužel tento soubor nebyl analyzován na chemickou analýzu prostřednictvím SEM-EDS, tedy nebylo baryum v tkáních potvrzeno.



Obrázek 28: Spektra hematitu ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) a barytu ( $\text{BaSO}_4$ ) nalezených v souboru vzorků hypertrofických tkání, zjištěná pomocí Ramanovy mikrospektroskopie. Dolní spektrum je naměřené a horní spektrum je získané z knihovny spekter.

Na základě shlukové analýzy byly podle jednotlivých detekovaných sloučenin vzorky rozděleny do šesti specifických skupin (klastřů), (obrázek 29). Do první skupiny patří pacienti, u kterých byla v tkáni zjištěna nějaká sloučenina hliníku. Druhá skupina je složena pouze z jednoho pacienta s přítomným  $\text{CaSO}_4$  v tkáni. Třetí skupina je tvořena pacienty, u kterých byl v tkáni detekován rutil ( $\text{TiO}_2$ ), kalcit ( $\text{CaCO}_3$ ) a  $\text{SiO}_2$ . Čtvrtá skupina je založena především na přítomnosti hematitu ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) v tkáni. V páté skupině jsou pacienti, u kterých byl detekován v tkáni baryt ( $\text{BaSO}_4$ ) a současně ankerit ( $\text{CaFe}(\text{CO}_3)_2$ ). K poslední, šesté skupině patřili pacienti se současně zjištěným anatasem ( $\text{TiO}_2$ ), amorfním uhlíkem a grafitem.





Obrázek 29: Graf hierarchické shlukové analýzy na hlavních komponentách za účelem charakterizace skupin vzorků se statisticky významně se odlišujícími vlastnostmi. Vzorky se tak rozdělily podle jednotlivých detekovaných sloučenin do šesti specifických skupin (klastřů).

Z celkového hodnocení souboru pacientů dále vyplývá, že jednotlivé analyzované vzorky tkání se od sebe vzájemně lišily především „pacient od pacienta“. V souboru 40 vzorků hypertrofických tkání bylo devět kuřáků, z toho byli všichni kuřáci manuálně pracující muži. Podle Erikssona a kol. (2013) bylo prokázáno, že samotné kouření může být spojeno s vysokou prevalencí chronické rýmy u mužů (i žen) a podle výsledků jejich studie byla prevalence chronické rýmy nejnižší u nekuřáků a nejvyšší u těžkých kuřáků (18,5% vs 34,5%,  $p < 0,001$ ). Dle autora lze tedy říci, že kouření může mít jistý vliv na vznik chronické rýmy [247]. V této práci se nám toto tvrzení jednoznačně nepotvrdilo.

Byla však zjištěna jistá závislost mezi pacienty s chronickou rýmou, kteří byli kuřáci a mezi výskytem amorfního uhlíku v jejich hypertrofické tkáni. Zároveň také manuálně pracující pacienti a pacienti mužského pohlaví měli v hypertrofické tkáni větší množství amorfního uhlíku. Ale všichni kuřáci s vyšším obsahem amorfního uhlíku v hypertrofické tkáni byli mužského pohlaví a manuálně pracující. Dalo by se tedy říci, že u manuálně pracujících mužů, kuřáků bylo zjištěno větší množství amorfního uhlíku v hypertrofické tkáni. Na základě tohoto zjištění nelze jednoznačně tvrdit, že částice amorfního uhlíku způsobily chronické

záněty v oblasti měkké tkáně skořep nosních, ale je možné, že se mohly částečně podílet na vzniku onemocnění. Tato skutečnost již byla potvrzena na buněčných kulturách (PC-12), kde bylo již bylo prokázáno, že ultrajemné částice (DEPs), které jsou součástí částic výfukových plynů z dieselových motorů, mohou indukovat oxidační stres a podílet se na vzniku zánětu [188].

Zajímavé bylo, že amorfni uhlík byl nejčastěji zjištěn u manuálních profesí, při kterých byli pracovníci pravidelně vystavováni emisím z dopravy (strážník, speditér, policista, výpravčí, řidič). Jak již bylo řečeno, doprava je jedním z významných zdrojů amorfniho uhlíku – sazí. Jednak jsou uvolňovány z dieselových motorů [179,180], také při brždění automobilů byl prokázán vznik sazí [22]. Ostatní manuálně pracující, u kterých byl zjištěn amorfni uhlík, byli zaměstnání v průmyslu (dělníci, svářeči a obráběči) a také v kancelářských profesích (student, programátor). Saze jsou totiž využívány taky jako černé barvivo v laserových tiskárnách [187]. To mohlo být příčinou detekce amorfniho uhlíku také pacientů, kteří vykonávali kancelářskou práci.

Také byla v souboru pacientů s chronickou rýmou nalezena jistá souvislost mezi věkem pacientů a obsahem oxidu titaničitého v hypertrofické tkáni. Podle Slavina a kol. (2009) je rýma u starších pacientů často běžná, protože strukturální změny v nosu spojené se stárnutím, předurčují starší osoby k rinitidě [248]. Jak již bylo uvedeno výše, částice  $\text{TiO}_2$  jsou přítomny v předmětech denní potřeby (bílý pigment do bonbónů, žvýkaček, želé, cukrovinek, džemů, také v potravinových obalech, jako barvivo do inkoustových propisek, v keramice, tabletkách, papíru, v kosmetice a v lécích). Člověk je tedy jejich působení vystaven prakticky denně. Při dlouhodobé expozici je tedy možné, že částice  $\text{TiO}_2$  se v určité míře mohou deponovat v měkkých tkáních dýchacích cest. Otázkou i v tomto případě zůstává, zda částice  $\text{TiO}_2$  mohly být iniciátory vzniku zánětu nebo se do nosní sliznice dostaly až po vzniku onemocnění. Soubor tkání nebyl analyzován prostřednictvím SEM-EDS, přítomnost elementárního titanu tak nebyla potvrzena.

Pro vytvoření širšího pohledu na možný vstup nanočástic do dýchacích cest a na jejich možný vliv na organismus, byla snaha analyzovat sputum (hlen), které se běžně vyskytuje na povrchu sliznice v dutině nosní. Cílem bylo zjistit, zda se mikro a nanočástice detekované v hypertrofických tkáních nevyskytovaly také ve sputu na jejich povrchu.

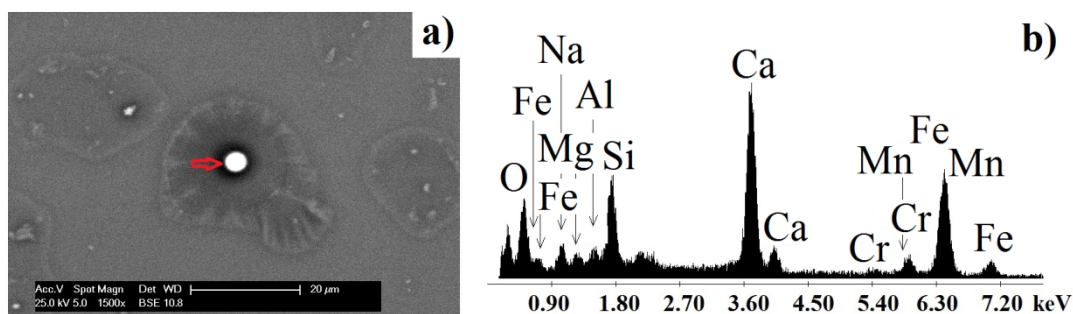
### 4.3 Vyhodnocení souboru cytologických odběrů sputa

Všechny vzorky sputa (hlen, resp. to, co je vysmrkáno) z povrchu sliznice v oblasti skořep nosních byly analyzovány použitím Ramanova mikrospektrometru, nicméně ani v jednom z těchto vzorků cytologických stěrů nebyla nalezena sloučenina na bázi kovů. Z toho důvodu byly vzorky analyzovány převážně pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Tato metoda detekovala v analyzovaném sputu částice a stanovila jejich chemické složení. V tabulce 4 jsou uvedeny elementy, které se podařilo ve vzorcích sputa zjistit. Současně jsou v tabulce 4 uvedeny také sloučeniny detekované Ramanovou mikrospektrometrií v hypertrofických tkáních z oblasti skořep nosních, z jejichž povrchů byly již zmíněné stěry pořízeny a zároveň jsou tamtéž uvedeny údaje o jednotlivých pacientech, včetně pracovní anamnézy.

*Tabulka 4: Přehled detekovaných sloučenin ve vzorcích cytologický odběrů sputa prostřednictvím skenovací elektronové mikroskopie. Současně přehled sloučenin, zjištěných prostřednictvím Ramanovy mikrospektroskopie, ve vzorcích hypertrofických tkáních z kterých byl pořízen stěr. Zároveň jsou uvedeny informace o pohlaví, věku, kouření a pracovní anamnéze. (AC-amorfní uhlík, GR-grafit, TiO<sub>2</sub>-A - anatas, TiO<sub>2</sub>-R - rutil).*

Vzorek	Pohlaví	Věk	Kouření	Povolání	Hypertrofická tkáň (Raman)	SEM – cytologie
C1/M37	M	44	N	Vedoucí výroby	-	Fe, Zn
C2/M18	M	34	A	Speditér	AC, CaCO <sub>3</sub> , GR, Si-com, TiO <sub>2</sub> -A	Ba, Fe
C3/M17	Ž	42	N	Skladnice	Ankerite, BaSO <sub>4</sub> , TiO <sub>2</sub> -A	Ba
C4/M21	M	31	N	Operátor výroby	Ankerite, GR	Fe, Cr, Zn
C5/M41	M	47	N	Manažer	neměřeno	Fe, Mn, Zn
C6/M23	M	28	N	Operátor výroby	TiO <sub>2</sub> -A	Cr, Fe, Mn, Ti
C7/M22	M	28	N	Valcíř kovů	TiO <sub>2</sub> -A	Ti, Zn
C8/M42	M	44	A	Prodavač	neměřeno	Cr, Fe, Ni
C9/M43	Ž	40	N	Administrativní pracovnice	neměřeno	Fe, Ti

V souboru byly pomocí skenovací elektronové mikroskopie detekovány téměř ve všech cytologických vzorcích částice s majoritním obsahem Fe, na obrázku 30 spolu s prvky Cr a Mn. Jeho přítomnost ve formě sloučeniny však v tkáni nebyla Ramanovou mikrospektroskopií potvrzena (tabulka 4). Velikost detekovaných částic na bázi železa se pohybovala v rozmezí od 2 do 10 $\mu\text{m}$ , avšak byly zjištěny i částice ve velikosti pod 1 $\mu\text{m}$  (tabulka 5). Podobně tomu bylo i u částic s majoritním obsahem barya. Ty byly prostřednictvím SEM-EDS detekovány v cytologickém stěru převážně ve velikosti pod 1 $\mu\text{m}$  (tabulka 5). Zároveň byla prostřednictvím Ramanovy mikrospektroskopie přítomnost barya potvrzena detekcí sloučeniny barytu ( $\text{BaSO}_4$ ) v hypertrofické tkáni. Z hlediska pracovní anamnézy bylo baryum nalezeno u pacientů pracujících v profesích speditér a skladnice, což může být spojeno s uvolňováním barya z nespalovacích procesů [101,183].

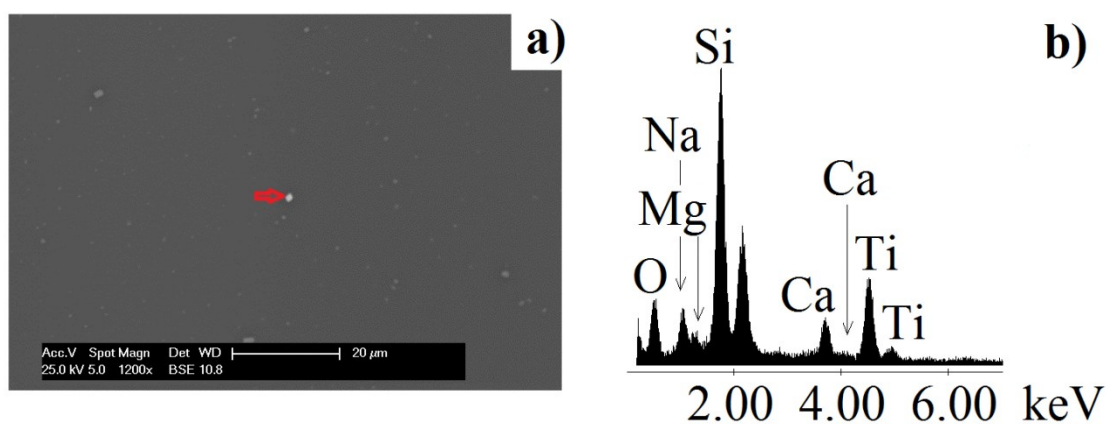


Obrázek 30 : Kulovitá částice s majoritním obsahem železa, chromu a manganu, zjištěná pomocí SEM-EDS analýzy ve vzorku C6 a) s příslušným EDS spektrem b).

Tabulka 5: Přehled velikostí částic/shluků částic, detekovaných pomocí SEM-EDS ve vzorcích cytologických odběrů z povrchu hypertrofické tkáně (je uvedena nejmenší detekovaná velikost kde nebyla částice detekována, je uvedena pomlčka).

VZOREK	Přehled velikostí částic/shluků částic, detekovaných pomocí SEM-EDS ( $\mu\text{m}$ )						
	Ba	Cr	Fe	Mn	Ni	Ti	Zn
C1/M37	-	-	$\leq 1$	-	-	-	4
C2/M18	$\leq 1$	-	4	-	-	-	-
C3/M17	$\leq 1$	-	-	-	-	-	-
C4/M21	-	2	2	-	-	-	3
C5/M41	-	-	6	7	-	-	6
C6/M23	-	5	2	5	-	5	-
C7/M22	-	-	-	-	-	2	$\leq 1$
C8/M42	-	2	$\leq 1$	-	2	-	-
C9/M43	-	-	10	-	-	2	-

V cytologických stěrech bylo pomocí SEM-EDS detekováno také poměrně velké množství částic na bázi zinku (tabulka 4). V jednom případě také ve velikosti pod  $1 \mu\text{m}$  (tabulka 5). Přítomnost sloučenin zinku však pomocí Ramanova mikrospektrometru nebyla zjištěna v hypertrofických tkáních. Naopak v hypertrofických tkáních bylo nalezeno větší množství sloučenin oxidu titaničitého, převážně ve formě anatasu. U pacientů pracujících v profesích operátor výroby a valcír kovů byl titan zjištěn také v cytologických stěrech (obrázek 31).



Obrázek 31: Částice/shluk částic titanu zjištěná pomocí SEM-EDS analýzy ve vzorku C7 a) s příslušným EDS spektrem b).

#### 4.4 Bronchogenní karcinomy - adenokarcinomy

Následně byly zkoumány vzorky tkání z dolních cest dýchacích, které byly získány na základě biopsií (tkáň odebrána za účelem histologické analýzy při operaci) a nekropsií (tkáň odebrána za účelem histologické analýzy při pitvě). Jednalo se vzorky bronchogenních karcinomů (adenokarcinomů), tedy karcinomů průdušek a plicního parenchymu (tkáň). Získané výsledky z Ramanovy mikrospektroskopie a SEM-EDS analýzy jsou uvedeny v tabulce 6. Výsledky ukazují, že železo bylo nalezeno téměř ve všech vzorcích plicní tkáně. V mnoha případech bylo detekováno ve formě částic o velikosti menší než 1  $\mu\text{m}$  (tabulka 7). Ve vzorcích A8 (adenokarcinom), R3 a R4 (referenční tkáň) bylo nalezeno železo ve formě aglomerátů (obrázek 32).

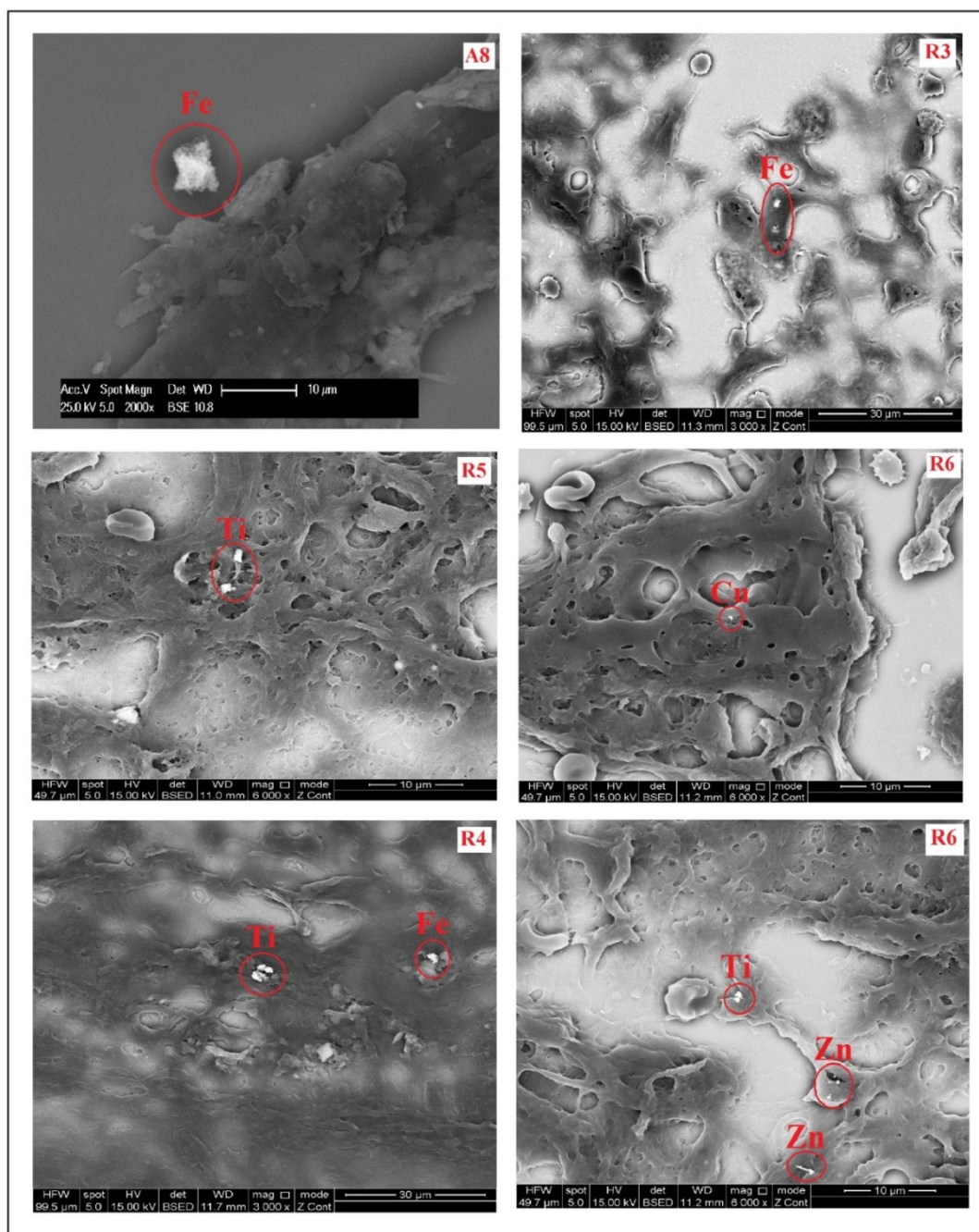
*Tabulka 6: Přehled detekovaných sloučenin ve vzorcích adenokarcinomů (A1-A13) a referenčních vzorků plicní tkáně (R1-R6) prostřednictvím Ramanovy mikrospektroskopie (AC-amorfní uhlík, GR-grafit,  $\text{TiO}_2\text{-A}$  - anatas,  $\text{TiO}_2\text{-R}$  - rutil)) a skenovací elektronové mikroskopie, spolu s uvedeným pohlavím, věkem, kouřením a pracovní anamnézou.*

Vzorek	Pohlaví	Věk	Kouření	Profese	Raman	SEM
A1	M	71	A	Důchodce	GR	Fe, Ti
A2	Ž	36	N	Švadlena	AC	-
A3	M	72	A	Vedoucí provozu	AC, $\text{MgCO}_3$	Fe, Ti
A4	Ž	49	A	Nezaměstnaná	$\text{FeCO}_3$ , GR	Cu, Fe, Ti, Zn
A5	Ž	70	A	Zdravotní sestra	sICu	Cu, Fe, Zn
A6	M	61	A	Drůbežárna, rozvoz pošty, ostraha	GR	Cu, Fe
A7	Ž	44	N	Psycholožka	AC, $\text{TiO}_2\text{-A}$ , $\text{TiO}_2\text{-R}$	Fe, Ti
A8	M	70	A	Brusič kovů, svářeč	$\text{CaCO}_3$ , $\text{FeCO}_3$ , $\text{TiO}_2\text{-A}$	Cr, Fe, Ti, W
A9	Ž	72	N	Ředitelka ZŠ	$\text{CaCO}_3$ , $\text{TiO}_2\text{-A}$	Fe, Mn, Ti
A10	M	71	N	Mechanik závodu	GR	Fe
A11	Ž	64	A	Jeřábice-dělnice	GR	Fe
A12	Ž	62	A	Prodavačka	AC, $\text{CaCO}_3$	Ba, Bi, Cr, Fe, Ni
A13	Ž	63	N	Administrativní pracovnice	$\text{CaCO}_3$ , $\text{TiO}_2\text{-A}$	Fe

<b>R1</b>	Ž	78	N	Práce ve školství	-	Ti
<b>R2</b>	M	74	N	Řidič	AC, GR, TiO <sub>2</sub> -A, TiO <sub>2</sub> -R	Ba, Fe, Mn, Sb, Ti, Zn
<b>R3</b>	M	60	N	Nezaměstnaný	GR	Fe
<b>R4</b>	M	67	N	Vysoké pece, šachta	AC, GR, SiO <sub>2</sub>	Fe, Ti
<b>R5</b>	Ž	70	N	Účetní	AC, GR	Cr, Fe, Ni, Ti
<b>R6</b>	Ž	71	N	Dělnice	GR	Cu, Ti, Zn

Tabulka 7: Přehled velikostí částic/shluků částic, detekovaných pomocí SEM-EDS ve vzorcích adenokarcinomů (A1-A13) a referenčních vzorků plicní tkáně (R1-R6), (je uvedena nejmenší detekovaná velikost, kde nebyla částice detekována, je uvedena pomlčka.).

VZOREK	VELIKOST DETEKOVANÝCH ČÁSTIC (μm)										
	Ba	Bi	Cu	Cr	Fe	Mn	Ni	Sb	Ti	W	Zn
<b>A1</b>	-	-	-	-	≤ 1	-	-	-	≤ 1	-	-
<b>A2</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>A3</b>	-	-	-	-	≤ 1	-	-	-	2	-	-
<b>A4</b>	-	-	5	-	≤ 1	-	-	-	≤ 1	-	5
<b>A5</b>	-	-	5	-	5	-	-	-	-	-	10
<b>A6</b>	-	-	8	-	2	-	-	-	-	-	-
<b>A7</b>	-	-	-	-	≤ 1	-	-	-	3	-	-
<b>A8</b>	-	-	-	3	≤ 1	-	-	-	3	2	-
<b>A9</b>	-	-	-	-	≤ 1	10	-	-	≤ 1	-	-
<b>A10</b>	-	-	-	-	≤ 1	-	-	-	-	-	-
<b>A11</b>	-	-	-	-	≤ 1	-	-	-	-	-	-
<b>A12</b>	2	3	-	7	≤ 1	-	7	-	-	-	-
<b>A13</b>	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-
<b>R1</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
<b>R2</b>	≤ 1	-	-	-	≤ 1	2	-	≤ 1	≤ 1	-	3
<b>R3</b>	-	-	-	-	≤ 1	-	-	-	-	-	-
<b>R4</b>	-	-	-	-	≤ 1	-	-	-	-	-	2
<b>R5</b>	-	-	-	≤ 1	≤ 1	-	≤ 1	-	2	-	-
<b>R6</b>	-	-	≤ 1	-	-	-	-	-	2	-	≤ 1

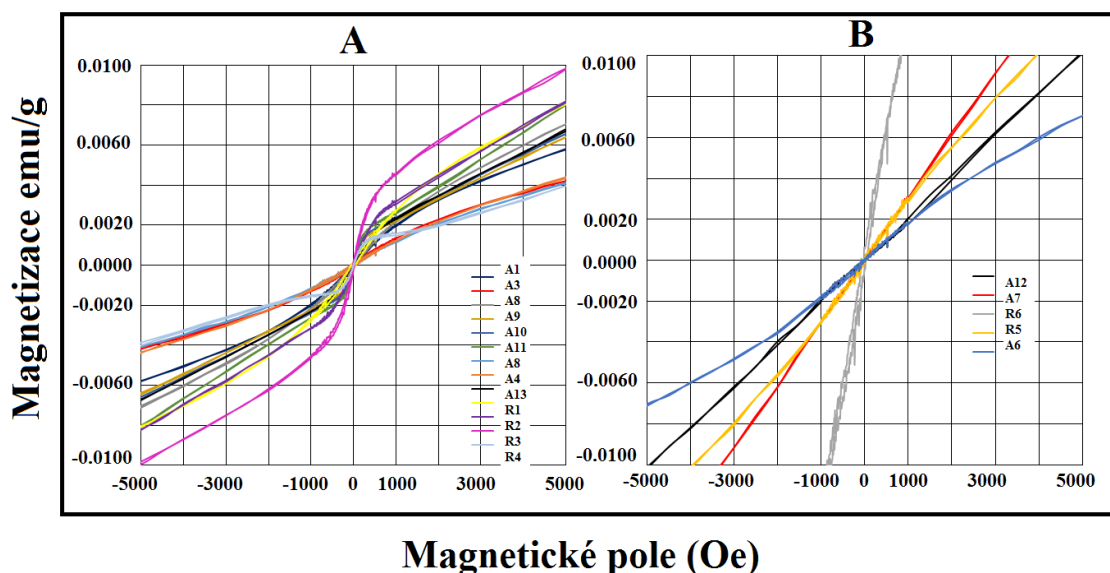


Obrázek 32: Shluky částic, které byly pomocí SEM-EDS detekovány v nádorových a referenčních tkáních plic. A8 - adenokarcinom, R3-6 - referenční plicní tkáň.

Přesné stanovení zdrojů částic je téměř nemožné, částečně by mohly pocházet z pracovní expozice, ale také ze znečištění prostředí (průmysl, doprava). Například metalurgický průmysl a pyrometallurgie jsou známými zdroji nanometrických kovových částic, převážně železa [249]. Pacient R4 pracoval jako dělník na vysokých pecích a v uhelných dolech, takže částice na bázi železa zjištěné v jeho plicní tkáni mohou z velké části pocházet z pracovního prostředí. Akumulace částic v plicních tkáních může být spojena s velikostí částic, neboť se

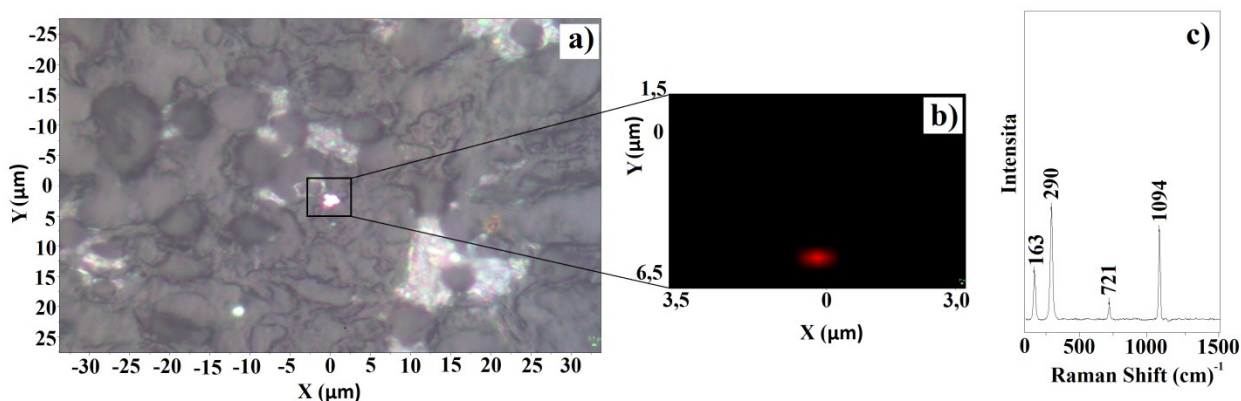


předpokládá, že velmi malé částice se při vdechování mohou relativně snadno dostat hluboko do plic, až do plicních sklípků. Účinnost obranného mechanismu dýchacích cest, fagocytóza, je poměrně silně závislá na tvaru a velikosti částic. Zatímco větší částice (asi 1  $\mu\text{m}$  a větší) jsou účinně fagocytovány makrofágy, neaglomerované ultrajemné částice, přítomné v alveolární oblasti nejsou makrofágy fagocytovány prakticky vůbec [77,78]. To může vést k velké akumulaci těchto malých částic a větší interakci s alveolárními epiteliálními buňkami [75]. Podle některých studií na hlodavcích je známo, že ultrajemné částice mohou procházet epitelem a dostat se tak až do intersticia plic [76,79,80]. Podobné mechanismy pravděpodobně fungují v lidském těle, nicméně to nebylo dosud jednoznačně prokázáno. Přítomnost shluků částic s majoritním obsahem železa, zjištěná v plicní tkáni lze částečně vysvětlit tím, že magnetické nanočástice mají poměrně velký sklon se shlukovat, což může mít za následek tvorbu aglomerátů či agregátů [250]. Ve shluku se pak nanočástice mohly chovat jako větší částice, především v závislosti na velikosti samotného aglomerátu/agregátu. K jeho vytvoření však mohlo dojít až po průniku částic do epitelu plic s přispěním samotného živého systému, který se pravděpodobně snažil cizorodé částice neustále eliminovat. Z důvodu průkazu přítomnosti magnetických nanočástic v tkáni bylo provedené magnetometrické měření, které potvrdilo magnetický charakter některých vzorků (obrázek 33). Byla prokázána přítomnost částic s magnetickým charakterem v plicní tkáni ve vzorcích A4, A8 a R3.

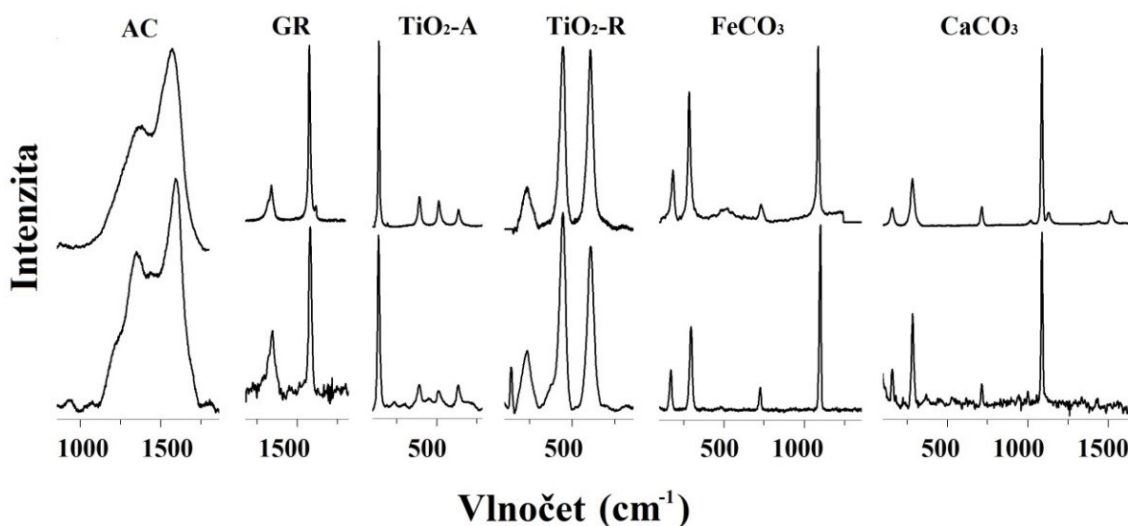


Obrázek 33: Některé vzorky nádorových tkání, jakož i některé referenční vzorky vykazovaly slabé feromagnetické chování (A). Ostatní vzorky vykazovaly paramagnetické chování (B).

V plicní nádorové tkáni pacienta A8 byly detekovány částice na bázi železa (obrázek 32), které mohly být spojeny s pracovní expozicí. Tento pacient vykonával profesi brusič kovů. Broušení nepaří, vzhledem k používání chladících kapalin, mezi vysokoteplotní procesy, ale při vysoké rychlosti, která je během broušení vyvinuta se kov může zahřívat a odpařovat, a během tohoto procesu může vznikat poměrně vysoký podíl ultrajemných částic [251]. Podle Brouwera a kol. (2010) může být koncentrace kovových částic o velikostech <100 nm přítomných v pracovním prostředí spojován s činnostmi jako je svařování nebo broušení. Současně autoři při monitorování pracovního prostředí zjistili, že právě při svařování nebo broušení byly ve vzduchu přítomné spíše aglomeráty nebo agregáty kovových částic než samotné malé částice [252]. Přítomnost částic na bázi železa byla ve vzorku A8 potvrzena rovněž pomocí Ramanovy mikrospektroskopie, zjištěním sloučeniny sideritu – ( $\text{FeCO}_3$ ), (obrázek 34, obrázek 35).

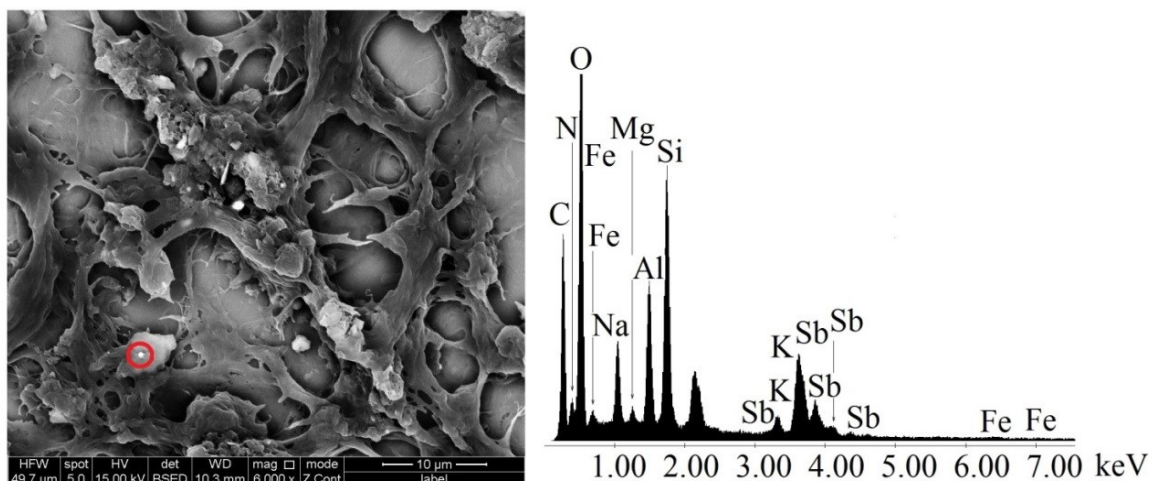


Obrázek 34: Ramanova spektrální mapa vybrané oblasti vzorku nádorové plicní tkáně (vzorek A8), kde a) je tkáň pod světelným mikroskopem s vybranou oblastí, b) spektrální mapa vybrané oblasti (červeně - místa detekce  $\text{FeCO}_3$ , černě - okolní tkáň) a c) naměřené spektrum  $\text{FeCO}_3$ .



Obrázek 35: Vybraná spektra sloučenin detekovaných Ramanovou mikrospektroskopií v plicích nádorových tkáních (adenokarcinom) a referenčních vzorcích plic (bez karcinomu). Horní spektrum je referenci. (AC – amorfni uhlík, GR – grafit,  $\text{TiO}_2\text{-A}$  – anatas,  $\text{TiO}_2\text{-R}$  – rutil,  $\text{FeCO}_3$  - siderit,  $\text{CaCO}_3$  – kalcit).

U posledního vzorku (R3), ve kterém byl také detekován shluk částic na bázi železa, nebyla zjištěna přesná pracovní anamnéza, nelze tedy odhadovat možnou souvislost mezi detekovanými částicemi železa v tkáni a vykonávanou profesí. V souvislosti s pracovní expozicí byla významná detekce částic s obsahem antimonu (obrázek 36) a barya u profese řidič (vzorek R2). Jak baryum, tak antimon jsou obecně spojovány se znečištěním pocházejícím ze silniční dopravy, konkrétně s nespalovacími procesy jako je například brzdění. Běžně se totiž ve formě sloučenin ( $\text{BaSO}_4$  a  $\text{Sb}_2\text{S}_3$ ) používají do brzdových obložení (destiček) automobilů jako plniva a lubrikanty [22,183]. Je tedy možné, že při dlouhodobé expozici, která je u profese řidiče pravděpodobná, mohly některé částice, detekované v plicích pacienta, pocházet právě z nespalovacích procesů v dopravě.

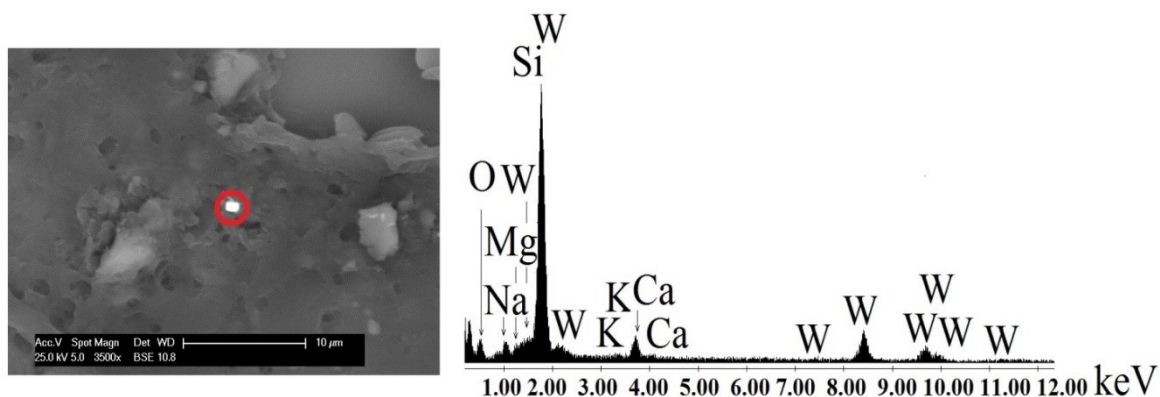


Obrázek 36: Částice s majoritním obsahem antimonu, detekovaná pomocí SEM - EDS. Tato částice byla zjištěna v referenčním vzorku plic (R2) u pacienta, který pracoval jako řidič.

Dalším detekovaným prvkem ve studovaných plicních tkáních byl titan (viz tabulka 6). Jeho přítomnost byla zjištěna prostřednictvím SEM-EDS v téměř polovině vzorků plicní nádorové tkáně a ve více než polovině referenčních vzorků plicní tkáně. Současně byla jeho přítomnost v nádorové i referenční plicní tkáni (A7-9, A13, R2) potvrzena Ramanovou mikrospektroskopií (obrázek 35), kterou byly identifikovány dvě formy oxidu titaničitého, a to anatas a rutil. Jak již bylo uvedeno výše, oxid titaničitý je široce používán jako pigment a využívá se jako bělicí prostředek do barev, plastů, papíru, inkoustu, potravin, kosmetiky a léčiv [174]. Podle Chena (2014) mohou zároveň nanočástice  $\text{TiO}_2$  způsobovat zánět, fibrózu a rakovinu plic a jsou potenciálně karcinogenní pro člověka [174].

U tří vzorků tkání plic (A4, A5, A6) byla zjištěna přítomnost částic s majoritním obsahem mědi. Současně jeden referenční vzorek (R6) obsahoval shluk částic na bázi mědi (obrázek 32). Kromě toho byly nalezeny jak v nádorové plicní tkáni, tak v referenčních plicních tkáních částice s majoritním obsahem prvků: Zn, Mn, Ni, Bi a Cr (Tabulka 6). Zároveň byly detekovány fáze: grafit, amorfni uhlík, uhličitan vápenatý (obrázek 35), uhličitan hořečnatý, oxid křemičitý a sloučeniny mědi (tabulka 6). Významné bylo zjištění částice na bázi wolframu v nádorové plicní tkáni u pacienta pracujícího jako brusič kovů/svářeč (obrázek 37). Zdrojem těchto wolframových částic mohlo být pravděpodobně pracovního prostředí. Podle Gruberové (2009) pracovníci, jejichž hlavní činností je svařování a broušení mohou svařovat pomocí netavící se wolframové elektrody v inertním plynu, angl. TIG – Tungsten Inert Gas a současně zabrušovat wolframové elektrody [232,254]. Tato metoda se používá především pro svařování ocelí s obsahem chromu a niklu, dále pro svařování hliníku, hořčíku, titanu a dalších neželezných kovů [255], čemuž by odpovídaly další nalezené prvky (tabulka

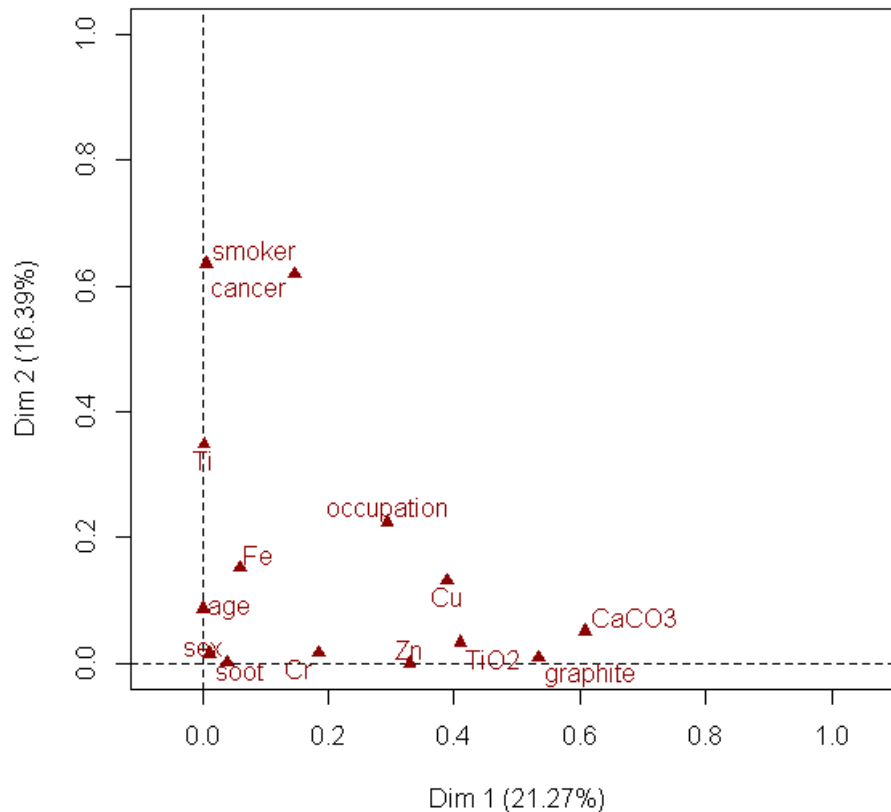
6).



Obrázek 37: Částice na bázi wolframu zjištěného SEM - EDS. Tato částice se objevila u pacienta s karcinomem (A8) pracujícího v profesi brusič kovů/svářeč.

Tyto výsledky byly také následně zpracovány statistickou analýzou a její výsledky odhalily relativně významnou souvislost mezi výskytem rakoviny plic a kouřením (obrázek 38). Podle Rodrigueze a kol. (2009) byl zaznamenán velmi silný vztah mezi kouřením a zvýšeným rizikem vzniku rakoviny plic u pracovníků ve slévárnách železa a oceli. Současně autoři zjistili, že pracovníci měli vysoké riziko rakoviny plic [256]. S ohledem na nízký počet respondentů nelze v naší studii tuto hypotézu jednoznačně potvrdit. Jak je patrné z uvedených výsledků, přesto, že byl hodnocený soubor relativně malý, byly zjištěny určité významné skutečnosti. Z toho důvodu má význam pokračovat v dalším výzkumu v oblasti detekce částic v nádorové tkáni, vyhodnotit větší soubor pacientů a potvrdit tak závěry z této dílčí pilotní studie.

**Graph of the variables**



*Obrázek 38: Chí kvadrát test (test dobré shody) pro testování asociace jednotlivých kategoriálních proměnných.*

Jak už bylo uvedeno výše, IARC uvádí seznam látek, které jsou zařazeny do skupin, podle jejich působení na lidský organismus z hlediska jejich karcinogenity. Podle této klasifikace lze odhadnout míru karcinogenity jednotlivých látek, které jsou do této kategorie zařazeny [65]. Tato klasifikace byla v předložené práci využita pro identifikaci možného rizika v souvislosti s přítomností detekovaných látek v sedimentovaném silničním prachu z povrchu cesty, který se podílí na každodenní expozici člověka v oblastech s vyšší hustotou silniční dopravy.

## 4.5 Sedimentovaný prach z cesty

Nejběžnější a nejlépe dostupný možný zdroj kontaminace lidského organismu prostřednictvím inhalační expozice je sedimentovaný prach ze silnice. Pro zhodnocení možného rizika přítomnosti škodlivých látek v tomto prachu bylo nutné stanovit elementární složení sedimentovaného silničního prachu v městské a příměstské oblasti vybrané průmyslové aglomerace. Bylo zvoleno město Ostrava, které je třetím největším městem v České republice s počtem obyvatel přes 300 000 a je sídlem největších železárenských a ocelářských závodů v zemi. Vzhledem k počtu občanů se v Ostravě nachází také poměrně vysoký počet automobilů, kdy v roce 2015 připadalo na jedno vozidlo 2,45 obyvatel [257].

Ve vzorcích hodnocených prachů v obou lokalitách (městské a příměstské) byly pomocí metody AES - ICP detekovány prvky: Ba, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb, Sb, Sn, Zn a V. Přehled detekovaných prvků je uveden v tabulce 8 spolu s výsledkem porovnání t-testu.

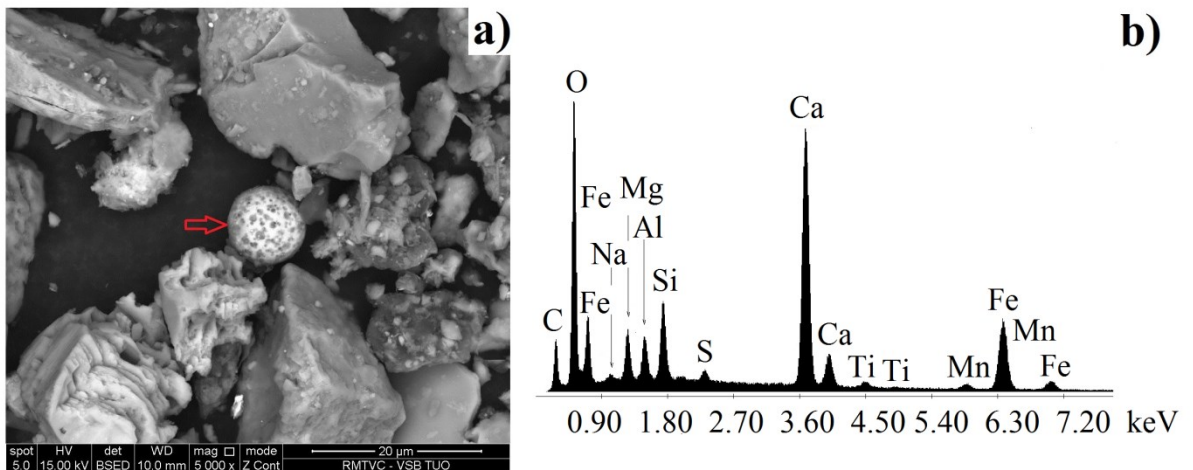
Tabulka 8: Průměry obsah prvků na obou lokalitách (městské a příměstské) určené ICP (\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ ).

Elements	Urban (mean) (mg.kg <sup>-1</sup> )	Suburban (mean) (mg.kg <sup>-1</sup> )	p < 0.05 (t-test)
Ba	414.125	361.875	**
Cr	170.5	339.375	**
Cu	106.25	25.5	**
Ni	32.625	28.375	-
Pb	32.625	58.5	**
V	72.75	110.75	**
Zn	234.125	192.875	*
Sb	24.9	3.314	**
Sn	17.588	7.129	*
	(%)	(%)	
Fe	4.3075	3.985	-
Mn	0.20313	0.54638	**

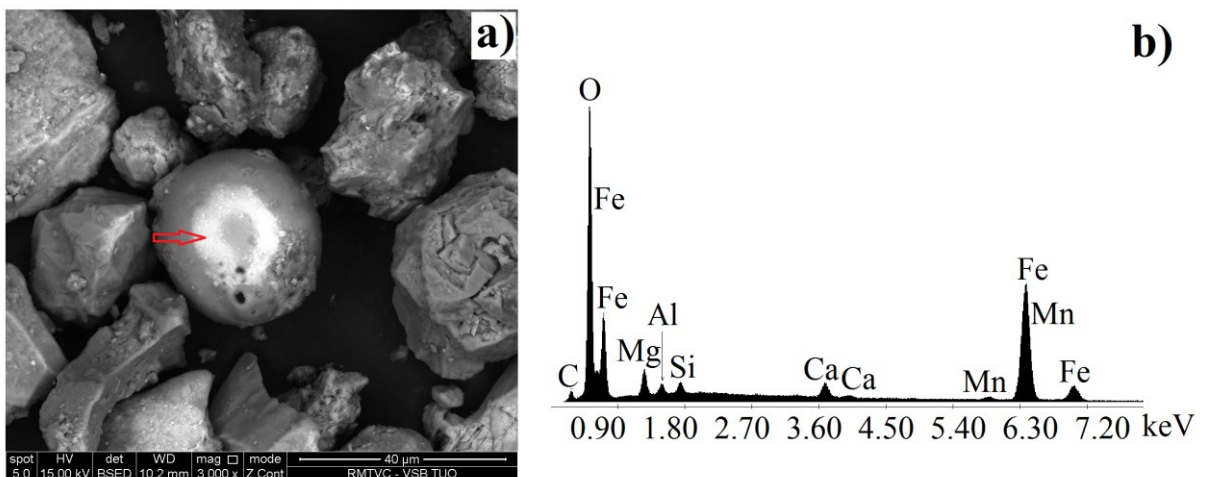
Současně byly některé elementy potvrzeny analýzou SEM-EDS. V městské lokalitě byly zjištěny především Fe, Ti a Mn. Ukázka morfologie částic je prezentována na obrázku 39, kde se jedná o kulovitou částici na bázi Fe, Ti a Mn. Velikost této částice se pohybovala okolo 10µm Naopak v příměstské lokalitě (B) byly zjištěny částice s majoritním obsahem Fe, Mn, Zr a Si. Částice okolo 20µm nalezena v sedimentovaném prachu příměstské lokality je



zobrazena na obrázku 40. Částice mimo jiné obsahovala převážně Fe a Mn.



Obázek 39: SEM obrázek kulovité částice, obsahující z velké části železo, mangan a titan detekované ve vzorku sedimentovaného prachu na odběrovém místě A (městská část Ostravy), (a) s příslušným EDS spektrem (b).

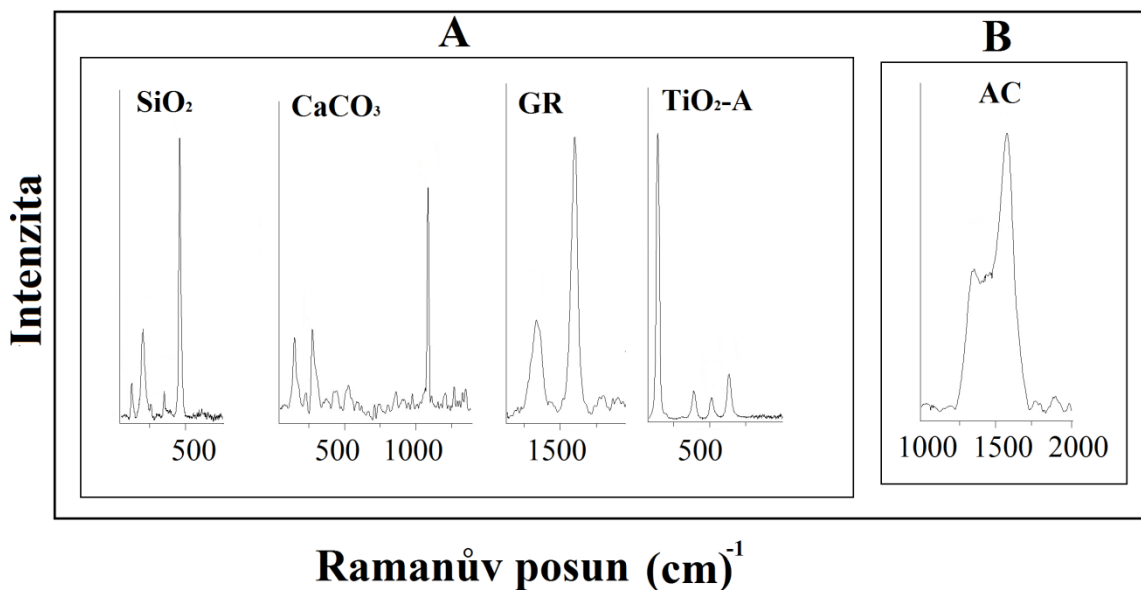


Obázek 40: SEM obrázek částice, s majoritním obsahem železa a manganu, detekované ve vzorku sedimentovaného prachu na odběrovém místě B (příměstská část Ostravy), (a) s příslušným EDS spektrem (b).

Pomocí Ramanovy mikrospektroskopie byly ve vzorcích sedimentovaného prachu z městské lokality identifikovány fáze jako  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$  – anatas,  $\text{CaCO}_3$  a grafit. V příměstské lokalitě pak pouze amorfni uhlík. Přehled Ramanových spekter těchto fází je zobrazen na obrázku 41. Z důvodu vysoké fluorescence vzorků prachu byla analýza na Ramanově mikrospektrometru značně ztížena. Částice na bázi kovů mohly být pokryty okolním fluoreskujícím materiálem a tudíž spektra daných sloučenin nebylo možno změřit. Laser má přibližně tloušťku svazku 500



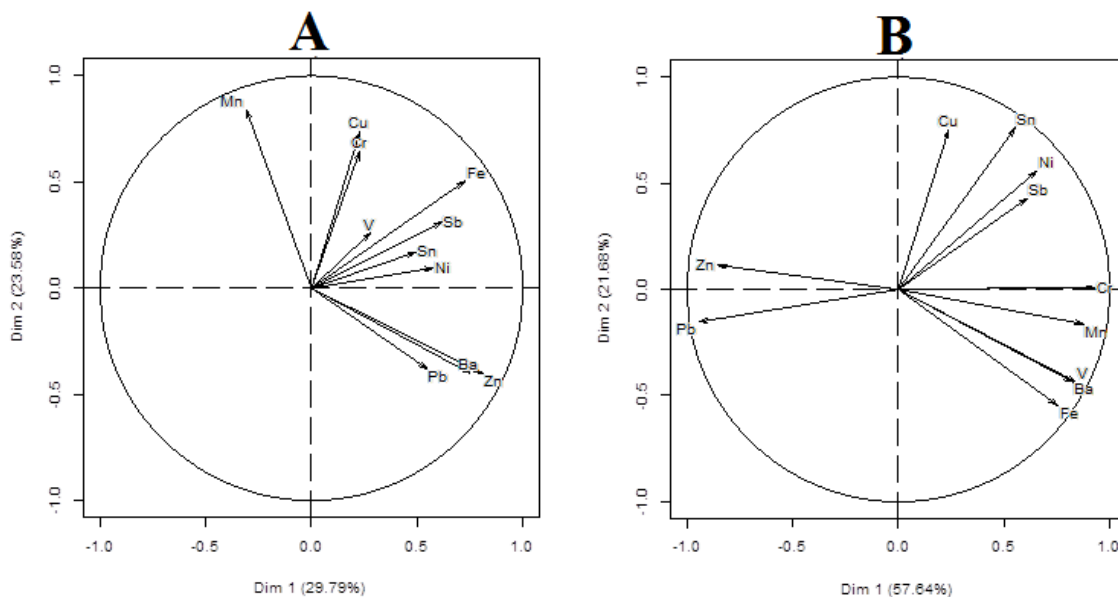
nm, tudíž menší částice jsou obtížněji detekovatelné, protože dochází současně k detekci okolí, které může být zatížené již zmíněnou fluorescencí.



Obrázek 41: Vybraná spektra sloučenin nalezených ve vzorcích sedimentovaného prachu na odběrovém místě A (městská část Ostravy) a odběrovém místě B (příměstská část Ostravy), změřená pomocí Ramanovy mikrospektroskopie (GR – grafit, TiO<sub>2</sub>-A – anatas).

Statistická analýza prvků byla provedena na základě údajů o množství prvků určených na obou místech za účelem stanovení celkového vztahu mezi jednotlivými prvky ve vzorcích silničního prachu. Vizualizace výsledků je znázorněna na obrázku 42, zde jsou proměnné výsledných elementárních koncentrací zobrazeny jako vektory, jejichž délky odpovídají reprezentaci konkrétní proměnné v modelu a úhly vytvořené vektory ukazují stav korelace proměnných. Korelační koeficienty jsou v tomto modelu definovány jako kosinus těchto úhlů - ostrý úhel představuje pozitivní korelaci, tupý úhel zápornou korelaci a pravý úhel bez jakékoliv korelace. Hodnotící vztahy se lišily mezi místy odběru vzorků. Na obou místech byla zjištěna pozitivní korelace mezi Pb a Zn. V městské lokalitě byla navíc doprovázena korelací s Ba, naopak v příměstské lokalitě Ba negativně korelovalo jak s Pb, tak se Zn. Kromě toho bylo Ba v příměstské lokalitě pozitivně spojeno s Fe, a naopak v městské lokalitě Ba nebylo v žádné korelaci s Fe. Vzhledem k tomu, že jak Ba, tak i Fe jsou kovy, které se běžně vyskytují i v neznečištěné půdě [233], lze konstatovat, že: a) situace na příměstské lokalitě odráží očekávanou koncentraci těchto kovů v posuzovaném regionu a b) v městské lokalitě je odlišný zdroj Ba od zdroje Ba v příměstské lokalitě. Oba zjištěné elementy, Pb a Zn jsou spojeny se znečištěním souvisejícím s dopravou, můžeme tedy předpokládat, že

přítomnost Ba v městské lokalitě může také souviset s dopravou. Bylo zjištěno, že Cr je v městské lokalitě v pozitivní korelaci s Cu, avšak v případě příměstské lokality nemá žádnou korelaci.



Obrázek 42 : Korelační kruhy - založené na výsledcích analýz hlavních složek (PCA – z angl. Principal Component Analysis), pro městskou A a příměstskou lokalitu B.

Městská a příměstská lokalita se lišily v objemu dopravy a způsobem lokálního vytápění bytových jednotek, nicméně zjištěné prvky ve všech odebraných vzorcích prachu byly stejné a kromě Fe bez významného rozdílu v měsíci sběru (březen až říjen).

Lze předpokládat, že detekované prvky (tabulka 8) mohou představovat potenciální riziko jak pro životní prostředí, tak pro lidské zdraví, zejména pokud jsou ve formě částic resuspendovány do ovzduší. Například, lidské zdraví může být ovlivněno expozicí sloučeninám antimonu, chronické vystavení může způsobit respirační problémy, jako je pneumokonióza, zatímco jeho požití může způsobit průjmy, zvracení, únavu a bolest hlavy [258]. Složení sedimentovaného silničního prachu z obou odběrových lokalit tedy může naznačovat, že akumulace těchto kovů a jejich možný přesun do půdy a následně podzemních vod může představovat možné riziko pro životní prostředí. Navíc byly zjištěny významné rozdíly v obsahu těchto prvků mezi městskými a příměstskými lokalitami. U většiny prvků byl obsah Ba, Cu, Fe, Ni, Sb, Sn a Zn vyšší v městské lokalitě, zatímco některé prvky - jako Cr, Mn, Pb a V - byly zjištěny ve vyšších množstvích v příměstské lokalitě.

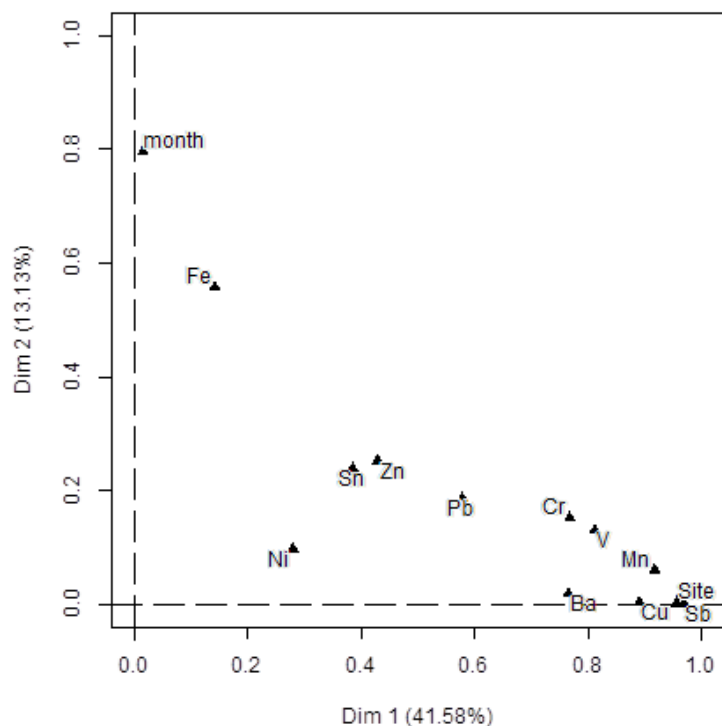
Veškeré prvky nacházející se ve větších množstvích v městské lokalitě mohly být nějak spojeny s emisemi z dopravy (buď z opotřebením brzd, opotřebením z pneumatik nebo emise z

výfukových plynů [259-262]. Ačkoli může být původ některých prvků v sedimentovaném silničním prachu odlišný (lokální vytápění, průmysl), přesné rozlišení je téměř nemožné. Vzhledem k tomu, že největší rozdíl v místech odběru vzorků je v jejich objemu provozu (byly vybrány podle tohoto parametru), většina obsahů detekovaných prvků ve vzorcích sedimentovaných silničních prachů v městské lokalitě lze připsat dopravě, konkrétněji nespalovacím procesům v dopravě. Znečištění ovzduší prachovými částicemi vzniklými prostřednictvím opotřebení je rozděleno podle velikosti částic do frakcí. Sedimentovaná frakce (z angl. non-airborne) obsahuje větší částice, které se usazují na okolních površích vozovek. Polévaté částice (z angl. airborne) setrvávají suspendovány ve vzduchu a mohou být v závislosti na své velikosti unášeny vzduchem daleko od svého zdroje. Například více než 50% hmotnostních procent brzdového otěru je emitováno do okolí jako sedimentovaná frakce [263,264] a podle odhadu Velké Británie celkový úbytek pneumatik při opotřebením dosahuje až 140 g/m/rok [265,266].

Brzdové obložení automobilů je multikomponentní materiál, který se obvykle skládá z více než 10 složek a proto jejich složení není jednotné, navíc u jednotlivých kompozitů není úplně přesně známé, především z důvodu obchodního tajemství výrobců [267]. Přesto ale existují tzv. „tracery“ neboli indikátory emisí z brzd. Například Sternbeck a kol. (2002) navrhl jako jeden z nich stanovení poměru Cu/Sb, střední hodnotu tohoto poměru určil jako  $4,6 \pm 2,3$ . V našich výsledcích hodnota poměru Cu/Sb (tabulka 8) v prachu z městské lokality dobře koresponduje s uvedeným intervalem (= 4,3), naopak poměr Cu/Sb v prachu příměstské lokality byl mnohem vyšší (= 7,7). Z tohoto zjištění bychom mohli předpokládat, že Cu a Sb v městské lokalitě by mohly pocházet převážně z otěrů brzd.

Ze všech prvků zjištěných v sedimentovaném prachu z povrchu silnice pouze vanad pravděpodobně nemůže být považován jako možný indikátor opotřebení brzd [259]. Vanad se nachází v zemské kůře, ale může mít také antropogenní původ, zejména ze spalování fosilních paliv, dieselové saze, ale i z katalyzátorů na bázi vanadu [261,268,269]. Vysoké obsahy kovů v sedimentovaném prachu příměstské lokality, jako jsou Cr, Mn, Pb a V, mohou být také spojeny s vysokým počtem lokálních topných systémů na tuhá paliva [270].

Množství železa bylo jedinou proměnnou, která se významně nelišila v závislosti na místě odběru vzorků, ale místo toho vykazovala významnou sezónní závislost (obrázek 43).



Obrázek 43: Výsledky analýzy faktorů na smíšených datech, kvalitativní i kvantitativní proměnné. Lze pozorovat, že Fe je mnohem více závislé na měsíci (month) na rozdíl od ostatních prvků, které jsou v korelaci spíše s místem odběru (site).

Z obrázku 43 je zřejmé, že Fe korelovalo většinou se Sb a Sn v městské lokalitě, což také potvrdilo jako možný zdroj emisí Fe v městské lokalitě otěry z brzd. Jak už bylo uvedeno výše, Fe, Sb a Sn mohou být použity jako indikátory opotřebení brzd [259]. Naopak v příměstské lokalitě bylo Fe v korelaci s V, což by mohlo naznačovat jiný zdroj než právě již zmíněné opotřebení brzd, což také souvisí s mnohem objemem dopravy v této lokalitě.

Při srovnání výsledků sedimentovaného prachu a výsledků hypertrofických tkání z oblasti skořep nosních lze konstatovat, že byly nalezeny částice Ba v prachu (tabulka 8) i v hypertrofických tkáních (tabulka 1) a současně byla nalezena v hypertrofických tkáních sloučenina  $BaSO_4$  (tabulka 3). Také částice na bázi Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb a Zn byly nalezeny jak v sedimentovaném prachu (tabulka 8), tak i v hypertrofických tkáních (tabulka 1).

Vyjma Pb, Sn a V byly všechny ostatní prvky detekované v sedimentovaném prachu (tabulka 8) nalezeny také v plicních nádorových a referenčních vzorcích (tabulka 6). Na základě těchto zjištění lze sedimentovaný prach z povrchu silnice zařadit mezi možné zdroje kontaminace horních a dolních cest dýchacích pevnými částicemi na bázi kovů.

## 5. ZÁVĚR

Byla provedena charakterizace souboru vzorků hypertrofických tkání, adenokarcinomů a cytologických vzorků sputa. Studované tkáně byly primárně charakterizovány metodou Ramanovy mikrospektroskopie, vybrané vzorky byly pak následně podrobeny analýze na skenovacím elektronovém mikroskopu, kdy zjištěné výsledky byly vyhodnoceny statistickými metodami. Navíc byl proveden odběr silničního prachu v závislosti na zatíženosti dopravy (2 lokality) v průběhu osmi měsíců, jakož možný potenciální zdroj částic zatěžující dýchací systém člověka. Na základě provedených výzkumů a dosažených výsledků vyplývají tyto skutečnosti:

- 1) Použitím Ramanovy mikrospektroskopie se v hypertrofických tkáních z oblasti skořep nosních podařilo detekovat přítomnost pevných částic/shluků. Detekované částice byly na bázi oxidu titaničitého ( $\text{TiO}_2$ ) ve dvou svých modifikacích (anatas a rutil), amorfního uhlíku, grafitu,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Mg}(\text{CO}_3)_2$ ,  $\text{CaSO}_4$ , magnetitu ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) a ankeritu ( $\text{CaFe}(\text{CO}_3)_2$ ).
- 2) Metodou SEM-EDS se jednak potvrdila přítomnost Ti, Fe a Mn v hypertrofických tkáních a dále byla zjištěna přítomnost mnoha dalších kovů, například částice na bázi chromu, molybdenu, olova, niklu, barya, zinku, mědi a kadmia. Mnohé byly detekovány v mikronových velikostech. Velká část z nich ovšem byla zjištěna také v rozměrech menších než  $1\mu\text{m}$ .
- 3) Byla zjištěna jistá významná statistická závislost mezi výskytem některých částic/shluků částic na bázi kovů a určitou profesí. Největší množství kovových částic/shluků částic bylo nalezeno ve vzorcích hypertrofické tkáně svářečů. Velká část z nich byla zjištěna ve velikosti pod  $1\mu\text{m}$ . Mnohé z těchto částic/shluků částic patří svým chemickým složením podle IARC mezi agens „prokazatelně karcinogenní pro člověka“.
- 4) V referenčních vzorcích tkáně z oblasti skořep nosních (pacienti s diagnostikovanými chronickými rinitidami) byla po analýze použitím Ramanovy mikrospektroskopie zjištěna přítomnost těchto sloučenin:  $\text{TiO}_2$  ve formě anatasu,  $\text{TiO}_2$  ve formě rutilu, grafitu, magnesitu ( $\text{MgCO}_3$ ) a sloučenin Al a Cu. Tudíž není možné obdržet referenční vzorky nezatížené částicemi, kdy i nenarozený plod je ovlivňován přes plodovou vodu matky.
- 5) Analýza většího souboru hypertrofických tkání přinesla navíc zjištění některých dalších částic/shluků částic na bázi kovů, např. sloučeniny železa hematit – ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), dále pak  $\text{SiO}_2$ , baryt – ( $\text{BaSO}_4$ ) a sloučeniny hliníku. Z celkového statistického vyhodnocení souboru čtyřiceti pacientů vyplynulo, že se nepotvrdil původně předpokládaný, významný, rozdíl ve

výskytu částic v tkáni v závislosti na vzdálenosti od nozder. Jednotlivé analyzované vzorky tkání se od sebe vzájemně lišily především „pacient od pacienta“. Významné však bylo zjištění, že všichni kuřáci v souboru pacientů byli manuálně pracující muži. Podobně také byla zjištěna jistá závislost mezi pacienty s chronickou rýmou, kteří byli kuřáci a mezi výskytem amorfního uhlíku v jejich hypertrofické tkáni. Také byla v souboru pacientů s chronickou rýmou nalezena jistá souvislost mezi věkem pacientů a obsahem oxidu titaničitého v hypertrofické tkáni.

6) V cytologických vzorcích sputa byly zjištěny částice/shluky částic s majoritním obsahem Fe, spolu s Cr, Mn, Ba a Ti. Velikosti detekovaných částic/shluků částic byly i ve velikostech pod 1  $\mu\text{m}$ .

7) Téměř ve všech vzorcích plicní nádorové tkáně a referenční plicní tkáně bylo detekováno železo. Jednak prostřednictvím SEM – EDS jako částice s majoritním obsahem Fe, ale i jako sloučenina železa pomocí Ramanovy mikrospektroskopie. V mnoha případech bylo detekováno ve formě částic/shluku částic ve velikosti menší než 1  $\mu\text{m}$ . Podobně také titan byl zjištěn prostřednictvím SEM-EDS v téměř polovině vzorků plicní nádorové tkáně a ve více než polovině referenčních vzorků plicní tkáně. Současně byla jeho přítomnost v nádorové i referenční plicní tkáni potvrzena Ramanovou mikrospektroskopií. Významná byla také detekce částic/shluků částic s majoritním obsahem Sb, Ba, Cu, Zn, Mn, Ni, Bi a Cr. Zároveň byly detekovány fáze: grafit, amorfní uhlík, uhličitan vápenatý, uhličitan hořečnatý, oxid křemičitý a sloučeniny mědi.

8) Výsledky statistické analýzy odhalily relativně významnou souvislost mezi výskytem rakoviny plic a kouřením.

9) Nebyla nalezena souvislost s výskytem částic v tkáních a výskytem nádorů. Nelze tedy stanovit, zda přítomnost částic má vliv na vzniku nádoru, či vzniknuvší nádor ovlivňuje další akumulaci částic.

10) Všechny determinované prvky (Ba, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sb, Sn, V a Zn) byly detekovány ve všech sedimentovaných vzorcích prachu z obou hodnocených míst (A i B). Sezónní rozdíl byl pozorován pouze u obsahu železa. Na druhé straně bylo zjištěno, že obsah všech ostatních stanovených prvků - s výjimkou železa - se výrazně liší v závislosti na místě sběru. Vyšší obsah Ba, Cu, Sb, Sn a Zn byl pozorován ve vzorcích odebraných v blízkosti rušné městské silnice, v městské lokalitě. Vyšší obsah Cr, Mn, Pb a V byl pozorován ve vzorcích z příměstské lokality

11) Pomocí Ramanovy mikrospektroskopie byly ve vzorcích sedimentovaného prachu z městské lokality identifikovány fáze jako  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$  – anatas,  $\text{CaCO}_3$  a grafit. Ve vzorku z příměstské lokality pak pouze amorfní uhlík, což má za následek vysoká fluorescence vzorku.

Souhrnem lze konstatovat, že se podařilo zjistit přítomnost částic na bázi kovů v tkáních z různých částí dýchacího systému, ať už referenčních nebo pozměněných důsledkem nějakého patologického stavu. V rámci práce byl nalezen nejvhodnější způsob úpravy biologického materiálu pro účely jednotlivých chemických a mikroskopických analýz, a sice příprava vzorků tkání nanesených v podobě tenkých řezů na mikroskopické sklíčko. Pomocí vybraných metod bylo stanoveno chemické a fázové složení detekovaných částic a navíc byla odhadnuta jejich velikost. Současně se podařilo charakterizovat jeden z možných zdrojů kontaminace organismu pevnými částicemi, a sice sedimentovaný prach z povrchu silnice. Takto získané informace a postupy by mohly dále posloužit pro lékařskou praxi. Přítomnost částic na bázi kovů by mohla částečně objasnit příčiny některých onemocnění. P metody detekce částic v lidské tkáni by se tak mohly výhledově stát součástí speciálního vyšetření u některých autoimunitních onemocnění nebo u nemocí, které byly diagnostikovány jako idiopatické, tedy vzniklé z neznámých příčin.

## 6. BIBLIOGRAFIE

- [1] *DOPORUČENÍ KOMISE o definici nanomateriálu 2011/696/EU*. In: . Brusel, 2011, ročník 275, číslo 38. Dostupné také z: <https://www.mpo.cz/assets/dokumenty/45005/50585/583166/priloha002.pdf>
- [2] VOGEL, Ulla, Kai SAVOLAINEN, Qinglan WU a Martie VAN TONGEREN. *Handbook of nanosafety: measurement, exposure and toxicology*. 1. 2014. ISBN 978-012-4166-042.
- [3] PATOČKA, Jiří. *Obecná toxikologie: doplňkové texty pro posluchače kombinované formy studia studijního programu „Ochrana obyvatelstva“* [online]. České Budějovice, 2007 [cit. 2017-8-14].
- [4] RUPOVÁ, Marcela a Petr SKŘEHOT. *Bezpečnost a ochrana zdraví při práci s nanomateriály: příručka pro zaměstnavatele*. 1.vyd. Praha: Výzkumný ústav bezpečnosti práce, v. v. i., 2011. ISBN 978-80-86973-86-9.
- [5] OBERDÖRSTER, Günter, Andrew MAYNARD, Ken DONALDSON et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology*. 2005, **2**(1), 8-. DOI: 10.1186/1743-8977-2-8. ISSN 17438977. Dostupné také z: <http://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-8977-2-8>
- [6] FILIPOVÁ, Zuzana, Jana KUKUTSCHOVÁ a Miroslav MAŠLÁŇ. *Rizika nanomateriálů*. 1. vyd. V Olomouci: Univerzita Palackého, 2012. ISBN 978-80-244-3201-4.
- [7] SAVOLAINEN, Kai, Harri ALENIUS, Hannu NORPPA, Lea PYLKKÄNEN, Timo TUOMI a Gerhard KASPER. Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies—A review. *Toxicology*. 2010, **269**(2-3), 92-104. DOI: 10.1016/j.tox.2010.01.013. ISSN 0300483x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X10000247>
- [8] HLAVÁČEK, Antonín a Petr SKLÁDAL. Kvantové tečky: příprava, konjugace a využití v bioanalytické chemii a biologii. *Chemické listy*. 2011, **105**, 611-615.
- [9] GREINER, Andreas a Joachim H. WENDORFF. Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Angewandte Chemie International Edition*. 2007, **46**(30), 5670-5703. DOI: 10.1002/anie.200604646. ISSN 14337851. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200604646>
- [10] SUBBIAH, Thandavamoorthy, G. BHAT, R. TOCK, S. PARAMESWARAN a S. RAMKUMAR. Electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*. 2005, **96**(2), 557-569. DOI: 10.1002/app.21481. ISSN 0021-8995. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.21481>
- [11] PETRÁŠ, David, Dušan KIMMER, Karel SOUKUP a Petr KLUSOŇ. Bezpečná nanovlákná. *Chemické listy*. 2009, **103**, 1009-1016.
- [12] KOLÁŘOVÁ, Lucie. *Úvod do nanovědy a nanotechnologií*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-802-4441-795.
- [13] YANNONI, C.S., H.R. WENDT, M.S. DE VRIES et al. Characterization of fullerenes and doped fullerenes. *Synthetic Metals*. 1993, **59**(3), 279-295. DOI: 10.1016/0379-6779(93)91162-U. ISSN 03796779. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037967799391162U>
- [14] HERRERO-LATORRE, C., J. ÁLVAREZ-MÉNDEZ, J. BARCIELA-GARCÍA, S. GARCÍA-MARTÍN a R.M. PEÑA-CRECENTE. Characterization of carbon nanotubes and analytical methods for their determination in environmental and biological samples:



- A review. *Analytica Chimica Acta*. 2015, **853**, 77-94. DOI: 10.1016/j.aca.2014.10.008. ISSN 00032670. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267014012410>
- [15] PRNKA, Tasilo, Jiřina SHRBENÁ a Karel ŠPERLINK. *Nanotechnologie v České republice 2008: Česká společnost pro nové materiály a technologie Praha*. 1. Ostrava: Repronis, 2008. ISBN 978-807-3291-877.
- [16] 99/30/EC. *Council Directive 1999/30/EC of 22 April 1999 relating to limit values for sulphur dioxide, nitrogen dioxide and oxides of nitrogen, particulate matter and lead in ambient air: Směrnice Rady 1999/30/ES ze dne 22. dubna 1999 o mezních hodnotách pro oxid siřičitý, oxid dusičitý a oxidy dusíku, částice a olovo ve vnějším ovzduší*. 1. Praha: MŽP, 1999.
- [17] 2008/50/EC. *Directive 2008/50/EC of the European Parliament and of the Council on ambient air quality and cleaner air for Europe*. 1. Praha: MŽP, 2008.
- [18] HINDS, William. *Aerosol technology: properties, behavior, and measurement of airborne particles*. 2nd ed. New York: Wiley, 1999. ISBN 978-047-1194-101.
- [19] HUSSEIN, Tareq, Thodoros GLYTSOS, Jakub ONDRÁČEK et al. Particle size characterization and emission rates during indoor activities in a house. *Atmospheric Environment*. 2006, **40**(23), 4285-4307. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2006.03.053. ISSN 13522310. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231006003554>
- [20] Prašnost na pracovišti. *Státní zdravotní ústav* [online]. Ostrava: Státní zdravotní ústav Ostrava, 2008 [cit. 2017-09-08]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/pracovni-prostredi/prasnost-na-pracovisti-1>
- [21] ČSN EN 481. *Ovzduší na pracovišti. Vymezení velikostních frakcí pro měření poletavého prachu: Česká technická norma (ČSN)*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 1994.
- [22] PEIKERTOVÁ, P., J. KUKUTSCHOVÁ, I. VÁVRA, V. MATĚJKA, O. ŽIVOTSKÝ, M. VACULÍK, P.W. LEE a P. FILIP. Water suspended nanosized particles released from nonairborne brake wear debris. *Wear*. 2013, **306**(1-2), 89-96. DOI: 10.1016/j.wear.2013.07.008. ISSN 00431648. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043164813004389>
- [23] CHARRON, Aurelie a Roy HARRISON. Primary particle formation from vehicle emissions during exhaust dilution in the roadside atmosphere. *Atmospheric Environment*. 2003, **37**(29), 4109-4119. DOI: 10.1016/S1352-2310(03)00510-7. ISSN 13522310. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231003005107>
- [24] PANT, Pallavi a Roy HARRISON. Estimation of the contribution of road traffic emissions to particulate matter concentrations from field measurements: A review. *Atmospheric Environment*. 2013, **77**, 78-97. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2013.04.028. ISSN 13522310. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231013002732>
- [25] HARRISON, Roy, Alan JONES, David BEDDOWS, Manuel DALL'OSTO a Irina NIKOLOVA. Evaporation of traffic-generated nanoparticles during advection from source. *Atmospheric Environment*. 2016, **125**, 1-7. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2015.10.077. ISSN 13522310. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231015304933>
- [26] ZHU, Yifang, William HINDS, Seongheon KIM a Constantinos SIOUTAS. Concentration and Size Distribution of Ultrafine Particles Near a Major Highway. *Journal of the Air*. 2002, **52**(9), 1032-1042. DOI: 10.1080/10473289.2002.10470842.

- ISSN 1096-2247. Dostupné také z:  
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10473289.2002.10470842>
- [27] ZHU, Yifang, William HINDS, Seongheon KIM, Si SHEN a Constantinos SIOUTAS. Study of ultrafine particles near a major highway with heavy-duty diesel traffic. *Atmospheric Environment*. 2002, **36**(27), 4323-4335. DOI: 10.1016/S1352-2310(02)00354-0. ISSN 13522310. Dostupné také z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231002003540>
- [28] FULLER, Christina, Doug BRUGGE, Paige WILLIAMS, Murray MITTLEMAN, John DURANT a John SPENGLER. Estimation of ultrafine particle concentrations at near-highway residences using data from local and central monitors. *Atmospheric Environment*. 2012, **57**, 257-265. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2012.04.004. ISSN 13522310. Dostupné také z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231012003342>
- [29] KOZAWA, Kathleen, Arthur WINER a Scott FRUIN. Ultrafine particle size distributions near freeways: Effects of differing wind directions on exposure. *Atmospheric Environmental*. 2012, **63**, 250-260.
- [30] KITTELSON, David. Engines and nanoparticles. *Journal of Aerosol Science*. 1998, **29**(5-6), 575-588. DOI: 10.1016/S0021-8502(97)10037-4. ISSN 00218502. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021850297100374>
- [31] KUKUTSCHOVÁ, Jana, Pavel MORAVEC, Vladimír TOMÁŠEK et al. On airborne nano/micro-sized wear particles released from low-metallic automotive brakes. *Environmental Pollution*. 2011, **159**(4), 998-1006. DOI: 10.1016/j.envpol.2010.11.036. ISSN 02697491. Dostupné také z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749110005476>
- [32] DALL'OSTO, Manuel, David BEDDOWS, Johanna GIETL, Oluremi OLATUNBOSUN, Xiaoguang YANG a Roy HARRISON. Characteristics of tyre dust in polluted air: Studies by single particle mass spectrometry (ATOFMS). *Atmospheric Environment*. 2014, **94**, 224-230. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2014.05.026. ISSN 13522310. Dostupné také z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231014003732>
- [33] ČABANOVÁ, Kristina, Daniela PLACHÁ, Jana KUKUTSCHOVÁ a Radmila KUČEROVÁ. Chemical and Phase Analysis of Road Dust. In: *Nanocon 2012*. Ostrava: TANGER Ltd., Ostrava, 2013, s. 679-684. ISBN 978-80-87294-35-2.
- [34] BUONANNO, G., L. MORAWSKA a L. STABILE. Particle emission factors during cooking activities. *Atmospheric Environment*. 2009, **43**(20), 3235-3242. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2009.03.044. ISSN 13522310. Dostupné také z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231009002775>
- [35] WALLACE, Lance. Ultrafine particles from a vented gas clothes dryer. *Atmospheric Environment*. 2005, **39**(32), 5777-5786. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2005.03.050. ISSN 13522310. Dostupné také z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135223100500333X>
- [36] HE, Congrong, Lidia MORAWSKA a Len TAPLIN. Particle Emission Characteristics of Office Printers. *Environmental Science*. 2007, **41**(17), 6039-6045. DOI: 10.1021/es063049z. ISSN 0013-936x. Dostupné také z:  
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es063049z>
- [37] SOUZA, Victor a Ana FERNANDO. Nanoparticles in food packaging: Biodegradability and potential migration to food—A review. *Food Packaging and Shelf Life*. 2016, **8**, 63-70. DOI: 10.1016/j.fpsl.2016.04.001. ISSN 22142894. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221428941630028X>

- [38] METAK, Amal, Farhad NABHANI a Stephen CONNOLLY. Migration of engineered nanoparticles from packaging into food products. *LWT - Food Science and Technology*. 2015, **64**(2), 781-787. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.06.001. ISSN 00236438. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643815004284>
- [39] STÖRMER, A., J. BOTT, D. KEMMER a R. FRANZ. Critical review of the migration potential of nanoparticles in food contact plastics. *Trends in Food Science*. 2017, **63**, 39-50. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.01.011. ISSN 09242244. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224416303843>
- [40] VELZEBOER, Ilona, A. HENDRIKS, Ad RAGAS a Dik VAN DE MEENT. AQUATIC ECOTOXICITY TESTS OF SOME NANOMATERIALS. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2008, **27**(9), 1942-. DOI: 10.1897/07-509.1. ISSN 0730-7268. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1897/07-509.1>
- [41] LÓPEZ-HERAS, Isabel, Yolanda MADRID a Carmen CÁMARA. Prospects and difficulties in TiO<sub>2</sub> nanoparticles analysis in cosmetic and food products using asymmetrical flow field-flow fractionation hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*. 2014, **124**, 71-78. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.02.029. ISSN 00399140. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914014001271>
- [42] LIGUORI, Biase, Steffen HANSEN, Anders BAUN a Keld JENSEN. Control banding tools for occupational exposure assessment of nanomaterials — Ready for use in a regulatory context?. *NanoImpact*. 2016, **2**, 1-17. DOI: 10.1016/j.impact.2016.04.002. ISSN 24520748. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452074815300100>
- [43] KIRICHENKO, K.Yu., V.A. DROZD, V.V. CHAIKA, A.V. GRIDASOV, A.S. KHOLODOV a K.S. GOLOKHAVAST. Nano- and Microparticles in Welding Aerosol: Granulometric Analysis. *Physics Procedia*. 2017, **86**, 50-53. DOI: 10.1016/j.phpro.2017.01.017. ISSN 18753892. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1875389217300172>
- [44] GOMES, J.F. a R.M. MIRANDA. Emission of airborne ultrafine particles during welding of steel plates. *Ciência*. 2014, **26**(1), 1-8. DOI: 10.1016/j.ctmat.2014.09.001. ISSN 08708312. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S087083121400024X>
- [45] DVORACKOVA, Jana, Hana BIELNIKOVA, Jana KUKUTSCHOVA et al. Detection of nano- and micro-sized particles in routine biopsy material - pilot study. *Biomedical Papers*. 2015, **159**(1), 87-92. DOI: 10.5507/bp.2012.104. ISSN 12138118. Dostupné také z: <http://biomed.papers.upol.cz/doi/10.5507/bp.2012.104.html>
- [46] PELCLOVA, Daniela, Hana BAROSOVA, Jana KUKUTSCHOVA et al. Raman microspectroscopy of exhaled breath condensate and urine in workers exposed to fine and nano TiO<sub>2</sub> particles: a cross-sectional study. *Journal of Breath Research*. 2015, **9**(3), 036008-. DOI: 10.1088/1752-7155/9/3/036008. ISSN 1752-7163. Dostupné také z: <http://stacks.iop.org/1752-7163/9/i=3/a=036008?key=crossref.b010edafc0e604610d4b15da88366cff>
- [47] DONALDSON, Ken, Lang TRAN, Luis JIMENEZ, Rodger DUFFIN, David NEWBY, Nicholas MILLS, William MACNEE a Vicki STONE. Combustion-derived nanoparticles: A review of their toxicology following inhalation exposure. *Particle and Fibre Toxicology*. 2005, **2**(10), 1-14. DOI: 10.1186/1743-8977-2-10. ISSN 17438977. Dostupné také z: <http://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-8977-2-10>
- [48] CARD, J., D. ZELDIN, J. BONNER a E. NESTMANN. Pulmonary applications and

- toxicity of engineered nanoparticles. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2008, **295**(3), 400-411. DOI: 10.1152/ajplung.00041.2008. ISSN 1040-0605. Dostupné také z: <http://ajplung.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajplung.00041.2008>
- [49] ZHAO, Yuliang a Hari NALWA. *Nanotoxicology: interactions of nanomaterials with biological systems*. Stevenson Ranch, Calif: American Scientific Publishers, 2007. ISBN 15-888-3088-8.
- [50] OBERDORSTER, Gunter, Juraj FERIN a Bruce LEHNERT. Correlation between Particle Size, In Vivo Particle Persistence, and Lung Injury. *Environmental Health Perspectives*. 1994, **102**, 173-. DOI: 10.2307/3432080. ISSN 00916765. Dostupné také z: <http://www.jstor.org/stable/3432080?origin=crossref>
- [51] PATOČKA, Jiří. *Vojenská toxikologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0608-3.
- [52] HOUDY, Philippe a Marcel LAHMANI. *Nanoethics and nanotoxicology*. Heidelberg: Springer, 2011. ISBN 978-364-2201-769.
- [53] Bezpečnost a ochrana zdraví při práci: Ochrana pracovníků před působením nanočástic. *Technickytydenik.cz: vubp.cz* [online]. Praha: Business Media CZ, 2014 [cit. 2017-08-14]. Dostupné z: [http://www.technickytydenik.cz/rubriky/serialy/bezpecnost-a-ochrana-zdravi/bezpecnost-a-ochrana-zdravi-pri-praci-16\\_26644.html](http://www.technickytydenik.cz/rubriky/serialy/bezpecnost-a-ochrana-zdravi/bezpecnost-a-ochrana-zdravi-pri-praci-16_26644.html)
- [54] MARKALOUS, Bohumil, František CHARVÁT a Jan NEJEDLÝ. *Rinitidy, sinusitidy a nosní polypy*. 1. Praha: Triton, 2009. ISBN 978-807-3872-601.
- [55] NOHAVICA, Dušan. Rizika nanomateriálů a nanotechnologií pro lidské zdraví a životní prostředí. *Český časopis pro fyziku*. 2011, **61**(3-4), 220-227.
- [56] HOLGATE, Stephen, Jonathan SAMET, Hillel KOREN a Robert MAYNARD. *Air pollution and health*. San Diego: Academic Press, 1999. ISBN 01-235-2335-4.
- [57] Allergic Rhinitis. In: *The New York Times* [online]. New York: The New York Times Company, 2017 [cit. 2017-08-30]. Dostupné z: <http://www.nytimes.com/health/guides/disease/allergic-rhinitis/overview.html>
- [58] ZBORAYOVÁ, Katarína. *Nosní obstrukce - objektivizace a možnosti léčebného ovlivnění*. Hradec Králové, 2009. Disertační práce. Lékařská fakulta v Hradci Králové.
- [59] PNIÁK, Tomáš. *Význam septoplastiky a turbinoplastiky v léčbě OSA a chrápání*. Olomouc, 2012. Disertační práce. Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci.
- [60] TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0512-5.
- [61] ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK. *Speciální onkologie: příznaky, diagnostika a léčba maligních chorob*. 1. vyd. Praha: Galén, 2010. ISBN 978-80-7262-648-9.
- [62] PETERA, Jiří, ed. *Obecná onkologie: učebnice pro lékařské fakulty*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-0968-1.
- [63] Podstata nádorové transformace buněk a etiopatogeneze nádorů. In: *Slideplayer* [online]. b.r. [cit. 2017-08-30]. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/4082358/>
- [64] World Health Organization. *World Health Organization* [online]. Geneva, 1982 [cit. 2017-08-31]. Dostupné z: <http://www.who.int/en/>
- [65] Agents Classified by the IARC Monography. *International Agency for Research on Cancer* [online]. Lyon, France: Lyon CEDEX 08, 2017 [cit. 2017-08-31]. Dostupné z: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>
- [66] HOUGAARD, Karin, Luisa CAMPAGNOLO, Pascale CHAVATTE-PALMER et al. A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles. *Reproductive Toxicology*. 2015, **56**, 118-140. DOI: 10.1016/j.reprotox.2015.05.015. ISSN 08906238.

- Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890623815001069>
- [67] CASSEE, Flemming, Hans MUIJSER, Evert DUISTERMAAT, Jan FREIJER, Kees GEERSE, Jan MARIJNISSEN a Josje ARTS. Particle size-dependent total mass deposition in lungs determines inhalation toxicity of cadmium chloride aerosols in rats. Application of a multiple path dosimetry model. *Archives of Toxicology*. 2002, **76**(5-6), 277-286. DOI: 10.1007/s00204-002-0344-8. ISSN 0340-5761. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-002-0344-8>
- [68] KANADA. *ICRP: Human respiratory tract model for radiological protection: A report of a Task Group of the International Commission on Radiological Protection*. In: . Ottawa: Pergamon, 1994, ročník 24, číslo 1-3.
- [69] GEISER, Marianne a Wolfgang KREYLING. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*. 2010, **7**(2), 2-17. DOI: 10.1186/1743-8977-7-2. ISSN 1743-8977. Dostupné také z: <http://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-8977-7-2>
- [70] JAQUES, Peter a Chong KIM. MEASUREMENT OF TOTAL LUNG DEPOSITION OF INHALED ULTRAFINE PARTICLES IN HEALTHY MEN AND WOMEN. *Inhalation Toxicology*. 2008, **12**(8), 715-731. DOI: 10.1080/08958370050085156. ISSN 0895-8378. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08958370050085156>
- [71] OBERDÖRSTER, Günter, Eva OBERDÖRSTER a Jan OBERDÖRSTER. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives*. 2005, **113**(7), 823-839. DOI: 10.1289/ehp.7339. ISSN 0091-6765. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1257642/>
- [72] DAIGLE, Christopher, David CHALUPA, F. GIBB, Paul MORROW, Günter OBERDÖRSTER, Mark UTELL a Mark FRAMPTON. Ultrafine Particle Deposition in Humans During Rest and Exercise. *Inhalation Toxicology*. 2008, **15**(6), 539-552. DOI: 10.1080/08958370304468. ISSN 0895-8378. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08958370304468>
- [73] ZHANG, Z., C. KLEINSTREUER, J.F. DONOHUE a C.S. KIM. Comparison of micro- and nano-size particle depositions in a human upper airway model. *Journal of Aerosol Science*. 2005, **36**(2), 211-233. DOI: 10.1016/j.jaerosci.2004.08.006. ISSN 00218502. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021850204003325>
- [74] SCHILLER, Ch., J. GEBHART, J. HEYDER, G. RUDOLF a W. STAHLHOFEN. Deposition of Monodisperse Insoluble Aerosol Particles in the 0.005 to 0.2  $\mu\text{m}$  Size Range Within the Human Respiratory Tract. *The Annals of Occupational Hygiene*. 1988, **32**, 41-49. DOI: 10.1093/annhyg/32.inhaled\_particles\_VI.41. ISSN 1475-3162. Dostupné také z: [https://academic.oup.com/annweh/article/32/inhaled\\_particles\\_VI/41/152491/Deposition-of-Monodisperse-Insoluble-Aerosol](https://academic.oup.com/annweh/article/32/inhaled_particles_VI/41/152491/Deposition-of-Monodisperse-Insoluble-Aerosol)
- [75] OSTIGUY, Claude, Gilles LAPOINTE, Mylène TROTTIER, Luc MÉNARD, Yves CLOUTIER, Michel BOUTIN, Monty ANTOUN a Christian NORMAND. *Health effects of nanoparticles report*. 1. Montréal: Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail, 2006. ISBN 978-289-6310-616.
- [76] KREYLING, W., M. SEMMLER, F. ERBE, P. MAYER, S. TAKENAKA, H. SCHULZ, G. OBERDÖRSTER a A. ZIESENIS. TRANSLOCATION OF ULTRAFINE INSOLUBLE IRIIDIUM PARTICLES FROM LUNG EPITHELIUM TO EXTRAPULMONARY ORGANS IS SIZE DEPENDENT BUT VERY LOW. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2002, **65**(20), 1513-1530. DOI:

- 10.1080/00984100290071649. ISSN 1528-7394. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00984100290071649>
- [77] GREEN, T.R., J. FISHER, M. STONE, B.M. WROBLEWSKI a E. INGHAM. Polyethylene particles of a 'critical size' are necessary for the induction of cytokines by macrophages in vitro. *Biomaterials*. 1998, **19**(24), 2297–2302.
- [78] TABATA, Yasuhiko a Yoshito IKADA. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *Biomaterials*. 1988, **9**(4), 356-362. DOI: 10.1016/0142-9612(88)90033-6. ISSN 01429612.
- [79] FERIN, J., G. OBERDÖRSTER a D. PENNEY. Pulmonary Retention of Ultrafine and Fine Particles in Rats. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1992, **6**(5), 535-542. DOI: 10.1165/ajrcmb/6.5.535. ISSN 1044-1549. Dostupné také z: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/ajrcmb/6.5.535>
- [80] OBERDÖRSTER, Günter, Jacob FINKELSTEIN, Carl JOHNSTON, Rober GELEIN, Christopher COX, Raymond BAGGS a Alison ELDER. Acute Pulmonary Effects of Ultrafine Particles in Rats and Mice. *Health Effects Institute Research Report*. 2000, **96**, 5-74.
- [81] GEHR, Peter a Joachim HEYDER. *Particle-lung interactions*. 1. New York: M. Dekker, 2000. ISBN 978-0-8247-9891-8.
- [82] NIKULA, Kristen, Kelly AVILA, William GRIFFITH a Joe MAUDERLY. Lung Tissue Responses and Sites of Particle Retention Differ between Rats and Cynomolgus Monkeys Exposed Chronically to Diesel Exhaust and Coal Dust. *Fundamental and Applied Toxicology*. 1997, **37**(1), 37-53. DOI: 10.1006/faat.1997.2297. ISSN 02720590. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272059097922971>
- [83] NEMMAR, Abderrahim, Marc HOYLAERTS, Peter HOET, David DINSDALE, Tim SMITH, Haiyan XU, Jozef VERMYLEN a Benoit NEMERY. Ultrafine Particles Affect Experimental Thrombosis in an In Vivo Hamster Model. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2002, **166**(7), 998-1004. DOI: 10.1164/rccm.200110-026OC. ISSN 1073-449x. Dostupné také z: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200110-026OC>
- [84] C. P. ELDER, Alison, Robert GELEIN, Jacob N. FINKELSTEIN, Christopher COX a Günter OBERDÖRSTER. PULMONARY INFLAMMATORY RESPONSE TO INHALED ULTRAFINE PARTICLES IS MODIFIED BY AGE, OZONE EXPOSURE, AND BACTERIAL TOXIN. *Inhalation Toxicology*. 2001, **12**(4), 227-246. DOI: 10.1080/089583700750019585. ISSN 0895-8378. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/089583700750019585>
- [85] ELDER, Alison, Robert GELEIN, Mitra AZADNIV, Mark FRAMPTON, Jack FINKELSTEIN a Günter OBERDÖRSTER. Systemic Effects of Inhaled Ultrafine Particles in Two Compromised, Aged Rat Strains. *Inhalation Toxicology*. 2004, **16**(6-7), 461-471. DOI: 10.1080/08958370490439669. ISSN 0895-8378. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08958370490439669>
- [86] ELDER, Alison, Robert GELEIN, Mitra AZADNIV, Mark FRAMPTON, Jack FINKELSTEIN a Gunter OBERDÖRSTER. Systemic Interactions between Inhaled Ultrafine Particles and Endotoxin. *Annals of Occupational Hygiene*. 2002, **46**(1), 231-234.
- [87] ZHOU, Ya-Mei, Cai-Yun ZHONG, Ian KENNEDY, Valerie LEPPERT a Kent PINKERTON. Oxidative stress and NFκB activation in the lungs of rats: a synergistic interaction between soot and iron particles. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2003, **190**(2), 157-169. DOI: 10.1016/S0041-008X(03)00157-1. ISSN 0041008x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X03001571>

- [88] NEMMAR, Abderrahim, Benoit NEMERY, Peter HOET, Jos VERMYLEN a Marc HOYLAERTS. Pulmonary Inflammation and Thrombogenicity Caused by Diesel Particles in Hamsters. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2003, **168**(11), 1366-1372. DOI: 10.1164/rccm.200306-801OC. ISSN 1073-449x. Dostupné také z: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200306-801OC>
- [89] KATZ, Michael, Edwin GEORGE a Leslie GILBERT. Axonal elongation as a stochastic walk. *Cell Motility*. 1984, **4**(5), 351-370. DOI: 10.1002/cm.970040505. ISSN 02716585. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cm.970040505>
- [90] TJÄLVE, H. a J. HENRIKSSON. Uptake of metals in the brain via olfactory pathways. *Neurotoxicology*. 1999, **20**(2-3), 181-195.
- [91] BRENNEMAN, Karrie, Brian WONG, Matthew BUCCELLATO, Elisabeth COSTA, Elizabeth GROSS a David DORMAN. Direct Olfactory Transport of Inhaled Manganese (54MnCl<sub>2</sub>) to the Rat Brain: Toxicokinetic Investigations in a Unilateral Nasal Occlusion Model. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2000, **169**(3), 238-248. DOI: 10.1006/taap.2000.9073. ISSN 0041008x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X00990732>
- [92] DORMAN, David, Karrie BRENNEMAN, Anna MCELVEEN, Sean LYNCH, Kay ROBERTS a Brian WONG. OLFACTORY TRANSPORT: A DIRECT ROUTE OF DELIVERY OF INHALED MANGANESE PHOSPHATE TO THE RAT BRAIN. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2002, **65**(20), 1493-1511. DOI: 10.1080/00984100290071630. ISSN 1528-7394. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00984100290071630>
- [93] AL-SALEHI, S.K., P.V. HATTON, C.A. MILLER, C. MCLEOD a A. JOINER. The effect of carbamide peroxide treatment on metal ion release from dental amalgam. *Dental Materials*. 2006, **22**(10), 948-953. DOI: 10.1016/j.dental.2005.10.006. ISSN 01095641. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0109564105003106>
- [94] OSTIGUY, Claude, Sylvain MALO a Paul PAUL. Synthesis of scientific knowledge on the health risks following occupational exposure to manganese. *IRSST – Communications Division* [online]. 2003, , 1-42 [cit. 2017-08-29]. Dostupné z: <http://www.irsst.qc.ca/media/documents/pubirsst/R-349.pdf>
- [95] OSTIGUY, Claude, Paul ASSELIN, Sylvain MALO, Daniel NADEAU a Philippe DEWAL. Management of Occupational Manganism: Consensus of an Experts' Panel. *IRSST – Communications Division* [online]. 2005, , 1-57 [cit. 2017-08-29]. Dostupné z: <http://www.irsst.qc.ca/media/documents/pubirsst/r-417.pdf>
- [96] MORRY, Jingga, Worapol NGAMCHERDTRAKUL a Wassana YANTASEE. Oxidative stress in cancer and fibrosis: Opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles. *Redox Biology*. 2017, **11**, 240-253. DOI: 10.1016/j.redox.2016.12.011. ISSN 22132317. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213231716303421>
- [97] NAKAJIMA, Hiroo, Kiyokazu OZAKI, Tadashi HONGYO, Isao NARAMA a Takeshi TODO. A rapid and easy method for the qualitative detection of intracellular deposition of inhaled nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2011, **7**(6), 881-888. DOI: 10.1016/j.nano.2011.02.004. ISSN 15499634. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963411000256>
- [98] DONALDSON, Ken, Vicki STONE, Rodger DUFFIN, Anna CLOUTER, Roel SCHINS a Paul BORM. The Quartz Hazard: Effects of Surface and Matrix on Inflammogenic Activity. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. 2001, **20**(1), 109-118. DOI:

- 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.v20.iSuppl.1.100. ISSN 0731-8898. Dostupné také z: <http://www.dl.begellhouse.com/journals/0ff459a57a4c08d0,7748b75858095780,496d35c10e066d1d.html>
- [99] OBERDÖRSTER, Günter, Zachary SHARP, Viorel ATUDOREI, Alison ELDER, Robert GELEIN, Alex LUNTS, Wolfgang KREYLING a Christopher COX. EXTRAPULMONARY TRANSLOCATION OF ULTRAFINE CARBON PARTICLES FOLLOWING WHOLE-BODY INHALATION EXPOSURE OF RATS. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2002, **65**(20), 1531-1543. DOI: 10.1080/00984100290071658. ISSN 1528-7394. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00984100290071658>
- [100] OBERDÖRSTER, G., Z. SHARP, V. ATUDOREI, A. ELDER, R. GELEIN, W. KREYLING a C. COX. Translocation of Inhaled Ultrafine Particles to the Brain. *Inhalation Toxicology*. 2004, **16**(6-7), 437-445. DOI: 10.1080/08958370490439597. ISSN 0895-8378. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08958370490439597>
- [101] KUKUTSCHOVÁ, J., V. ROUBÍČEK, K. MALACHOVÁ et al. Wear mechanism in automotive brake materials, wear debris and its potential environmental impact. *Wear*. 2009, **267**(5-8), 807-817. DOI: 10.1016/j.wear.2009.01.034. ISSN 00431648. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004316480900163X>
- [102] SCHRÖDER, Katrin, Christina POHLENZ-MICHEL, Nelly SIMETSKA, Jens-Uwe VOSS, Sylvia ESCHER a Inge MANGELSDORF. Carcinogenicity and Mutagenicity of Nanoparticles: Assessment of Current Knowledge as Basis for Regulation. *Environmental Research of the Federal Ministry for the Environment: Nature Conservation, Building and Nuclear Safety* [online]. 2014, (50), 3-163 [cit. 2017-08-14]. ISSN 1862-4804. Dostupné z: [https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/texte\\_50\\_2014\\_carcinogenicity\\_and\\_mutagenicity\\_of\\_nanoparticles\\_1.pdf](https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/texte_50_2014_carcinogenicity_and_mutagenicity_of_nanoparticles_1.pdf)
- [103] ROLLER, Markus. Carcinogenicity of inhaled nanoparticles. *Inhalation Toxicology*. 2009, **21**(1), 144-157. DOI: 10.1080/08958370902942541. ISSN 0895-8378. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08958370902942541>
- [104] KUMAR, Prashant, Liisa PIRJOLA, Matthias KETZEL a Roy HARRISON. Nanoparticle emissions from 11 non-vehicle exhaust sources – A review. *Atmospheric Environment*. 2013, **67**, 252-277. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2012.11.011. ISSN 13522310. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231012010564>
- [105] NELSON, Mark, Frederick DOMANN, G. BOWDEN, Stephen HOOSER, Quintus FERNANDO a Dean CARTER. Effects of Acute and Subchronic Exposure of Topically Applied Fullerene Extracts on the Mouse Skin. *Toxicology and Industrial Health*. 1993, **9**(4), 623-630. DOI: 10.1177/074823379300900405. ISSN 0748-2337. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/074823379300900405>
- [106] BORM, Paul, Roel SCHINS a Catrin ALBRECHT. Inhaled particles and lung cancer, part B: Paradigms and risk assessment. *International Journal of Cancer*. 2004, **110**(1), 3-14. DOI: 10.1002/ijc.20064. ISSN 0020-7136. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.20064>
- [107] MAGAYE, Ruth a Jinshun ZHAO. Recent progress in studies of metallic nickel and nickel-based nanoparticles' genotoxicity and carcinogenicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2012, **34**(3), 644-650. DOI: 10.1016/j.etap.2012.08.012. ISSN 13826689. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1382668912001287>



- [108] PIETRUSKA, Jodie, Xinyuan LIU, Ashley SMITH, Kevin MCNEIL, Paula WESTON, Anatoly ZHITKOVICH, Robert HURT a Agnes KANE. Bioavailability, Intracellular Mobilization of Nickel, and HIF-1 $\alpha$  Activation in Human Lung Epithelial Cells Exposed to Metallic Nickel and Nickel Oxide Nanoparticles. *Toxicological Sciences*. 2011, **124**(1), 138-148. DOI: 10.1093/toxsci/kfr206. ISSN 1096-6080. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/toxsci/article/1698431/Bioavailability>,
- [109] SALNIKOW, K., M.V. BLAGOSKLONNY, H. RYAN, R. JOHNSON a M. COSTA. Carcinogenic nickel induces genes involved with hypoxic stress. *Cancer Research*. 2000, **60**(1), 38-41.
- [110] SALNIKOW, K. a M. COSTA. Epigenetic mechanisms of nickel carcinogenesis. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. 2000, **19**(3), 307-318.
- [111] SALNIKOW, K., W.G. AN, G. MELILLO, M.V. BLAGOSKLONNY a M. COSTA. Nickel-induced transformation shifts the balance between HIF-1 and p53 transcription factors. *Carcinogenesis*. 1999, **20**(9), 1819-1823.
- [112] SALNIKOW, Konstantin a Anatoly ZHITKOVICH. Genetic and Epigenetic Mechanisms in Metal Carcinogenesis and Cocarcinogenesis: Nickel, Arsenic, and Chromium. *Chemical Research in Toxicology*. 2008, **21**(1), 28-44. DOI: 10.1021/tx700198a. ISSN 0893-228x. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/tx700198a>
- [113] SALNIKOW, K. a M. COSTA. The role of hypoxia-inducible signaling pathway in nickel carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*. 2002, **110**(5), 831-834.
- [114] GIERTZ, Silvia, Beatriz FERNANDES, Carlos FERNANDES a Celia FRANCO. Metallic ions in organs of rats injected with metallic particles of stainless steel 316L and Ti6Al4V alloy. *Materials Research*. 2010, **13**(1), 35-39. DOI: 10.1590/S1516-14392010000100009. ISSN 1516-1439. Dostupné také z: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext)
- [115] CHEN, Wenwen, Shaohua ZHANG, Yangyang YU, Huisheng ZHANG a Qianjun HE. Structural-Engineering Rationales of Gold Nanoparticles for Cancer Theranostics. *Advanced Materials*. 2016, **28**(39), 8567-8585. DOI: 10.1002/adma.201602080. ISSN 09359648. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adma.201602080>
- [116] SINGH, Mohan, David HARRIS-BIRTILL, Sheraz MARKAR, George HANNA a Daniel ELSON. Application of gold nanoparticles for gastrointestinal cancer theranostics: A systematic review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2015, **11**(8), 2083-2098. DOI: 10.1016/j.nano.2015.05.010. ISSN 15499634. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963415001318>
- [117] BAGALKOT, Vaishali, Marcus BADGELEY, Thomas KAMPFRATH, Jeffrey DEIULIIS, Sanjay RAJAGOPALAN a Andrei MAISEYEU. Hybrid nanoparticles improve targeting to inflammatory macrophages through phagocytic signals. *Journal of Controlled Release*. 2015, **217**, 243-255. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.09.027. ISSN 01683659. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365915301280>
- [118] ALLEN, M., F. LAW a N. RUSHTON. The effects of diamond-like carbon coatings on macrophages, fibroblasts and osteoblast-like cells in vitro. *Clinical Materials*. 1994, **17**(1), 1-10. DOI: Allen M1, Law F, Rushton N.
- [119] SANSONE, V., D. PAGANI a M. MELATO. The effects on bone cells of metal ions released from orthopaedic implants. A review. *CLINICAL CASES IN MINERAL AND BONE METABOLISM*. 2013, **10**(1), 34-40. DOI: 10.11138/ccmbm/2013.10.1.034. ISSN 1971-3266. Dostupné také z: <http://www.ccmbm.com/common/php/portiere.php?ID=787932401e63c23fe24a7d147d>

- [120] COBB, A.G. a T.P. SCHMALZREID. The clinical significance of metal ion release from cobalt-chromium metal-on-metal hip joint arthroplasty. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers*. 2006, **220**(2), 385-398. DOI: Cobb AG1, Schmalzreid TP.
- [121] JANTZEN, Christopher, Henrik JØRGENSEN, Benn DUUS, Sune SPORRING a Jes LAURITZEN. Chromium and cobalt ion concentrations in blood and serum following various types of metal-on-metal hip arthroplasties. *Acta Orthopaedica*. 2013, **84**(3), 229-236. DOI: 10.3109/17453674.2013.792034. ISSN 1745-3674. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/17453674.2013.792034>
- [122] AFOLARANMI, G., J. TETTEY, M. GRANT a M.H. GRANT. Release of Chromium from Orthopaedic Arthroplasties. *The Open Orthopaedics Journal*. 2008, **2**(1), 10-18. DOI: 10.2174/1874325000802010010. ISSN 18743250. Dostupné také z: <http://benthamopen.com/ABSTRACT/TOORTHJ-2-10>
- [123] SAMPSON, B. a A. HART. Clinical usefulness of blood metal measurements to assess the failure of metal-on-metal hip implants. *Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry and laboratory medicine*. 2012, **49**(2), 118-131. DOI: 10.1258/acb.2011.011141. ISSN 0004-5632. Dostupné také z: <http://acb.sagepub.com/lookup/doi/10.1258/acb.2011.011141>
- [124] HARTMANN, Albrecht, Franziska HANNEMANN, Jörg LÜTZNER, Andreas SEIDLER, Hans DREXLER, Klaus-Peter GÜNTHER, Jochen SCHMITT a Jo JOSEPH. Metal Ion Concentrations in Body Fluids after Implantation of Hip Replacements with Metal-on-Metal Bearing – Systematic Review of Clinical and Epidemiological Studies. *PLoS ONE*. 2013, **8**(8), 70359-. DOI: 10.1371/journal.pone.0070359. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0070359>
- [125] MYLLYNEN, Päivi, Michael LOUGHRAN, C. HOWARD, Raija SORMUNEN, Adrian WALSH a Kirsi VÄHÄKANGAS. Kinetics of gold nanoparticles in the human placenta. *Reproductive Toxicology*. 2008, **26**(2), 130-137. DOI: 10.1016/j.reprotox.2008.06.008. ISSN 08906238. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890623808001470>
- [126] BAROŠOVÁ, H., J. DVOŘÁČKOVÁ, O. MOTYKA, K. KUTLÁKOVÁ, P. PEIKERTOVÁ, J. RAK, H. BIELNIKOVÁ a J. KUKUTSCHOVÁ. Metal-based particles in human amniotic fluids of fetuses with normal karyotype and congenital malformation—a pilot study. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015, **22**(10), 7582-7589. DOI: 10.1007/s11356-014-3987-0. ISSN 0944-1344. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-014-3987-0>
- [127] ZELENÍK, Karol, Jana KUKUTSCHOVÁ, Jana DVOŘÁČKOVÁ, Hana BIELNIKOVÁ, Pavlína PEIKERTOVÁ, Lenka ČÁBALOVÁ a Pavel KOMÍNEK. Possible role of nano-sized particles in chronic tonsillitis and tonsillar carcinoma: a pilot study. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2013, **270**(2), 705-709. DOI: 10.1007/s00405-012-2069-5. ISSN 0937-4477. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00405-012-2069-5>
- [128] ČÁBALOVÁ, Lenka, Kristina ČABANOVÁ, Hana BIELNIKOVÁ, Jana KUKUTSCHOVÁ, Jana DVOŘÁČKOVÁ, Kateřina DĚDKOVÁ, Karol ZELENÍK a Pavel KOMÍNEK. Micro- and Nanosized Particles in Nasal Mucosa: A Pilot Study. *BioMed Research International*. 2015, **2015**, 1-6. DOI: 10.1155/2015/505986. ISSN 2314-6133. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/505986/>
- [129] WICHMANN, H.- a A. PETERS. Epidemiological evidence of the effects of ultrafine

- particle exposure. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2000, **358**(1775), 2751-2769. DOI: 10.1098/rsta.2000.0682. ISSN 1364-503x. Dostupné také z: <http://rsta.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsta.2000.0682>
- [130] PETERS, Oliver, Tobias BACK, Ute LINDAUER, Christina BUSCH, Dirk MEGOW, Jens DREIER a Ulrich DIRNAGL. Increased Formation of Reactive Oxygen Species after Permanent and Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat. *Journal of Cerebral Blood Flow*. 1998, **18**(2), 196-205. DOI: 10.1097/00004647-199802000-00011. ISSN 0271-678x. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1097/00004647-199802000-00011>
- [131] PENTTINEN, P., K.L. TIMONEN, P. TIITTANEN, A. MIRME, J. RUUSKANEN a J. PEKKANEN. Ultrafine particles in urban air and respiratory health among adult asthmatics. *European Respiratory Journal*. 2001, **17**(3), 428-435. DOI: 10.1183/09031936.01.17304280. ISSN 00000000. Dostupné také z: <http://erj.ersjournals.com/content/17/3/428>
- [132] PEKKANEN, J., A. PETERS, G. HOEK et al. Particulate Air Pollution and Risk of ST-Segment Depression During Repeated Submaximal Exercise Tests Among Subjects With Coronary Heart Disease: The Exposure and Risk Assessment for Fine and Ultrafine Particles in Ambient Air (ULTRA) Study. *Circulation*. 2002, **106**(8), 933-938. DOI: 10.1161/01.CIR.0000027561.41736.3C. ISSN 0009-7322. Dostupné také z: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.0000027561.41736.3C>
- [133] BRUSKE-HOHLFELD, I., A. PETERS a H.E. WICHMANN. *Epidemiology of nanoparticles* [online]. Buxton, UK: Health and Safety Laboratory, 2004 [cit. 2017-08-29]. Dostupné z: [https://www.hsl.gov.uk/media/394200/nanosymrep\\_final.pdf](https://www.hsl.gov.uk/media/394200/nanosymrep_final.pdf)
- [134] Blood markers of coagulation and inflammation in healthy human subjects exposed to carbon ultrafine particles. HEINRICH, Uwe. *Effects of air contaminants on the respiratory tract: interpretations from molecules to meta analysis ; 9th International Inhalation Symposium*. Stuttgart: Fraunhofer-IRB-Verl, 2004, s. 181-194. ISBN 9783816764786.
- [135] BRUNEKREEF, Bert a Stephen HOLGATE. Air pollution and health. *The Lancet*. 2002, **360**(9341), 1233-1242. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)11274-8. ISSN 01406736. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673602112748>
- [136] BROOK, R., S. RAJAGOPALAN, C. POPE et al. Particulate Matter Air Pollution and Cardiovascular Disease: An Update to the Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2010, **121**(21), 2331-2378. DOI: 10.1161/CIR.0b013e3181dbee1. ISSN 0009-7322. Dostupné také z: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIR.0b013e3181dbee1>
- [137] RÜCKERL, Regina, Alexandra SCHNEIDER, Susanne BREITNER, Josef CYRYS a Annette PETERS. Health effects of particulate air pollution: A review of epidemiological evidence. *Inhalation Toxicology*. 2011, **23**(10), 555-592. DOI: 10.3109/08958378.2011.593587. ISSN 0895-8378. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08958378.2011.593587>
- [138] BREM, F., A. HIRT, M. WINKLHOFER, K. FREI, Y. YONEKAWA, H.-G. WIESER a J. DOBSON. Magnetic iron compounds in the human brain: a comparison of tumour and hippocampal tissue. *Journal of The Royal Society Interface*. 2006, **3**(11), 833-841. DOI: 10.1098/rsif.2006.0133. ISSN 1742-5689. Dostupné také z: <http://rsif.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsif.2006.0133>
- [139] LAWSON, E.E., B.W. BARRY, A.C. WILLIAMS a H.G.M. EDWARDS. Biomedical Applications of Raman Spectroscopy. *Journal of Raman spectroscopy*. 1997, **28**, 111-

- [140] BONNIER, F., A. MEHMOOD, P. KNIEF et al. In vitro analysis of immersed human tissues by Raman microspectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2011, **42**(5), 888-896. DOI: 10.1002/jrs.2825. ISSN 03770486. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.2825>
- [141] MEHRMOHAMMADI, Mohammad, Soon JOON YOON, Douglas YEAGER a Stanislav Y. EMELIANOV. Photoacoustic Imaging for Cancer Detection and Staging. *Current Molecular Imaging*. 2013, **2**(1), 89-105. DOI: 10.2174/2211555211302010010. ISSN 22115552. Dostupné také z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article>
- [142] KONG, Kenny, Catherine KENDALL, Nicholas STONE a Ioan NOTINGHER. Raman spectroscopy for medical diagnostics — From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015, **89**, 121-134. DOI: 10.1016/j.addr.2015.03.009. ISSN 0169409x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X15000447>
- [143] DAS, Nandan, Yichuan DAI, Peng LIU, Chuazhen HU, Lieshu TONG, Xiaoya CHEN a Zachary SMITH. Raman Plus X: Biomedical Applications of Multimodal Raman Spectroscopy. *Sensors*. 2017, **17**(7), 1592-. DOI: 10.3390/s17071592. ISSN 1424-8220. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/17/7/1592>
- [144] OSTROWSKI, Anja, Daniel NORDMEYER, Alexander BOREHAM et al. Overview about the localization of nanoparticles in tissue and cellular context by different imaging techniques. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2015, **6**, 263-280. DOI: 10.3762/bjnano.6.25. ISSN 2190-4286. Dostupné také z: <http://www.beilstein-journals.org/bjnano/content/6/1/25>
- [145] MOVASAGHI, Zanyar, Shazza REHMAN a Ihtesham REHMAN. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2007, **42**(5), 493-541. DOI: 10.1080/05704920701551530. ISSN 0570-4928. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/05704920701551530>
- [146] TALARI, Abdullah, Zanyar MOVASAGHI, Shazza REHMAN a Ihtesham REHMAN. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2014, **50**(1), 46-111. DOI: 10.1080/05704928.2014.923902. ISSN 0570-4928. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/05704928.2014.923902>
- [147] ELLIS, David a Royston GOODACRE. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. *The Analyst*. 2006, **131**(8), 875-. DOI: 10.1039/b602376m. ISSN 0003-2654. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b602376m>
- [148] KLINE, Nicole a Patrick TREADO. Raman Chemical Imaging of Breast Tissue. *Journal of Raman spectroscopy*. 1997, **28**(2-3), 119-124. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4555(199702)28.
- [149] HAKA, Abigail, Zoya VOLYNSKAYA, Joseph GARDECKI et al. Diagnosing breast cancer using Raman spectroscopy: prospective analysis. *Journal of Biomedical Optics*. 2009, **14**(5), 054023-. DOI: 10.1117/1.3247154. ISSN 10833668. Dostupné také z: <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.3247154>
- [150] GAO, Pin, Bing HAN, Ye DU, Gang ZHAO, Zhigang YU, Weiqing XU, Chao ZHENG a Zhimin FAN. The Clinical Application of Raman Spectroscopy for Breast Cancer Detection. *Journal of Spectroscopy*. 2017, **2017**, 1-10. DOI: 10.1155/2017/5383948. ISSN 2314-4920. Dostupné také z: <https://www.hindawi.com/journals/jspec/2017/5383948/>
- [151] HU, Yaogai, Aiguo SHEN, Tao JIANG, Yong AI a Jiming HU. Classification of normal

- and malignant human gastric mucosa tissue with confocal Raman microspectroscopy and wavelet analysis. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2008, **69**(2), 378-382. DOI: 10.1016/j.saa.2007.04.009. ISSN 13861425. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142507002107>
- [152] MIN, Young-Kun, Tatsuya YAMAMOTO, Ehiichi KOHDA, Toshiaki ITO a Hiro-o HAMAGUCHI. 1064 nm near-infrared multichannel Raman spectroscopy of fresh human lung tissues. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2005, **36**(1), 73-76. DOI: 10.1002/jrs.1280. ISSN 0377-0486. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.1280>
- [153] RASHID, Nosheen, Haq NAWAZ, Kelvin POON et al. Raman microspectroscopy for the early detection of pre-malignant changes in cervical tissue. *Experimental and Molecular Pathology*. 2014, **97**(3), 554-564. DOI: 10.1016/j.yexmp.2014.10.013. ISSN 00144800. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014480014001737>
- [154] MANOHARAN, R., J.J. BARAGA, M.S. FELD a R.P. RAVA. Quantitative histochemical analysis of human artery using Raman spectroscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1992, **16**(2), 211-233.
- [155] BARAGA, Joseph, Michael FELD a Richard RAVA. Rapid Near-Infrared Raman Spectroscopy of Human Tissue with a Spectrograph and CCD Detector. *Applied Spectroscopy*. 1992, **46**(2), 187-190.
- [156] BUSCHMAN, Hendrik, Jason MOTZ, Geurt DEINUM et al. Diagnosis of human coronary atherosclerosis by morphology-based Raman spectroscopy. *Cardiovascular Pathology*. 2001, **10**(2), 59-68. DOI: 10.1016/S1054-8807(01)00063-1. ISSN 10548807. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1054880701000631>
- [157] JENKINS, Samir, Haiou QU, Thilak MUDALIGE et al. Rapid determination of plasmonic nanoparticle agglomeration status in blood. *Biomaterials*. 2015, **51**, 226-237. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.01.072. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961215000897>
- [158] DOU, XIAOMING, YOSHINORI YAMAGUCHI, HIROSHI YAMAMOTO, SHIGERU DOI a YUKIHIRO OZAKI. Quantitative analysis of metabolites in urine by anti-Stokes Raman spectroscopy. *Biospectroscopy*. 1997, **3**(2), 113-120. DOI: 10.1002/(SICI)1520-6343(1997)3:2<113::AID-BSPY4>3.0.CO;2-8.
- [159] CARMONA, Pedro, Juana BELLANATO a Elena ESCOLA. Infrared and Raman spectroscopy of urinary calculi: A review. *Biospectroscopy*. 1997, **3**(5), 331-346. DOI: 10.1002/(SICI)1520-6343(1997)3:5<331::AID-BSPY2>3.0.CO;2-5.
- [160] BRINDHA, Elumalai, Ramu RAJASEKARAN, Prakasarao ARUNA, Dornadula KOTEESWARAN a Singaravelu GANESAN. High wavenumber Raman spectroscopy in the characterization of urinary metabolites of normal subjects, oral premalignant and malignant patients. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2017, **171**, 52-59. DOI: 10.1016/j.saa.2016.06.048. ISSN 13861425. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142516303778>
- [161] SORIANO-URSÚA, Marvin, Eunice FARFÁN-GARCÍA, Yessica LÓPEZ-CABRERA, Enrique QUEREJETA a José TRUJILLO-FERRARA. Boron-containing acids: Preliminary evaluation of acute toxicity and access to the brain determined by Raman scattering spectroscopy. *NeuroToxicology*. 2014, **40**, 8-15. DOI: 10.1016/j.neuro.2013.10.005. ISSN 0161813x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161813X13001605>
- [162] AHLINDER, Linnea, Barbro EKSTRAND-HAMMARSTRÖM, Paul GELADI a Lars

- ÖSTERLUND. Large Uptake of Titania and Iron Oxide Nanoparticles in the Nucleus of Lung Epithelial Cells as Measured by Raman Imaging and Multivariate Classification. *Biophysical Journal*. 2013, **105**(2), 310-319. DOI: 10.1016/j.bpj.2013.06.017. ISSN 00063495. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349513006966>
- [163] SALEHI, Hamideh, Isabelle CALAS-BENNASAR, Jean-Cédric DURAND, Elodie MIDDENDORP, Jean VALCARCEL, Christian LARROQUE a Katalin NAGY. Confocal Raman spectroscopy to monitor intracellular penetration of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2014, **45**(9), 807-813. DOI: 10.1002/jrs.4561. ISSN 03770486.
- [164] LI, Ying-Sing a Jeffrey CHURCH. Raman spectroscopy in the analysis of food and pharmaceutical nanomaterials. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2014, **22**(1), 29-48. DOI: 10.1016/j.jfda.2014.01.003. ISSN 10219498. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949814000040>
- [165] PAUDEL, Amrit, Dhara RAIJADA a Jukka RANTANEN. Raman spectroscopy in pharmaceutical product design. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015, **89**, 3-20. DOI: 10.1016/j.addr.2015.04.003. ISSN 0169409x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X15000599>
- [166] BUMBRAH, Gurvinder a Rakesh SHARMA. Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*. 2016, **6**(3), 209-215. DOI: 10.1016/j.ejfs.2015.06.001. ISSN 2090536x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090536X15000477>
- [167] ZAVALETA, Cristina, Keith HARTMAN, Zheng MIAO et al. Preclinical Evaluation of Raman Nanoparticle Biodistribution for their Potential Use in Clinical Endoscopy Imaging. *Small*. 2011, **7**(15), 2232-2240. DOI: 10.1002/smll.201002317. ISSN 16136810. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/smll.201002317>
- [168] Projekt rozšíření VTP Ostrava. In: *VTP Ostrava* [online]. Ostrava: Magistrát města Ostravy, 2017 [cit. 2017-08-31]. Dostupné z: <https://vtp.ostrava.cz/doprava>
- [169] ČABANOVÁ, Kristina, Pavlína PEIKERTO VÁ, Hana BIELNIKOVÁ et al. Raman microspectroscopy as a useful tool for nanopathology. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2017, **48**(3), 357-362. DOI: 10.1002/jrs.5045. ISSN 03770486. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.5045>
- [170] R: A language and environment for statistical computing. *The R Project for Statistical Computing* [online]. Vienna, Austria: The R Foundation, b.r. [cit. 2017-08-31]. Dostupné z: <https://www.R-project.org/>
- [171] Lê, Sébastien, Julie JOSSE a François HUSSON. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*. 2008, **25**(1), -. DOI: 10.18637/jss.v025.i01. ISSN 1548-7660. Dostupné také z: <http://www.jstatsoft.org/v25/i01/>
- [172] MCCREERY, Richard. *Raman spectroscopy for chemical analysis*. New York: John Wiley, 2000. ISBN 04-712-5287-5.
- [173] SOCRATES, George. *Infrared and raman characteristic group frequencies: tables and charts*. 3rd ed. West Sussex: John Wiley, 2007. ISBN 978-047-0093-078.
- [174] CHEN, Tao, Jian YAN a Yan LI. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2014, **22**(1), 95-104. DOI: 10.1016/j.jfda.2014.01.008. ISSN 10219498. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S102194981400009X>
- [175] CONNY, Joseph, Donna KLINEDINST, Scott WIGHT a Jeffrey PAULSEN.

- Optimizing Thermal-Optical Methods for Measuring Atmospheric Elemental (Black) Carbon: A Response Surface Study. *Aerosol Science and Technology*. 2003, **37**(9), 703-723. DOI: 10.1080/02786820300920. ISSN 0278-6826. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02786820300920>
- [176] SEINFELD, John a Spyros PANDIS. *Atmospheric chemistry and physics: from air pollution to climate change*. New York: Wiley, 1998. ISBN 04-711-7816-0.
- [177] CYRYS, Josef, Joachim HEINRICH, Gerard HOEK et al. Comparison between different traffic-related particle indicators: Elemental carbon (EC), PM<sub>2.5</sub> mass, and absorbance. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*. 2003, **13**(2), 134-143. DOI: 10.1038/sj.jea.7500262. ISSN 10534245. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/sj.jea.7500262>
- [178] HENDREN, Christine, Xavier MESNARD, Jocelyn DRÖGE a Mark WIESNER. Estimating Production Data for Five Engineered Nanomaterials As a Basis for Exposure Assessment. *Environmental Science*. 2011, **45**(7), 2562-2569. DOI: 10.1021/es103300g. ISSN 0013-936x. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es103300g>
- [179] NERI, Giovanni, Lucio BONACCORSI, Andrea DONATO, Candida MILONE, Maria MUSOLINO a Anna VISCO. Catalytic combustion of diesel soot over metal oxide catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*. 1997, **11**(2), 217-231. DOI: 10.1016/S0926-3373(96)00045-8. ISSN 09263373. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926337396000458>
- [180] NITHYANANDAN, Karthik, Yilu LIN, Robert DONAHUE, Xiangyu MENG, Jiayang ZHANG a Chia-fon LEE. Characterization of soot from diesel-CNG dual-fuel combustion in a CI engine. *Fuel*. 2016, **184**, 145-152. DOI: 10.1016/j.fuel.2016.06.028. ISSN 00162361. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001623611630480X>
- [181] List of Air Pollutants Modeled in the 2011 NATA. *United States Environmental Protection Agency* [online]. Washington D.C., USA: US EPA, 2017 [cit. 2017-09-04]. Dostupné z: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/2011-nata-pollutants.pdf>
- [182] BIRCH, M. a R. CARY. Elemental Carbon-Based Method for Monitoring Occupational Exposures to Particulate Diesel Exhaust. *Aerosol Science and Technology*. 1996, **25**(3), 221-241. DOI: 10.1080/02786829608965393. ISSN 0278-6826. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02786829608965393>
- [183] KUKUTSCHOVÁ, Jana, Václav ROUBÍČEK, Miroslav MAŠLÁŇ, Dalibor JANČÍK, Václav SLOVÁK, Kateřina MALACHOVÁ, Zuzana PAVLÍČKOVÁ a Peter FILIP. Wear performance and wear debris of semimetallic automotive brake materials. *Wear*. 2010, **268**(1-2), 86-93. DOI: 10.1016/j.wear.2009.06.039. ISSN 00431648. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043164809004530>
- [184] MARTÍNEZ, Juan, Neus PUY, Ramón MURILLO, Tomás GARCÍA, María NAVARRO a Ana MASTRAL. Waste tyre pyrolysis – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2013, **23**, 179-213. DOI: 10.1016/j.rser.2013.02.038. ISSN 13640321. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032113001408>
- [185] EVANS, Anne a Russ EVANS. The Composition of a Tyre: Typical Components. *The Waste & Resources Action Programme* [online]. Banbury, Oxon: The Old Academy, 2006, , 1-5 [cit. 2017-09-04]. Dostupné z: <http://www.wrap.org.uk/sites/files/wrap/2%20-%20Composition%20of%20a%20Tyre%20-%20May%202006.pdf>

- [186] Automobilizace. *Vítejte na Zemi: multimediální ročenka životního prostředí* [online]. ESF, CENIA, česká informační agentura životního prostředí, 2013 [cit. 2017-09-04]. Dostupné z: [http://www.vitejtenazemi.cz/cenia/index.php?p=kolik\\_aut\\_jezdi\\_ve\\_sвете&site=doprava](http://www.vitejtenazemi.cz/cenia/index.php?p=kolik_aut_jezdi_ve_sвете&site=doprava)
- [187] BELLO, Dhimiter, John MARTIN, Christopher SANTEUFEMIO, Qingwei SUN, Kristin LEE BUNKER, Martin SHAFER a Philip DEMOKRITOU. Physicochemical and morphological characterisation of nanoparticles from photocopiers: implications for environmental health. *Nanotoxicology*. 2012, 7(5), 989-1003. DOI: 10.3109/17435390.2012.689883. ISSN 1743-5390. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/17435390.2012.689883>
- [188] KIM, Yong-Dae, Susan LANTZ-MCPEAK, Syed ALI a Michael KLEINMAN. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2014, 37(3). DOI: 10.1016/j.etap.2014.03.008. ISSN 13826689.
- [189] HOUGH, Randy. Graphite and Its Effects on the Human Body and Tool Room Equipment. *EzineArticles* [online]. 2008, , 1-2 [cit. 2017-09-04]. Dostupné z: <http://ezinearticles.com/?Graphite-and-Its-Effects-on-the-Human-Body-and-Tool-Room-Equipment&id=1091561>
- [190] Bezpečnostní list grafitu. In: *MACH CHEMIKÁLIE spol. s r.o.* [online]. Ostrava: MACH CHEMIKÁLIE spol. s r.o., 2017 [cit. 2017-09-04]. Dostupné z: [http://www.mach-chemikalie.cz/images/download/old\\_file/123/grafit.pdf](http://www.mach-chemikalie.cz/images/download/old_file/123/grafit.pdf)
- [191] WINTER, Ruth. *A consumer's dictionary of food additives: descriptions in plain English of more than 12,000 ingredients both harmful and desirable found in foods*. Completely rev. and updated 6th ed. New York: Three Rivers Press, 2004. ISBN 14-000-5232-7.
- [192] VRBOVÁ, Tereza. *Víme, co jíme?, aneb:; Průvodce "Ěčky" v potravinách*. 1. Praha: EcoHouse, 2001. ISBN 80-238-7504-3.
- [193] SKURRAY, Geoffrey. *Decoding food additives: A comprehensive guide to food additive codes and food labelling*. Sydney, N.S.W: Hachette Australia, 2007. ISBN 978-073-3622-243.
- [194] Occupational health guidelines for chemical hazards. In: *Centers for Disease Control and Prevention* [online]. Clifton Road Atlanta, USA: CDC, Clifton Road Atlanta, 1995 [cit. 2017-09-04]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/niosh/docs/81-123/pdfs/0090.pdf>
- [195] *Výhláška, kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin*. In: . ČR, 2008, ročník 2008, částka 71, číslo 225.
- [196] NOURI, S., M.R. SHARIF, A.H. KHORSHIDI a Y. PANAHI. Comparison the Effect of Calcium Sulfate and Ferric Chloride in Controlling Liver Bleeding; An Animal Model Study. *Journal of Zanjan University of Medical Sciences and Health Services*. 2015, 23(96), 46-56.
- [197] SHRIMALI, Kaustubh, Jiaqi JIN, Behzad HASSAS, Xuming WANG a Jan MILLER. The surface state of hematite and its wetting characteristics. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2016, 477, 16-24. DOI: 10.1016/j.jcis.2016.05.030. ISSN 00219797. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979716303150>
- [198] JEFFUS, Larry. *Welding: principles and applications*. Seventh edition. New York, USA: DELMAR, 2012. ISBN 978-1111039172.
- [199] KIRSCHVINK, J., A. KOBAYASHI-KIRSCHVINK a B. WOODFORD. Magnetite biomineralization in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992, 89(16), 7683–7687.
- [200] HAUTOT, D., Q. PANKHURST, N. KHAN a J. DOBSON. Preliminary evaluation of



- nanoscale biogenic magnetite in Alzheimer's disease brain tissue. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2003, **270**(1), 62-64. DOI: 10.1098/rsbl.2003.0012. ISSN 0962-8452. Dostupné také z: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsbl.2003.0012>
- [201] KUČÍRKOVÁ, Lucie, Karel KRÁLOVEC, Radim HAVELEK, Lenka BRŮČKOVÁ a Miloš SEDLÁK. Toxicita magnetických nanočástic. *Chemické listy*. 2015, **109**, 693-700.
- [202] BUGARU, Marilena a Bogdan RUJOI. Toxic elements in coal and their ashes. *UPB Scientific Bulletin: Series B: Chemistry and Materials Science*. 2014, **76**(1), 127-130.
- [203] OLIVEIRA, Marcos, Frans WAANDERS, Luis SILVA, Andre JASPER a SAMPAIO. A Multi-analytical Approach to Understand the chemistry of Fe-minerals in Feed Coals and Ashes. *Coal Combustion and Gasification Products*. 2011, **3**(1), 51-62. DOI: 10.4177/CCGP-D-11-00006.1. ISSN 19460198.
- [204] APOPA, Patrick, Yong QIAN, Rong SHAO, Nancy GUO, Diane SCHWEGLER-BERRY, Maricica PACURARI a Dale PORTER. *Particle and Fibre Toxicology*. 2009, **6**(1). DOI: 10.1186/1743-8977-6-1. ISSN 1743-8977.
- [205] KADIISKA, Maria, Ronald MASON, Kevin DREHER, Daniel COSTA a Andrew GHIO. In Vivo Evidence of Free Radical Formation in the Rat Lung after Exposure to an Emission Source Air Pollution Particle †. *Chemical Research in Toxicology*. 1997, **10**(10), 1104-1108. DOI: 10.1021/tx970049r. ISSN 0893-228x. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/tx970049r>
- [206] AUST, A.E., J.C. BALL, A.A. HU, J.S. LIGHTY, K.R. SMITH, A.M. STRACCIA, J.M. VERANTH a W.C. YOUNG. Particle characteristics responsible for effects on human lung epithelial cells. *Research report: Health Effects Institute*. 2002, **110**, 1-76.
- [207] HITZFELD, B., K.H. FRIEDRICHS, J. RING a H. BEHRENDT. Airborne particulate matter modulates the production of reactive oxygen species in human polymorphonuclear granulocytes. *Toxicology*. 1997, **120**(3), 185-195. DOI: 10.1016/S0300-483X(97)03664-0. ISSN 0300483x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X97036640>
- [208] DOBROVOLSKAIA, M. a Scott MCNEIL. *Handbook of immunological properties of engineered nanomaterials*. USA: World Scientific Publishing Co.Pte.Ltd., 2013. ISBN 978-981-4390-25-5.
- [209] SZABOVÁ, Zuzana, Karol BALOG, Pavol ČEKAN a Richard KURACINA. *PRÍRUČKA BEZPEČNOSTI A O CHRANY ZDRAVIA PRI ZVÁRANÍ* [online]. 1. Trnava: Materiálovotechnologická fakulta STU so sídlom v Trnave, 2015 [cit. 2017-09-05]. ISBN 978-80-8096-220-3. Dostupné z: <http://www.bozp-zvaranie.mtf.stuba.sk/prirucka.pdf>
- [210] Cadmium in Soils and Plants. MCLAUGHLIN, M. a B. SINGH. *Cadmium in Soils and Plants*. Dordrecht: Springer Verlag, 1999, s. 257-267. ISBN 9789401059169.
- [211] KENŠOVÁ, Renáta, David HYNEK, Vojtěch ADAM a René KIZEK. Působení kadmia na živé organismy. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* [online]. 2014, **3**, 32-34 [cit. 2017-09-05]. Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_239\\_nanotech/J\\_Met\\_Nano/0314/pdf/jmn3-07.pdf](http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0314/pdf/jmn3-07.pdf)
- [212] BENCKO, Vladimír, Jaroslav LENER a Miroslav CIKRT. *Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka*. 2. přepracované a doplněné vyd., v Grada Publishing 1. vyd. Praha: Grada, 1995. ISBN 80-716-9150-X.
- [213] WAALKES, M.P. Cadmium carcinogenesis in review. *Journal of inorganic biochemistry*. 2000, **79**(1-4), 241-244.
- [214] Chromium. NORDBERG, G., B. FOWLER a M. NORDBERG. *Handbook on the*

- toxicology of metals*. 3rd ed. Boston: Academic Press, 2007, s. 487-510. ISBN 978-0-12-369413-3.
- [215] POIRIER, L., T. SOURKES, G. BOUVIER, R. BOUCHER a S. CARABIN. STRIATAL AMINES, EXPERIMENTAL TREMOR AND THE EFFECT OF HARMALINE IN THE MONKEY. *Brain*. 1966, **89**(1), 37-52. DOI: 10.1093/brain/89.1.37. ISSN 0006-8950. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/89.1.37>
- [216] STÝBLOVÁ, V., V. BENCKO, V. DROBNÝ, V. CHUCHMAL, V. KELLEROVÁ a V. ZLAB. Neurotoxic effects of manganese: health aspects, pathogenesis, clinical picture, therapy. *Ceskoslovenska neurologie a neurochirurgie*. 1980, **43**(4), 222-231.
- [217] MELLA, HUGO. THE EXPERIMENTAL PRODUCTION OF BASAL GANGLION SYMPTOMATOLOGY IN MACACUS RHESUS. *Archives of Neurology And Psychiatry*. 1924, **11**(4), 405-. DOI: 10.1001/archneurpsyc.1924.02190340027003. ISSN 0096-6754. Dostupné také z: <http://archneurpsyc.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archneurpsyc.1924.02190340027003>
- [218] MORONI, B. a C. VITI. Grain size, chemistry, and structure of fine and ultrafine particles in stainless steel welding fumes. *Journal of Aerosol Science*. 2009, **40**(11), 938-949. DOI: 10.1016/j.jaerosci.2009.08.004. ISSN 00218502. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021850209001438>
- [219] RICHMAN, Julie, Kenneth LIVI a Alison GEYH. A scanning transmission electron microscopy method for determination of manganese composition in welding fume as a function of primary particle size. *Journal of Aerosol Science*. 2011, **42**(6), 408-418. DOI: 10.1016/j.jaerosci.2011.03.004. ISSN 00218502. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021850211000450>
- [220] SUNDERMAN, F., Anterior AITIO, Lindsay MORGAN a Tor NORSETH. Biological Monitoring of Nickel. *Toxicology and Industrial Health*. 1986, **2**(1), 17-78. DOI: 10.1177/074823378600200102. ISSN 0748-2337. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/074823378600200102>
- [221] ZIRWAS, Matthew a Matthew MOLENDÁ. Dietary nickel as a cause of systemic contact dermatitis. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*. 2009, **2**(6), 39-43.
- [222] Nickel. NORDBERG, G., B. FOWLER a M. NORDBERG. *Handbook on the toxicology of metals*. 3rd ed. Boston: Academic Press, 2007, s. 743-758. ISBN 978-0-12-369413-3.
- [223] KUO, Chung-Yih, Ruey-Hong WONG, Jia-Yi LIN, Ji-Ching LAI a Huei LEE. Accumulation of Chromium and Nickel Metals in Lung Tumors from Lung Cancer Patients in Taiwan. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2006, **69**(14), 1337-1344. DOI: 10.1080/15287390500360398. ISSN 1528-7394. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15287390500360398>
- [224] MAGNUS, Knut, Aage ANDERSEN a Arne HøGETVEIT. Cancer of respiratory organs among workers at a nickel refinery in Norway second report. *International Journal of Cancer*. 1982, **30**(6), 681-685. DOI: 10.1002/ijc.2910300602. ISSN 00207136. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.2910300602>
- [225] DOLL, R., L.G. MORGAN a F.E. SPEIZER. Cancers of the lung and nasal sinuses in nickel workers. *British Journal of Cancer*. 1970, **24**(4), 623-632.
- [226] SMITH, C., S. LIVINGSTON a D. DOOLITTLE. An international literature survey of "IARC Group I carcinogens" reported in mainstream cigarette smoke. *Food and Chemical Toxicology*. 1997, **35**(10), 1107-1130.

- [227] WEINER, Eugene. *Applications of environmental chemistry: a practical guide for environmental professionals*. Boca Raton: Lewis Pub., 2000. ISBN 15-667-0354-9.
- [228] Molybdenum. NORDBERG, G., B. FOWLER a M. NORDBERG. *Handbook on the toxicology of metals*. 3rd ed. Boston: Academic Press, 2007, s. 731-741. ISBN 978-0-12-369413-3.
- [229] Barium. NORDBERG, G., B. FOWLER a M. NORDBERG. *Handbook on the toxicology of metals*. 3rd ed. Boston: Academic Press, 2007, s. 407-417. ISBN 978-0-12-369413-3.
- [230] HIRT, Miroslav a František VOREL. *Soudní lékařství*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2015-2016. ISBN 978-80-271-0268-6.
- [231] BASELT, Randall. *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*. 9th ed. Seal Beach, Ca.: Biomedical Publications, 2011. ISBN 978-0962652387.
- [232] TŘEBICHAŤSKÝ, Jan, Dagmar HAVRDOVÁ a Milan BLOHBERGER. *Škodliviny I – Toxické kovy*. 1. Kutná Hora: Kutná Hora : NSO - František Nekvasil, 1998.
- [233] SHACKLETTE, H. a J. BOERNGEN. Element Concentrations in Soils and Other Surficial Materials of the Conterminous United States. In: *U.S. Geological Paper 1270* [online]. Washington: United States government printing office, 1984, s. 1-105 [cit. 2017-09-05]. ISSN 82-600084.
- [234] LECH, T. a J. SADLIK. Copper Concentration in Body Tissues and Fluids in Normal Subjects of Southern Poland. *Biological Trace Element Research*. 2007, **118**(1), 10-15. DOI: 10.1007/s12011-007-0014-z. ISSN 0163-4984. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12011-007-0014-z>
- [235] Toxic Substances Portal - Copper. *ATSDR - Agency for Toxic Substances & Disease Registry* [online]. Atlanta, USA: U.S. Department of Health & Human Service, 2017 [cit. 2017-09-05]. Dostupné z: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/TP.asp?id=206&tid=37>
- [236] BLAKLEY, B., J. BEREZOWSKI, H. SCHIEFER a K. ARMSTRONG. Chronic copper toxicity in a dairy cow. *The Canadian Veterinary Journal*. 1982, **23**(6), 190-192.
- [237] FRANKLIN, R.B. a L.C. COSTELLO. The important role of the apoptotic effects of zinc in the development of cancers. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2009, **106**(5), 750-757. DOI: 10.1002/jcb.22049. ISSN 07302312. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.22049>
- [238] KENŠOVÁ, R., D. HYNEK, V. ADAM a R. KIZEK. Působení zinku na živé organismy. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* [online]. 2014, **3**, 29-31 [cit. 2017-09-21]. Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_239\\_nanotech/J\\_Met\\_Nano/0314/pdf/jmn3-06.pdf](http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0314/pdf/jmn3-06.pdf)
- [239] STRNADOVÁ, Nina a Daniela MATĚJSKOVÁ. Ostraňování sloučenin mědi a zinku z vod adsorpcí na hydroxidu hořečnatém. *Chemické listy*. 2006, **100**, 803-808.
- [240] CLIFT, Martin, Kirsten CLIFT, Geoffrey HUNT, Peter GEHR a Barbara ROTHEN-RUTISHAUSER. NanoImpactNet Nomenclature. *NanoImpactNet: The European Network on the Health and Environmental Impact of Nanomaterials* [online]. Institute for Work and Health, 2010, **3**, 1-14 [cit. 2017-09-05]. Dostupné z: [http://nanopinion.archiv.zsi.at/sites/default/files/nin\\_nomenclature\\_-\\_version\\_3\\_-\\_final.pdf](http://nanopinion.archiv.zsi.at/sites/default/files/nin_nomenclature_-_version_3_-_final.pdf)
- [241] SALEM, Harry a Sidney KATZ. *Inhalation toxicology*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC/Taylor, 2006. ISBN 978-0-8493-4049-9.
- [242] LJUNGGREN, Karl, Vitauts LIDUMS a Bengt SJOGREN. Blood and urine concentrations of aluminium among workers exposed to aluminium flake powders.

- British Journal of Industrial Medicine*. 1991, **48**(2), 106-109.
- [243] SJOGREN, B., V. LIDUMS, M. HAKANSSON a L. HEDSTROM. Exposure and urinary excretion of aluminum during welding. *Scandinavian Journal of Work, Environment*. 1985, **11**(1), 39-43. DOI: 10.5271/sjweh.2255. ISSN 0355-3140. Dostupné také z: [http://www.sjweh.fi/show\\_abstract.php?abstract\\_id=2255](http://www.sjweh.fi/show_abstract.php?abstract_id=2255)
- [244] EXLEY, C. The toxicity of aluminium in humans. *Morphologie*. 2016, **100**(329), 51-55. DOI: 10.1016/j.morpho.2015.12.003. ISSN 12860115. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286011516000023>
- [245] DARBRE, P.D. Aluminium and the human breast. *Morphologie*. 2016, **100**(329), 65-74. DOI: 10.1016/j.morpho.2016.02.001. ISSN 12860115. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S128601151600028X>
- [246] *Nariadení vlády 361/2007, kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví při práci*. In: . 2007, číslo 361.
- [247] ERIKSSON, J., L. EKERLJUNG, B.-M. SUNDBLAD, J. LÖTVALL, K. TORÉN, E. RÖNMARK, K. LARSSON a B. LUNDBÄCK. Cigarette smoking is associated with high prevalence of chronic rhinitis and low prevalence of allergic rhinitis in men. *Allergy*. 2013, **68**(3), 347-354. DOI: 10.1111/all.12095. ISSN 01054538. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/all.12095>
- [248] SLAVIN, Raymond. Treating rhinitis in the older population: special considerations. *Allergy, Asthma*. 2009, **5**(1), 9-. DOI: 10.1186/1710-1492-5-9. ISSN 1710-1492. Dostupné také z: <http://aacijournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1710-1492-5-9>
- [249] HLEIS, Dany, Ignacio FERNÁNDEZ-OLMO, Frédéric LEDOUX, Adib KFOURY, Lucie COURCOT, Thérèse DESMONTS a Dominique COURCOT. Chemical profile identification of fugitive and confined particle emissions from an integrated iron and steelmaking plant. *Journal of Hazardous Materials*. 2013, **250-251**, 246-255. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.01.080. ISSN 03043894. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389413001064>
- [250] BUZEA, Cristina, Ivan PACHECO a Kevin ROBBIE. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007, **2**(4), 17-71. DOI: 10.1116/1.2815690. ISSN 1934-8630. Dostupné také z: <http://avs.scitation.org/doi/10.1116/1.2815690>
- [251] ELIHN, K a P. BERG. Ultrafine Particle Characteristics in Seven Industrial Plants. *The Annals of Occupational Hygiene*. 2009, **53**(5), 475-484. DOI: 10.1093/annhyg/mep033. ISSN 1475-3162. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/annweh/article/53/5/475/207057/Ultrafine-Particle-Characteristics-in-Seven>
- [252] BROUWER, Derk. Exposure to manufactured nanoparticles in different workplaces. *Toxicology*. 2010, **269**(2-3), 120-127. DOI: 10.1016/j.tox.2009.11.017. ISSN 0300483x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X09005976>
- [253] GRUBEROVÁ, Michaela. *Rizika chemických škodlivin v pracovním ovzduší kovovýroby, měření a hodnocení*. České Budějovice, 2009. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v českých Budějovicích. Vedoucí práce Radmila Řepová.
- [254] AMBROŽ, O., B. KANDUS a J. KUBÍČEK. *Technologie svařování a zařízení: učební texty pro kurzy svářečských inženýrů a technologů*. 1. vyd. Ostrava: ZEROSS, 2001. Svařování. ISBN 80-857-7181-0.
- [255] MINAŘÍK, Václav. *Přehled metod svařování*. 1. vyd. Ostrava: ZEROSS, 1998. ISBN 80-857-7157-8.
- [256] RODRÍGUEZ, V., A. TARDÓN, M. KOGEVINAS, C.S. PRIETO, A. CUETO, M. GARCÍA, I.A. MENÉNDEZ a J. ZAPLANA. Lung cancer risk in iron and steel foundry workers: a nested case control study in Asturias, Spain. *American Journal of*

- Industrial Medicine*. 2000, **38**(6), 644-650. DOI: 10.1002/1097-0274(200012)38:6<644::AID-AJIM5>3.0.CO;2-M.
- [257] Informace o dopravě v Ostravě 2015. *Statutární město Ostrava: oficiální portál* [online]. Ostrava: Ostravské komunikace, a.s., oddělení dopravního inženýrství, 2016 [cit. 2017-09-05]. Dostupné z: <https://www.ostrava.cz/cs/urad/magistrat/odbory-magistratu/odbor-dopravy/oddeleni-silnic-mostu-rozvoje-a-organizace-dopravy/informace-o-doprave/OKroenka2015.pdf>
- [258] STENHAMMAR, L. Diarrhoea following contamination of drinking water with copper. *European Journal of Medical Research*. 1999, **4**(6), 217-218.
- [259] GRIGORATOS, Theodoros a Giorgio MARTINI. Brake wear particle emissions: a review. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015, **22**(4), 2491–2504.
- [260] GIETL, Johanna, Roy LAWRENCE, Alistair THORPE a Roy HARRISON. Identification of brake wear particles and derivation of a quantitative tracer for brake dust at a major road. *Atmospheric Environment*. 2010, **44**(2), 141-146. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2009.10.016. ISSN 13522310. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231009008735>
- [261] DOČEKAL, B., V. KRIVAN a N. PELZ. Trace and minor element characterization of diesel soot. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 1992, **343**(12), 873–878.
- [262] ADACHI, Kouji a Yoshiaki TAINOSHO. Characterization of heavy metal particles embedded in tire dust. *Environment International*. 2004, **30**(8), 1009-1017. DOI: 10.1016/j.envint.2004.04.004. ISSN 01604120. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412004000868>
- [263] GARG, Bhagwan, Steven CADLE, Patricia MULAWA, Peter GROBLICKI, Chris LAROO a Graham PARR. Brake Wear Particulate Matter Emissions. *Environmental Science*. 2000, **34**(21), 4463-4469. DOI: 10.1021/es001108h. ISSN 0013-936x. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es001108h>
- [264] CHA, Soyung, Philip CARTER a Ronald BRADOW. Simulation of Automobile Brake Wear Dynamics and Estimation of Emissions. *SAE International*. 1983, , 1-24. DOI: 10.4271/831036. Dostupné také z: <http://papers.sae.org/831036/>
- [265] *Environment Agency news: Tyres in the environment: Executive summary*. EA, Bristol.: Science of the Total Environment, 1999. ISBN 01873 16075 5.
- [266] WIK, Anna. *When the Rubber Meets the Road: Ecotoxicological Hazard and Risk Assessment of Tire Wear Particles*. Göteborg, Sweden, 2008. Doctoral thesis. Faculty of Science, University of Gothenburg.
- [267] PEIKERTOVA, Pavlina a Peter FILIP. Influence of the Automotive Brake Wear Debris on the Environment - A Review of Recent Research. *SAE International Journal of Materials and Manufacturing*. 2016, **9**(1), -. DOI: 10.4271/2015-01-2663. ISSN 1946-3987. Dostupné také z: <http://papers.sae.org/2015-01-2663/>
- [268] HERNANDEZ, Hector a Ramiro RODRIGUEZ. Geochemical evidence for the origin of vanadium in an urban environment. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2012, **184**(9), 5327-5342. DOI: 10.1007/s10661-011-2343-9. ISSN 0167-6369. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10661-011-2343-9>
- [269] JOHNSON, Timothy. Diesel Emission Control in Review. *SAE International Journal of Fuels and Lubricants*. 2009, **2**(1), 1-12. DOI: 10.4271/2009-01-0121. ISSN 1946-3960. Dostupné také z: <http://papers.sae.org/2009-01-0121/>
- [270] SYŠALOVÁ, Jiřina, Ivana ŠÝKOROVÁ, Martina HAVELCOVÁ, Jiřina SZÁKOVÁ, Hana TREJTNAROVÁ a Bohumil KOTLÍK. Toxicologically important trace elements and organic compounds investigated in size-fractionated urban particulate matter collected near the Prague highway. *Science of The Total Environment*. 2012, **437**, 127-

136. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.07.030. ISSN 00489697. Dostupné také z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969712009758>

## SEZNAM ZKRATEK

ASTM	Mezinárodní organizace pro normalizaci
DNA	deoxyribonukleová kyselina
QD	kvantové tečky, angl. quantum dots
PM	prachové (pevné) částice, angl. particulate matter
FP	jemné částice, angl. fine particles
UFP	ultrajemné částice, angl. ultrafine particles
PM <sub>2,5</sub>	částice s aerodynamickým průměrem $\leq 2,5 \mu\text{m}$
ČR	Česká republika
D	průměr
RES	retikuloendoteliální systém
A549	živé plicní epitelální buňky
NCI	Národní onkologický registr, angl. National cancer institute
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum zhoubných novotvarů, angl. International Agency for Research on Cancer
WHO	světová zdravotnická organizace, angl. World Health Organization
CNS	centrální nervová soustava
ROS	reaktivní forma kyslíku, angl. reactive oxygen species
eNPs	cíleně připravované nanočástice, angl. engineered nanoparticles
EDS	energieově disperzní spektrometr
GNPs	nanočástice zlata, angl. gold nanoparticles
LiLa	lipo-latexové nanočástice
M1	zánětlivý fenotyp
DLC	povlaky z uhlíku, angl. diamond like carbon
MoM	ortopedický kovový implantáty „kov na kov“, angl. „metal on metal“
PEG	pegylované nanočástice zlata s vrstvou polyetylen glykolu
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
SERS	povrchově zesílená Ramanova spektroskopie, angl. urface enhanced Raman spectroscopy
cRM	konfokální Ramanova mikroskopie
AuN	nanočástice zlata
MCF-7	buňky diferencovaného epitelu prsní žlázy
TERT	imortalizovaná lidská keratinocytová buněčná linie z oblasti dutiny ústní
VŠB-TUO	Vysoká škola báňská – technická univerzita Ostrava
FN-ENT	etická komise fakultní nemocnice Ostrava
RTG	rentgenový detektor

AES-ICP	atomovou emisní spektroskopie s indukčně vázanou plazmou
AAS-GF	atomovou absorpční spektroskopií s elektrotermální atomizací
HCP	hierarchická shluková analýza na hlavních komponentech, angl. Hierarchical clustering on principal components
MCA	Mnohonásobná korespondenční analýza, angl. Multiple correspondence analysis
PCA	analýza hlavních komponent, angl. Principal component analysis
GR	grafit
AC	amorfní uhlík
TiO <sub>2</sub> -A	anatas
TiO <sub>2</sub> -R	rutil
DEPs	ultrajemné částice z výfukových plynů automobilů s dieselovými motory, angl. diesel engine particles
PC-12	buněčné kultury
SEM-EDS	skenovací elektronová mikroskopie s energiově disperzní spektrometr
TIG	wolframové elektrody v inertním plynu, angl. Tungsten Inert Gas



# SEZNAM OBRÁZKŮ

**Obrázek 1:** Orientační velikostní rozmezí částic přírodního (zeleně) a antropogenního původu (červeně), převzato a upraveno podle

**Obrázek 2:** Vdechovatelná, thorakální a respirabilní konvence, znázorněna jako procenta z polétavého prachu. Z grafu vyplývá, že 50% polétavého prachu s  $D = 10 \mu\text{m}$  je v thorakální frakci a 50 % polétavého prachu s  $D = 4 \mu\text{m}$  je v respirabilní frakci, převzato z [20]

**Obrázek 3:** Životní cyklus nanomateriálů/nanočástic v životním prostředí, upraveno podle [12].

**Obrázek 4:** Obrázek 4 : Koncentrace nanočástic emitovaných v kanceláři během provozu laserové tiskárny ve srovnání s koncentrací ve vnějším prostředí, ( $\text{p.cm}^{-3}$ - počet částic na  $\text{cm}^{-3}$ ), upraveno podle [41].

**Obrázek 5:** Obecný obrázek biodegradace plastů, upraveno podle [42].

**Obrázek 6:** SEM analýza erytrocytu, při bodové analýze světlých bodů uvnitř buňky byl zjištěn majoritní obsah wolframu v glioblastomu mozku u 62 let staré pacientky pracující jako svářečka, převzato z [39].

**Obrázek 7:** Obecné schéma možného příjmu nanometrických částic do lidského organismu, jejich předpokládané translokační dráhy uvnitř lidského těla a onemocnění, které s tím mohou souviset, převzato z [51].

**Obrázek 8:** Hypertrofie sliznice dolní skořepy nosní, převzato z [57].

**Obrázek 9:** Podstata nádorové transformace, převzato z [61]

**Obrázek 10:** tkáň plicního adenokarcinomu a plicní tkáň bez nádoru, nabarvená speciální barvicí technikou hematoxilin-eozin, zobrazená v optickém mikroskopu, určená pro histologické hodnocení (oddělení patologie, fakultní nemocnice Ostrava).

**Obrázek 11:** Rozdělení dýchacích cest (A) a ukládání částic (depozice) v těle dospělého jedince při klidovém dýchání ústy vyjádřena jako funkce velikostí částic;(B) data u průdušek jsou dány součtem depozice v průduškách a plicních sklípcíchprůdušinkách,upraveno podle [67].

**Obrázek 12:** Vzorek hypertrofické měkké tkáně z oblasti skořepy nosní rozdělen na tři části v závislosti na vzdálenosti od nozder.

**Obrázek 13:** Vzorek tkáně z oblasti skořepy nosní - dva řezy natažené na mikroskopickém sklíčku. Modře je vyznačena oblast sliznice (S) a báze (B).

**Obrázek 14:** Vzorek cytologického stěru buněk z povrchu sliznice v oblasti skořep nosních nanesených na povrch mikroskopického sklíčka. Buňky jsou v oblasti bílých skvrn na sklíčku.

**Obrázek 15:** Vzorek nádorové tkáně z oblasti plic - adenokarcinom, dva řezy nataženy na mikroskopickém sklíčku.

**Obrázek 16:** Místa odběrů vzorků. A – Ostrava- Poruba, B – Ludgeřovice.

**Obrázek 17:** Síť devíti bodů zvolena pro vzorek hypertrofické měkké tkáně z oblasti skořepy nosní a) a síť třiceti bodů zvolená pro vzorek plicní nádorové tkáně -adenokarcinom b).

**Obrázek 18:** Ramanova spektrální mapa částice grafitu. Vlevo obrázek z optického mikroskopu a) a vpravo spektrální mapa, kde je vidět skutečná velikost a tvar grafitu b) grafit je zde znázorněn červenou barvou a okolní tkáň černě.

**Obrázek 19:** Ramanův mikrospektrometr XploRATM (HORIBA JobinYvon, Francie)

**Obrázek 20:** Skenovací elektronový mikroskop Quanta FEG 450 (FEI) a) a Skenovací elektronový mikroskop Philips XL30 b).

**Obrázek 21:** Vibrační magnetometr EV9 VSM firmy MicroSense.

**Obrázek 22:** Vybraná spektra sloučenin nalezených ve vzorcích hypertrofických tkání, změřená pomocí Ramanovy mikrospektroskopie. (AC- amorfni uhlík, GR – grafit,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – magnetit,  $\text{TiO}_2$ -A – anatas,  $\text{TiO}_2$ -R – rutil,  $\text{MgCO}_3$  uhličitan hořečnatý,  $(\text{CaFe}(\text{CO}_3)_2)$  - ankerit,  $\text{CaCO}_3$  - kalcit). Dolní spektrum je naměřené a horní spektrum je referenční spektrum z knihovny spekter.

**Obrázek 23:** Ramanova spektrální mapa vybrané oblasti vzorku hypertrofické tkáně (mukotomie, vzorek M3), kde a) je tkáň pod světelným mikroskopem s vybranou oblastí, b) spektrální mapa vybrané oblasti (červeně - místa detekce  $\text{TiO}_2$  ve formě anatasu, černě - okolní tkáň) a c) naměřené spektrum  $\text{TiO}_2$  ve formě anatasu.

**Obrázek 24:** SEM-EDS obrázek částice s majoritním zastoupením železa, detekované v hypertrofické tkáni (a) s příslušným EDS spektrem (b) detekovaných ve vzorku M6.

**Obrázek 25:** SEM-EDS obrázek částice, která obsahuje nikl, detekované v hypertrofické tkáni (a) s příslušným EDS spektrem (b) detekovaných ve vzorku M3.

**Obrázek 26:** SEM-EDS obrázek částice, která obsahuje barium, detekované v hypertrofické tkáni (a) s příslušným EDS spektrem (b) detekovaných ve vzorku M3.

**Obrázek 27:** SEM-EDS obrázek shluku částic, obsahující z velké části zinek, detekovaných v hypertrofické tkáni (a) s příslušným EDS spektrem (b) detekovaných ve vzorku M2.

**Obrázek 28:** Spektra hematitu ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) a barytu ( $\text{BaSO}_4$ ) nalezených v souboru vzorků hypertrofických tkání, zjištěná pomocí Ramanovy mikrospektroskopie. Dolní spektrum je naměřené a horní spektrum je získané z knihovny spekter.

**Obrázek 29:** Graf hierarchické shlukové analýzy na hlavních komponentách za účelem charakterizace skupin vzorků se statisticky významně se odlišujícími vlastnostmi. Vzorky se tak rozdělily podle jednotlivých detekovaných sloučenin do šesti specifických skupin (klastřů).

**Obrázek 30:** Kulovitá částice s majoritním obsahem železa, chrómu a manganu, zjištěná pomocí SEM-EDS analýzy ve vzorku C6 a) s příslušným EDS spektrem b).

**Obrázek 31:** Částiceúshluk částic titanu zjištěná pomocí SEM-EDS analýzy ve vzorku C7 a) s příslušným EDS spektrem b).

**Obrázek 32:** Shluky částic, které byly pomocí SEM-EDS detekovány v nádorových a referenčních tkáních plic. A8 - adenokarcinom, R3-6 - referenční plicní tkáň.

**Obrázek 33:** Některé vzorky nádorových tkání, jakož i některé referenční vzorky vykazovaly slabé feromagnetické chování (A). Ostatní vzorky vykazovaly paramagnetické chování (B).

**Obrázek 34:** Ramanova spektrální mapa vybrané oblasti vzorku nádorové plicní tkáně (vzorek A8), kde a) je tkáně pod světelným mikroskopem s vybranou oblastí, b) spektrální mapa vybrané oblasti (červeně - místa detekce  $\text{FeCO}_3$ , černě - okolní tkáň) a c) naměřené spektrum  $\text{FeCO}_3$ .

**Obrázek 35:** Vybraná spektra sloučenin detekovaných Ramanovou mikroskopioskopií v plicních nádorových tkáních (adenokarcinom) a referenčních vzorcích plic (bez karcinomu). Horní spektrum je referenci. AC - amorfní uhlík, GR - grafit,  $\text{TiO}_2\text{-R}$  - oxid titaničitý-rutil,  $\text{TiO}_2\text{-A}$  - oxid titaničitý - anatas,  $\text{FeCO}_3$  - siderit,  $\text{CaCO}_3$  – kalcit.

**Obrázek 36:** Částice s majoritním obsahem antimonu, detekovaná pomocí SEM - EDS. Tato částice byla zjištěna v referenčním vzorku plic (R2) u pacienta, který pracoval jako řidič.

**Obrázek 37:** Částice na bázi wolframu zjištěného SEM - EDS. Tato částice se objevila u pacienta s karcinomem (A8) pracujícího v profesi brusič kovů/svářeč.

**Obrázek 38:** Chí kvadrát test (test dobré shody) pro testování asociace jednotlivých kategoriálních proměnných.

**Obrázek 39:** SEM obrázek kulovité částice, obsahující z velké části železo, mangan a titan detekované ve vzorku sedimentovaného prachu na odběrovém místě A (městská část Ostravy), (a) s příslušným EDS spektrem (b).

**Obrázek 40:** SEM obrázek částice, s majoritním obsahem železa a manganu, detekované ve vzorku sedimentovaného prachu na odběrovém místě B (příměstská část Ostravy), (a) s příslušným EDS spektrem (b).

**Obrázek 41:** Vybraná spektra sloučenin nalezených ve vzorcích sedimentovaného prachu na odběrovém místě A (městská část Ostravy) a odběrovém místě B (příměstská část Ostravy), změřená pomocí Ramanovy mikrospektroskopie.

**Obrázek 42:** Korelační kruhy - založené na výsledcích analýz hlavních složek (PCA – z angl. Principal Component Analysis), pro městskou A a příměstskou lokalitu B.

**Obrázek 43:** Výsledky analýzy faktorů na smíšených datech, kvalitativní i kvantitativní proměnné. Lze pozorovat, že Fe je mnohem více závislé na měsíci (month) na rozdíl od ostatních prvků, které jsou v korelaci spíše s místem odběru (site).

## SEZNAM TABULEK

**Tabulka 1:** Přehled detekovaných fází a prvků ve vzorcích hypertrofické tkáně (mukotomie) pomocí Ramanova mikrospektrometru a skenovacího elektronového mikroskopu. AC – amorfni uhlík, GR – grafit  $\text{TiO}_2\text{-R}$  – rutil,  $\text{TiO}_2\text{ A}$  – anatas.

**Tabulka 2:** Přehled velikostí částic, detekovaných pomocí SEM-EDS ve vzorcích hypertrofické tkáně (je uvedena nejmenší detekovaná velikost).

**Tabulka 3:** Přehled detekovaných fází ve vzorcích hypertrofické tkáně prostřednictvím Ramanovy mikrospektroskopie, s uvedeným pohlavím, věkem, kouřením a pracovní anamnézou. (AC-amorfni uhlík, GR-grafit,  $\text{TiO}_2\text{-A}$ -anatas,  $\text{TiO}_2\text{-R}$ -rutil).

**Tabulka 4:** Přehled detekovaných sloučenin ve vzorcích cytologický odběrů sputa prostřednictvím skenovací elektronové mikroskopie. Současně přehled sloučenin, zjištěných prostřednictvím Ramanovy mikrospektroskopie, ve vzorcích hypertrofických tkání, z kterých byl pořízen stěr. Zároveň jsou uvedeny informace o pohlaví, věku, kouření a pracovní anamnéze. (AC-amorfni uhlík, GR-grafit,  $\text{TiO}_2\text{-A}$ -anatas,  $\text{TiO}_2\text{-R}$ -rutil).

**Tabulka 5:** Přehled velikostí částic/shluků částic, detekovaných pomocí SEM-EDS ve vzorcích cytologických odběrů z povrchu hypertrofické tkáně (je uvedena nejmenší detekovaná velikost kde nebyla částice detekována, je uvedena pomlčka).

**Tabulka 6:** Přehled detekovaných sloučenin ve vzorcích adenokarcinomů (A1-A13) a referenčních vzorků plicní tkáně (R1-R6) prostřednictvím Ramanovy mikrospektroskopie (AC-amorfni uhlík, GR-grafit,  $\text{TiO}_2\text{-A}$ -anatas,  $\text{TiO}_2\text{-R}$ -rutil) a skenovací elektronové mikroskopie, spolu s uvedeným pohlavím, věkem, kouřením a pracovní anamnézou.

**Tabulka 7:** Přehled velikostí částic/shluků částic, detekovaných pomocí SEM-EDS ve vzorcích adenokarcinomů (A1-A13) a referenčních vzorků plicní tkáně (R1-R6), (je uvedena nejmenší detekovaná velikost, kde nebyla částice detekována, je uvedena pomlčka).

**Tabulka 8:** Průměrný obsah prvků na obou lokalitách (městské a příměstské) určené ICP (\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ ).

# PŘÍLOHY

## **Příloha 1**

Publikace přímo související s disertační prací, které byly publikovány před odevzdáním disertační práce:

- Raman microspectroscopy as a useful tool for nanopathology
- Micro- and Nanosized Particles in Nasal Mucosa: A Pilot Study
- Metal and carbon-based particles/clusters in the peripheral T-cell lymphoma in the lungs
- Chemical and phase analysis of road dust