

# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**Obor č. 4: Biologie**

## **Imunitní reakce a reparace cílových orgánů po inhalaci rozpustných nanočástic olova**

**Adriena Jedličková  
Jihomoravský kraj**

**Brno 2021**

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

## **Imunitní reakce a reparace cílových orgánů po inhalaci rozpustných nanočástic olova**

Immune response and reparation of target organs  
after soluble lead nanoparticles inhalation

**Autor:** Adriena Jedličková

**Škola:** Gymnázium, Brno, tř. Kpt. Jaroše 14, p. o.

**Kraj:** Jihomoravský kraj

**Konzultanti:** doc. RNDr. Marcela Buchtová, Ph.D.  
RNDr. Iva Kubištová, Ph.D.

Brno 2021

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne .....

Adriena Jedličková

## PODĚKOVÁNÍ

Děkuji doc. RNDr. Marcelu Buchtové, Ph.D. za možnost vypracovat svoji Středoškolskou odbornou činnost v Laboratoři molekulární morfogeneze na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., za odborné vedení, vstřícný přístup a trpělivost.

Děkuji RNDr. Ivě Kubištové, Ph.D. za pomoc při sestavování formální stránky práce.

Děkuji Tereze Smutné za pomoc při analýzách a čas, který mi věnovala.

Děkuji Ing. Lucii Vrlíkové za pomoc při zpracování histologických vzorků.

Děkuji MUDr. Janě Dumkové, Ph.D., Mgr. Daniele Kristekové a MVDr. Ivetě Putnové, Ph.D. za pomoc při korektuře práce.

Děkuji všem z Laboratoře molekulární morfogeneze za vytvoření přátelské atmosféry na pracovišti.

Děkuji mé rodině a kamarádům za neustálou podporu.



## ABSTRAKT

**Současný stav.** Částice s alespoň jedním rozměrem od 1 do 100 nm jsou potenciálním rizikem pro živé organismy již od samotného vzniku života. S postupným vývojem společnosti a rozvojem dopravy či průmyslu však jejich množství rychle stoupá a nanočástice se tak stávají potenciálně vyšším rizikem. Olovo, které lidstvo i přes jeho stovky let známou toxicitu stále hojně využívá, vzniká ve formě nanočástic při mnoha průmyslových procesech a koncentrace v některých velkoměstských a industriálních oblastech přesahují stanovené limity. Dříve provedené experimenty se zabývaly toxicitou nanočástic olova, ovšem v nerozpustné formě. Tato práce na ně navazuje a zabývá se vlivem chronické inhalace rozpustných nanočástic olova na imunitní systém a reparační mechanismy v exponovaných tkáních.

**Experimentální design a použité metody.** Rozpustné nanočástice olova ve formě dusičnanu olovnatého byly generovány ve spolupráci s Ústavem analytické chemie, v.v.i.. Modelové organismy, myši laboratorní, byly umístěny v celotělových inhalačních komorách, kde byly vystaveny generovaným nanočásticím po dobu 6 a 11 týdnů. Šestitýdenní skupina byla následně odebrána mimo inhalační komoru a po dobu 5 týdnů inhalovala vzduch bez generovaných nanočástic. K porovnání těchto dvou exponovaných skupin sloužila kontrolní skupina, jež inhalovala po dobu 11 týdnů vzduch bez nanočástic olova. Každá experimentální skupina zahrnovala 5 jedinců. Po odběru cílových orgánů (plic a jater) a jejich zvážení byly vzorky rozděleny a dále zpracovány pro histologické analýzy či byly zmrazeny pro následné analýzy genové exprese. Pro zhodnocení histopatologických změn byla použita základní i specifická histologická barvení; Hematoxylin-eosin, Toluidinová modř, Sirius Red, Massonův zelený trichrom; dále imunohistochemické metody s využitím markerů CD68, MPO, SOX2, Nanog, a imunofluorescenční metody, s markery Ki67 a SOX9. Pro analýzu relativní genové exprese bylo vybráno několik genů: *NFkB1*, *IL1- $\alpha$* , *IL1- $\beta$* , *IL6*, *Sox2* a *Sox9*.

**Výsledky.** Inhalace  $Pb(NO_3)_2$ NPs způsobila závažné patologické změny v plicích i v játrech. Reparační aktivita probíhala v tkáních intenzivně, ale mezi jedinci v rámci experimentálních skupin byla zaznamenána vysoká variabilita jejich intenzity. V některých oblastech byla detekována fibróza značící nevratné poškození tkání. V plicích došlo po inhalaci  $Pb(NO_3)_2$ NPs k nárůstu počtu progenitorových buněk, pneumocytů II. typu. Imunitní odpověď byla po inhalaci  $Pb(NO_3)_2$ NPs snížena, což potvrdily analýzy exprese vybraných imunitních buněk a prozánětlivých cytokinů. V plicním parenchymu byly po inhalaci  $Pb(NO_3)_2$ NPs detekovány neutrofilní granulocyty, počet žírných buněk byl vyšší. V játrech došlo podobně jako v plicích ke snížení exprese markerů typických pro makrofágy.

**Závěry.** Po chronické inhalaci  $Pb(NO_3)_2$ NPs se změnila mikroskopická struktura plic a jater. Zvýšení proliferativní aktivity a zvýšený výskyt progenitorových buněk nestačily ke kompenzaci poškození tkání, což potvrdil nález plicní a jaterní fibrózy i v exponované skupině po skončení eliminačního období. Imunitní odpověď byla po inhalaci  $Pb(NO_3)_2$ NPs snížena, ovšem eliminační perioda napomohla k návratu analyzovaných faktorů na hodnoty blízké kontrolní skupině. Vliv inhalace rozpustných a nerozpustných nanočástic olova se významně lišil, a to např. ve výskytu kolagenních vláken, proliferativní aktivitě, množství progenitorových buněk a expresi některých molekul souvisejících s aktivitou imunitního systému. V budoucnu bude důležité se detailně zaměřit

na eliminační mechanismy, zejména pak na úlohu kmenových buněk, které mají mj. v medicíně velký potenciál. Dále bude nezbytné prohloubit znalosti efektů různých koncentrací NPs olova na cílové orgány v dlouhodobém měřítku.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

dusičnan olovnatý; nanočástice; inhalace; plíce; játra; imunitní odpověď; reparace; kmenové buňky

## ABSTRACT

**Background.** Nanoparticles with at least one dimension from 1 to 100 nm are a potential risk for all living organism from the very beginning of their life. However, with the gradual expansion of human society, especially increase of transport and industry, amount of nanoparticles is rapidly increasing in our environment, and nanoparticles represent a potentially higher risk. Despite its hundreds of thousands of years of known toxicity, lead has been widely used and it is produced in the form of nanoparticles by many industrial processes resulting in increasing lead concentrations in some agglomerations and industrial areas. Previous experiments analyzed the toxicity of lead nanoparticles in insoluble form. In recent project, we aim to determine the effect of soluble lead nanoparticles on the immune system and repair mechanisms following sub-chronic inhalation.

**Experimental design and utilized methods.** The soluble lead nanoparticles in a form of lead II nitrate were generated in cooperation with Institute of Analytical Chemistry, Czech Academy of Sciences. Laboratory mice as model organisms were placed into a whole-body chamber, where they were exposed to nanoparticles for 6 and 11 weeks. Some animals were removed from the inhalation chamber after 6 weeks exposition and inhaled air without the nanoparticles for additional 5 weeks. A control group of animals, which inhaled air without lead nanoparticles for 11 weeks were used for the comparison. Five animals were included in each experimental group. Target organs (lungs and liver) were weighed after their collection and further processed for histological analyses or were frozen for subsequent gene expression analyzes. To evaluate histopathological changes, routine as well as specific histological staining were used such as Hematoxylin-eosin, Toluidine Blue, Sirius Red, Masson's Green Trichrome. Moreover, we performed immunohistochemical labeling using markers CD68, MPO, SOX2, Nanog, and immunofluorescent detection with markers Ki67 and SOX9. To analyze gene expression changes, we selected several genes typical for tissue response to stress exposure: *NFkB1*, *IL1- $\alpha$* , *IL1- $\beta$* , *IL6*, *Sox2* a *Sox9*.

**Results.** Inhalation of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ NPs caused serious pathological changes within both lungs and liver. Reparative processes were detected in tissues, but a high individual variability was noted in all experimental groups. In some regions, we detected a fibrosis as a sign of an irreversible tissue damage. In lungs exposed to  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ NPs, the number of progenitor cells, pneumocytes type II, increased. Immune response was decreased after  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ NPs inhalation, which was confirmed by the analyses of selected immune cells and pro-inflammatory cytokines' expression. Following  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ NPs inhalation, we found neutrophile granulocytes in the lung parenchyma, and the number of mast cell was increased. The expression of macrophage markers was decreased in liver as well as in lungs.

**Conclusions.** After sub-chronic inhalation of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ NPs, the microscopic structure of lungs and liver was altered. Enhanced proliferation activity and increased number of progenitor cells was not sufficient for effective tissue repair, which was verified by the findings of pulmonary and hepatic fibrosis also in an experimental group with long clearance period. Immune response was decreased after  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ NPs inhalation, however, the clearance period led to the return of investigated factors to values close to the control group. Inhalation of soluble and insoluble lead nanoparticles caused distinct effects on tissues including the occurrence of collagen fibers, proliferation activity, number

of progenitor cells, and in the expression of several markers typical for immune cells. In the future, it will be important to focus in detail on the elimination mechanisms of lead nanoparticles from cells and on the role of stem cells in reparative processes. Careful investigation of the effects of different concentrations of lead NPs in the long-term experiments will be also necessary.

## **KEY WORDS**

lead II nitrate; nanoparticles; inhalation; lungs; liver; immune response; reparation; stem cells

# OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část .....</b>	<b>14</b>
2.1	Nanočástice a jejich význam.....	14
2.2	Využití olova v praxi .....	15
2.3	Nanočástice olova a jejich toxicita .....	16
2.4	Cílové orgány exponované inhalovaným nanočásticím .....	17
2.4.1	Plíce ( <i>pulmones</i> ) .....	17
2.4.2	Játra ( <i>hepar</i> ) .....	21
<b>3</b>	<b>Cíle práce .....</b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>Praktická část.....</b>	<b>25</b>
4.1	Modelový organismus.....	25
4.2	Generování nanočástic .....	25
4.3	Experimentální design .....	25
4.4	Inhalace rozpustných nanočástic olova.....	26
4.5	Odběr a fixace vzorků.....	27
4.6	Histologické zpracování .....	27
4.6.1	Příprava a krájení parafinových řezů .....	27
4.6.2	Histologická barvení .....	27
4.7	Imunohistochemické metody .....	30
4.7.1	Použité markery .....	32
4.8	Imunofluorescenční metody .....	33
4.8.1	Použité markery .....	35
4.9	Analýza genové exprese .....	35
4.9.1	Izolace mRNA .....	35
4.9.2	Reverzní transkripce .....	36
4.9.3	qPCR.....	36
4.9.4	Markery použité pro analýzu genové exprese .....	37
4.10	Statistické vyhodnocení provedených analýz .....	37
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>38</b>
5.1	Změna hmotnosti cílových orgánů po inhalaci Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs.....	39
5.2	Histopatologické změny po inhalaci Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs v cílových orgánech .....	41
5.2.1	Změny intenzity a rozsahu histopatologických změn v plicích.....	41
5.2.2	Změny intenzity a rozsahu histopatologických změn v játrech.....	43

5.3	Reparační procesy v cílových tkání po inhalaci Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs .....	46
5.3.1	Fibrotické změny v plicích a v játrech po inhalaci Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs .....	46
5.3.2	Změny počtu proliferujících buněk v obou cílových orgánech po inhalaci Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs .....	49
5.3.3	Změny počtu progenitorových buněk po inhalaci Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs .....	53
5.4	Imunitní odpověď v plicích a játrech po inhalaci Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs .....	59
5.4.1	Imunitní odpověď plic po inhalaci Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs.....	59
5.4.2	Imunitní odpověď jater po inhalaci Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs.....	65
<b>6</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>69</b>
6.1	Možnosti vstupu nanočástic do organismu .....	70
6.2	Pozitivní účinky některých druhů nanočástic na živé organismy .....	71
6.3	Patologické změny v plicích a v játrech .....	73
6.4	Reparativní procesy a zachování homeostázy plic a jater .....	75
6.5	Imunitní odpověď plic a jater .....	78
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Seznam obrázků .....</b>	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>Seznam tabulek .....</b>	<b>83</b>
<b>10</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>85</b>
<b>11</b>	<b>Seznam použitých internetových zdrojů.....</b>	<b>99</b>
<b>P1:</b>	<b>Detaily praktické části práce.....</b>	<b>103</b>
	Charakteristika generovaných rozpustných nanočástic olova .....	103
	Charakteristika experimentálních skupin.....	103
	Kontrolní (ctr) skupina.....	103
	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs skupina .....	103
	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs/CL skupina.....	103
	Vyhodnocení analýzy genové exprese.....	103
	Nepárový Studentův t-test .....	104
	Přepočet počtu detekovaných buněk na 1 mm <sup>2</sup> .....	104
<b>P2:</b>	<b>Přílohy k výsledkům .....</b>	<b>105</b>
	Analýza hmotnosti cílových orgánů .....	105
	Plíce.....	105
	Souhrn provedených analýz v plicích.....	105
	Histopatologická analýza vzorků plic.....	106
	Kvantifikace Ki67-pozitivních buněk v plicích.....	107
	Kvantifikace Nanog-pozitivních buněk v plicích .....	116
	Kvantifikace TB-pozitivních buněk v plicích.....	127

Kvantifikace CD68-pozitivních buněk v plicích .....	129
Játra.....	140
Souhrn provedených analýz v játrech.....	140
Histopatologická analýza vzorků jater.....	140
Kvantifikace Ki67-pozitivních buněk v játrech.....	141
Kvantifikace CD68-pozitivních buněk v játrech .....	152
<b>P3: Seznam použitého materiálu .....</b>	<b>159</b>
Seznam použitých chemikálií .....	159
Seznam použitých roztoků.....	160
Roztoky použité při histologických barveních .....	160
Roztoky použité při imunohistochemických a imunofluorescenčních metodách .....	160
Seznam použitých kitů.....	162
Kity použité při imunohistochemických metodách .....	162
Kity použité při imunofluorescenčních metodách .....	162
Kity použité při analýze genové exprese .....	162
Seznam použitých protilátek.....	163
Protilátky použité při imunohistochemických metodách.....	163
Protilátky použité při imunofluorescenčních metodách .....	163
Seznam použitých TaqMan .....	164
Seznam použitých přístrojových pomůcek .....	165
Seznam použitých softwarů .....	166
<b>P4: Publikace.....</b>	<b>167</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- Ab – protilátka (*Antibody*)  
AbI – primární protilátka (*Primary Antibody*)  
AbII – sekundární protilátka (*Secondary Antibody*)  
ABC – avidin-biotinový komplex (*Avidin Biotin Complex*)  
AFLD – alkoholová tuková choroba jater (*Alcoholic Fatty Liver Disease*)  
Ag – antigen (*Antigen*)  
APAAP – alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza (*Alkaline Phosphatase Anti-Alkaline Phosphatase*)  
ARDS – syndrom akutní dechové tísně (*Acute Respiratory Distress Syndrome*)  
AT2 – pneumocyty II. typu (*Alveolar Type 2 Cells*)  
CD68 – klastr diferenciac 68 (*Cluster of Differentiation 68*)  
COPD – chronická obstrukční plicní nemoc (*Chronic Obstructive Pulmonary Disease*)  
ctr – kontrolní skupina (*Control Group*)  
cDNA – komplementární kyselina deoxyribonukleová (*Complementary Deoxyribonucleic Acid*)  
DAB – diaminobenzidin (*Diaminobenzidine*)  
DEPC voda – diethylpyrokarbonát voda (*Diethyl Pyrocarbonate Water*)  
DNA – deoxyribonukleová kyselina (*Deoxyribonucleic Acid*)  
ESF – Evropská vědecká agentura (*The European Science Foundation*)  
HE – hematoxylin-eosin (*Hematoxylin-Eosin*)  
IF – imunofluorescence (*Immunofluorescence*)  
Ig – imunoglobulin (*Immunoglobulin*)  
IgE – imunoglobulin E (*Immunoglobulin E*)  
IHC – imunohistochemie (*Immunohistochemistry*)  
IL1- $\alpha$  – interleukin 1- $\alpha$  (*Interleukin 1- $\alpha$* )  
IL1- $\beta$  – interleukin 1- $\beta$  (*Interleukin 1- $\beta$* )  
IL2 – interleukin 2 (*Interleukin 2*)  
IL6 – interleukin 6 (*Interleukin 6*)  
MGT – Massonův zelený trichrom (*Masson's Green Trichrome*)  
MPO – myeloperoxidáza (*Myeloperoxidase*)  
mRNA – mediátorová kyselina ribonukleová (*Messenger Ribonucleic Acid*)  
NAFLD – nealkoholická steatóza jater (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*)  
NFkB1 – podjednotka 1 jaderného faktoru kappa B (*Nuclear Factor Kappa B Subunit 1*)  
NPs – nanočástice (*Nanoparticles*)  
OSHA – Správa bezpečnosti a ochrany zdraví při práci (*Occupational Safety and Health Administration*)  
PAP – peroxidáza-anti-peroxidázový komplex (*Peroxidase Anti-Peroxidase Complex*)  
Pb – olovo (*Plumbum*)  
Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> – dusičnan olovnatý (*Lead II Nitrate*)  
Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs – nanočástice dusičnanu olovnatého (*Lead II Nitrate Nanoparticles*)



Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL – nanočástice dusičnanu olovnatého/čistící se skupina (*Lead II Nitrate Nanoparticles/Clearance Group*)  
PbO – oxid olovnatý (*Lead Oxide*)  
PbONPs – nanočástice oxidu olovnatého (*Lead Oxide Nanoparticles*)  
PCNA – jaderný antigen proliferujících buněk (*Proliferating Cell Nuclear Antigene*)  
PCR – polymerázová řetězová reakce (*Polymerase Chain Reaction*)  
PM – hmota pevných a kapalných částic v ovzduší (*Particulate Matter*)  
qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*)  
RNA – ribonukleová kyselina (*Ribonucleic Acid*)  
SC – kmenové buňky (*Stem Cells*)  
SOX2 – *Sex Determinant Region Y BOX 2*  
SOX9 – *Sex Determinant Region Y BOX 9*  
SR – Sirius red (*Sirius Red*)  
TEM – transmisní elektronová mikroskopie (*Transmission Electron Microscopy*)  
TB – Toluidinová modř (*Toluidine Blue*)  
UV záření – ultrafialové záření (*Ultraviolet Radiation*)  
WHO – Světová zdravotnická organizace (*World Health Organization*)

# 1 ÚVOD

Toxicita olova je známá již od dob antiky a jeho účinky na živé organismy byly popsány v mnoha studiích. Byly provedeny studie, ve kterých bylo olovo v různých formách inhalováno, injektováno do organismu či přidáváno do potravy (Dumková a kol., 2017; Dumková a kol., 2020a; Lebedová a kol., 2018; Sutunkova a kol., 2020; Minnema a Hammond, 1994; James a kol., 1985).

Díky stále vzrůstajícímu znečištění ovzduší se inhalace částic velmi malých rozměrů stala v současnosti významným a diskutovaným tématem. Malé částice o velikosti v řádech mikro- a nano- metrů představují vážné riziko, protože se díky svým miniaturním rozměrům snadno dostanou do organismu, kde dokáží snadno pronikat přes plasmatické membrány a pomocí krevního oběhu se tak dostat do celého těla (Kreyling a kol., 2010; Dumková a kol., 2016; Schleh a kol., 2011). Právě nanočástice těžkých kovů, jako jsou např. olovo, kadmium nebo zinek, vyskytující se ve zvýšené koncentraci ve velkých městech a průmyslových oblastech, představují nemalé zdravotní riziko dnešní doby (Li a kol., 2013; Nováková, 2015; Querol a kol., 2007).

V dříve provedených experimentech byly zkoumány účinky inhalace nanočástic oxidu olovnatého, tedy nerozpustných forem nanočástic olova na primární i sekundární orgány (Dumková a kol., 2017; Dumková a kol., 2020a). Olovo v rozpustné formě představuje zhruba třetinu celkového obsahu olova v ovzduší a účinky těchto rozpustných nanočástic olova na organismus dosud nebyly popsány. Pro náš inhalační experiment jsme proto vybrali nanočástice dusičnanu olovnatého, které se rozpustí ihned při interakci s povrchem sliznic (Coufalík a kol., 2016; Manousakas a kol., 2015; Mukhtar a Limbeck, 2013; URL 7).

Tato práce je součástí projektu s názvem „Centrum toxických studií nanočástic“, na kterém spolupracuje Ústav živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky, v.v.i., Ústav analytické chemie Akademie věd České republiky, v.v.i. a Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Projekt se zabývá toxickým vlivem inhalovaných aerosolů obsahujících kovové nanočástice na živé organismy.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Nanočástice a jejich význam

Nanočástice (NPs) jsou částice s alespoň jedním rozměrem v rozmezí 1–100 nm (předpona nano vznikla z řeckého slova nanos, v překladu trpaslík). V přírodě se NPs vyskytují běžně a v poměrně velkém množství, např. jako aerosol mořské soli, produkt sopečných erupcí, z přírodních požárů, jako částice vzniklé zvětráváním v pouštních oblastech, či zvětráváním zeminy z polí aj. Zajímavým příkladem je produkce nanočástic uhlovodíků stromy, jejichž přítomnost ve vzduchu může tvořit viditelný namodralý opar (The Great Smoky Mountains, USA) (Jeevanandam a kol., 2018; URL 1)

Částice s rozměry v řádech nanometrů mohou vznikat i lidskou činností. Můžeme je rozdělit do dvou kategorií: částice, které vznikly za konkrétním účelem, např. implementací do nějaké technologie, a částice, které vznikly jako vedlejší produkty průmyslových procesů. Obor, který se zabývá jejich generováním a použitím v technologiích a technologických postupech se nazývá nanotechnologie. Nanotechnologie má velký potenciál především ve zlepšování kvality ovzduší, vody a půdy, může významně přispět ke zlepšení kvality životního prostředí díky efektivnější detekci znečišťujících látek (Jeevanandam a kol., 2018).

Mezi nejvýznamnější zdroj nežádoucích NPs vzniklých v důsledku lidské činnosti patří provoz vozidel s benzínovým a naftovým pohonem, který je původcem 90 % NPs uhlíku na Zemi. Dalším významným zdrojem NPs je spalování fosilních paliv v uhelných elektrárnách, svařování, rafinace a tavení rudy, demolice budov nebo třeba i kouření (Jeevanandam a kol., 2018).

Podle archeologických nálezů byly NPs využívány již starověkými civilizacemi. Byly nalezeny nádoby dekorované jílovým, později i kovovým práškem obsahující NPs, či keramické výrobky vyztužené nanovláknem. Lidé ve starověkém Egyptě dokázali pomocí chemických procesů syntetizovat nanočástice sulfidu olovnatého, který využívali k barvení vlasů. Ve 14. a 13. století př. n. l. uměli Egypťané a Mezopotámci využít kovové NPs ke zhotovení skla. Ve 4. století n. l. Římané vyráběli za pomoci NPs zlata dichroické sklo. Další významný zdokumentovaný posun nastal až v roce 1857, kdy Michael Faraday poprvé popsal přípravu NPs. Během druhé světové války pak byly generovány NPs oxidu křemičitého, jež se používaly jako náhrady sazí do pryžových výztuží. NPs jsou využívány ve velké míře i dnes, kdy se vyskytují v mnoha produktech denní potřeby: v krémech, v šampónech, v zubních pastách atd. (Jeevanandam a kol., 2018; Heiligtag a Niederberger, 2013).

S vývojem společnosti a objevem nanotechnologie se množství nanočástic, především těch nežádoucích vzniklých v důsledku lidské činnosti, radikálně zvýšilo. Nanočástice představují vážné nebezpečí pro živé organismy, protože jejich vstup do organismu, především do dolních cest dýchacích je relativně snadný, a i nízké koncentrace mohou při dlouhodobé expozici způsobit fatální zdravotní komplikace (Bundschuh a kol, 2018; Jeevanandam a kol., 2018; Li a kol., 2013).

## 2.2 Využití olova v praxi

Olovo (Pb – *plumbum*) je chemický prvek s atomovým číslem 82. V periodické soustavě prvků se nachází ve skupině IV.A, v šesté periodě. Vyskytuje se s oxidačními čísly +2 a +4. Jedná se o měkký, světle šedý kov. Typickými vlastnostmi jsou kujnost, vysoká hustota, nízký bod tání a schopnost pohlcovat gama záření. Kvůli jeho toxicitě jej řadíme mezi těžké kovy (URL 2).

Jako prvek se v přírodě olovo vyskytuje zřídka, najdeme ho především ve formě nerostů, například jako galenit (sulfid olovnatý; PbS), cerusit (uhličitan olovnatý; PbCO<sub>3</sub>) či anglesit (síran olovnatý; PbSO<sub>4</sub>) (URL 2).

Znečištění olovem lze rozdělit na přírodní a nepřírodní. Přírodní znečištění může pocházet např. z lesních požárů nebo sopečných erupcí. Původcem nepřírodního znečištění olovem je lidská aktivita, především pak doprava a průmysl včetně výroby baterií, zpracování kovů, spalování uhlí aj. (Zhang a kol., 2015; URL 3; URL 4). Rozpustné částice olova ve vzduchu tvoří více než třetinu celkového množství olovnatých částic ve vzduchu (Mukhtar a Limbeck, 2013; Coufalík a kol., 2016; URL 3).

Jedním z největších problémů novodobé historie, co se expozice olovu týče, je olovnatý benzín. Benzín s přidaným tetraethylolovem byl na trh poprvé uveden v roce 1923. I přes mnohá varování o negativním vlivu na lidské zdraví (negativní účinky olova na živé organismy jsou známé mnoho set let) byl olovnatý benzín dále produkován. V první polovině 70. let bylo tetraethylolovo přidáváno prakticky do všech druhů benzínu po celém světě. Četné studie poukazující na negativní účinky tetraethylolova či olova obecně na zdraví a dále pak i zjištění, že olovo ničí katalyzátory výfukových plynů u automobilů, přispěly k plošným zákazům produkce olovnatého benzínu v mnoha státech světa (Landrigan, 2002).

Dnes je tetraethylolovo nahrazováno ferrocenem, avšak 20 % světové produkce benzínu olovo stále ještě obsahuje. Se zvyšující se frekvencí a dostupností letecké dopravy přibývá rovněž znečištění z leteckého olovnatého benzínu (Landrigan, 2002; Zhang a kol., 2015; URL 3; URL 4).

Olovo se do lidského těla může dostat několika cestami, přičemž mezi ty hlavní patří inhalace a dále pak prostřednictvím dermálního a gastrointestinálního systému. Olovo se do trávicího traktu dostává konzumací kontaminované vody (např. olovené potrubí) či potravy. Nebezpečí představují i zemědělské plodiny, které mohou být kontaminovány již během pěstování (voda, půda) či během jejich transportu (kontejnery) (Zhang a kol., 2015; URL 2).

Olovo bylo využíváno lidmi již ve starověku. Ve starověkém Římě byla z olova budována síť vodovodního potrubí, nádobí, mince atd., díky čemuž byly prokázány následky otravy olovem již v době Augusta Caesara (URL 2).

Otrava olovem může způsobit neurologické, jaterní, renální, hematologické, imunitní, reprodukční, vývojové, gastrointestinální i kardiovaskulární obtíže. Náchylnější k výše uvedeným problémům, zejména k těm neurologického charakteru, jsou děti. Provedené studie

prokázaly nižší IQ, problémy s učením, delší reakční dobu, hyperaktivitu, problémy s chováním aj. U plodu může vést expozice olovu matkou k fatálnímu poškození nervové soustavy, k předčasnému porodu či dokonce k jeho letalitě (Zhang a kol., 2015).

Olovo je i přes svoji stovky let známou toxicitu stále využíváno v relativně velké míře i dnes. V rámci světové zdravotnické organizace (WHO) byl stanoven limit olova v ovzduší na  $0,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . V USA, v rámci ochrany pracovníků v kovodělném průmyslu, Occupational Safety and Health Administration (OSHA) stanovila limit expozice olova na průměrně  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$  během osmihodinové směny (URL 5; URL 6).

## 2.3 Nanočástice olova a jejich toxicita

Nanočástice olova jsou důležitým elementem elektrochemického průmyslu, využívají se např. při výrobě fotocitlivých komponentů, optických zařízeních, polovodičů v LED diodách nebo při produkci mazacích olejů. Společně s novými možnostmi využití nanočástic olova v praxi, stoupá zároveň nebezpečí jejich působení na organismus a nebezpečí potenciální otravy olovem (Li a kol., 2013; Nováková, 2015).

Nanočástice a obecně jakékoliv částice olova v ovzduší představují velký zdravotní problém. Nejvíce zasažena jsou velká města a průmyslové oblasti, přičemž ke zhoršení situace dochází během zimních období. Koncentrace  $\text{PM}_{10}$  (particulate matter – částice menší než  $10 \mu\text{m}$ ) částic olova v těchto oblastech přesahuje  $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Querol a kol., 2007; Tan a kol., 2006).

Také v Brně byla provedena studie zabývající se složením  $\text{PM}_1$  (particulate matter – částice menší než  $1 \mu\text{m}$ ). Největší zjištěná koncentrace těchto olovnatých částic byla naměřena v zimě roku 2009 –  $0,265 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , i přesto však nepřesáhla stanovené limity WHO (Mikuška a kol., 2020).

Pro naši studii jsme vybrali nanočástice dusičnanu olovnatého. Dusičnan olovnatý  $[\text{Pb}(\text{NO}_3)_2]$  je anorganická sloučenina vyskytující se ve formě bezbarvé nebo bílé krystalické látky. Tato sloučenina byla produkována již od středověku, kdy sloužila jako základ pro barviva na textil. Kvůli toxicitě olova je jeho používání omežováno a tato sloučenina je postupně nahrazována jinými látkami (URL 7).

Přestože utilizace dusičnanu olovnatého je dnes minimální, zvolili jsme jej pro jeho vysokou rozpustnost – nanočástice dusičnanu olovnatého se ihned při interakci s povrchem sliznice rozpustí. Olovo ve formách rozpustných ve vodě totiž dle některých studií tvoří více než třetinu olovnatých částic v ovzduší. Dále jsme mohli porovnat vliv inhalace rozpustných nanočástic olova na cílové orgány s efektem inhalace nerozpustných nanočástic ve formě oxidu olovnatého ( $\text{PbO}$ ) (Coufalík a kol., 2016; Manousakas a kol., 2015; Mukhtar a Limbeck, 2013; URL 7).

## 2.4 Cílové orgány exponované inhalovaným nanočásticím

Orgány, na které se tato práce zaměřuje, jsou plíce a játra. Plíce představují primární orgán, jelikož s generovanými nanočásticemi dusičnanu olovnatého byly v přímém kontaktu a játra jsou pak sekundárním orgánem, který slouží jako tkáň podílející se významně na detoxikaci. Z dříve provedených studií je známo, že se inhalované nanočástice šíří pomocí krevního oběhu do celého těla (Dumková a kol., 2017; Dumková a kol., 2020a; Lebedová a kol., 2018), a proto jsme do naší studie zařadili i tento sekundární orgán.

### 2.4.1 Plíce (*pulmones*)

Plíce (*pulmones*) jsou párový elastický orgán, který je součástí respiračního aparátu, jenž zajišťuje výměnu krevních plynů mezi krví a vzduchem. V dutině hrudní (*cavum thoracis*) zaujímají plíce nejvíce místa, celková kapacita myších plic dosahuje objemu okolo 1 ml. Povrch plic je pokryt poplicnicí (*pleura visceralis*), dutina hrudníku je zevnitř pokryta pohrudnicí (*pleura parietalis*), tyto serózní blány se spojují v plicní brance (*hilus pulmonis*), kde zároveň do plic vstupují průdušky (*bronchi*), nervy, krevní a mízní cévy. Prostor mezi poplicnicí a pohrudnicí se nazývá pohrudniční dutina (*cavum pleurae*) a je vyplněna tekutinou (Balko a kol., 2017; Ruberte a kol., 2017).

Stejně jako levá lidská plíce je i myší levá plíce (*pulmo sinister*) menší než pravá. Na rozdíl od člověka, jehož levá plíce se dělí na dva laloky, je ale levá myší plíce jednolaločná. Pravá myší plíce (*pulmo dexter*) se dělí na čtyři laloky: *lobus cranialis*, *lobus medius*, *lobus caudalis*, *lobus accessorius*, zatímco pravou lidskou plíci tvoří celkem tři laloky. V plicích nalezneme dva krevní oběhy: funkční (*vasa publica*), jehož účelem je přívod krve pro výměnu plynů a odvod okysličené krve do srdce, a nutritivní (*vasa privata*), který má za úkol vyživovat průduškové a plicní tkáně (Ruberte a kol., 2017; Harkema a kol., 2012).

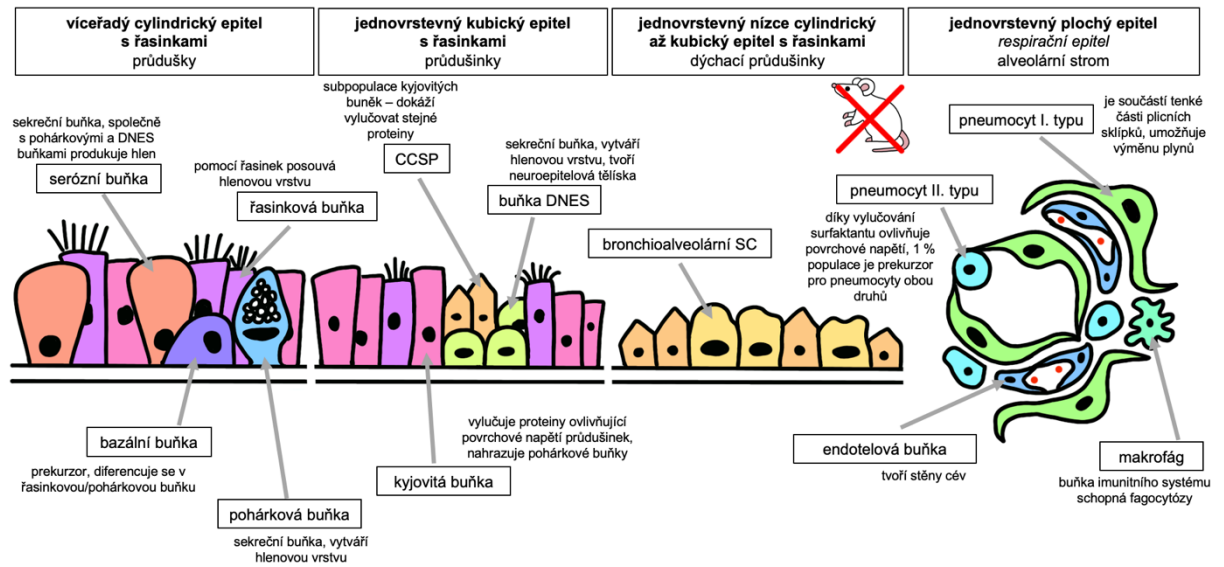
#### 2.4.1.1 Průduškový strom (*arbor bronchalis*)

Průduškový strom začíná rozdělením průdušnice (*trachea*) na levou a pravou hlavní průdušku (*bronchi principales*). Hlavní průdušky se rozdělují do lalokových průdušek (*bronchi lobares*), přivádějících vzduch do jednotlivých plicních laloků (viz výše). Lalokové průdušky se dělí dále na segmentové průdušky (*bronchi segmentales*), které se rozdělí na průdušinky (*bronchioli*), tvořící další úroveň rozvětvení až do konce průduškového stromu. Průduškový strom končí koncovými průdušinkami (*bronchioli terminales*) (Balko a kol., 2017).

#### 2.4.1.2 Sklípkový strom (*arbor alveolaris*)

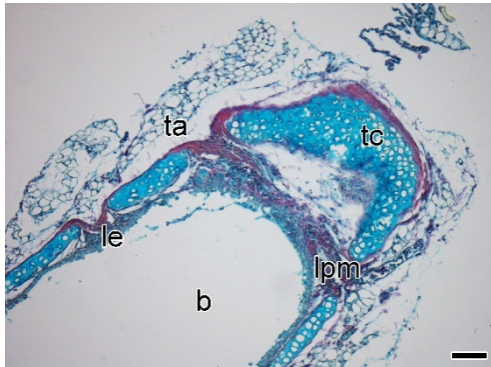
Sklípkový strom lidských plic začíná dýchacími průdušinkami (*bronchioli respiratorii*), které se dále větví do sklípkových chodbiček. Myš ale dýchací průdušinky nemá, koncové průdušinky se větví přímo do sklípkových chodbiček (*ductus alveolares*), jež se otevírají do sklípkových váčků (*sacculi alveolares*). Terminální jednotkou plic jsou plicní sklípky (*alveoli pulmonis*) (Balko a kol., 2017; Ruperte a kol., 2017).

### 2.4.1.3 Mikroskopická stavba plic



**Obrázek 1.** Schéma epitelů plicní tkáně (upraveno podle Wong a kol., 2009 a Balko a kol., 2017). V plicích se vyskytují čtyři základní uspořádání epitelu. Víceřadý cylindrický epitel s řasinkami se nachází v průduškách a skládá se z bazálních, pohárkových, serózních, řasinkových a kyjovitých buněk. Jednovrstevný kubický epitel s řasinkami, tvořený kyjovitými buňkami, buňkami DNES, CCSP a řasinkovými buňkami, s postupným rozvětčováním průduškového stromu nahrazuje víceřadý cylindrický epitel. Najdeme jej na úrovni bronchiolů. Jednovrstevný nízký cylindrický až kubický epitel s řasinkami se nachází v dýchacích průdušinkách, které ale myš, modelový organismus této práce, nemá. Je tvořen bronchioalveolárními kmenovými buňkami (SC – stem cells) a buňkami CCSP (subpopulací kyjovitých buněk). Jednovrstevný plochý epitel, také známý pod názvem respirační epitel, je terminální mikroskopickou jednotkou plic, ve které probíhá samotná výměna plynů. Nachází se v alveolárním stromě a jeho součástí jsou pneumocyty I. a II. typu, endotelové buňky a makrofágy.

Stavba průdušek je téměř identická se stavbou průdušnice, liší se tvarem a velikostí chrupavek. Hyalinní chrupavka v průdušnici tvoří neúplné prstence, v průduškách (obr. 3D) se tyto neúplné prstence (obr. 2) zmenšují a s pokračujícím rozvětčováním se podíl chrupavky snižuje, tvoří pouze ostrůvky a postupně je nahrazována hladkou svalovinou, umožňující snadné roztažení a stažení při nádechu a výdechu. Vnější vrstvou průdušek je adventicie (*tunica adventitia*) (obr. 3D), spojující průdušky s okolní plicní tkání. Vnitřní vrstvu průdušek pokrývá víceřadý cylindrický epitel tvořený serózními, bazálními, řasinkovými, pohárkovými a kyjovitými buňkami (obr. 1) (Balko a kol., 2017; Denney a Ho, 2018; Kobayashi a Tata, 2018; McInnes, 2014; Ruperte a kol., 2017; Wong a kol., 2009).



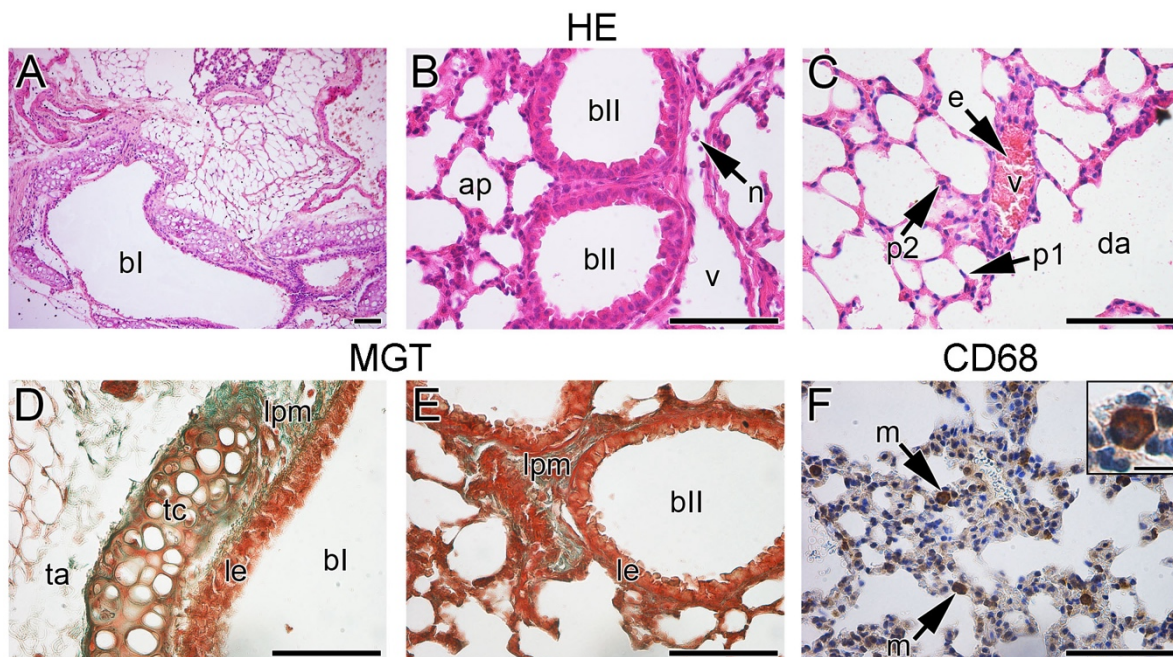
**Obrázek 2.** Podkovovitá chrupavka v průdušce vyšší úrovně. **b** – průduška (*bronchus*); **le** – epitelová vrstva (*lamina epithelialis*); **lpm** – vrstva z řídkého kolagenního vaziva (*lamina propria mucosae*); **ta** – adventicie (*tunica adventitia*); **tc** – hyalinní chrupavka (*textus cartilagenius*). Měřítko 100  $\mu$ m. Obarveno pomocí Sirius Red (SR). Kolagenní vazivo je vizualizováno červeno-růžově, chrupavka je zabarvena světle modře, ostatní struktury jsou tmavě modré.

Průdušinky (obr. 3E) se skládají z obdobných vrstev jako průdušky, ale neobsahují hyalinní chrupavku, kolagenní vazivo a hladká svalovina se vyskytuje ve větší míře, stavba epitelu je rovněž odlišná – v průdušinkách nalezneme jednovrstevný kubický epitel s řasinkami, tvořený řasinkovými, kyjovitými, CCSP a DNES buňkami (obr. 1) (Balko a kol., 2017; Denney a Ho, 2018; Kobayashi a Tata, 2018; McInnes, 2014; Ruperte a kol., 2017; Wong a kol., 2009).

Dýchací průdušinky, které u myši nejsou vyvinuty, jsou součástí alveolárního stromu. Stavbu podobnou průdušinkám narušují místy se vyklenující plicní sklípky. Jednovrstevný nízký cylindrický až kubický epitel s řasinkami je tvořen především bronchioalveolárními kmenovými buňkami (SC) a CCSP buňkami, řasinek postupně s rozvětčováním ubývá (obr. 1). *Lamina propria mucosae* je složena především z řídkého kolagenního vaziva, hladká svalovina se vyskytuje spíše ojediněle (Balko a kol., 2017; Denney a Ho, 2018; Kobayashi a Tata, 2018; Wong a kol., 2009).

Plicní sklípky jsou tvořeny jednovrstevným plochým epitelem (známý také jako respirační epitel) (obr. 1, obr. 3C). Respirační epitel je tvořen pneumocyty I. a II. typu. Pneumocyty I. typu zajišťují společně s hustou sítí vlásečnic výměnu kyslíku a oxidu uhličitého při dýchání (obr. 3C – p1, p2), pneumocyty II. typu vylučují látky, jež jsou součástí surfaktantu, sloučeniny ovlivňující povrchové napětí plicních sklípků. Mezi sklípkové přepážky (*septa interalveolaria*) oddělují epitel jednotlivých plicních sklípků. Pro vyrovnání tlaku jsou plicní sklípky propojeny Kohnovými póry (*pori septales*) (Balko a kol., 2017; Denney a Ho, 2018; Kobayashi a Tata, 2018; Wong a kol., 2009).





**Obrázek 3.** Mikroskopická stavba plic. **A** – Průduška (bl) obklopená sítí sklípkových chodbiček, váčků a plicních sklípků (**B**, ap). Obarveno pomocí Hematoxylinu-eosinu (HE). Jádra jsou zbarvena fialově, cytoplasma růžově. **B** – Průdušinky (bII); céva (v), ve které vidíme neutrofilní granulocyty (n). Obarveno pomocí Hematoxylinu-eosinu (HE). Jádra jsou zbarvena fialově, cytoplasma růžově. **C** – Sklípkové chodbičky (da) přecházejí do plicních sklípků (ap). Mezi plicními sklípkými probíhá hustá síť vlásečnic (v), která zajišťuje, společně s pneumocyty I. typu (p1), výměnu plynů při dýchání. Na snímku můžeme ve vlásečnicích pozorovat červené krvinky (e), dále můžeme pozorovat také pneumocyty II. typu (p2). Obarveno pomocí Hematoxylinu-eosinu (HE). Jádra jsou zbarvena fialově, cytoplasma růžově. Erytrocyty v cévě jsou zbarveny červeně. **D** – Epitelovou vrstvu (le) průdušek (bl) tvoří víceřadý cylindrický epitel, jehož součástí je velké množství pohárkových a řasinkových buněk. Dále se zde nachází vrstva řídkého kolagenního vaziva a hladké svaloviny (lpm). Průdušky jsou vyztuženy hyalinní chrupavkou (tc). Tyto vrstvy spojuje s okolní tkání adventicie (ta). **E** – Epitelová vrstva (le) průdušinek (bII) je tvořena jednovrstevným kubickým epitelem s typickými kyjovitými buňkami. Vrstva hladké svaloviny a řídkého kolagenního vaziva (lpm) je výrazná. Vrstva adventicie (ta) spojuje s okolní tkání. Obarveno pomocí Massonova zeleného trichromu (MGT). Kolagenní vazivo je zbarveno zeleně, hladká svalovina červeně, buněčná jádra a cytoplasma jsou vizualizována hnědě. **F** – V plicích se často vyskytují makrofágy (m; detail ve výřezu, měřítko – 10 µm). Makrofágy detekovány pomocí nepřímé trojstupňové imunohistochemické metody a klastru diference 68 (CD68) a jsou obarveny hnědě. Negativní jádra jsou modrá, obarvena hematoxylinem. **ap** – plicní sklípky (*alveoli pulmonis*); **bl** – průdušky (*bronchi*); **bII** – průdušinky (*bronchioli*); **da** – sklípkové chodbičky (*ductus alveolares*); **e** – červená krvinka (*erythrocytus*); **le** – epitelová vrstva (*lamina epithelialis*); **lpm** – vrstva z řídkého kolagenního vaziva (*lamina propria mucosae*); **m** – makrofágy (*macrophagus*); **n** – neutrofilní granulocyt (*neutrophil*); **p1** – pneumocyty I. typu; **p2** – pneumocyty II. typu; **ta** – adventicie (*tunica adventitia*); **tc** – hyalinní chrupavka (*textus cartilagenius*); **v** – sinusoida (*vas capillare*). Měřítka – 100 µm, měřítko výřezu – 10 µm.

#### 2.4.1.4 Kmenové/progenitorové buňky v plicích dospělých jedinců

Úlohou kmenových/progenitorových buněk (SC) je nahrazování starých či poškozených plicních buněk pro udržení fyziologické struktury tkání (URL 8).

V plicích se nachází dva typy těchto buněk, přičemž jeden typ se vyskytuje v alveolárních oblastech (oblasti, kde probíhá výměna plynů při dýchání), druhý se nachází v oblastech bronchiálních. Mezi SC plic patří bronchiální bazální buňky, kyjovité buňky, buňky DNES a pneumocyty II. typu (Balko a kol., 2017; URL 8).

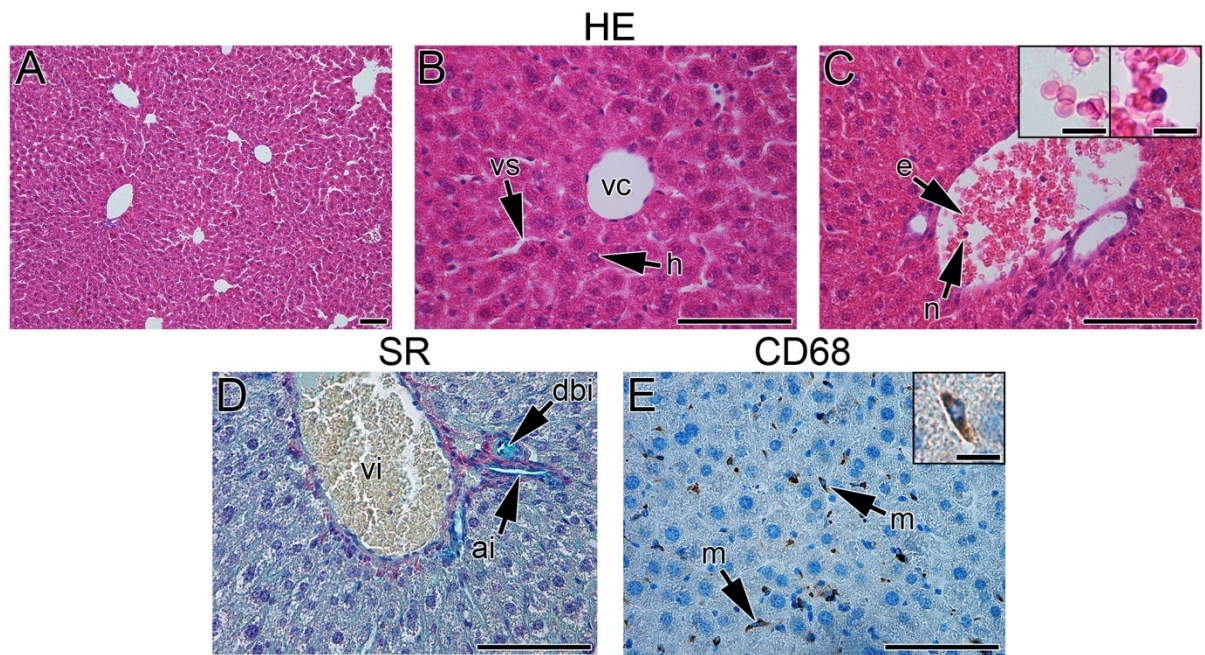
## 2.4.2 Játra (*hepar*)

Játra (*hepar*) jsou součástí trávicího traktu. Nachází se pod pravou brániční klenbou, jsou částečně chráněna žebry. Na povrchu jsou kryta pobřišnicí, s bránicí jsou spojena vazem. Pod serózou se nachází vazivové Glissonovo pouzdro (*capsula fibrosa hepatis Glissoni*), jehož trávce pronikají do jaterního parenchymu. Cévy, nervy a žlučovody do jater vstupují a vystupují jaterní brankou (*porta hepatis*). Jedná se o největší žlázu lidského těla. Funkcí jater je syntéza většiny bílkovin krevní plazmy, skladování vitaminů rozpustných v tucích (A, D, E, K) a železa, biotransformace odpadních látek metabolismu a xenobiotik, metabolismus cukrů, tuků i proteinů, tvorba žluči aj. (Balko a kol., 2017; Harkema a kol., 2012; Ruperte a kol., 2017).

Stejně jako člověk má i myš játra rozdělena na 4 laloky: 2 větší – pravý (*lobus dexter*) a levý (*lobus sinister*) a dva menší – ocasatý (*lobus caudatus*) a čtyřhranný (*lobus quadratus*). Na rozdíl od člověka jsou ale tyto laloky dále rozděleny: levý a pravý se dělí na mediální a laterální, z ocasatého laloku vybíhá *processus papillaris* a *processus caudatus*. Nejmenší čtyřhranný lalok není nijak dále rozdělen. V játrech, podobně jako v plicích, nalezneme dva krevní oběhy: funkční (*vasa publica*) a nutritivní (*vasa privata*) (Balko a kol., 2017; Harkema a kol., 2012; Ruperte a kol., 2017).

### 2.4.2.1 Mikroskopická stavba jater

Játra jsou tvořena z velké části jaterními buňkami. Hepatocyt je buňka polygonálního tvaru, s jedním či dvěma velkými kulatými jádry v centru buňky. V játrech jsou dále Kupfferovy buňky (jaterní makrofágy) (obr. 4E) či Itoovy buňky (Balko a kol., 2017).



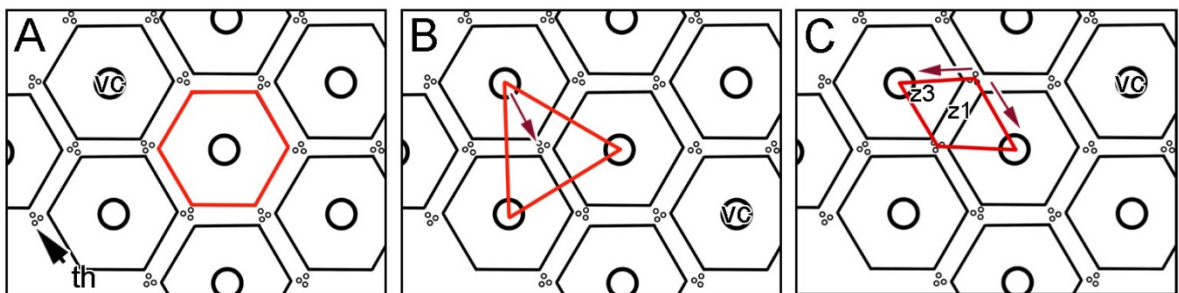
**Obrázek 4.** Mikroskopická stavba jater. **A** – V játrech se nachází hustá síť cév (vs). Stavba myších jater se od jiných živočichů liší tím, že klasický lalůček není jasně definován (např. vazivem). Vrcholy klasického lalůčku tvoří portální triády (th). Obarveno pomocí Hematoxylinu-eosinu (HE). Jádra jsou zabarvena fialově, cytoplasma růžově. **B** – Centrální žila (vc). Hepatocyty (h) jsou uloženy v trámčích, mezi kterými probíhají jaterní sinusoidy (vs). Obarveno pomocí Hematoxylinu-eosinu (HE). Jádra jsou zabarvena fialově, cytoplasma růžově. **C** – V cévě vidíme červené krvinky (e) (detail ve výřezu vlevo, měřítko – 10  $\mu$ m) a neutrofilní granulocyty (n) (detail ve výřezu vpravo, měřítko – 10  $\mu$ m). Obarveno pomocí Hematoxylinu-eosinu (HE). Jádra jsou zabarvena fialově, cytoplasma růžově. **D** – Portobiliární prostor (*trias hepatica*) se skládá z interlobulární žíly (vi), interlobulární tepny (ai) a interlobulárního žlučovodu (dbi). Obarveno pomocí Sirius Red (SR). Kolagenní vazivo je zbarveno červeno-růžově, chrupavka světle modře, ostatní struktury jsou tmavě modré. **E** – Jaterní makrofágy (m) se nazývají Kupfferovy buňky (detail ve výřezu, měřítko – 10  $\mu$ m). Kupfferovy buňky byly vizualizovány pomocí nepřímé trojstupňové imunohistochemické metody hnědě, jako marker byl použit CD68. Negativní jádra byla obarvena pomocí Hematoxylinu modře. **ai** – interlobulární tepna (*arteria interlobularis*); **dbi** – interlobulární žlučovod (*ductus bilifer interlobularis*); **e** – červená krvinka (*erythrocytus*); **h** – hepatocyt (*hepatocito*); **m** – Kupfferova buňka (*macrophagus*); **n** – neutrofilní granulocyt (*neutrophil*); **th** – portobiliární prostor (*trias hepatica*); **vc** – centrální žila (*vena centralis*); **vi** – interlobulární žíla (*vena interlobularis*); **vs** – sinusoida (*vas capillare*). Měřítko – 100  $\mu$ m, měřítko výřezů – 10  $\mu$ m.

Základní morfologickou jednotkou jater je jaterní lalůček (*lobulus hepaticus classicus*) (obr. 5A). Má tvar pravidelného šestiúhelníku. V jeho středu se nachází centrální žíla (*vena centralis*), do které teče krev ze sinusoid probíhajících podél hepatocytů, které jsou uspořádány do trámců směřujících od centrální žíly k okrajům lalůčku. Mezi sinusoidami a jednotlivými trámci hepatocytů najdeme Disseho prostor (*spatium perisinusoideum*). Obráceným směrem teče ve žlučových vlásečnicích žluč. Na vrcholech šestiúhelníku se nachází portobiliární vazivový prostor (*trias hepatica*) s trojicí struktur, které tvoří interlobulární tepna (*arteria interlobularis*), interlobulární žíla (*vena interlobularis*) a interlobulární žlučovod (*ductus bilifer interlobularis*) (Balko a kol., 2017).



Portální lalůček (*lobulus portalis*) (obr. 5B) je základní oběhovou jednotkou jater. Má tvar trojúhelníku, jehož vrcholy tvoří centrální žíly tří sousedících klasických lalůček a v jehož středu se nachází portální triáda (Balko a kol., 2017).

Jaterní acinus (*acinus hepaticus*) (obr. 5C) tvoří základní funkční jednotku jater. Má tvar kosočtverce, jehož vrcholy tvoří dvě portální triády a dvě centrální žíly. Tkáň této jednotky lze rozdělit do tří kategorií podle obsahu krve. Krev s nejvyšším množstvím kyslíku, živin a vstřebaným obsahem xenobiotik se nachází v krátké úhlopříčce, mezi portálními triádami, tvoří zónu I. Krev s nejnižším obsahem kyslíku, živin a xenobiotik se nachází na vrcholech krátké úhlopříčky, centrálních žil a tvoří zónu III. Zóna II. je přechodem první a třetí zóny (Balko a kol., 2017).



**Obrázek 5.** Jaterní lalůčky (upraveno dle Balko a kol., 2017). **A** – Klasický lalůček (*lobulus hepaticus classicus*) (červeně vyznačeno), má tvar šestiúhelníku. Jeho vrcholy tvoří portobiliární prostor (th), v jeho středu se nachází centrální žíla (vc). Krev teče podél jednotlivých hepatocytů. **B** – Portální lalůček (*lobulus portalis*) (červeně vyznačeno) má tvar trojúhelníku, jeho vrcholy tvoří centrální žíly sousedících klasických lalůček. Směr proudu krve je vyznačen fialově. **C** – Jaterní acinus (*acinus hepaticus*) (červeně vyznačeno) má na průřezu tvar kosočtverce, jehož vrcholy jsou dvě centrální žíly a dvě portální triády. Podle vlastností krve se jaterní acinus dělí na 3 zóny, ve schématu jsou vyznačeny zóna I (z1) a zóna III (z3), zóna II tvoří přechod mezi zónou I a III a nemá pevné hranice. Směr proudu krve je vyznačen fialovými šipkami. **th** – portální triáda (*trias hepatica*); **vc** – centrální žíla (*vena centralis*); **z1** – zóna I v jaterním acinu; **z3** – zóna III v jaterním acinu.

#### 2.4.2.2 Kmenové/progenitorové buňky v játrech dospělých jedinců

Kmenové/progenitorové buňky v játrech dospělých jedinců nebyly ještě detailně prozkoumány, ale důkaz o jejich přítomnosti existuje (Lagasse, 2007).

Ve studiích, kde byla játra modelových organismů poškozena a proliferační aktivita hepatocytů byla zastavena, byla detekována proliferace oválných buněk (oval cells). Jedná se o buňky oválného tvaru, které se diferencují v hepatocyty a nahrazují ztrátu či poškození jaterního parenchymu. Další experimenty prokázaly, že původ oválných buněk je v epitelu žlučovodu (Lagasse, 2007).

Za zdroj oválných buněk jsou považovány buňky nacházející se v tzv. Herringově kanálku, což je struktura, která spojuje intralobulární žlučovody, probíhající uvnitř jednotlivých trámčů, s interlobulárními žlučovody, probíhajícími v portobiliárních prostorech (Lagasse, 2007).

### 3 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce je posoudit vliv inhalace rozpustných nanočástic olova na mikroskopickou stavbu cílových orgánů (plic a jater), na jejich imunitní odpověď a následnou reparaci.

Dále byly stanoveny tyto dílčí cíle:

- provedení histopatologické analýzy cílových orgánů
- detekce kolagenních vláken v cílových orgánech
- určení úrovně proliferační aktivity cílových orgánů
- stanovení počtu a genové exprese vybraných markerů progenitorových buněk v cílových orgánech
- analýza imunitní odpovědi plic a jater
- určení exprese vybraných imunitních buněk
- determinace změn genové exprese vybraných prozánětlivých cytokinů a transkripčního faktoru NFkB1 souvisejících s imunitní odpovědí cílových orgánů

## 4 PRAKTICKÁ ČÁST

### 4.1 Modelový organismus

Modelovým organismem pro provedené experimenty byly samice myši laboratorní ICR (CD-1) (outbrední linie), s průměrnou hmotností do 24 g, 6–8 týdnů staré.

Veškeré experimenty byly provedeny v souladu s etickým zákonem Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AVČR, v.v.i. a se schválením komise pro laboratorní zvířata (no. 81/2010; 29. 3. 2010).

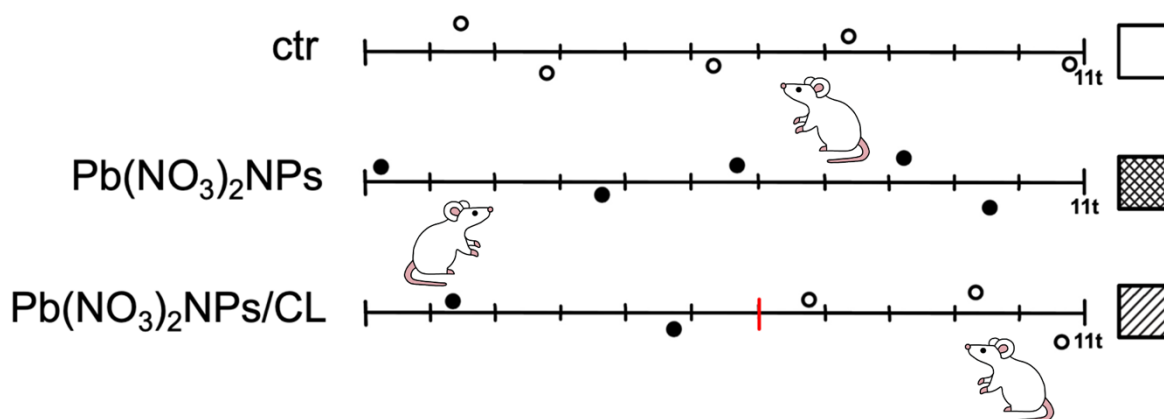
### 4.2 Generování nanočástic

Generování  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  probíhalo ve spolupráci s Ústavem analytické chemie AVČR, v.v.i.

Nanočástice byly kontinuálně generovány pneumatickou atomizací 4mM roztoku dusičnanu olovnatého v nebulizátoru *in situ*. Generovaný roztok byl následně v sušící komoře smíchán s filtrovaným vzduchem. Nakonec byly generované nanočástice dusičnanu olovnatého zředěny proudem vzduchu. Průměrná hmotnostní koncentrace byla stanovena na  $68,6 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (P1).

### 4.3 Experimentální design

Pro experiment byly použity tři skupiny po pěti jedincích; jedna kontrolní (dále označována jako skupina ctr) a dvě exponované. Exponovaná skupina č. 1 [dále označována jako skupina  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$ ] inhalovala rozpustnou formu nanočástic olova [ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$ ] po dobu 11 týdnů, 24 hodin denně, 7 dní v týdnu. Exponovaná skupina č. 2 [dále označována jako skupina  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$ ] inhalovala  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  po dobu 6 týdnů, 24 hodin denně, 7 dní v týdnu, poté 5 týdnů vzduch bez obsahu generovaných  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$ . Kontrolní skupina myši inhalovala 11 týdnů vzduch bez generovaných nanočástic (obr. 6).



**Obrázek 6.** Experimentální design. Inhalace proběhla u tří skupin po pěti modelových jedincích. Kontrolní skupina inhalovala po dobu jedenácti týdnů vzduch bez generovaných nanočástic. Ve výsledcích provedených analýz je tato skupina označována bílým vzorem.  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupina inhalovala po dobu jedenácti týdnů vzduch s obsahem generovaných nanočástic. Ve výsledcích provedených analýz je tato skupina označována křížkovým vzorem.  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs/CL}$ , skupina s eliminačním obdobím, inhalovala po dobu šesti týdnů vzduch s obsahem generovaných nanočástic a následně pět týdnů vzduch bez generovaných nanočástic (na časové ose je bod oddělující inhalaci vzduchu s generovanými nanočásticemi vyznačen červeně).  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs/CL}$  skupina je ve výsledcích provedených analýz označována vzorem s pruhy v šikmém směru.

#### 4.4 Inhalace rozpustných nanočástic olova

Týden před začátkem experimentů byli všichni jedinci ponecháni v laboratorních podmínkách za účelem aklimatizace. Po celou dobu inhalací bylo jedincům poskytováno krmivo a voda *ad libitum*.

Obě experimentální skupiny a kontrolní skupina byly umístěny do inhalační komory s inhalačními klecemi (obr. 7) se stálými podmínkami prostředí (udržovanými pomocí klimatizace), které byly nepřetržitě monitorovány. V inhalační komoře bylo 12 hodin světlo a 12 hodin tma. Zdravotní stav a chování jedinců byly kontrolovány pomocí kamerového systému.



**Obrázek 7.** Inhalační komora s inhalačními klecemi (foto Eva Svozilová, DiS., Ústav analytické chemie, AV ČR, v.v.i.)

## 4.5 Odběr a fixace vzorků

Po skončení inhalací byli všichni jedinci usmrceni pomocí cervikální dislokace v souladu s projektem pokusů a zákona 214/2011 dle vyhlášky č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat. Z každého jedince byly vypreparovány cílové orgány: plíce a játra.

Cílové orgány byly zváženy a následně byly vzorky:

1. Určené pro histologické zpracování umístěny do 10% paraformaldehydu a následně skladovány při teplotě 4 °C.
2. Určené pro analýzu genové exprese umístěny do tekutého dusíku a následně skladovány při teplotě -80 °C.

## 4.6 Histologické zpracování

Vzorky určené pro histologické zpracování byly následně po dobu 2 hodin promývány ve vodní lázni. Dalším krokem byly lázně ve vzestupné alkoholové řadě (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %), kde byly vzorky v každém roztoku ponechány po dobu dvou hodin. Následovaly tři lázně v xylenu po dvou hodinách pro projasnění. Nakonec byly vzorky třikrát prosyceny dvouhodinovými parafinovými lázněmi.

### 4.6.1 Příprava a krájení parafinových řezů

Správně orientované vzorky byly následně zality do parafinu o teplotě 56 °C. Po zatuhnutí (24 h) byl z parafinových bločků odstraněn přebytečný parafin tak, aby vznikl rovnoramenný lichoběžník s cílovým orgánem uprostřed a na rotačním mikrotomu byly nakrájeny řezy silné 5 μm. Nakrájené řezy byly poté napnuty na vodní hladině při teplotě 39 °C a umístěny na podložní sklíčka. Sklíčka byla nejprve umístěna na horké desce při teplotě 38 °C, poté přes noc v termostatu (37 °C). Takto připravené vzorky byly skladovány při teplotě 4 °C a následně dále zpracovávány (histologická barvení, imunohistochemické a imunofluorescenční metody).

### 4.6.2 Histologická barvení

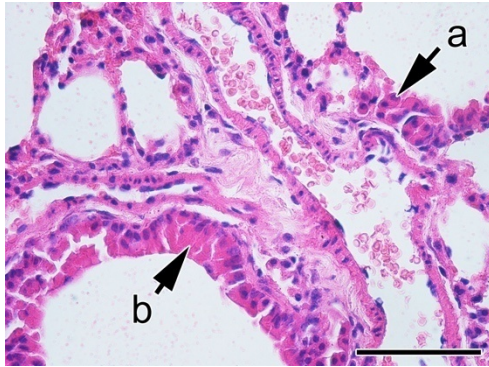
Histologická barvení byla využita pro rozlišení jednotlivých tkáňových komponent, přičemž jsme zapojili detekci přehlednými a specifickými barveními (Balko a kol., 2017; URL 9). Zatímco nám přehledná histologická barvení umožnila souhrnně obarvit celou tkáň, díky specifickým histologickým barvením bylo možné vizualizovat jednotlivé struktury.

#### 4.6.2.1 Hematoxylin-eosin

Toto barvení využívá dvě chemické látky: hematoxylin a eosin, kde hematoxylin obarvil fialově kyselé (basofilní) struktury jako jsou např. buněčná jádra a organely obsahující RNA a eosin růžově barvil zásadité (acidofilní) struktury, tedy např. cytoplasmu či buněčné stěny (URL 10).



**Postup:** Vzorky odparafinujeme pomocí dvou lázní v xylynu po 10 minutách. Následují dvě lázně v 96% alkoholu pro zavodnění tkáně, opět po 10 minutách. Poté barvíme Mayerovým hematoxylinem (P3) kyselé nebo bazofilní struktury 5 minut, následně opláchneme v teplé vodě a vzorky v ní necháme 5 minut modrat. Dále barvíme zásadité struktury 3 minuty v eosinu (P3), poté vzorky opláchneme ve studené vodě. Následují opět dvě desetiminutové lázně v 96% alkoholu pro odvodnění tkáně, oplach v xylynu a dvě lázně xylynu po 10 minutách pro projasnění. Nakonec vzorky zamontujeme. Výsledkem je modrofialové zbarvení kyselých a bazofilních tkání a růžovočervené zbarvení zásaditých a acidofilních tkání (obr. 8).

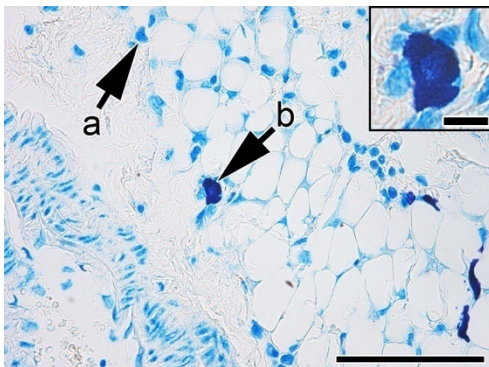


**Obrázek 8.** Histologické barvení Hematoxylin-eosin. **a** – Kyselé (bazofilní struktury) jsou fialové, obarvené Mayerovým hematoxylinem. **b** – Zásadité (acidofilní) struktury jsou růžové, obarvené eosinem. Měřítko – 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.6.2.2 Toluidinová modř

Toluidinová modř (TB) je bazické barvivo, které jsme využili pro detekci mastocytů (URL 9; URL 11).

**Postup:** Vzorky odparafinujeme ve dvou xylenových lázních po 10 minutách. Následně zavodníme tkáň pomocí sestupné alkoholové řady (100 %, 96 %, 70 %) a opláchneme v destilované vodě, každá lázeň po 5 minutách. Následuje lázeň v Toluidine Blue Working Solution (P3). Poté odvodníme tkáň dvěma rychlými oplachy v 96% a 100% alkoholu, projasníme ve dvou xylenových lázních a zamontujeme. Výsledkem je tmavě modré zbarvení žírných buněk a světle modré zbarvení jader (obr. 9).

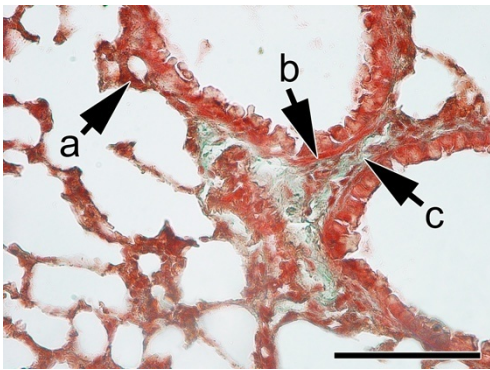


**Obrázek 9.** Specifické histologické barvení Toluidinová modř. **a** – buněčná jádra jsou obarvena světle modře, **b** – žírné buňky (detail; měřítko – 10  $\mu\text{m}$ ) jsou obarveny tmavě modře. Měřítko – 100  $\mu\text{m}$ , měřítko detailu – 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.6.2.3 Massonův zelený trichrom

Trichromová barvení jsou tvořena kombinací tří barev, přičemž v případě námi používaného Massonova zeleného trichromu (MGT) jsme jej využili pro obarvení kolagenních vláken v zeleném odstínu (URL 9).

**Postup:** Vzorky odparafinujeme ve dvou xylenových lázních po deseti minutách. Poté vzorky zavodníme ve dvou lázních v 96% alkoholu po deseti minutách. Následuje lázeň ve Weigertově hematoxylinu (tvořen reagensí A a B v poměru 1:1; P3), jenž obarví hnědě jádra. Vzorky rychle opláchneme v kyselém ethanolu (96% ethanol se třemi kapkami 36% kyseliny chlorovodíkové) a poté 5 minut ve vodě. Následuje barvení kyselým fuchsinem, trvajícím 5 minut, který obarví červeně svalovinu. Následně vzorky opláchneme 10 sekund v 1% kyselině fosfowolframové. Pro obarvení kolagenních vláken použijeme roztok světlé zeleně, ve kterém vzorky inkubujeme 6 minut. Nakonec vzorky opláchneme ve vodě, po uschnutí zamontujeme. Výsledkem je hnědé zbarvení buněčných jader a cytoplasmy, červené zbarvení hladké svaloviny a zelené zbarvení kolagenních vláken (obr. 10).

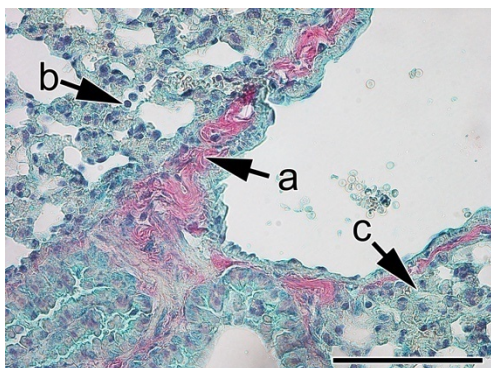


**Obrázek 10.** Specifické histologické barvení Massonův zelený trichrom. **a** – hnědé zbarvení buněčných jader a cytoplasmy. **b** – červené zbarvení hladké svaloviny. **c** – zelené zbarvení kolagenních vláken. Měřítko – 100  $\mu$ m.

#### 4.6.2.4 Sirius red

Sirius red (SR) je histologické barvení, které jsme použili pro přesnější detekci kolagenních vláken, které se barví červeně, zatímco buněčná jádra jsou tmavě modrého zbarvení.

**Postup:** Vzorky odparafinujeme ve dvou xylenových lázních po deseti minutách. Poté vzorky zavodníme pomocí dvou desetiminutových lázní v 96% alkoholu a třímínutové lázni v destilované vodě. Následuje desetiminutová lázeň v alcianové modři a desetiminutový oplach v teplé tekoucí vodě. Poté vzorky opláchneme v destilované vodě. Následuje dvoumínutová lázeň v Ehrlichově hematoxylinu, poté desetiminutový oplach v teplé tekoucí vodě. Vzorky poté opláchneme v destilované vodě. Následně vzorky na 10 minut umístíme do 2,5% kyseliny fosfomolybdenové. Následuje dvoumínutový oplach v destilované vodě. Poté vzorky 90 minut inkubujeme v tekutině Sirius red. Následují dvě múnutové lázně v 0,5% kyselině octové. Nakonec vzorky odvodníme dvěma lázněmi v 96% alkoholu po deseti minutách a projasníme dvěma lázněmi v xylenu po deseti minutách. Výsledkem je tmavě modré zbarvení buněčných jader, světle modře zbarvená cytoplasmata a červeno-růžově zbarvená kolagenní vlákna (obr. 11).

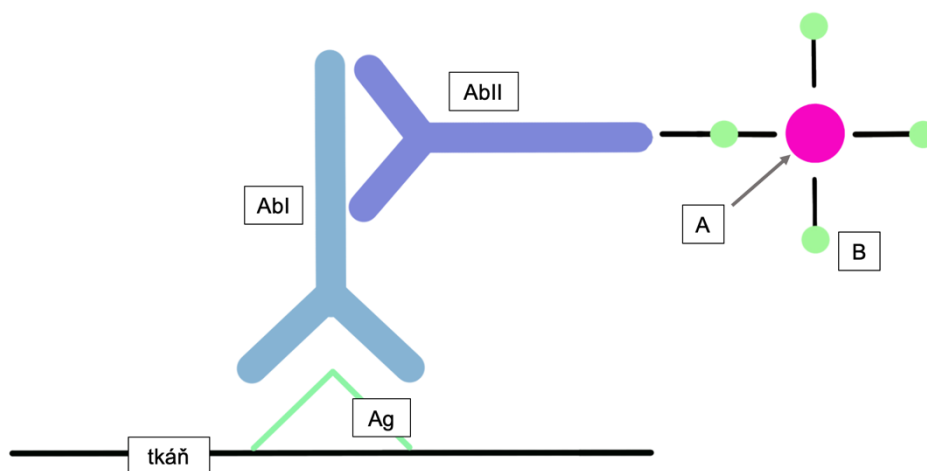


**Obrázek 11.** Specifické histologické barvení Sirius red. **a** – kolagenní vlákna jsou zbarvena červeno-růžově. **b** – buněčná jádra jsou zbarvena tmavě modře až fialově. **c** – cytoplasma je obarvena světle modře. Měřítko – 100  $\mu\text{m}$ .

## 4.7 Imunohistochemické metody

Imunohistochemie (IHC) je metoda, která nám umožnila detekci specifických antigenů v tkáních či v buňkách (SOX2, SOX9, Ki67, MPO, ...). V našich analýzách jsme využili tzv. metodu nepřímou dvouступňovou, kdy je primární protilátka proti detekovanému antigenu neoznačená a na primární protilátku je aplikována sekundární značená protilátka proti imunoglobulinům dárce AbI, čímž dochází k vizualizaci vzniklého komplexu (Beranová a Tonar, 2002).

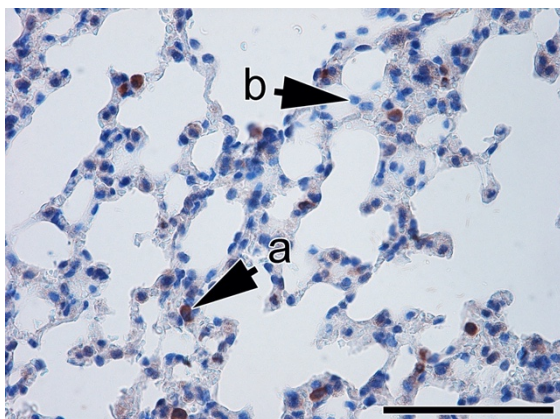
V naší práci byla využita nepřímá trojstupňová metoda, která se používá v případě nízké koncentrace molekul detekovaného antigenu v tkáni. Pro efektivnější vazbu protilátek v tkáních je nejdříve provedeno odhalení epitopů, tzv. pretreatment. Provádí se umístěním sklíček se vzorky zkoumané tkáně do horké lázně (zpravidla o teplotě 98°C) s citrátovým pufrem a následné chlazení v tomto pufru. Kroky vedoucí k odhalení epitopů lze dle potřeby a vlastností konkrétních protilátek libovolně upravovat. Primární protilátka je neznačená a v prvním kroku se naváže na specifický antigen. Na AbI se poté váže protilátka sekundární, která je připravena proti imunoglobulinům dárce AbI a jejíž součástí je neznačený komplex, který tvoří můstek mezi AbI a značeným komplexem. Na AbII můžeme aplikovat několik druhů značených komplexů, např. PAP (peroxidáza-anti-peroxidázový komplex), APAAP (alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza) nebo ABC (avidin-biotin komplex) (obr. 12). ABC využívá pevné neimunologické vazby avidinu, bílkoviny vaječného bílku, s biotinem, vitamínem H. Avidin má schopnost vázat až čtyři molekuly biotinu (Beranová a Tonar, 2002).



**Obrázek 12.** Schéma nepřímé trojstupňové IHC metody s využitím ABC komplexu. Primární protilátka (AbI) se specificky naváže na tkáňový antigen (Ag). Sekundární protilátka (AbII) se naváže na AbI proti imunoglobulinům dárce primární protilátky. Na AbII se nakonec naváže značený komplex, v případě této práce se jedná o avidin-biotin komplex, skládající se z avidinu (A) a biotinu (B). **A** – avidin (avidin); **AbI** – primární protilátka (primary antibody); **AbII** – sekundární protilátka (secondary antibody); **Ag** – antigen (antigen); **B** – biotin (biotin).

**Postup:** Skla s řezy zkoumané jaterní tkáně nejprve umístíme do termostatu (56 °C) s cílem řezy zafixovat a zabránit tak jejich možnému uvolnění v navazujících krocích. Následují dvě xylenové lázně k odparafinování. Poté vzorky zavodníme pomocí lázní v sestupné alkoholové řadě (100 %, 96 %, 70 %) a destilované vodě. Dalším krokem je lázeň v citrátovém pufru při teplotě 98 °C a následné chlazení. Délku těchto kroků lze upravovat dle potřeby a vlastností konkrétní protilátky. Poté vzorky opláchneme ve fosfátovém pufru, třikrát po třech minutách. Následuje lázeň v 3% peroxidu vodíku, jejíž délku lze opět upravit dle potřeby, poté znovu oplach ve fosfátovém pufru (třikrát tři minuty). Na takto připravené vzorky aplikujeme blokační sérum (z kitu; P3) ředěné ve fosfátovém pufru v poměru 15:1000, které necháme působit 20–30 minut. Následujícím krokem je aplikace primární protilátky, ředěné v DAKO diluentu (poměry jednotlivých protilátek v následujících kapitolách; P3). Následuje oplach ve fosfátovém pufru třikrát po 3 minutách. Nato aplikujeme sekundární protilátku (z kitu; P3), ředěnou v poměru 1:200 ve fosfátovém pufru, se kterou necháme vzorek inkubovat po dobu 30 minut. Poté vzorky znovu opláchneme ve fosfátovém pufru třikrát po 3 minutách a aplikujeme ABC roztok (z kitu; P3), ředěný ve fosfátovém pufru v poměru 1:1:100, připravovaný současně se sekundární protilátkou. Následuje oplach ve fosfátovém pufru, třikrát po 3 minutách. Konkrétní antigen vizualizujeme pomocí DAB substrátu (P3), který připravíme smícháním jedné kapky DAB+ chromogen s 1 ml DAB+ Substrate Buffer. Reakcí DAB substrátu s ABC se detekovaný antigen zbarví hnědě, reakci zastavíme ponořením vzorků do destilované vody. Následně dobarvíme buněčná jádra Mayerovým hematoxylinem (2 minuty), jehož výsledné modré zbarvení získáme desetiminutovým oplachem v tekoucí vodě. Vzorky odvodníme ve vzestupné alkoholové řadě (70 %, 96 %, 100 %), každá lázeň po 5 minutách a projasníme dvěma desetiminutovými lázněmi v xylenu. Sklíčka nakonec zamontujeme montovacím médiem. Výsledkem je hnědé zbarvení částí tkáně obsahující detekovaný antigen, modré zbarvení negativních jader hematoxylinem (obr. 13).





**Obrázek 13.** Imunohistochemická nepřímá trojstupňová metoda s využitím ABC komplexu. **a** – Pozitivní buňky jsou zbarveny hnědě. **b** – Jádra ostatních buněk jsou zbarvena hematoxylinem modře. Měřítko – 100  $\mu\text{m}$ . Obarveno s markerem klastr diferenciace 68 (CD68).

## 4.7.1 Použité markery

### 4.7.1.1 Ki67 – imunohistochemická metoda

Ki67 (z názvu města Kiel, kde byla protilátka poprvé produkována a čísla 67 – číslo klonu v 96jamkové destičce) je protein související s proliferační aktivitou. Ki67 je exprimován během aktivních fází buněčného cyklu – G<sub>1</sub>, S a G<sub>2</sub> fáze, ale také během mitózy. Protilátka Ki67 byla použita pro detekci proliferační aktivity (tab. 1; P3) (Scholzen a Gerdes, 2000).

**Tabulka 1.** Podrobné informace o postupu při detekci Ki67-pozitivních buněk s využitím imunohistochemické metody.

Citrátový pufr	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Blokovací sérum	Kit	Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
25'	15'	45'	králičí	1:50	přes noc

### 4.7.1.2 SOX2

SOX2 (SRY (Sex Determinant Region Y) BOX2) je významný transkripční faktor v pluripotentních kmenových buňkách, který v nich společně s OCT4 a Nanog reguluje genovou expresi a udržuje jejich pluripotenci. SOX2 je také nezbytný pro přirozenou morfogenezi a homeostázu tkání, mj. nervových kmenových buněk, kmenových buněk sítnice, chuťových pohárků či epitelu v průdušnici a plicích, kde je exprimován v průduškách a průdušinkách. Společně s geny SOX1 a SOX3 patří do rodiny SOXB1 genů, s nimiž sdílí až 80 % sekvence. Protilátka SOX2 byla použita pro detekci progenitorových buněk v plicích (tab. 2; P3) (Zhang a Cui, 2014; Tompkins a kol., 2011).

**Tabulka 2.** Podrobné informace o postupu při detekci SOX2-pozitivních buněk.

Citrátový pufr	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Blokovací sérum	Kit	Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
20'	10'	25'	králičí	1:100	1 h

### 4.7.1.3 Nanog

Nanog (pojmenován podle země věčného mládí, krásy, zdraví a radosti – Tír Na nÓg z irských legend) je důležitý transkripční faktor, hraje významnou roli při organogenezi během embryonálního vývoje, ale také během reparace poškozených tkání. Jakákoliv nerovnováha jeho hladiny může mít fatální následky (vývojové vady, neschopnost reparace tkání, rakovina).

Protilátka Nanog byla použita pro detekci progenitorových buněk v plicích (tab 3; P3) (Allouba a kol., 2015).

**Tabulka 3.** Podrobné informace o postupu při detekci Nanog-pozitivních buněk.

Citrátový pufr	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Blokovací sérum	Kit	Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
25'	10'	25'	králičí	1:100	1 h 30'

#### 4.7.1.4 MPO

Pro detekci neutrofilních granulocytů byla použita protilátka MPO (myeloperoxidáza) (tab. 4; P3). Myeloperoxidáza je enzym, který za přítomnosti peroxidů a halogenidů dokáže usmrtit některé mikroorganismy. MPO se také účastní mnoha extracelulárních procesů (Tobler a Koeffler, 1991).

**Tabulka 4.** Podrobné informace o postupu při detekci MPO-pozitivních buněk.

Citrátový pufr	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Blokovací sérum	Kit	Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
20'	10'	25'	králičí	1:100	1 h

#### 4.7.1.5 CD68

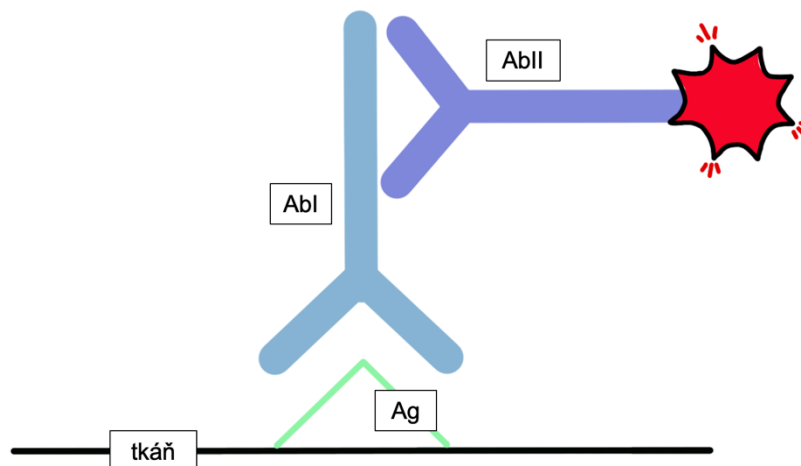
Pro detekci tkáňových makrofágů byl použit jimi vysoce exprimovaný membránový protein CD68 (Cluster of Differentiation 68) (tab. 5; P3). Tento protein je také exprimován krevními monocyty, lymfocyty, fibroblasty či endotelovými buňkami. Je důležitou součástí fagocytózy tkáňových makrofágů (URL 12).

**Tabulka 5.** Podrobné informace o postupu při detekci CD68-pozitivních buněk.

Citrátový pufr	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Blokovací sérum	Kit	Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
25'	8'	25'	králičí	1:100	1 h 30'

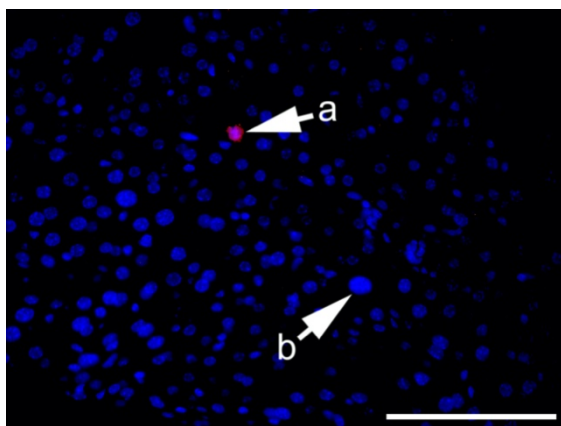
## 4.8 Imunofluorescenční metody

Imunofluorescence (IF) je histologická metoda využívající, stejně jako imunohistochemie, imunologickou vazbu protilátky ke specifickému antigenu v tkáních či buňkách, přičemž je (na rozdíl od imunohistochemických metod) primární/sekundární protilátka označena fluorochromem. Existuje imunofluorescenční metoda přímá a nepřímá. Při užití přímé metody se značená primární protilátka naváže na detekovaný antigen. Při použití nepřímé metody (obr. 14) je primární protilátka neznačená, naváže se na ni sekundární značená protilátka proti imunoglobulinům dárce AbI (Odell a Cook, 2013). Stejně jako u imunohistochemických metod je také u imunofluorescenčních metod pro efektivnější vazbu protilátek používán roztok na odhalení epitopů.



**Obrázek 14.** Schéma nepřímé imunofluorescenční metody. Primární protilátka (AbI) se specificky naváže na antigen (Ag) v tkáni. Na primární protilátku se poté naváže sekundární protilátka (AbII) (proti imunoglobulinům dárce AbI), která je značená. **AbI** – primární protilátka (primary antibody); **AbII** – sekundární protilátka (secondary antibody); **Ag** – antigen (antigen).

**Postup:** Vzorky odparafinujeme ve dvou xylenových lázních po 10 minutách a odvodníme pětiminutovými lázněmi v sestupné alkoholové řadě (100 %, 96 %, 70 %) a destilované vodě. Následuje lázeň v citrátovém pufru při teplotě 98 °C a poté chlazení, délky těchto kroků lze upravovat dle potřeby, záleží na vlastnostech konkrétní protilátky. Poté vzorky opláchneme ve fosfátovém pufru třikrát po 3 minutách. Následně na vzorky aplikujeme blokační sérum (z kitu; P3), zředěné ve fosfátovém pufru v poměru 15:1000, délku tohoto kroku lze opět upravovat dle potřeby. Následuje inkubace vzorků v primární protilátce (délka inkubace a ředění záleží na vlastnostech konkrétní protilátky). Přebytečnou primární protilátku opláchneme ve třech lázních ve fosfátovém pufru po třech minutách. Poté aplikujeme sekundární protilátku (z kitu; P3), ředěnou v poměru 1:200 ve fosfátovém pufru. Protože sekundární protilátka obsahuje fluorescenční značku, pracujeme ve tmě, sklíčka uchováváme v tmavém boxu a protilátku připravujeme v tmavé zkumavce. Následně opláchneme přebytečnou sekundární protilátku třemi lázněmi ve fosfátovém pufru po 3 minutách. Následuje aplikace montovacího média s DAPI, které barví jádra. Vzorek přikryjeme krycím sklíčkem a uchováváme ve tmě (výsledné zbarvení obr. 15).



**Obrázek 15.** Nepřímá imunofluorescenční metoda. **a** – Pozitivní buňky jsou v tomto případě zbarveny červeně (záleží na druhu sekundární protilátky). **b** – Jádra buněk jsou obarvena modře pomocí DAPI. Měřítko – 100  $\mu\text{m}$ . Obarveno s použitím markeru SOX9.

## 4.8.1 Použité markery

### 4.8.1.1 Ki67 – imunofluorescenční metoda

Protein Ki67, který je popsán v kap. 4.7.1.1, byl použit pro detekci proliferační aktivity (tab. 6; P3) také pomocí imunofluorescenční metody.

**Tabulka 6.** Podrobné informace o postupu při detekci Ki67-pozitivních buněk s využitím imunofluorescenční metody.

Citrátový pufr	Blokovací sérum	Kit	Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
25'	25'	králičí	1:50	přes noc

### 4.8.1.2 SOX9

SOX9 (SRY (Sex Determinant Region Y) BOX9) je transkripční faktor zásadní při diferenciaci chondrocytů, v embryonálním vývoji skeletu a plic. Je exprimován i v dospělosti – udržuje přirozenou homeostázu a proliferační aktivitu buněk. Protilátka SOX9 byla použita pro vizualizaci progenitorových buněk v játrech (P3) (Yan a kol., 2020; URL 13).

**Tabulka 7.** Podrobné informace o postupu při detekci SOX9-pozitivních buněk.

Citrátový pufr	Blokovací sérum	Kit	Koncentrace AbI	Doba inkubace AbI
25'	20'	králičí	1:100	přes noc

## 4.9 Analýza genové exprese

Z orgánů byla nejprve izolována mRNA, jež byla následně přepsána do cDNA. Exprese vybraných genů byla stanovena pomocí qPCR.

### 4.9.1 Izolace mRNA

Z vybraného vzorku, skladovaného při teplotě -80 °C, odebereme jeho malou část, cca 30 mg. Odebranou část dáme do zkumavky s 300 µl lyzačního roztoku. Lyzační roztok připravíme smícháním RLT pufru (P3) s β-Mercaptoethanolem v poměru 99:1. Obsah zkumavky homogenizujeme.

Následně do zkumavky přidáme 300 µl 70% EtOH, a centrifugujeme při 10 000 rpm po dobu 15 s. Vzniklý supernatant přeneseme na kolonku a centrifugujeme při 11 000 rpm po dobu 15 s. Přebytečnou tekutinu ve sběrné zkumavce vylijeme. Do kolonky přidáme 700 µl RW1 pufru (z kitu; P3) a centrifugujeme při 11 000 rpm po dobu 15 s. Tekutinu ze sběrné zkumavky opět vylijeme, do kolonky přidáme 300 µl RW1 a opět centrifugujeme při 11 000 rpm po dobu 15 s. Obsah sběrné zkumavky vylijeme. Do kolonky přidáme 500 µl RPE (z kitu; P3) a centrifugujeme při 11 000 rpm po dobu 15 s. Nasbíranou tekutinu vylijeme a zopakujeme předchozí krok. Přebytečnou tekutinu vylijeme a přidáme 500 µl RPE a 2 minuty centrifugujeme při 11 000 rpm, nasbíranou tekutinu vylijeme a vyměníme sběrnou zkumavku. Zbytky promývacích pufrů odstraníme centrifugací (14 000/1 min).



Kolonku přesuneme do nové zkumavky, přidáme do ní 25 µl DEPC vody a centrifugujeme při 10 000 rpm po dobu 15 s. Po skončení centrifugace kolonku vyhodíme, v nové zkumavce je vyzolovaná mRNA. Její koncentraci změříme na spektrofotometru. Získané vzorky uchovááme při teplotě -80 °C.

Celou dobu pracujeme rychle a na ledu. Pracovní povrchy ošetřujeme 70 % EtOH a přípravkem k eliminaci RNA kontaminace.

## 4.9.2 Reverzní transkripce

Mediátorová ribonukleová kyselina je kvůli její nestabilitě prepisována do cDNA. Tento proces se nazývá reverzní transkripce. Složení reakční směsi o celkovém objemu 20 µl vypočítáme takto:

$$x \text{ µl mRNA (500 ng/µl)} + 10 \text{ µl Master Mixu (P3)} + y \text{ l DEPC H}_2\text{O} = 20 \text{ µl}$$

Zkumavky s připravenou reakční směsí umístíme do Termocycleru, kde je inkubujeme po dobu 60 minut při 42 °C. Výslednou koncentraci cDNA určíme pomocí spektrofotometru, dle potřeby dále ředíme DEPC vodou. Vzorky uchovááme při teplotě -20 °C.

## 4.9.3 qPCR

Expres vybraných genů byla stanovena pomocí triplikátů každého vzorku na 96jamkové qPCR destičce. Expres testovaných genů byla normalizována k expresi „housekeeping“ genu, kterým byl aktin b (Actb). Objem jednoho triplikátu obsahoval 10 µl připravené směsi:

$$5 \text{ µl Master Mix (P3)} + 0,5 \text{ µl TaqMan (P3)} + 0,5 \text{ µl cDNA vzorku} + 4 \text{ µl DEPC H}_2\text{O}$$

Koncentrace cDNA se pro různé analýzy lišila v závislosti na optimalizaci protokolu.

Pro zabránění výparu se destička se vzorky přikryje fólií. Připravenou destičku umístíme do Lightcycleru Roche (tab.8). Počet cyklů a teplota se může měnit v závislosti na optimalizaci protokolu pro jednotlivé geny.

**Tabulka 8.** Přehled cyklů při qPCR.

preinkubační denaturace	1x 10 min při 95 °C	
amplifikace	45–50x	15 s při 95 °C
		60 s při 60/62 °C

Výsledky vyhodnocujeme pomocí  $\Delta\Delta\text{CT}$  metody (P1).

## 4.9.4 Markery použité pro analýzu genové exprese

### 4.9.4.1 Sox2

Sox2 (SRY (Sex Determinant Region Y) BOX2) byl vybrán jako gen důležitý pro pluripotenci buněk (Zhang a Cui, 2014; Tompkins a kol., 2011).

### 4.9.4.2 Sox9

Sox9 (SRY (Sex Determinant Region Y) BOX9) je gen podílející se na embryonálním vývoji skeletu, plic a na udržování homeostázy tkání (Yan a kol., 2020; URL 13).

### 4.9.4.3 Interleukin 1- $\alpha$

Interleukin-1 alfa (IL1- $\alpha$ ) je gen kódující prozánětlivý cytokin (endogenní pyrogen) z rodiny interleukinů 1. V případě zánětu jej produkují aktivované makrofágy a iniciuje se uvolňování interleukinu 2 (IL2), který spouští proliferaci T-lymfocytů, spouští dozrávání a proliferaci B-lymfocytů a aktivaci fibroblastového růstového faktoru (URL 14).

### 4.9.4.4 Interleukin 1- $\beta$

IL1- $\beta$  (Interleukin-1 beta) je gen kódující prozánětlivý cytokin (endogenní pyrogen) z rodiny interleukinů 1. Hraje důležitou roli v obranných mechanismech proti infekci a je exprimován v prekurzorech zhoubných nádorů (He a kol., 2011).

### 4.9.4.5 Interleukin 6

Interleukin 6 (IL6) je gen kódující prozánětlivý cytokin z rodiny interleukinů 6. Ovlivňuje imunitní odpověď či hematopoézu. Jeho deregulace je spojována s chronickými záněty a nádory hematopoetických a lymfoidních tkání (Hirano a Kishimoto, 1990).

### 4.9.4.6 NFkB1

NFkB1 (Nuclear Factor Kappa B Subunit 1) je gen kódující významný transkripční faktor, který je v případě zánětu aktivován a ovlivňuje expresi některých prozánětlivých cytokinů a chemokinů. Protein NFkB1 se běžně vyskytuje v cytoplasmě v neaktivní formě a při aktivaci se přesouvá do jádra, kde reguluje transkripci některých genů (Hunter a de Plaen, 2014).

## 4.10 Statistické vyhodnocení provedených analýz

Provedené analýzy byly statisticky zpracovány, jejich statistická významnost byla ověřována pomocí nepárového Studentova t-testu. Sloupce v grafech znázorňují průměrnou hodnotu jedinců, variabilita mezi jedinci je vizualizována pomocí směrodatné odchylky.

Při statistickém vyhodnocení kvantifikace pozitivních buněk a histopatologických změn byla použita data všech pěti jedinců (vj. Ki67), při statistickém vyhodnocení analýz genové exprese byl kvůli vysoké variabilitě či technickým odchylkám vyloučen jedinec s největší odchylkou (P1).

## 5 VÝSLEDKY

Inhalační experiment probíhal po dobu 11 týdnů. Kontrolní skupina myši inhalovala po celou dobu vzduch bez generovaných NPs.  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ NPs skupina naopak inhalovala po celou dobu vzduch s obsahem generovaných NPs. Poslední experimentální skupinou byla  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ NPs/CL skupina, která po dobu šesti týdnů inhalovala vzduch s obsahem generovaných nanočástic a následně pět týdnů vzduch bez generovaných nanočástic.

Cílovými orgány pro tento experiment byly plíce, centrum výměny plynů, a játra, centrum detoxikace.

Po analýze hmotnosti cílových orgánů (kap. 5.1) a po jejich dalším histologickém zpracování byla primárně provedena analýza histopatologických změn obou cílových orgánů (kap. 5.2). Pro podrobnější zkoumání byla vybrána dvě hlavní témata: reparace cílových orgánů (kap. 5.3) a imunitní odpověď cílových orgánů (kap. 5.4).

Reparační aktivita cílových orgánů byla zkoumána na základě hodnocení tří faktorů: přítomnost fibrózy, proliferační aktivita a exprese progenitorových buněk.

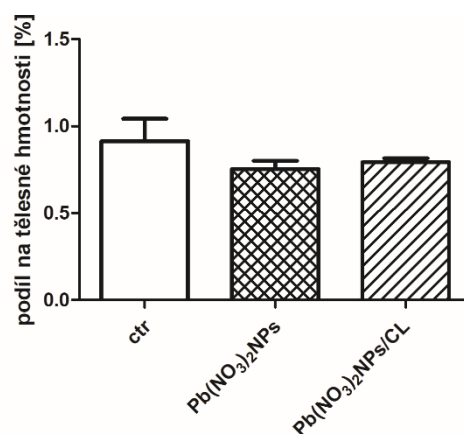
Pro analýzu imunitní odpovědi byly zvoleny markery některých imunitních buněk, dále pak prozánětlivé cytokiny a s nimi úzce související transkripční faktor NF $\kappa$ B1.

V předchozích experimentech byly předmětem výzkumu nanočástice oxidu olovnatého, tedy nerozpustné nanočástice olova (Dumková a kol., 2016; Dumková a kol., 2020a). Obdobný experimentální design (skupina s jedenáctitýdenní inhalací generovaných nanočástic a skupina s eliminačním obdobím, obdobná  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ NPs/CL skupině) nám tak umožnil porovnat rozdíly v odpovědi tkání na expozici rozpustnými a nerozpustnými nanočásticemi olova.

## 5.1 Změna hmotnosti cílových orgánů po inhalaci Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs

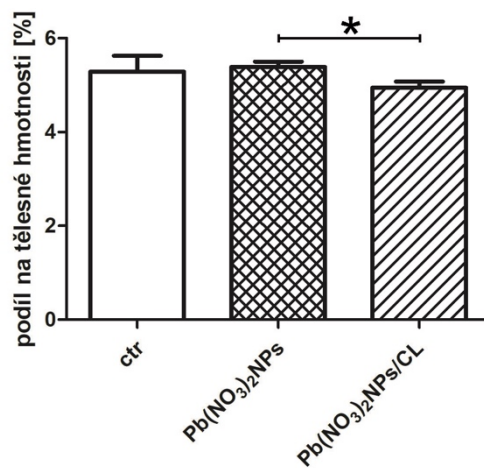
Cílové orgány byly zváženy ihned po odebrání, jejich hmotnost byla porovnána s celkovou tělesnou hmotností jedinců (P2).

Podíl hmotnosti plic na celkové tělesné hmotnosti (obr. 16) jedinců z Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupiny byl ve srovnání s kontrolní skupinou nižší ( $p > 0,05$ ), avšak statisticky nevýznamně. Nejnižší podíl byl zjištěn po aplikaci Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs, nejvyšší ve skupině kontrolní. U Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupiny byl podíl hmotnosti plic na tělesné hmotnosti oproti Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupině mírně, statisticky nesignifikantně ( $p > 0,05$ ), vyšší.



**Obrázek 16.** Podíl hmotnosti plic na celkové hmotnosti jedinců (P2). Nejvyšší průměrný podíl plic na tělesné hmotnosti byl zaznamenán u kontrolní skupiny, kde byla ovšem také nejvyšší variabilita. Podíly hmotnosti plic na tělesné hmotnosti jedinců z exponovaných skupin byly ve srovnání s kontrolní skupinou nižší ( $p > 0,05$ ).

V druhém cílovém orgánu, v játrech, byl rozdíl podílu hmotnosti jater na tělesné hmotnosti (obr. 7) mezi Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs a Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupinou signifikantní ( $* p < 0,05$ ). Nejvyšší podíl hmotnosti jater na tělesné hmotnosti byl detekován v Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupině, nejnižší v Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupině. Jiné statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami zaznamenány nebyly. Nejvyšší variabilita hmotnosti jater byla, stejně jako v případě plic, detekována v kontrolní skupině.



**Obrázek 17.** Podíl hmotnosti jater na celkové hmotnosti jedinců. Nejvyšší variabilita byla detekována v kontrolní skupině, stejně jako v plicích. Rozdíl podílu hmotnosti jater na tělesné hmotnosti mezi Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs a Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL byl statisticky významný (\*  $p < 0,05$ ). Jiné rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami nebyly statisticky významné ( $p > 0,05$ ).

## 5.2 Histopatologické změny po inhalaci $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$ v cílových orgánech

Nejprve byla provedena histopatologická analýza (P2) na vzorcích obarvených Hematoxylinem-eosinem.

### 5.2.1 Změny intenzity a rozsahu histopatologických změn v plicích

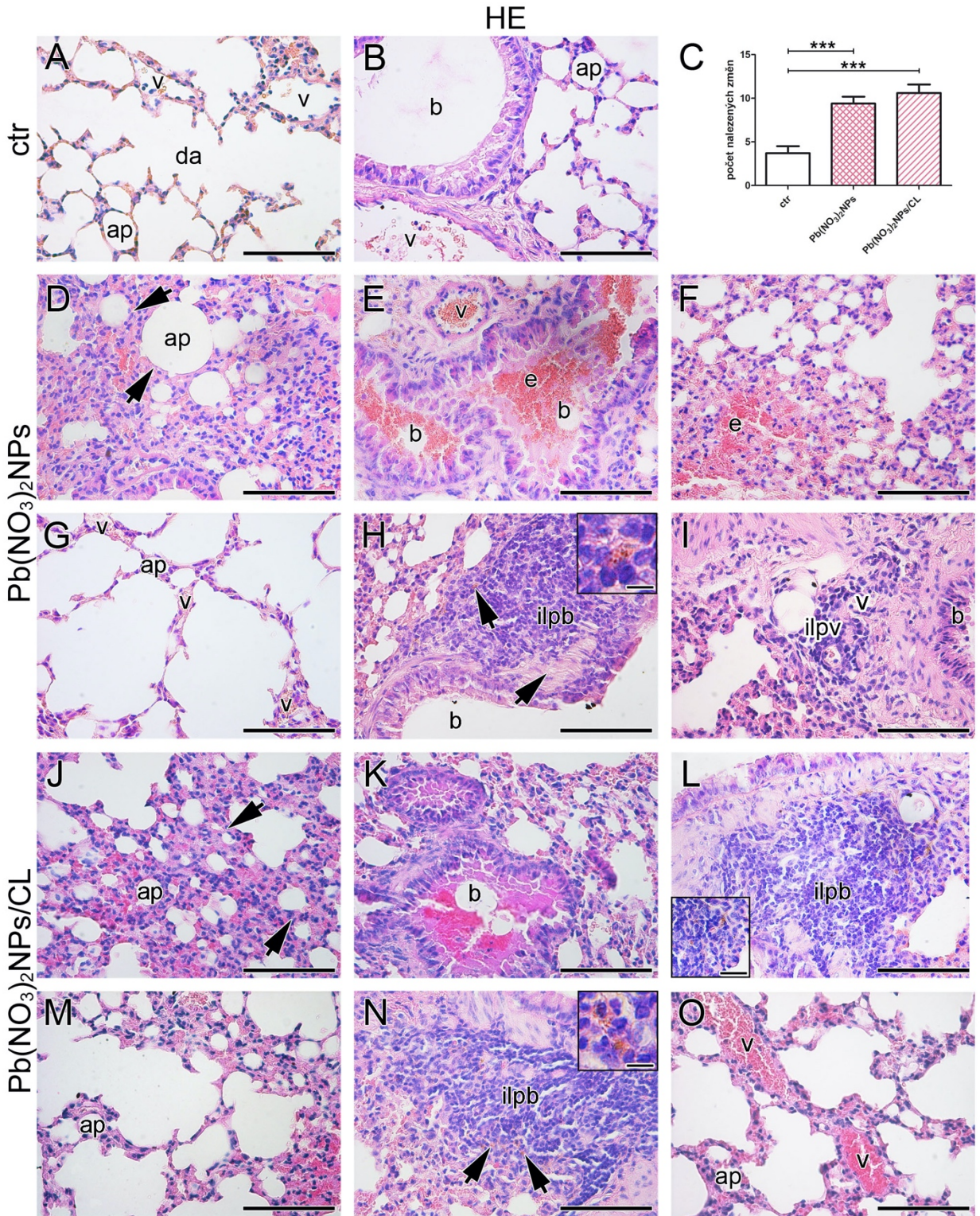
Plice kontrolních jedinců (obr. 18A,B) měly volně průchozí bronchioly bez zahlenění a krve, s nepoškozeným epitelem. Septa plicních sklípků byla bez ztlustění či morfologických změn (zvětšení, zmenšení). Cévy byly volně průchozí, bez známek poškození.

Ve vzorcích plic jedinců z exponovaných skupin byly oproti vzorkům z kontrolní skupiny nalezeny signifikantní histopatologické změny (obr. 18):

- Atelektáza (obr. 18D,J), tj. nevzdušnost plice či její části vedoucí ke snížení objemu plic, může mít malý, ale i fatální rozsah, který může vést ke kolapsu celé plice. Atelektáza se projevuje zvýšenou dušností a kašlem, ojediněle může být i bezpříznaková (Kritek, 2006).
- Hemoragie (krvácení) (obr. 18F) vzniká při poškození plicního parenchymu nebo endotelových buněk, někdy se vyskytuje u zánětů. Malé hemoragie se mohou objevit se selháváním srdce, jenž se projevuje výskytem siderofágů (makrofágů obsahující červené krvinky a hemosiderin) (URL 15).
- Hemostáza (obr. 18O) je proces, při němž dochází k hromadění krve v cévách či alveolech (Gentry a kol., 2008).
- Infiltráty imunitních buněk byly nalezeny okolo bronchů a bronchiolů (obr.18O) a také okolo cév (obr. 18I). Protože se jedná o chronický zánět, převažující složkou jsou leukocyty (URL 17).
- Ztlustění alveolárních sept (obr. 18F,J).
- Bronchiolitida (obr. 18E,K) se projevuje zánětem průdušinek a poškozením jejich epitelové vrstvy. Okolo průdušek a průdušinek se tvoří zánětlivý peribronchiolární infiltrát imunitních buněk a uvnitř vzniká hlen (Smyth a Brearey, 2006).
- Alveolární emfyzém (obr. 18G,M) je abnormální zvětšení vzdušného prostoru v plicích ve spojitosti s porušením jeho stěn. Plice ztratí svoji elasticitu a samotný proces dýchání je náročnější. Emfyzém se často objevuje zároveň s bronchiolitidou, tato kombinace chorob se nazývá chronická obstrukční plicní nemoc (COPD) (Agustí a Cosío, 2006; URL 16).
- V peribronchiolárních infiltrátech jsou také ojediněle ložiska hemosiderinu (obr. 18H,L,N). Jedná se o sloučeniny železa, proteinů a lipidů. Objevují se v případě nadměrné exprese železa a jejich přítomnost může doprovázet fibróza a další poškození tkání (Iancu, 1992; URL 21).

Počet histopatologických změn byl po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  v porovnání s kontrolní skupinou signifikantně vyšší (\*\*\*)  $p < 0,001$ ), a to v obou exponovaných skupinách. V  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$  skupině byl počet nalezených patologických změn i přes pětítýdenní eliminační období vyšší než v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině, avšak rozdíl nebyl statisticky významný ( $p > 0,05$ ).





**Obrázek 18.** Analýza histopatologických změn v plicích. **A, B** – Plice kontrolních jedinců bez signifikantních histopatologických změn. Plicní sklípky (ap) jsou flexibilní, jejich stavba není nijak porušena. Plice jsou vyživovány hustou sítí cév (v). Průdušky a průdušinky (b) jsou vzdušné, bez zahlenění či krve. **C** – Kvantifikace histopatologických změn v plicích (P2). Rozdíl mezi kontrolní a exponovanými skupinami byl statisticky signifikantní (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). **D, J** – Atelektáza, ztlustění septa plicních sklípků (ap). **E, K** – V průdušince (b) se nachází erythrocyty (e) a hlen. V kombinaci se zánětlivými infiltráty se jedná o bronchiolitidu. **F** – Hemoragie (H, G, N – detaily ve výřezech, měřítko  $-10 \mu\text{m}$ ). **G, M** – Alveolární emfyzém. **H, L, N** – Peribronchiolární infiltrát imunitních buněk (ilpb). **I** – Perivaskulární infiltrát leukocytů (ilpv). **O** – Hemostáza je rozeznatelná jako červeně vyplněná céva. Všechny histologické řezy byly obarveny pomocí Hematoxylinu-eosinu (HE). Jádra jsou zbarvena fialově, cytoplasma růžově, erythrocyty červeně. **ap** – plicní sklípek (*alveolus pulmonis*); **b** – průdušinka (*bronchiolus*); **da** – alveolární chodbička (*ductus alveolaris*); **e** – červená krvinka (*erythrocytus*); **ilpb** – peribronchiolární infiltrát leukocytů; **ilpv** – perivaskulární infiltrát leukocytů; **v** – céva (*vas*). Měřítko –  $100 \mu\text{m}$ , měřítko výřezů –  $10 \mu\text{m}$ .

## 5.2.2 Změny intenzity a rozsahu histopatologických změn v játrech

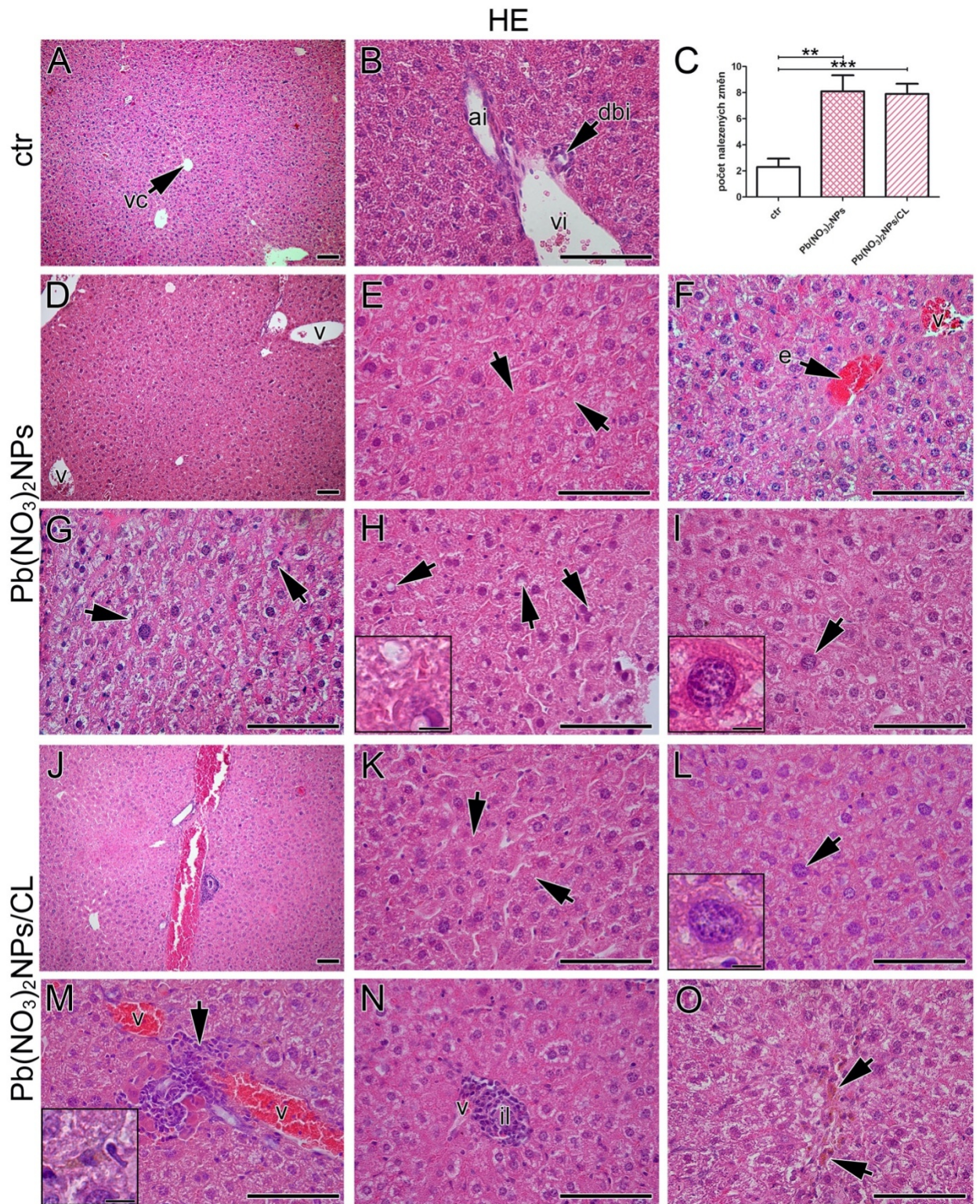
V játrech kontrolních jedinců (obr. 19A,B) byly nalezeny pouze minimální histopatologické změny. Celková struktura jater byla pravidelná, hepatocyty byly bez poškození (bez hypertrofie, dystrofie, megakaryocytů aj.).

V játrech byly po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  nalezeny tyto histopatologické změny:

- Remodelace trámčitého epitelu (obr. 19D,J).
- Hepatická hypertrofie (obr. 19E,K) je charakteristická zvětšenými hepatocyty. Vzniká sekundárně po expozici xenobiotikům. Nejčastěji se nachází v centrální části jater (URL 18).
- Dystrofie (obr. 19G) hepatocytů je typická úbytkem buněčné hmoty.
- Karyomegalie (obr. 19I,L) se projevuje zvětšenými jádry hepatocytů. Společně s buněčným jádrem se zvětšuje také objem cytoplasmy (URL 20).
- Steatóza (obr. 19H) je způsobena ukládáním tuku (URL 19).
- Infiltráty imunitních buněk (obr. 19N) byly nalezeny v jaterním parenchymu, ale také okolo cév a portobiliárního prostoru. Protože se jedná o chronický zánět, převažující složkou byly lymfocyty.
- Fokální nekróza (obr. 19M), označována také jako buněčná smrt větší skupiny hepatocytů, byla nalezena v obou exponovaných skupinách. Její zvýšená přítomnost společně s jejím nemalým rozsahem je důsledkem závažného poškození (Krishna, 2017).
- Hemostáza (obr. 19F,M) je mechanismus, při kterém dochází k hromadění krve v cévách (Gentry a kol., 2008).
- Ojedinele byla zaznamenána také přítomnost ložisek hemosiderinu (obr. 19M,O).

Rozsah nalezených histopatologických změn (obr. 19C; P2) byl v obou exponovaných skupinách oproti kontrolní skupině statisticky významně vyšší (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Na rozdíl od plic byl ale počet nalezených patologických změn v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs/CL}$  skupině oproti  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  mírně, statisticky nevýznamně, nižší.





**Obrázek 19.** Analýza histopatologických změn v játrech. **A** – Játra kontrolních jedinců jsou téměř bez histopatologických nálezů. Hepatocyty jsou okolo centrální žíly (vc) uloženy v pravidelných trámčích. **B** – Portální triáda v játrech kontrolních jedinců. Portobiliární prostor se skládá z interlobulární žíly (vi), interlobulární tepny (ai) a interlobulárního žlučovodu (dbi). **C** – Kvantifikace histopatologických změn v játrech (P2). Mezi kontrolní a Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupinou a také kontrolní a Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupinou byl zaznamenán statisticky významný rozdíl (\*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001). Počet nalezených patologických změn byl v Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupině v porovnání s Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupinou, na rozdíl od výsledků histopatologické analýzy v plicích, nižší. **D, J** – Játra jedinců z exponovaných skupin. Oproti kontrolní skupině nebyla struktura jater pravidelná, hepatocyty nejsou uspořádány v pravidelných trámčích. Počet nalezených patologických změn je statisticky významně vyšší než v kontrolní skupině. **E, K** – Hepatická hypertrofie. **F** – Hemostáza. V histologickém řezu poznáme cévu, ve které probíhá hemostáza jako červeně vyplněnou cévu. **G** – Hepatická dystrofie. **H** – Steatóza jater v raném stádiu. Na fotografii (detaily ve výřezu, měřítko – 10 μm) lze pozorovat drobné tukové kapénky. **I, L** – Karyomegalie, nález zvětšených jader hepatocytů (detaily ve výřezích, měřítko – 10 μm). **M** – Fokální nekróza. Na fotografii se fokální nekróza (šipka) nachází mezi dvěma cévami (v). Odumřelé buňky mají viditelně odlišnou růžovou barvu cytoplasmy a jinou strukturu, a nachází se po okrajích skupiny fialově obarvených imunitních buněk. Detail ve výřezu (měřítko – 10 μm) ukazuje hemosiderin. **N** – Infiltrát leukocytů (il). **M, O** – Hemosiderin (ve výřezích, měřítko – 10 μm). Na snímcích je zbarven světle hnědě. Všechny histologické řezy na fotografiích byly obarveny pomocí Hematoxylinu-eosinu (HE). Jádra jsou zbarvena fialově, cytoplasmata růžově, červené krvinky červeně. **ai** – interlobulární tepna (*arteria interlobularis*); **dbi** – interlobulární žlučovod (*ductus bilifer interlobularis*); **e** – červená krvinka (*erythrocytus*); **il** – infiltrát leukocytů; **il** – infiltrát leukocytů; **vc** – centrální žíla (*vena centralis*); **vi** – interlobulární žíla (*vena interlobularis*). Měřítka – 100 μm, měřítka výřezů – 10 μm.

## 5.3 Reparační procesy v cílových tkání po inhalaci Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs

Schopnost reparace cílových orgánů po inhalaci Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs byla zkoumána ze tří hledisek: na základě výskytu kolagenních vláken, proliferační aktivity a přítomnosti progenitorových buněk.

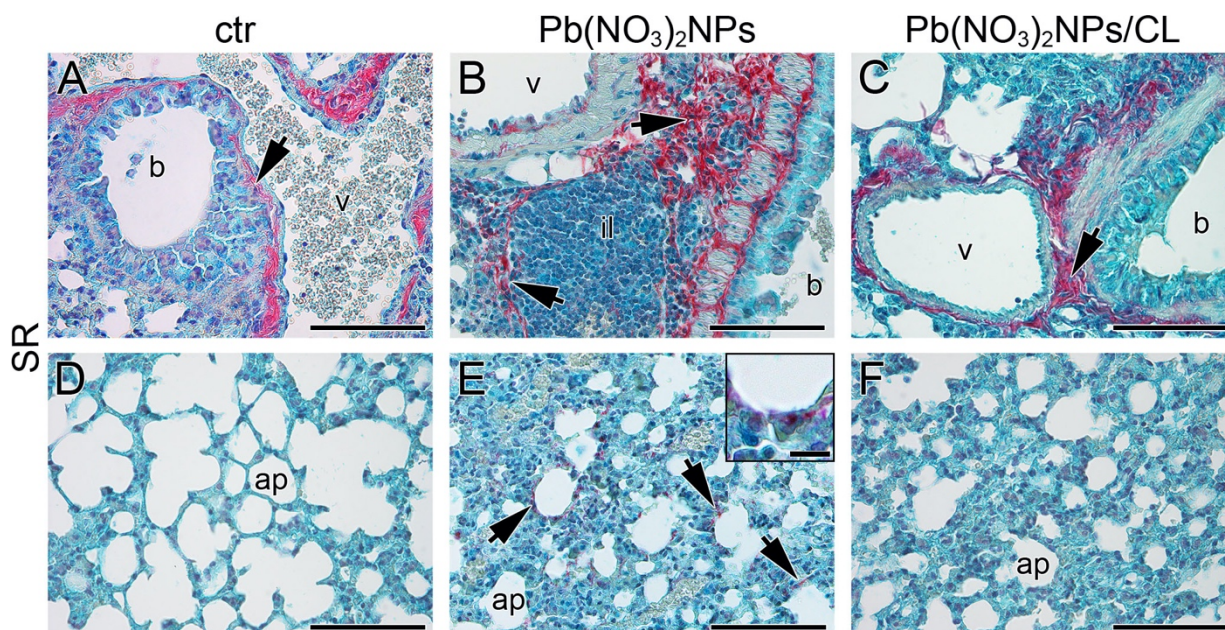
### 5.3.1 Fibrotické změny v plicích a v játrech po inhalaci Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs

Kolagenní vlákna jsou díky své pevnosti důležitou součástí tkání. Zvýšení jejich množství či expanze do jiných struktur je znakem reparačních či patologických procesů a nazývá se fibróza. Fibróza je typická pro neobnovitelné poškození tkání, kdy kolagenní vlákna nahradí jiné tkáňové struktury, což vede k omezení či úplné ztrátě funkce postiženého orgánu. Fibróza často doprovází záněty (infiltráty imunitních buněk) (URL 22).

Pro vizualizaci kolagenních vláken jsme využili dvě metody specifického histologického barvení: Sirius red a Massonův zelený trichrom. Přičemž v plicích se kolagenní vlákna běžně vyskytovala okolo cév, kde tvoří subendotelovou vrstvu, průdušek a průdušinek, která je součástí podpůrné vrstvy pro epitel (obr. 20A, 21A). V exponovaných skupinách byla kolagenní vlákna detekována i mimo tyto oblasti.

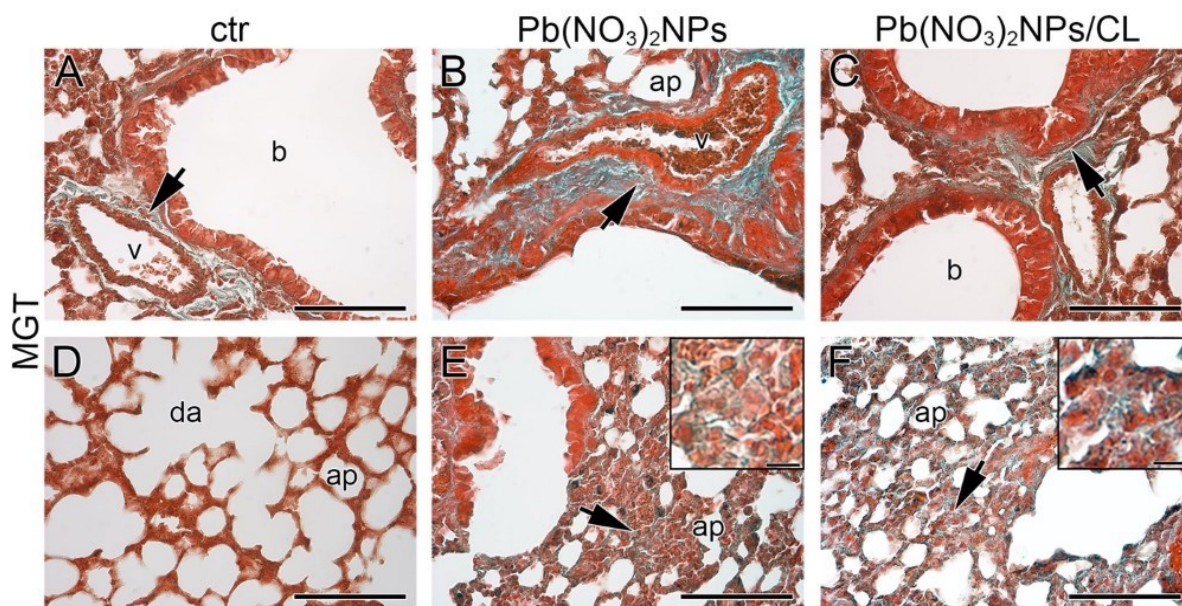
Ve vzorcích obarvených pomocí Sirius red (SR) byla v Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupině detekována kolagenní vlákna i v alveolárních oblastech a okolí peribronchiolárních infiltrátů (obr. 20B,E). V Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupině žádné změny pozorovány nebyly (obr. 20F). Lze tedy říci, že plicní parenchym byl v Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupině poškozen méně než v Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupině.





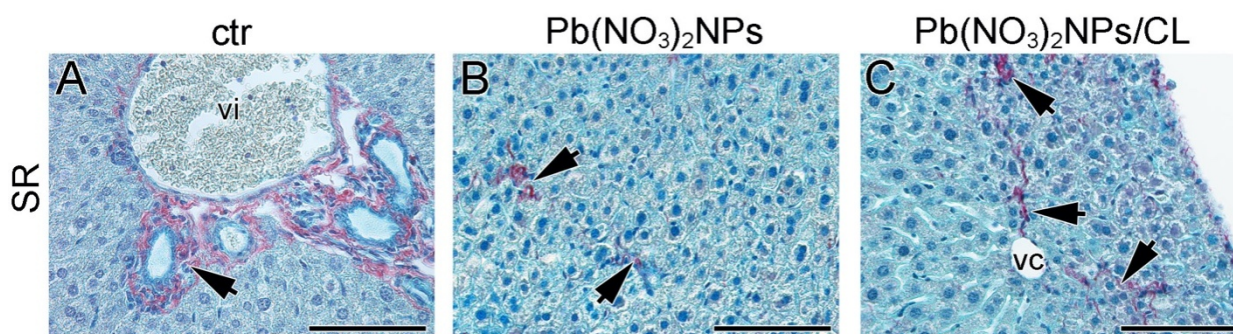
**Obrázek 20.** Analýza přítomnosti kolagenních vláken v plicích (1). **A, D** – Kolagenní vlákna (šipky) tvoří vrstvu řídkého kolagenního vaziva (*lamina propria mucosae*) průdušek a průdušinek, v těchto oblastech byla také v kontrolní skupině (ctr) nalezena. **B, E** – v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině byla kolagenní vlákna (šipky) detekována i v alveolárních oblastech (detail ve výřezu, měřítko – 10  $\mu\text{m}$ ) a v blízkosti peribronchionálních infiltrátů. **C, F** – V  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs/CL}$  skupině nebyly nalezeny žádné změny týkající se výskytu kolagenních vláken. Všechny histologické řezy na fotografiích byly obarveny pomocí Sirius red (SR). Kolagenní vlákna jsou červeno-růžová, jádra buněk jsou tmavě modrá a cytoplazma je světle modrá. **ap** – plicní sklípek (*alveolus pulmonis*); **b** – průdušinka (*bronchiolus*); **il** – infiltrát leukocytů; **v** – céva (*vas*). Měřítka – 100  $\mu\text{m}$ , měřítko výřezu – 10  $\mu\text{m}$ .

Ve vzorcích obarvených Massonovým zeleným trichromem (MGT), stejně jako ve vzorcích obarvených pomocí barvení Sirius red (SR), byla kolagenní vlákna nalezena okolo cév a bronchiolů (obr. 21A). Vlákna byla také detekována v alveolárních oblastech v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině (obr. 21E). Změny byly v případě tohoto barvení nalezeny i v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs/CL}$  skupině (obr. 21F).



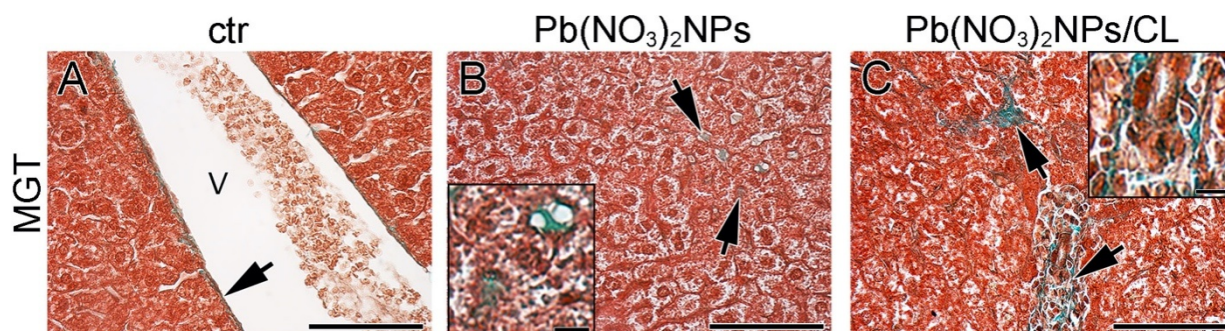
**Obrázek 21.** Analýza kolagenních vláken v plicích (2). **A, D** – Kolagenní vlákna (šipky) tvoří také subendotelovou vrstvu cév (nachází se mezi vrstvou endotelových buněk a hladké svaloviny). V kontrolní skupině byla kolagenní vlákna nalezena okolo průdušek, průdušinek a cév. **B, C, E, F** – V obou exponovaných skupinách [ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  a  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs/CL}$ ] byla kolagenní vlákna (šipky) detekována v alveolárních oblastech (detaily ve výřezech, měřítko – 10  $\mu\text{m}$ ). Všechny histologické řezy na fotografiích byly obarveny pomocí Massonova zeleného trichromu (MGT). Kolagenní vlákna jsou vizualizována zeleně, hladká svalovina červeně a jádra a cytoplasma buněk hnědě. **ap** – plicní sklípek (*alveolus pulmonis*); **b** – průdušinka (*bronchiolus*); **v** – céva (*vas*). Měřítko – 100  $\mu\text{m}$ , měřítko výřezů – 10  $\mu\text{m}$ .

V játrech se kolagenní vlákna vyskytovala okolo cév a žlučovodů (obr. 22A, 23A). Ve vzorcích exponovaných jedinců byla nalezena i mimo tyto zóny, a to jak ve vzorcích obarvených pomocí barvení Sirius red, tak ve vzorcích barvených Massonovým zeleným trichrem (obr. 22B,C, 23B,C).



**Obrázek 22.** Analýza kolagenních vláken v játrech (1). **A** – Kolagenní vlákna (šipky) se v játrech nachází okolo céva v portobilární oblasti. Portální triáda je tvořena interlobulární žilou (*vi*), interlobulární tepnou (*ai*) a interlobulárním žlučovodem (*dbi*). V kontrolní skupině se kolagenní vlákna vyskytovala právě v oblastech portálních triád a sinusoid (šipky). **B, C** – V exponovaných skupinách byla kolagenní vlákna detekována i mimo tyto oblasti, inhalace  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  tedy způsobila nevratné poškození jaterního parenchymu. Všechny histologické řezy na fotografiích byly obarveny pomocí Sirius red (SR). Kolagenní vlákna jsou zbarvena červeno-růžově, jádra buněk tmavě modře a cytoplasma světle modře. **vc** – centrální žíla (*vena centralis*); **vi** – interlobulární žíla (*vena interlobularis*). Měřítko – 100  $\mu\text{m}$ .



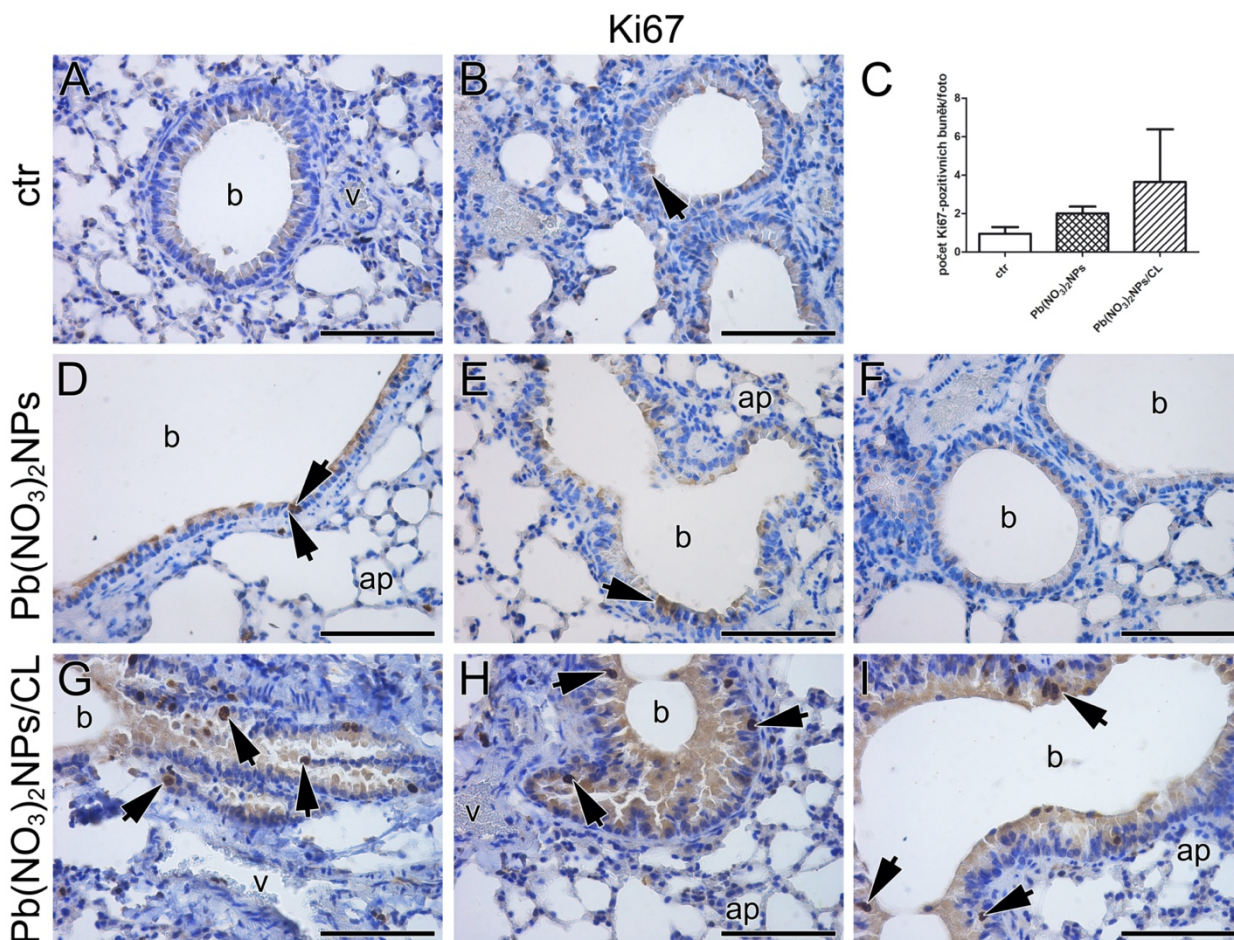


**Obrázek 23.** Analýza kolagenních vláken v játrech (2). **A** – Kolagenní vlákna (šipky) se v játrech vyskytují okolo cév (v), kde tvoří subendotelovou vrstvu (šipka). **B, C** – V exponovaných skupinách [ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  a  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs/CL}$ ] byla kolagenní vlákna (šipky) pozorována i mimo okolí cév a žlučovodů (detaily ve výřezech, měřítko – 10  $\mu\text{m}$ ). Všechny histologické řezy na fotografiích byly obarveny Massonovým zeleným trichromem (MGT). Kolagenní vlákna jsou zbarvena zeleně, jádra a cytoplasma buněk hnědě. v – céva (vas). Měřítko – 100  $\mu\text{m}$ , měřítko výřezů – 10  $\mu\text{m}$ .

### 5.3.2 Změny počtu proliferujících buněk v obou cílových orgánech po inhalaci $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$

Pro analýzu proliferační aktivity buněk v plicích i v játrech byl vybrán marker Ki67. Počet Ki67-pozitivních buněk byl v obou cílových orgánech kvantifikován (P2). V plicích byla analýza Ki67-pozitivních buněk rozdělena do dvou částí dle zkoumaných oblastí – na bronchiolární a alveolární.

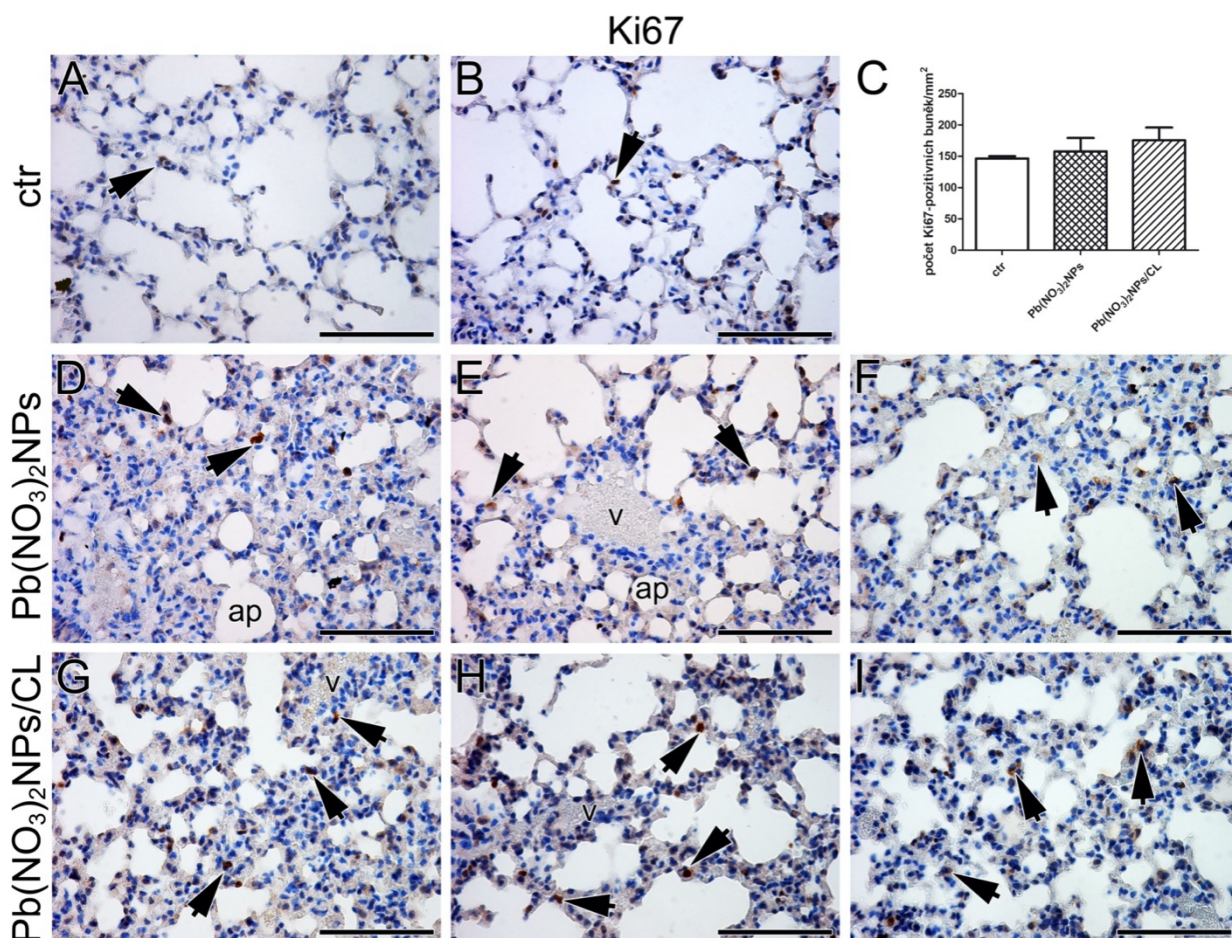
Počet Ki67-pozitivních buněk byl nejprve kvantifikován v bronchiolárních oblastech v plicích (obr. 24C; P2). Rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami nebyly signifikantní ( $p > 0,05$ ). Nejméně Ki67-pozitivních buněk bylo nalezeno v bronchiolárních oblastech kontrolní skupiny (obr. 22A,B). V  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině bylo oproti kontrolní skupině detekováno více Ki67-pozitivních buněk (obr. 24D,E,F). Nejvíce Ki67-pozitivních buněk bylo nalezeno v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs/CL}$  skupině, kde byla ale mezi jedinci vysoká variabilita (obr. 24G,H,I).



**Obrázek 24.** Analýza Ki67-pozitivních buněk v bronchiolárních oblastech plic. **A, B** – V bronchiolárních oblastech kontrolní skupiny nebyly nalezeny téměř žádné Ki67-pozitivní buňky (šipky). **C** – Ki67-pozitivní buňky byly v bronchiolárních oblastech v plicích kvantifikovány (P2). Rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami nebyly statisticky významné ( $p > 0,05$ ). **D, E, F** – V Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupině bylo oproti kontrolní skupině nalezeno více Ki67-pozitivních buněk (šipky). **G, H, I** – Nejvíce Ki67-pozitivních buněk (šipky) v bronchiolárních oblastech bylo detekováno v Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupině, mezi jedinci byla ovšem zaznamenána velmi vysoká variabilita. Ki67-pozitivní buňky byly v řezech na všech fotografiích detekovány pomocí nepřímé trojstupňové imunohistochemické metody s použitím markeru Ki67 hnědě. Negativní jádra jsou obarvena hematoxylinem modře. **ap** – plicní sklípek (*alveolus pulmonis*); **b** – průdušinka (*bronchiolus*); **v** – céva (*vas*). Měřítko – 100  $\mu$ m.

Dále byly kvantifikovány Ki67-pozitivní buňky v alveolárních oblastech (obr. 25C; P2). Trend výsledků kvantifikace byl podobný jako v oblastech bronchiolárních. Rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami nebyly signifikantní ( $p > 0,05$ ). Nejméně Ki67-pozitivních buněk bylo detekováno v kontrolní skupině (obr. 25A,B). V Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupině bylo oproti kontrolní skupině nalezeno více Ki67-pozitivních buněk, nicméně rozdíl v počtech byl bez statistické významnosti (obr. 25D,E,F;  $p > 0,05$ ). Nejvíce Ki67-pozitivních buněk bylo detekováno v Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupině (obr. 25G,H,I). V obou exponovaných skupinách byla oproti kontrolní skupině detekována relativně vysoká variabilita mezi jedinci.



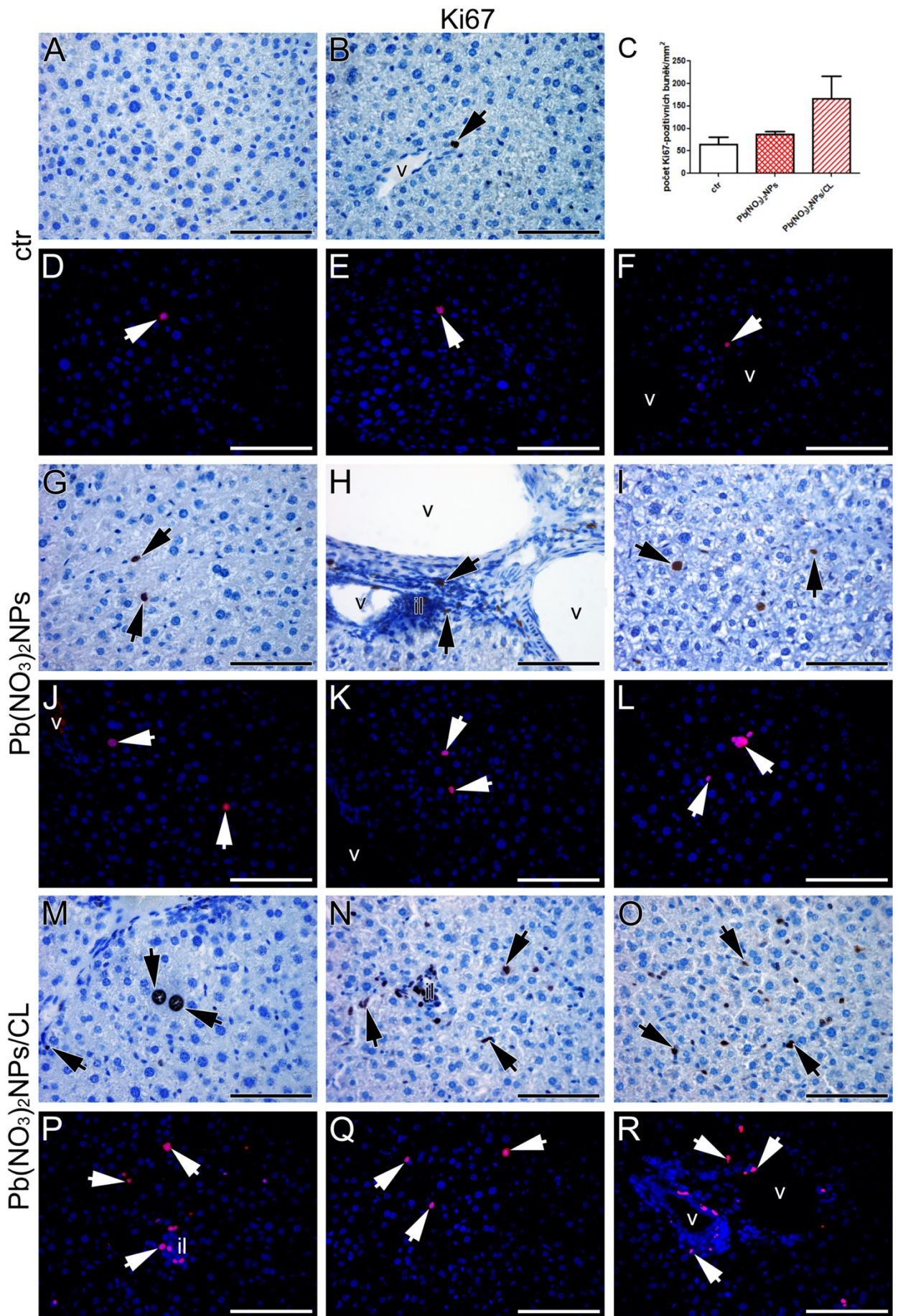


**Obrázek 25.** Analýza Ki67-pozitivních buněk v alveolárních oblastech plic. **A, B** – V alveolárních oblastech kontrolní skupiny byly Ki67-pozitivní především pneumocyty II. typu (šipky). **C** – Ki67-pozitivní buňky byly v alveolárních oblastech v plicích kvantifikovány (P2). Rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami nebyly statisticky signifikantní ( $p > 0,05$ ). **D, E, F** – V Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupině byl oproti kontrolní skupině detekován větší počet Ki67-pozitivních buněk (šipky), rozdíl byl ovšem bez statistické významnosti. **G, H, I** – Nejvíce Ki67-pozitivních buněk (šipky) bylo nalezeno v Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupině. Ki67-pozitivní buňky byly v řezech na všech fotografiích detekovány pomocí nepřímé trojstupňové imunohistochemické metody s použitím markeru Ki67 hnědě. Negativní jádra jsou obarvena hematoxylinem modře. **ap** – plicní sklípek (*alveolus pulmonis*); **da** – sklípková chodbička (*ductus alveolaris*). Měřítka – 100  $\mu$ m.

Pro detekci proliferační aktivity v játrech byl použit také marker Ki67, pozitivní buňky byly ovšem detekovány jednak pomocí nepřímé trojstupňové imunohistochemické metody, ale také pomocí nepřímé imunofluorescenční metody. Ki67-pozitivní v játrech byly hepatocyty, Kupfferovy buňky i buňky okolo cév a žlučovodů.

Ki67-pozitivní buňky byly kvantifikovány s využitím imunohistochemické detekce (obr. 26C; P2). Nejméně buněk bylo detekováno v kontrolní skupině (obr. 26A,B,D,E,F). V Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupině (obr. 26G,H,I,J,K,L) bylo oproti kontrolní skupině buněk více. Nejvyšší počet Ki67-pozitivních buněk byl nalezen v Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupině (obr. 26M,N,O,P,Q,R), jejich počet byl ovšem mezi jedinci opět vysoce variabilní. Rozdíly v počtech Ki67-pozitivních buněk mezi jednotlivými experimentálními skupinami nebyly statisticky významné ( $p > 0,05$ ).



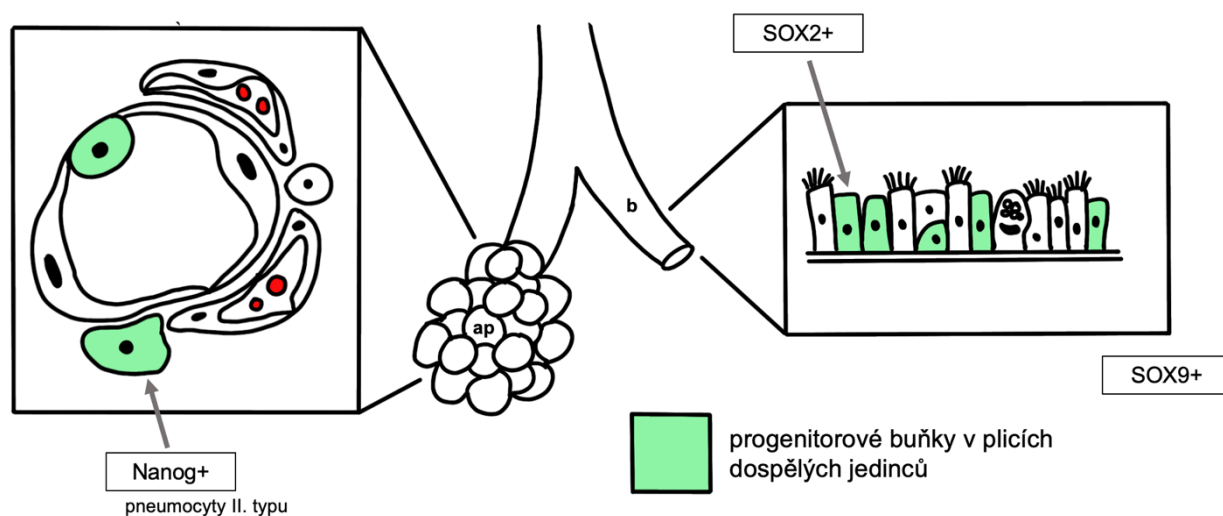


**Obrázek 26.** Analýza Ki67-pozitivních buněk v játrech. **A, B, D, E, F** – V játrech kontrolních jedinců bylo nalezeno nejméně Ki67-pozitivních buněk (šipky). Ki67-pozitivní buňky byly hepatocyty, Kupfferovy buňky, buňky okolo cév a žlučvodů. **C** – Ki67-pozitivní buňky byly kvantifikovány (P2). Rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami nebyly statisticky signifikantní ( $p > 0,05$ ). **G, H, I, J, K, L** – Ve vzorcích jater  $Pb(NO_3)_2NPs$  bylo nalezeno více Ki67-pozitivních buněk (šipky) než ve skupině kontrolní, rozdíl nebyl signifikantní ( $p > 0,05$ ). Ki67-pozitivní buňky byly nalezeny také v infiltátech leukocytů (il). **M, N, O, P, Q, R** – V  $Pb(NO_3)_2NPs/CL$  skupině bylo nalezeno nejvíce Ki67-pozitivních buněk (šipky). Mezi jedinci v této skupině byla zaznamenána poměrně vysoká variabilita. **A, B, G, H, I, M, N, O** – Ki67-pozitivní buňky byly na histologických řezech detekovány pomocí nepřímé trojstupňové imunohistochemické metody s použitím markeru Ki67(DAB, hnědě). Negativní jádra jsou obarvena hematoxylinem (modře). **D, E, F, J, K, L, P, Q a R** – Ki67-pozitivní buňky na histologických řezech detekovány pomocí nepřímé imunofluorescenční metody s vizualizací markeru Ki67 pomocí Alexa555 (červeně). Negativní jádra jsou zbarvena pomocí DAPI (modře). **il** – infiltrát leukocytů; **v** – céva (*vas*). Měřítka – 100  $\mu m$ .

### 5.3.3 Změny počtu progenitorových buněk po inhalaci $Pb(NO_3)_2NPs$

Úlohou progenitorových buněk je nahrazovat odumřelé a poškozené buňky, a tím udržovat homeostázu tkání. Progenitorové buňky v plicích jsou pneumocyty II. typu a některé buňky tvoří epitel průdušek a průdušinek (obr. 27).

V alveolárních oblastech byl pro detekci kmenových/progenitorových buněk vybrán marker Nanog (Barkauskas a kol., 2013) a pro jejich detekci v bronchiolárních oblastech byly vybrány dva markery (SOX2 a SOX9).



**Obrázek 27.** Schéma výskytu detekovaných markerů v progenitorových buňkách plic.

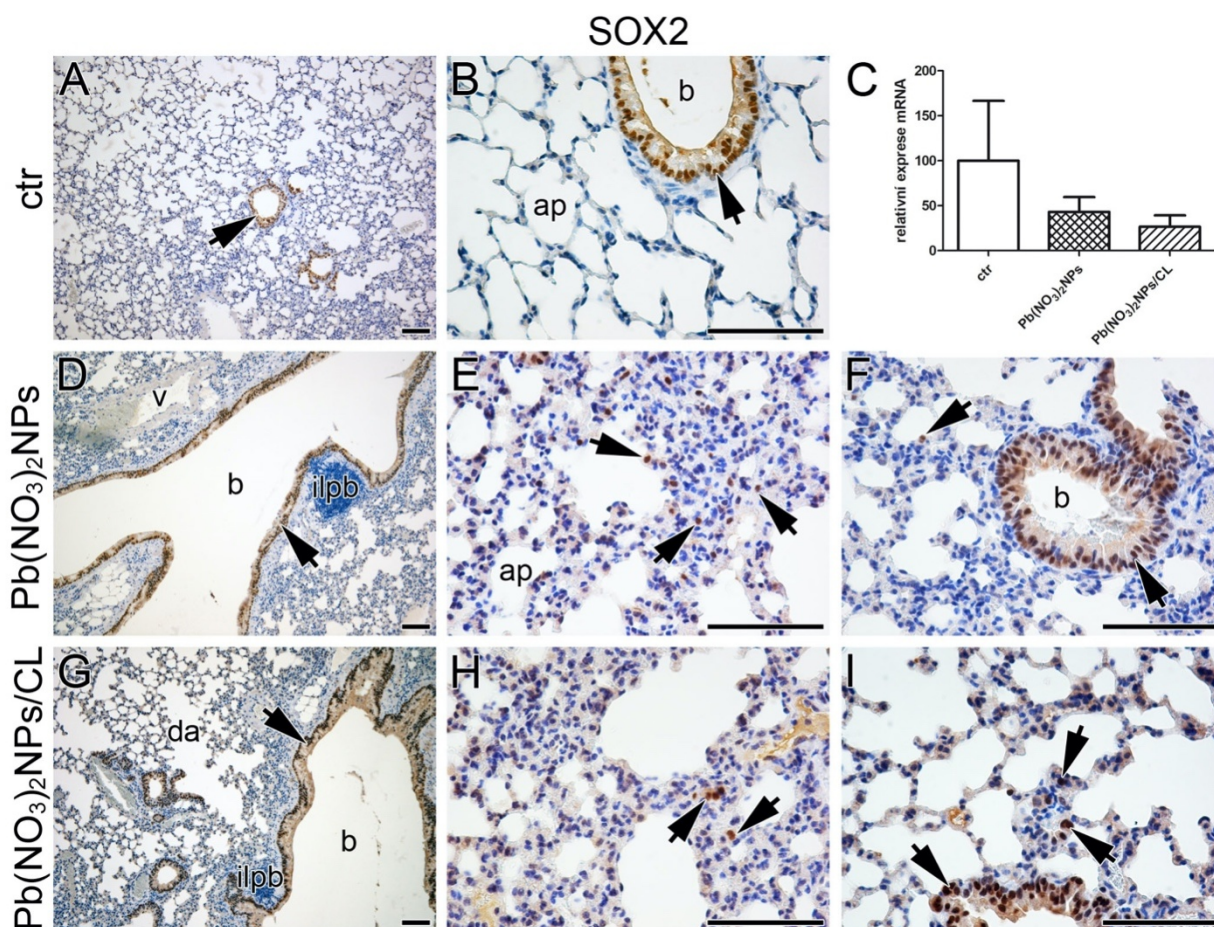
#### 5.3.3.1 SOX2-pozitivní buňky v alveolárních oblastech po inhalaci $Pb(NO_3)_2NPs$

Expres SOX2 na proteinové úrovni byla patrna v bronchiolárních oblastech u kontrolních zvířat (obr. 28A,B). Po inhalaci  $Pb(NO_3)_2NPs$  byly SOX2-pozitivní buňky nalezeny i v oblastech alveolárních (obr. 28E,F,H,I).

Analýzy mRNA úrovně (obr. 28C) prokázaly nejvyšší expresi transkripčního faktoru *Sox2* v kontrolní skupině, ovšem s vysokou variabilitou mezi jedinci. V  $Pb(NO_3)_2NPs$  oproti kontrolní



skupině byla exprese *Sox2* nižší, v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$  byla detekovaná exprese ze všech skupin nejnižší. Rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami nebyly statisticky významné ( $p > 0,05$ ).



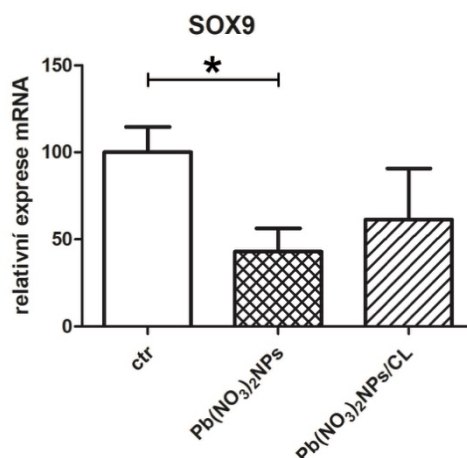
**Obrázek 28.** Analýza exprese proteinu SOX2 a genu *Sox2* v plicích. **A, B** – SOX2-pozitivní buňky byly v kontrolní skupině detekovány pouze v bronchiolárním epitelu, kde je jejich exprese fyziologická. Ve sklípkovém stromatu žádné pozitivní buňky pozorovány nebyly. Dle výsledků analýzy genové exprese (pro gen *Sox2*) byla exprese *Sox2* v kontrolní skupině oproti exponovaným skupinám nejvyšší, ale hodnoty jsou u jednotlivých jedinců vysoce variabilní. **C** – Relativní exprese genu *Sox2* v plicích. Výsledky analýzy genové exprese ukazují statisticky nevýznamný pokles  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupiny vůči kontrolní skupině. Exprese genu *Sox2* byla v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$  skupině oproti ostatním skupinám nejnižší. Rozdíly v expresi genu *Sox2* mezi experimentálními skupinami nebyly statisticky významné ( $p > 0,05$ ). **D, E, F** – V  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině byly SOX2-pozitivní buňky (šípky), stejně jako v kontrolní skupině, detekovány v bronchiolárním epitelu, ale také v alveolárních oblastech. **G, H, I** – V  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$  skupině byly SOX2-pozitivní buňky (šípky) nalezeny, stejně jako v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině, v bronchiálním i alveolárním stromě. SOX2-pozitivní buňky byly v řezech detekovány pomocí nepřímé trojstupňové imunohistochemické metody s použitím markeru SOX2 (DAB, hnědě). Negativní jádra jsou obarvena hematoxylinem (modře). **ap** – plicní sklípek (*alveolus pulmonis*); **b** – průdušinka (*bronchiolus*); **da** – sklípková chodbička (*ductus alveolaris*); **ilpb** – peribronchiolární infiltrát leukocytů; **v** – céva (*vas*). Měřítka – 100  $\mu\text{m}$

### 5.3.3.2 Statisticky významně nižší genová exprese *Sox9* v plicích po inhalaci $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$

Dalším markerem, vybraným pro analýzu progenitorových buněk v plicích, byl gen *Sox9*.

Analýza genové exprese *Sox9* na mRNA úrovni (obr. 29) ukázala signifikantní rozdíl mezi kontrolní skupinou, kde byla relativní exprese *Sox9* nejvyšší, a  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$ , kde byla exprese genu *Sox9* naopak nejnižší (\*  $p < 0,05$ ). Exprese genu *Sox9* na úrovni mediátorové RNA v plicích jedinců jednotlivých experimentálních skupin byla vysoce variabilní, nejvyšší variabilita byla zaznamenána v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$  skupině.

Protokol na imunohistochemickou detekci proteinu SOX9 se i po řadě pokusů nepodařilo optimalizovat, nebylo tedy možné porovnat výsledky exprese na genové a proteinové úrovni.

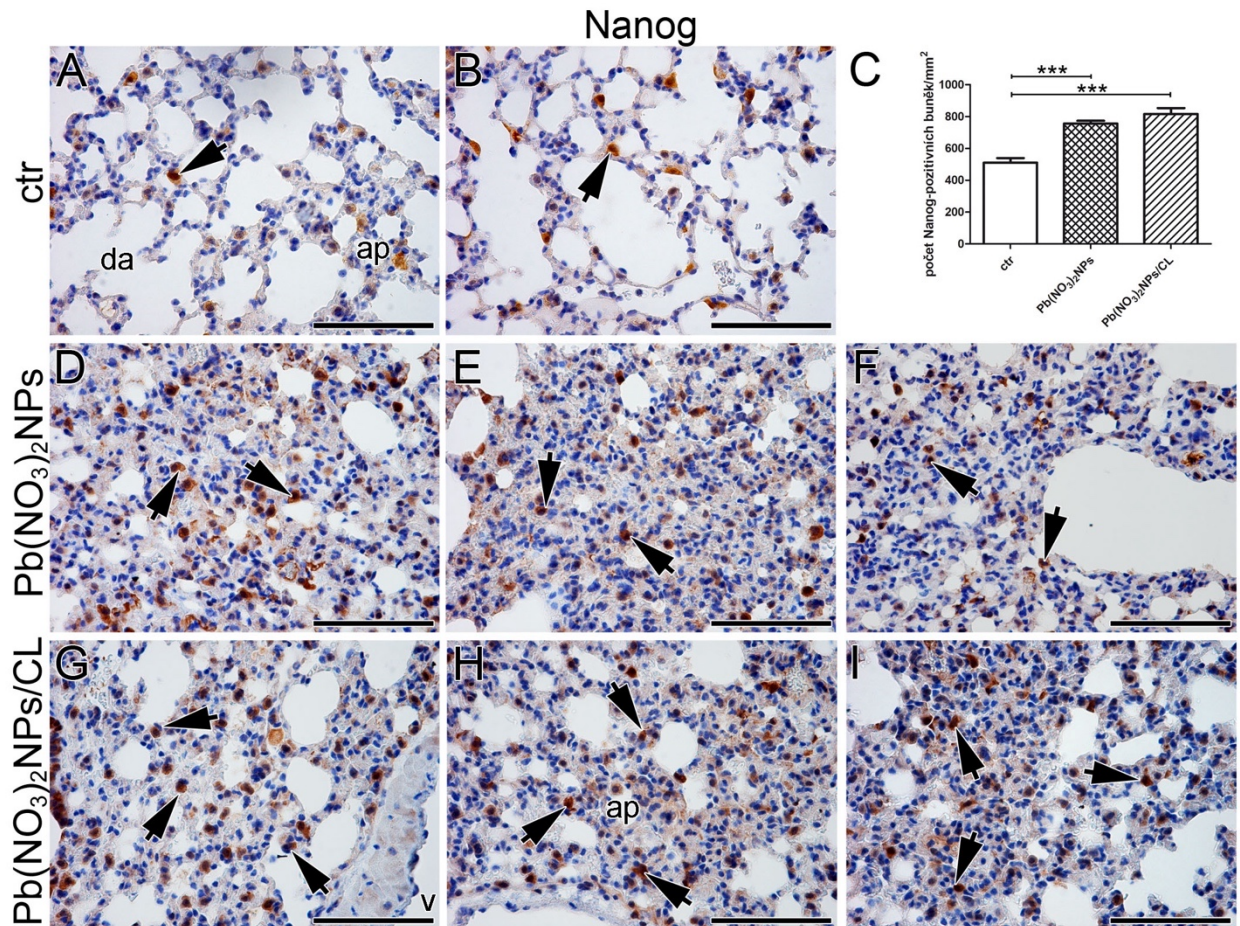


**Obrázek 29.** Analýza relativní genové exprese *Sox9* v plicích. Nejvyšší exprese genu *Sox9* v plicích byla detekována v kontrolní skupině, nejnižší v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině, rozdíl mezi těmito skupinami byl statisticky významný (\*  $p < 0,05$ ). V jednotlivých experimentálních skupinách byla mezi jedinci zaznamenána vysoká variabilita.

### 5.3.3.3 Zvýšení výskytu Nanog-pozitivních buněk po inhalaci $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$ v alveolárních oblastech

Počet Nanog-pozitivních buněk byl kvantifikován v alveolárních oblastech (obr. 30C; P2). Počet Nanog-pozitivních buněk v těchto oblastech se v obou exponovaných skupinách oproti kontrolní skupině (obr. 30A,B) signifikantně zvýšil (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). Nejvíce pozitivních buněk bylo detekováno v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$  skupině (obr. 30G,H,I).





**Obrázek 30.** Analýza Nanog-positivních buněk v alveolárních oblastech plic. **A, B** – V plicích kontrolních jedinců je přirozená homeostáza plicní tkáně a dochází k její postupné obnově. Vybrané Nanog-positivní buňky jsou označeny šipkami. **C** – Nanog-positivní buňky byly rovněž kvantifikovány na řezech (P2). Rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami byly statisticky významné (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). Nejméně Nanog-positivních buněk bylo nalezeno v kontrolní skupině, nejvíce v Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupině. **D, E, F** – V Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupině byl počet Nanog-positivních buněk (šipky) oproti kontrolní skupině signifikantně vyšší. **G, H, I** – Největší počet Nanog-positivních buněk (šipky) byl zaznamenán v Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupině. Nanog-positivní buňky byly v řezech na všech fotografiích detekovány pomocí nepřímé trojstupňové imunohistochemické metody s použitím markeru Nanog (DAB, hnědě). Negativní jádra jsou obarvena hematoxylinem (modře). **ap** – plicní sklípek (*alveolus pulmonis*); **b** – průdušinka (*bronchiolus*); **da** – sklípková chodbička (*ductus alveolaris*); **v** – céva (*vas*). Měřítka – 100  $\mu$ m.

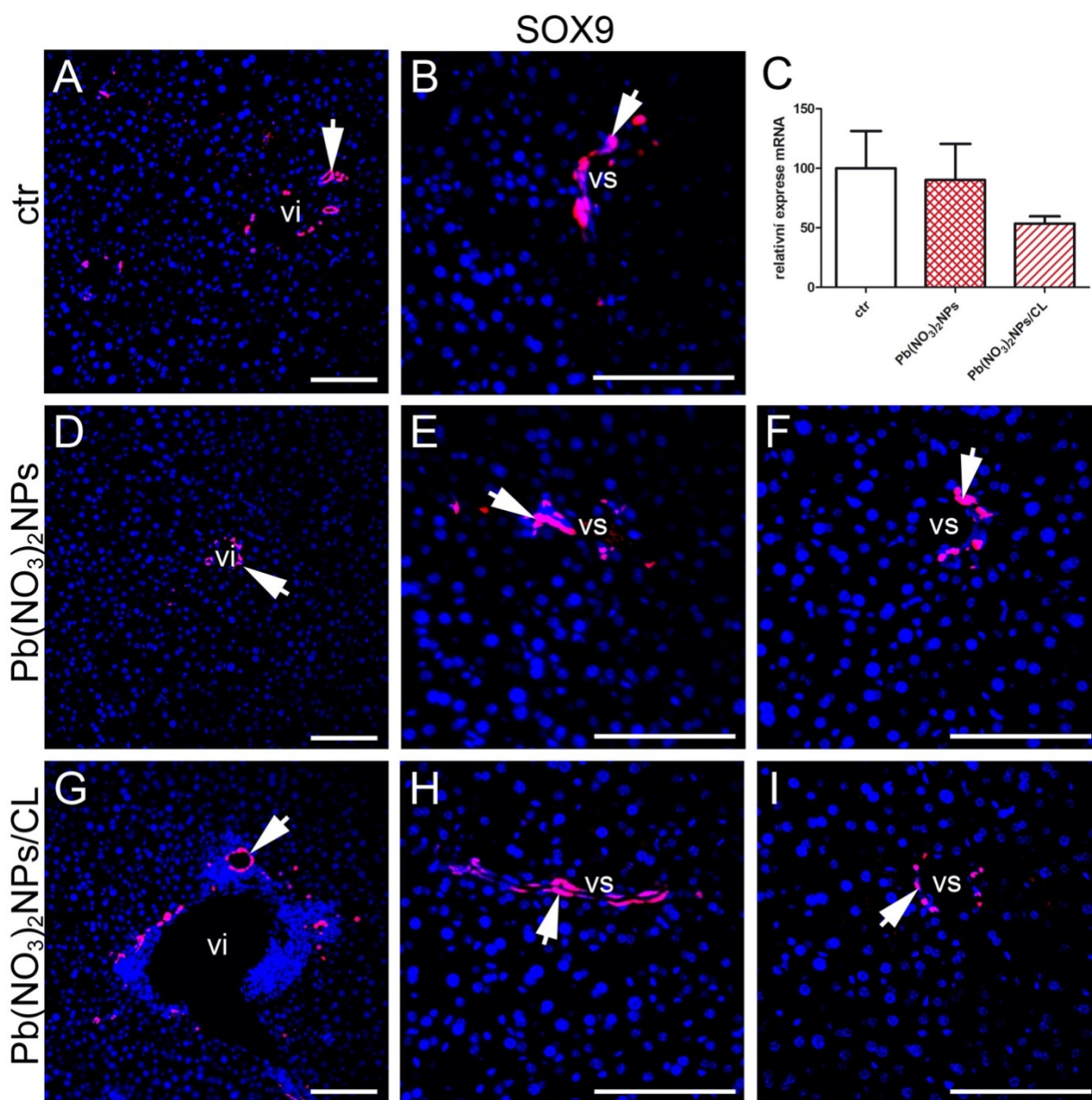
#### 5.3.3.4 Vysoká variabilita genové exprese Sox9 v játrech

Progenitorové buňky v játrech byly vizualizovány pomocí nepřímé imunofluorescenční metody a markeru SOX9 na proteinové úrovni. Byla provedena také analýza genové exprese Sox9 na mRNA úrovni.

SOX9-positivní buňky byly nalezeny okolo cév a portobiliárního prostoru (obr. 31). Žádné signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami nalezeny nebyly, množství SOX9-positivních buněk bylo podmíněno spíše velikostí dané cévy či portobiliárního prostoru v analyzovaném řezu.

Dle analýzy genové exprese (obr. 31C) byla exprese genu na mRNA úrovni Sox9 nejvyšší v kontrolní skupině, v Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupině byla genová exprese nižší a nejnižší genová exprese

byla zaznamenána u Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupiny. Exprese *Sox9* byla u kontrolní a Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupiny i po vyloučení jedince s největší odchylkou od průměru velmi variabilní. Rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami nebyly signifikantní ( $p > 0,05$ ).



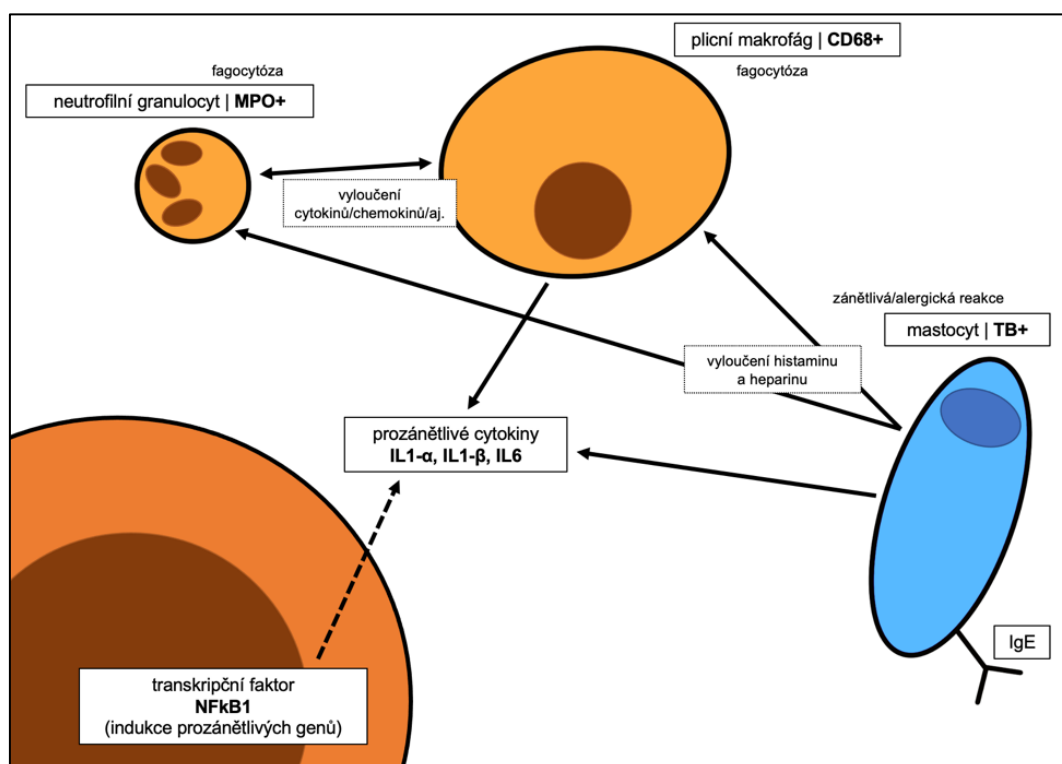
**Obrázek 31.** Analýza exprese proteinu SOX9 a genu *Sox9* v játrech. **A, B** – V játrech kontrolních jedinců byly SOX9-pozitivní buňky (šipky) nalezeny okolo cév a žlučovodů. **C** – Relativní exprese genu *Sox9* v játrech. V kontrolní a Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupině byla pozorována vysoká variabilita. Nejnižší genová exprese *Sox9* na mRNA úrovni byla změřena v Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupině, nejvyšší v kontrolní. Rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami nejsou statisticky významné ( $p > 0,05$ ). **D, E, F** – Exprese SOX9-pozitivních buněk (šipky) v játrech jedinců z Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupiny se oproti jedincům kontrolní skupiny nezměnila. Buňky byly detekovány v oblastech cév a žlučovodů a jejich množství bylo podmíněno velikostí dané cévy či žlučovodu. **G, H, I** – Stejně jako v kontrolní a Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupině byly i v Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupině detekovány SOX9-pozitivní buňky (šipky) okolo cév a žlučovodů. Jejich množství se oproti ostatním skupinám nelišilo. SOX9-pozitivní buňky byly detekovány pomocí nepřímé imunofluorescenční metody s použitím markeru SOX9 a jsou vizualizovány Alexa555 (červeně). Jádra negativních buněk jsou zbarvena pomocí DAPI (modře). **vi** – interlobulární žíla (*vena interlobularis*); **vs** – sinusoida (*vas capillare*). Měřítko – 100  $\mu$ m.



## 5.4 Imunitní odpověď v plicích a játrech po inhalaci $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$

### 5.4.1 Imunitní odpověď plic po inhalaci $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$

Pro analýzu imunitní odpovědi plic po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  bylo vybráno několik spolu souvisejících markerů (obr. 32). Byla provedena analýza neutrofilních granulocytů, plicních makrofágů a mastocytů, a poté analýza genové exprese některých prozánětlivých cytokinů a jednoho prozánětlivého transkripčního faktoru (Allen a kol., 2015; Navegantes a kol., 2017; Monticelli a Leoni, 2017).



**Obrázek 32.** Schéma námi selektovaných imunitních markerů v plicích a jejich vzájemných souvislostí. Transkripční faktor NFκB1 je v případě zánětu aktivován a reguluje expresi některých prozánětlivých cytokinů (Hunter a de Plaen, 2014). Prozánětlivé cytokiny jsou přímo vylučovány např. makrofágy (Arango Duque a Descoteaux, 2014). Žírné buňky, čili mastocyty, dokáží pomocí vyloučených chemických látek způsobit chemotaxi neutrofilních granulocytů a makrofágů (Halova a kol., 2012; Springer a kol., 2017), zároveň ale také vylučují některé prozánětlivé cytokiny (URL 27). Přítomnost neutrofilních granulocytů je také specificky regulována a plicní makrofágy ji ovlivňují pomocí chemokinů aj. Neutrofilny vznikají v kostní dřeni, následně se přesouvají do krevního oběhu a v případě zánětu či jiných podnětů se přesunou do tkání, kde mohou fagocytovat buněčný debris (Balko a kol., 2017).

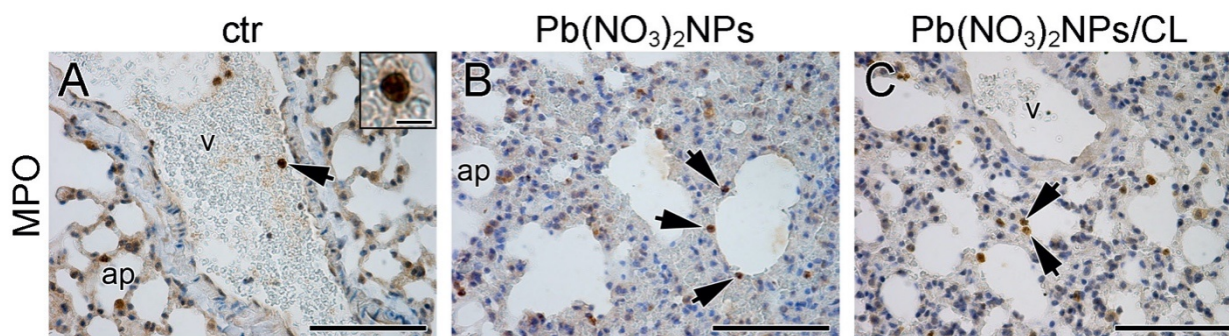
#### 5.4.1.1 MPO-pozitivní buňky jsou po inhalaci nanočástic detekovány také mimo plicní cévy

Neutrofilní granulocyt, buňka pravidelného kulatého tvaru, je nejpočetnější leukocyt v krvi (tvoří 60–70 % všech bílých krvinek). Neutrofilny vznikají v kostní dřeni, následně se přesouvají do krve, kde přežijí zhruba jeden den, v případě zánětu či infekce se přesunou do tkání, kde setrvávají jeden až dva dny. Podobně jako makrofágy mají schopnost fagocytózy. Díky své schopnosti fagocytovat bakterie bývají také nazývány mikrofágy (Balko a kol., 2017).



Neutrofilní granulocyty byly detekovány pomocí nepřímé trojstupňové imunohistochemické metody s využitím ABC komplexu, pomocí markeru MPO (myeloperoxidáza), což je enzym ze skupiny peroxidáz, který je uložen v azurofilních granulech neutrofilů a je uvolňován do mezibuněčného prostoru při degranulaci.

Neutrofilní granulocyty se v plicích kontrolních zvířat vyskytovaly zejména v luminu cév (obr. 33A). Po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  byly MPO-pozitivní buňky nalezeny také v alveolárních oblastech (obr. 33B,C).



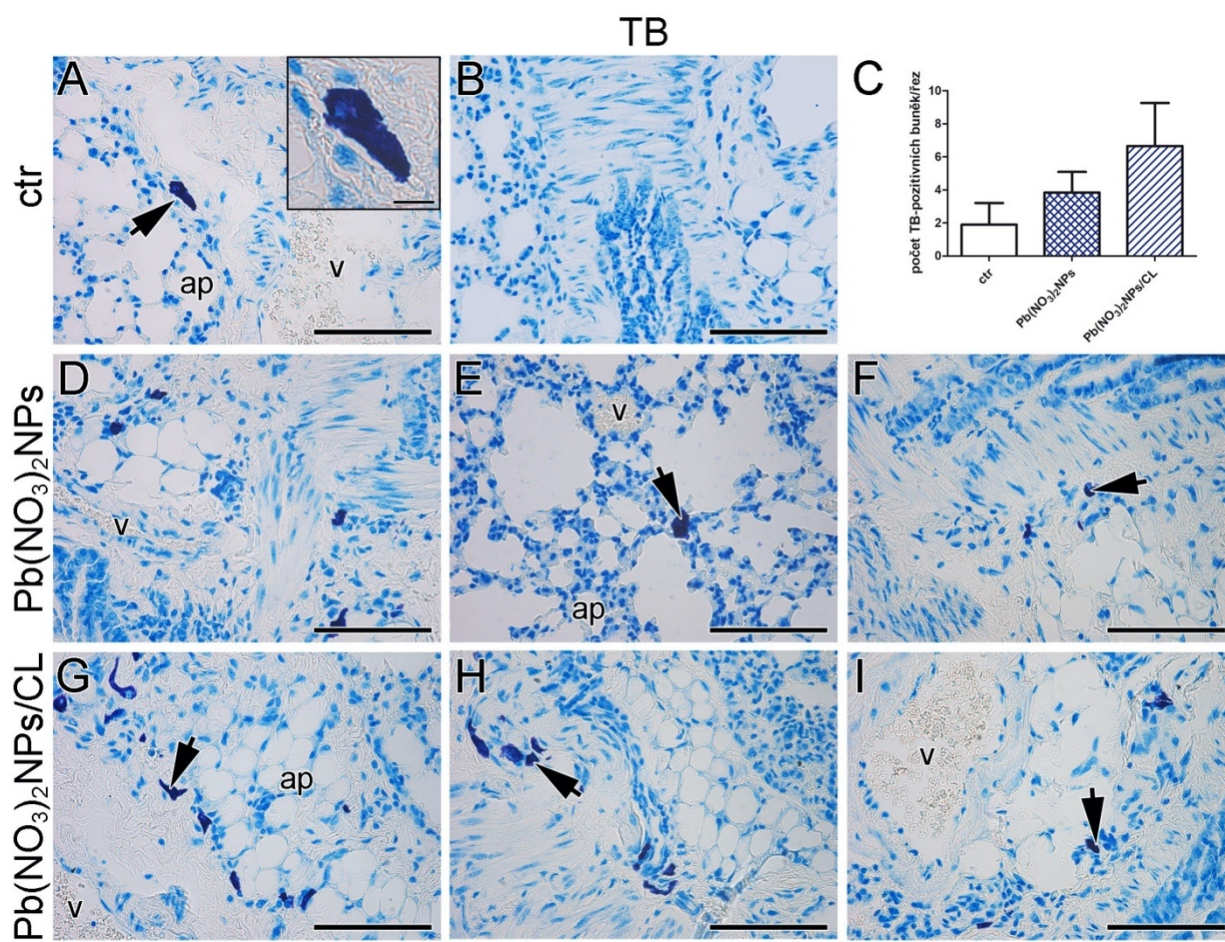
**Obrázek 33.** Analýza MPO-pozitivních buněk v plicích. **A** – MPO-pozitivní buňky (šipka, detail ve výřezu, měřítko – 10  $\mu\text{m}$ ) se běžně vyskytují v cévách (šipka). **B, C** – V experimentálních skupinách byly MPO-pozitivní buňky (šipky) detekovány také v alveolárních oblastech. MPO-pozitivní buňky byly v řezech detekovány pomocí nepřímé trojstupňové imunohistochemické metody s použitím markeru MPO (DAB, hnědě). Jádra negativních buněk jsou obarvena hematoxylinem (modře). **v** – céva (*vas*); **ap** – plicní sklípek (*alveolus pulmonis*). Měřítko – 100  $\mu\text{m}$ , měřítko výřezu – 10  $\mu\text{m}$ .

#### 5.4.1.2 Zvýšený počet mastocytů v plicích po expozici $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$

Mastocyty (obr. 34A– detail ve výřezu) neboli žírné buňky se nachází zejména v pojivové tkáni. Na povrchu mají receptory s afinitou k imunoglobulinu E (IgE). Po připojení IgE s navázaným antigenem k receptoru dojde k degranulaci – spustí se alergická či zánětlivá reakce (Siraganian, 1998; Balko a kol., 2017).

Pro vizualizaci žírných buněk bylo použito specifické histologické barvení Toluidinovou modří (TB).

TB-pozitivní buňky byly detekovány především v alveolárních oblastech, kde jsme je kvantifikovali (P2). Počet TB-pozitivních buněk se v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině (obr. 34D,E,F) oproti kontrolní skupině (obr. 34A,B) statisticky nevýznamně zvýšil ( $p > 0,05$ ). Pětítýdenní eliminační období vedlo k dalšímu statisticky nevýznamnému ( $p > 0,05$ ) zvýšení počtu TB-pozitivních buněk (obr. 34G,H,I), ovšem jejich počet byl velmi variabilní (obr. 31C).



**Obrázek 34.** Analýza mastocytů v plicích. **A, B** – Počet TB-positivních buněk (šipka, detail ve výřezu, měřítko – 10  $\mu$ m) byl v kontrolní skupině oproti exponovaným skupinám nejnižší. **C** – Kvantifikace počtu TB-positivních buněk (P2). Rozdíly v počtu TB-positivních buněk mezi jednotlivými skupinami nebyly statisticky signifikantní ( $p > 0,05$ ). Nejvíce TB-positivních buněk bylo nalezeno v Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupině, nejméně ve skupině kontrolní. **D, E, F** – V Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupině byl počet TB-positivních buněk (šipky) oproti kontrolní skupině statisticky nevýznamně vyšší. **G, H, I** – Největší počet TB-positivních buněk (šipky) byl detekován v Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupině, jejich počet byl ale mezi jedinci vysoce variabilní. TB-positivní buňky byly detekovány pomocí specifického histologického barvení Toluidinovou modří (tmavě modře až fialově). Negativní jádra jsou obarvena také pomocí roztoku Toluidinové modří (světle modře) (P3). **ap** – plicní sklípek (*alveolus pulmonis*); **v** – céva (*vas*). Měřítka – 100  $\mu$ m, měřítko výřezu – 10  $\mu$ m.

#### 5.4.1.3 Signifikantně snížené množství CD68-positivních buněk v plicích po inhalaci Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs

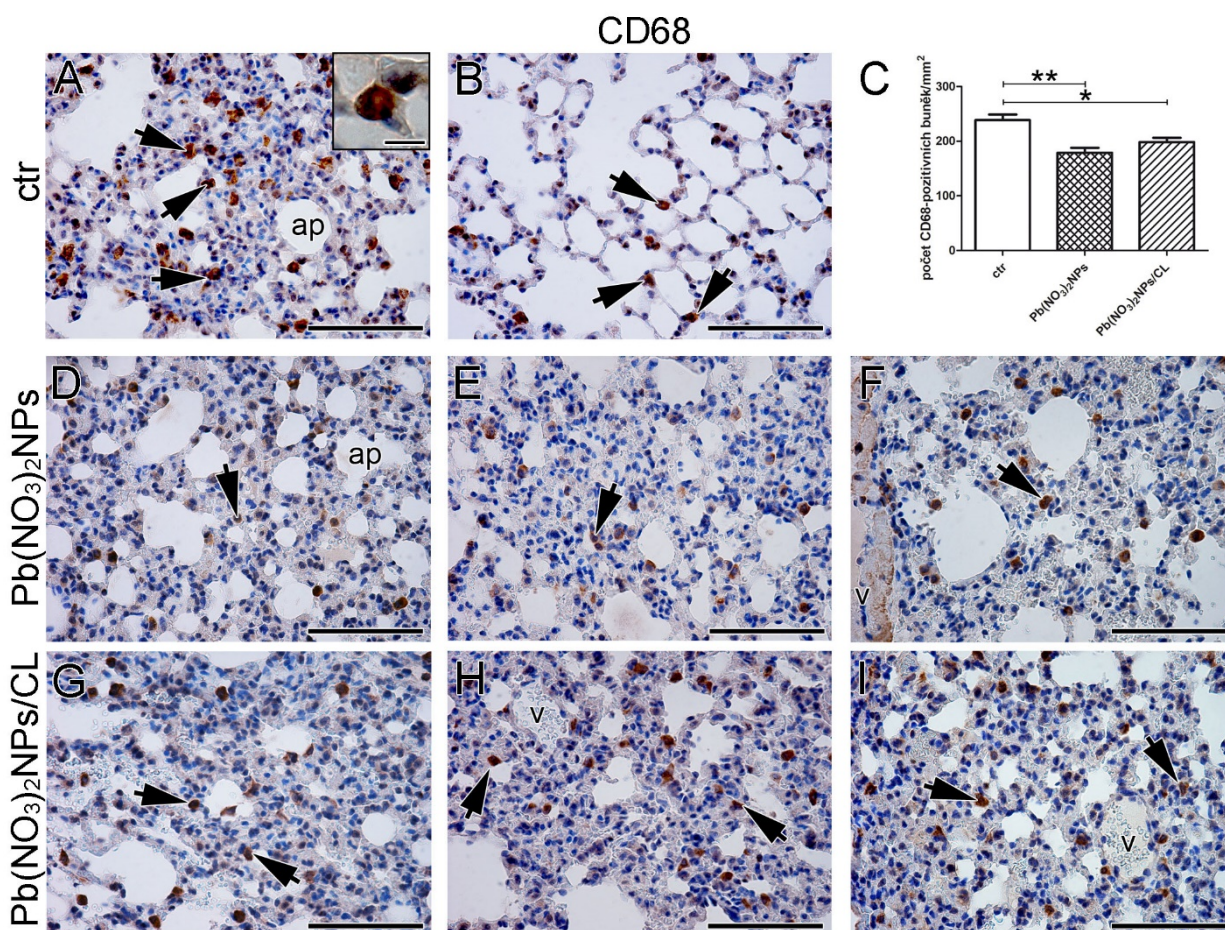
Makrofág (obr. 35A – výřez) je buňka imunitního systému, vznikající diferenciací krevních monocytů. Má mnoho funkcí, mezi ty nejdůležitější patří fagocytóza, chemotaxe, pohlcení poškozených a odumřelých buněk a cizorodých částic aj. Makrofágy se vyskytují v mnoha různých tkáních, mj. v játrech, kde se označují jako Kupfferovy buňky (Balko a kol., 2017).

Makrofágy byly detekovány v plicích i v játrech pomocí nepřímé trojstupňové IHC metody s využitím ABC komplexu, pomocí markeru CD68 (Cluster of Differentiation 68).

CD68-positivní buňky byly kvantifikovány ve všech experimentálních skupinách (obr. 35C; P2). Počet CD68-positivních buněk se napříč všemi skupinami signifikantně měnil. V plicích bylo



nejvíce CD68-pozitivních buněk nalezeno v kontrolní skupině (obr. 35A,B), v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině byl počet CD68-pozitivních buněk oproti kontrolní skupině statisticky významně nižší (obr. 35D,E,F) (\*\*  $p < 0,01$ ). V experimentální skupině s eliminačním obdobím se počet CD68-pozitivních lehce zvýšil (obr. 35G,H,I). Rozdíl mezi touto a kontrolní skupinou byl statisticky signifikantní (\*  $p < 0,05$ ).



**Obrázek 35.** Analýza CD68-pozitivních buněk v plicích. **A, B** – V plicích kontrolní skupiny bylo nalezeno nejvíce CD68-pozitivních buněk (šipky, detail ve výřezu, měřítko – 10  $\mu\text{m}$ ). **C** – Kvantifikace CD68-pozitivních buněk v plicích (P2). Rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami byly statisticky významné (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ). **D, E, F** – V  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině bylo detekováno nejméně CD68-pozitivních buněk (šipky). **G, H, I** – V  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$  byl počet CD68-pozitivních buněk (šipky) oproti  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině vyšší, ovšem bez statistické významnosti. CD68-pozitivní buňky byly detekovány pomocí nepřímé trojstupňové histologické metody s použitím markeru CD68 (DAB, hnědě). Jádra negativních buněk jsou pomocí hematoxylinu obarvena modře. **ap** – plicní sklípek (*alveolus pulmonis*); **v** – céva (*vas*). Měřítka – 100  $\mu\text{m}$ , měřítko výřezu – 10  $\mu\text{m}$ .

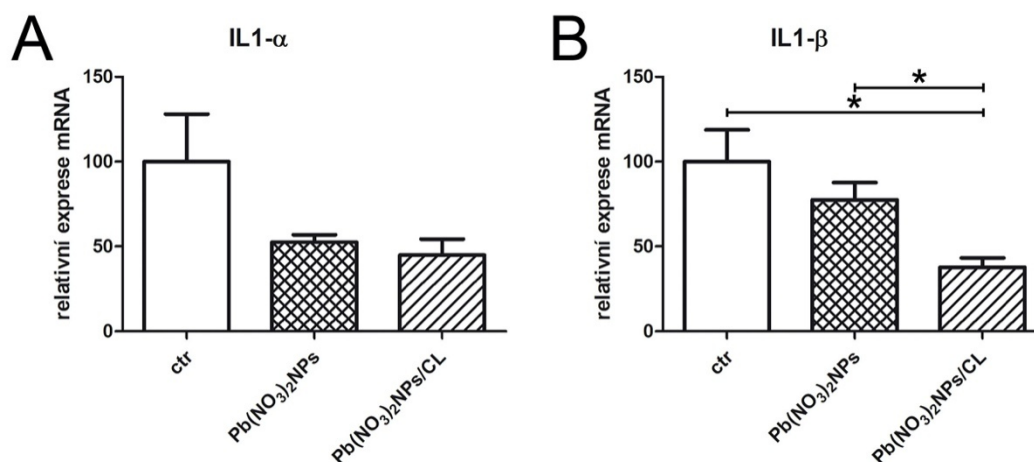
#### 5.4.1.4 Nižší exprese vybraných prozánětlivých cytokinů po inhalaci $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$ v plicích

Relativní exprese vybraných prozánětlivých cytokinů, *IL1- $\alpha$* , *IL1- $\beta$*  a *IL6* byla detekována mRNA úrovních plicích i v játrech pomocí analýzy genové exprese.

Dle výsledků analýzy genové exprese byla exprese interleukinu 1- $\alpha$  v plicích (obr. 36A) nejvyšší v kontrolní skupině, ovšem s vysokou variabilitou mezi jedinci. Mezi kontrolní a  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$

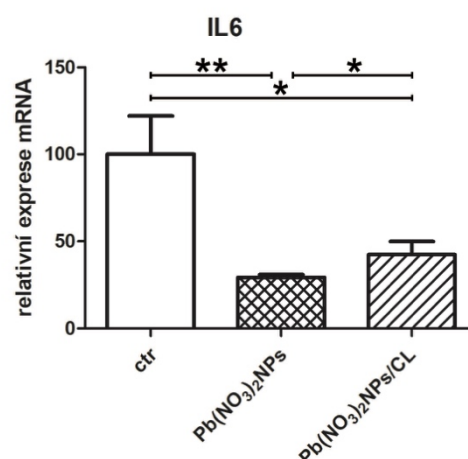
skupinou bylo zaznamenáno mírné snížení exprese. Nejnižší genová exprese byla detekována v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$  skupině. Rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami ovšem nejsou statisticky významné ( $p > 0,05$ ).

Nejvyšší genová exprese interleukinu 1- $\beta$  byla zaznamenána v kontrolní skupině (obr. 36B). Detekovaná exprese v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině byla v porovnání s kontrolní skupinou nižší, avšak rozdíl byl statisticky nevýznamný. Nejnižší exprese byla v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$  skupině, tento pokles byl vzhledem ke kontrolní a  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině statisticky významný ( $* p < 0,05$ ).



**Obrázek 36.** Analýza relativní genové exprese interleukinu 1- $\alpha$  a interleukinu 1- $\beta$  v plicích. **A** – Relativní exprese genu *IL1- $\alpha$*  byla nejvyšší v kontrolní skupině, ve které byla zároveň zaznamenána poměrně vysoká variabilita. V  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině byla oproti kontrolní skupině genová exprese nižší. Nejnižší exprese *IL1- $\alpha$*  byla v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$  skupině. Rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami nebyly statisticky významné ( $p > 0,05$ ). **B** – Nejvyšší genová exprese *IL1- $\beta$*  byla v kontrolní skupině. V obou exponovaných skupinách byla detekována genová exprese oproti kontrolní skupině nižší, rozdíly mezi kontrolní a  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupinou,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  a  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$  skupinou byly statisticky signifikantní ( $* p < 0,05$ ).

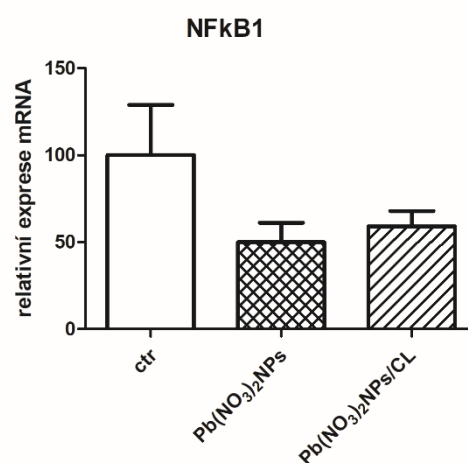
Posledním detekovaným interleukinem v plicích byl interleukin 6 (*IL6*) (obr. 37). Nejvyšší exprese byla zaznamenána, stejně jako u předchozích interleukinů, v kontrolní skupině, kde byla nicméně mezi jedinci vysoká variabilita. Rozdíl mezi kontrolní a  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupinou byl signifikantní ( $** p < 0,01$ ). Rozdíl exprese interleukinu 6 mezi  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$  skupinou a kontrolní i  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupinou byl také statisticky významný ( $* p < 0,05$ ). Nejnižší exprese byla detekována v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$  skupině.



**Obrázek 37.** Analýza relativní genové exprese interleukinu 6 v plicích. Nejvyšší exprese byla nalezena v kontrolní skupině, kde byla ovšem zaznamenána relativně vysoká variabilita mezi jedinci. Mezi kontrolní a Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupinou byl zaznamenán statisticky významný rozdíl (\*\*  $p < 0,01$ ). Rozdíly v genové expresi *IL6* mezi kontrolní a Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupinou a Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs a Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupinou jsou také statisticky signifikantní (\*  $p < 0,05$ ).

#### 5.4.1.5 Statisticky významně nižší exprese *NFκB1* v plicích po inhalaci Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs

Nejvyšší relativní exprese genu *NFκB1* (obr. 38) byla zaznamenána v kontrolní skupině, kde byla zároveň detekována rovněž největší variabilita mezi jedinci. V Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupině byla nejnižší exprese *NFκB1*, v Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupině byl oproti Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupině zaznamenán mírný nárůst. Rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami nebyly statisticky významné ( $p > 0,05$ ). Výsledky této analýzy korespondují s výsledky analýzy genové exprese interleukinu 6 a tím potvrzují souvislost těchto genů při imunitní reakci (obr. 32).

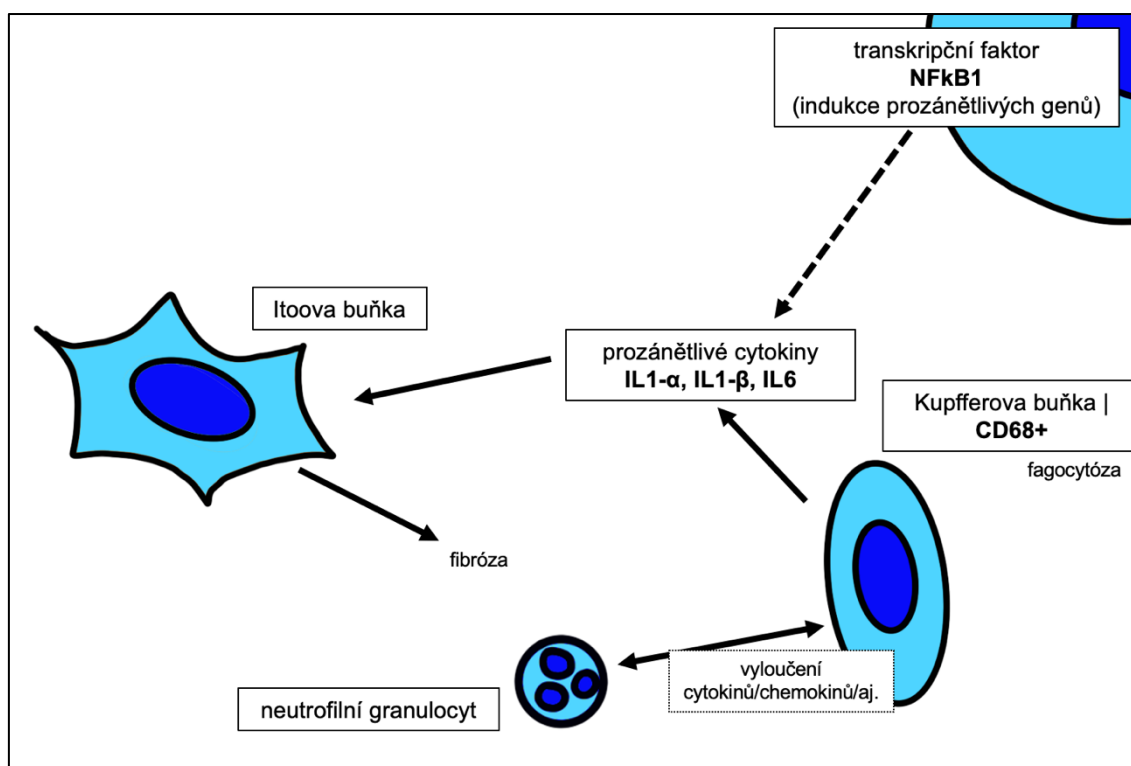


**Obrázek 38.** Analýza relativní exprese genu *NFκB1* v plicích. Nejvyšší genová exprese zároveň s největší variabilitou mezi jedinci byla detekována v kontrolní skupině. Nejnižší exprese byla zaznamenána v Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NP skupině. Rozdíly genové exprese *NFκB1* nejsou mezi jednotlivými experimentálními skupinami statisticky signifikantní ( $p > 0,05$ ).

V plicích byla po jedenáctidenní inhalaci  $Pb(NO_3)_2$ NPs snížena imunitní odpověď. Pětidenní eliminační období ovšem dopomohlo k návratu analyzovaných faktorů na hodnoty blízké kontrolní skupině.

#### 5.4.2 Imunitní odpověď jater po inhalaci $Pb(NO_3)_2$ NPs

Pro analýzu imunitní reakce jater po inhalaci  $Pb(NO_3)_2$ NPs bylo vybráno, podobně jako v plicích, několik spolu souvisejících markerů (obr.39). Pomocí markeru CD68 byla provedena analýza Kupfferových buněk, dále pak byly stanoveny rozdíly v genové expresi vybraných prozánětlivých cytokinů (*IL1- $\alpha$* , *IL1- $\beta$*  a *IL6*) a transkripčního faktoru *NFkB1* (Liaskou a kol., 2012; Elsharkawy a Mann, 2007).



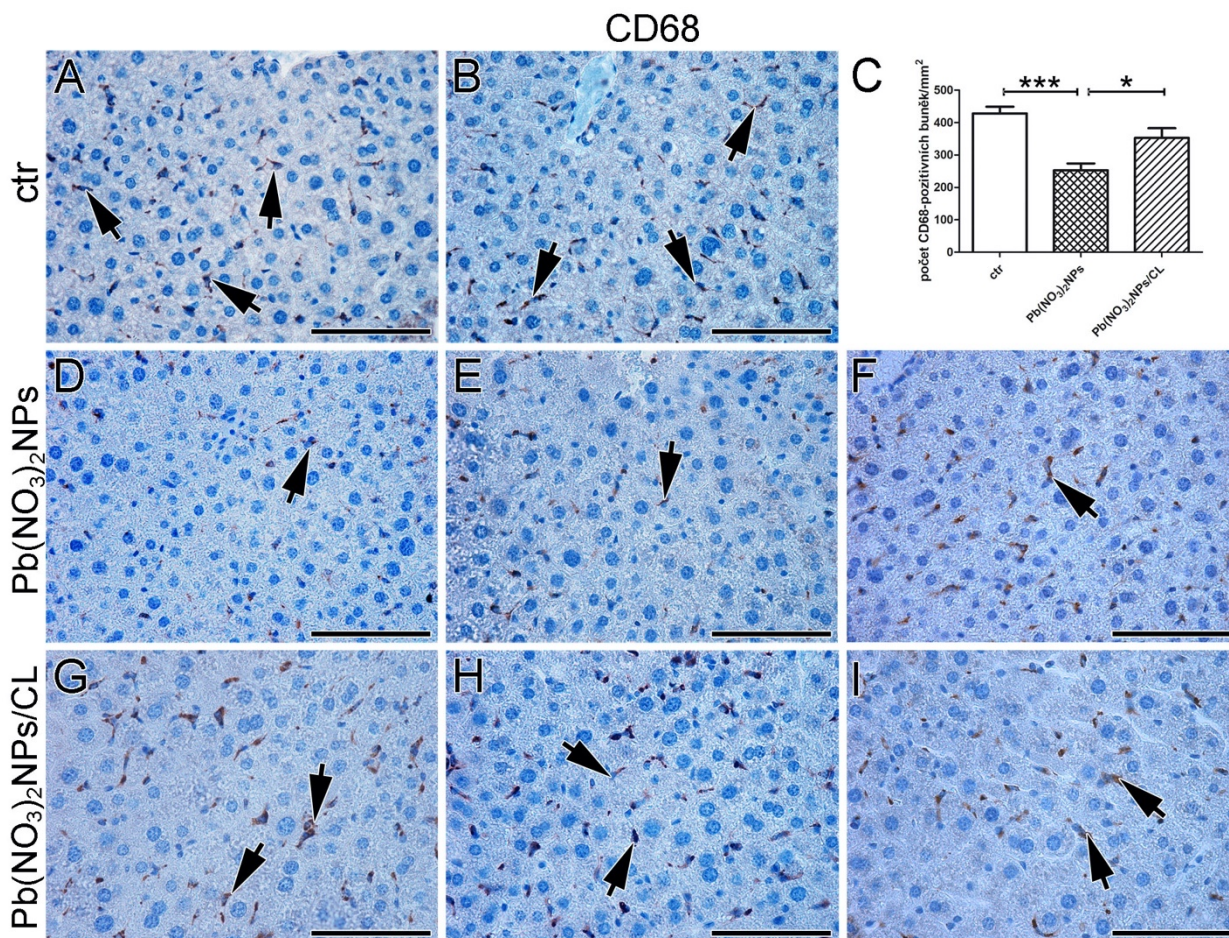
**Obrázek 39.** Schéma detekovaných imunitních markerů v játrech a jejich vzájemných souvislostí. Expze prozánětlivých cytokinů je regulována aktivovaným transkripčním faktorem NFkB1 (Hunter a de Plaen, 2014). Prozánětlivé cytokiny jsou vylučovány Kupfferovými buňkami, které navíc vylučují chemokiny a další látky ovlivňující chemotaxi neutrofilních granulocytů (a naopak) (Arango Duque a Descoteaux, 2014). Deregulovaná expze prozánětlivých cytokinů může aktivovat Itoovy buňky, jež vylučují kolagen, způsobující fibrózu a nevratné poškození tkání (Tsukada a kol., 2006; Liu a kol., 2012).

##### 5.4.2.1 Počet CD68-pozitivních buněk je v játrech signifikantně snížen po inhalaci $Pb(NO_3)_2$ NPs

Makrofágy byly detekovány také v játrech, kde jsme je kvantifikovali (obr. 40C; P2). Změna počtu CD68-pozitivních buněk odpovídala trendu v plicích. Nejvíce CD68-pozitivních buněk bylo nalezeno v kontrolní skupině (obr. 40A,B). Počet CD68-pozitivních buněk byl v  $Pb(NO_3)_2$ NPs skupině oproti kontrolní skupině signifikantně nižší (\*\*\*)  $p < 0,001$ , obr. 40D,E,F). V  $Pb(NO_3)_2$ NPs/CL skupině se počet CD68-pozitivních buněk ke kontrolní skupině přiblížil, stále



byl ale nižší oproti kontrole (obr. 40G,H,I). Rozdíl v počtu CD68-pozitivních buněk mezi  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  a  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$  byl statisticky významný (\*  $p < 0,05$ ).



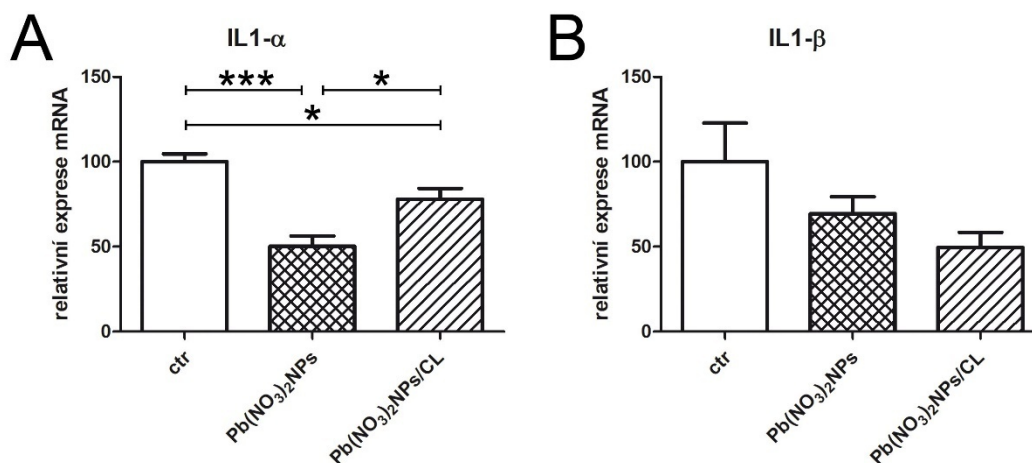
**Obrázek 40.** Analýza CD68-pozitivních buněk v játrech. **A, B** – Počet CD68-pozitivních buněk (šípky) byl v kontrolní skupině nejvyšší. **C** – Kvantifikace CD68-pozitivních buněk (P2). Nejvíce CD68-pozitivních buněk bylo detekováno v kontrolní skupině, rozdíl mezi kontrolní skupinou a  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupinou byl statisticky signifikantní (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). Počet CD68-pozitivních buněk byl v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$  ve srovnání s  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupinou vyšší, rozdíl byl statisticky významný (\*  $p < 0,05$ ), stále byl však nižší než v kontrolní skupině. **D, E, F** – Ve skupině  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  byl ve srovnání s kontrolní skupinou statisticky nižší počet CD68-pozitivních buněk (šípky). **G, H, I** – V  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$  byl počet CD68-pozitivních buněk (šípky) vyšší než v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině (\*  $p < 0,05$ ), stále byl však nižší než v kontrolní skupině. CD68-pozitivní buňky byly detekovány pomocí nepřímé trojstupňové histologické metody s použitím markeru CD68 (DAB, hnědě). Negativní jádra buněk jsou obarvena za pomoci hematoxylinu (modře). Měřítka – 100  $\mu\text{m}$ .

#### 5.4.2.2 Nižší exprese interleukinů v játrech po inhalaci $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$

Stejně jako v plicích byla i v játrech provedena analýza genové exprese vybraných prozánětlivých cytokinů, interleukinu 1- $\alpha$ , interleukinu 1- $\beta$  a interleukinu 6.

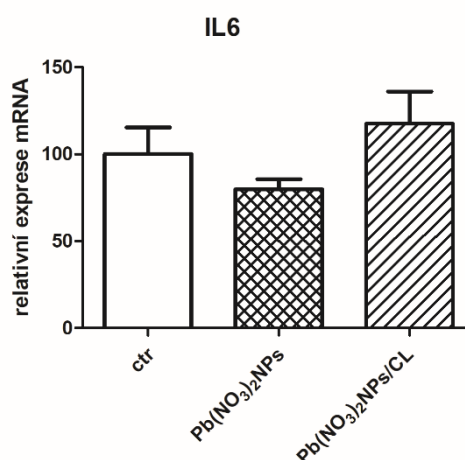
Nejvyšší genová exprese interleukinu 1- $\alpha$  byla zaznamenána u kontrolní skupiny (obr. 41A). Naopak nejnižší exprese byla detekována v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině, pokles mezi kontrolní a  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupinou byl signifikantní (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). Rozdíly v relativní genové expresi v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$  skupině byly vzhledem ke kontrolní i  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině statisticky významné (\*  $p < 0,05$ ).

Expresse genu interleukinu 1- $\beta$  v játrech vykazovala rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami, které ale byly statisticky nevýznamné ( $p > 0,05$ ) (obr. 41B). Nejvyšší exprese spolu s největší variabilitou mezi jedinci byla zaznamenána v kontrolní skupině. V  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině byla genová exprese interleukinu 1- $\beta$  oproti kontrolní skupině nižší, ale nejnižší exprese byla zaznamenána v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs/CL}$  skupině. Rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami nebyly statisticky významné ( $p > 0,05$ ).



**Obrázek 41.** Analýza relativní genové exprese interleukinu 1- $\alpha$  a interleukinu 1- $\beta$  v játrech. **A** – Rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami byly statisticky významné (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Největší relativní genová exprese interleukinu 1- $\alpha$  byla zaznamenána v kontrolní skupině, nejnižší naopak v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině. **B** – Nejvyšší exprese interleukinu 1- $\beta$  byla detekována v kontrolní skupině, mezi jedinci byla ovšem vysoká variabilita. Genová exprese byla v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině nižší než ve skupině kontrolní, nejnižší exprese byla nicméně zaznamenána v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs/CL}$  skupině.

Rozdíly v expresi interleukinu 6 mezi jednotlivými experimentálními skupinami v játrech byly statisticky nevýznamné ( $p > 0,05$ ) (obr. 42). Nejvyšší exprese byla zaznamenána v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs/CL}$  skupině, nejnižší v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině. V kontrolní a  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině byla zaznamenána vyšší variabilita mezi jedinci.



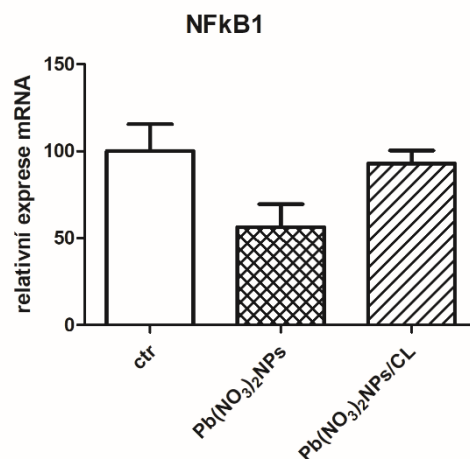
**Obrázek 42.** Analýza relativní genové exprese interleukinu 6 v játrech. Nejvyšší exprese interleukinu 6 byla detekována v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs/CL}$  skupině, nejnižší naopak v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině. Rozdíly mezi jednotlivými



experimentálními skupinami nebyly statisticky významné ( $p > 0,05$ ). V kontrolní a  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$  skupině byla mezi jedinci zaznamenána vyšší variabilita.

#### 5.4.2.3 Nižší exprese *NFκB1* v játrech po inhalaci $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$

Trend rozdílů genové exprese *NFκB1* se v játrech měnil velmi podobně jako v plicích, rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami byly taktéž nesignifikantní ( $p > 0,05$ ) (obr. 43). Nejnižší exprese byla zaznamenána v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině, nejvyšší v kontrolní skupině.



**Obrázek 43.** Analýza relativní genové exprese *NFκB1* v játrech. Nejvyšší genová exprese *NFκB1* byla detekována v kontrolní skupině, nejnižší naopak v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupině. Rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami nebyly statisticky významné ( $p > 0,05$ ).

Stejně jako v plicích byla i v játrech po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  imunitní odpověď snížena. Pětítýdenní eliminační perioda, stejně jako v plicích, dopomohla k návratu analyzovaných faktorů na hodnoty blízké kontrolní skupině.

## 6 DISKUSE

Nanočástice vznikají přirozeně při mnoha přírodních procesech (sopečná aktivita, rozsáhlé požáry, eroze) a jsou produkovány rovněž při řadě lidských činností, zejména v souvislosti s průmyslovou výrobou, energetikou a dopravou (Li a kol., 2013; Nováková, 2015; Dongarra a Varrica, 1998). Lidstvo tak svojí aktivitou významnou měrou přispívá ke zvyšování jejich množství a tím i ke znečišťování životního prostředí, ohrožujícímu samotný život na Zemi (Buzea a kol., 2007).

Potenciální riziko představují nanočástice těžkých kovů, neboť těžké kovy jsou v přírodě špatně rozložitelné a pro živé organismy toxické. Mezi nejčastěji se vyskytující těžké kovy v ovzduší patří mj. olovo, kadmium či zinek (Kemp, 2002; Pacyna a kol., 2007). Výzkum jejich negativních účinků na živé organismy je stále aktuální, protože mnohé mechanismy jejich působení na organismus nebyly dosud popsány.

Částice s alespoň jedním rozměrem od 1 do 100 nm se díky svým unikátním vlastnostem mohou snadno dostat do těl živých organismů, kde se pak dokáží snadno a rychle šířit (Elsaesser a Howard, 2012).

## 6.1 Možnosti vstupu nanočástic do organismu

Mezi tři nejčastější způsoby vstupu NPs do organismu patří (Elsaesser a Howard, 2012):

1. **Inhalace.** Nebezpečí inhalovaných NPs spočívá právě v jejich velikosti, protože jsou natolik malé, že nejsou zachyceny v nosní dutině, ale pokračují dál až do dolních cest dýchacích, kde mohou způsobit vážné změny (Jeevanandam a kol., 2018; Li a kol., 2013). Na druhou stranu byly provedeny studie, které využívají inhalaci léků o velikosti NPs k terapeutickým účelům, např. k léčbě rakoviny plic (Lee a kol., 2015). Efekt inhalace NPs různých druhů (organických i anorganických) byl popsán již v mnoha studiích. Většina výzkumů využívá jako modelový organismus myš či krysou (Dumková a kol., 2016; Dumková a kol., 2020a; Kim a kol., 2011; Li a kol., 2013; Sung a kol., 2009; Sung a kol., 2011). Úskalím využití těchto modelových organismů je odlišná stavba jejich nosní dutiny, která je oproti člověku složitější – slizniční povrch, kde se mohou inhalované částice zachytit, je členitější díky početnějším skořepám, (Harkema a kol., 2012). Studie využívající člověka jako modelový organismus sice také existují, ale nejsou zdaleka tak časté (Andujar a kol., 2014; Miller a kol., 2017) a většinou se jedná o krátkodobé experimenty.
2. **Gastrointestinální cesta.** Nanočástice se v potravě přirozeně vyskytují, ovšem mohou se do ní dostat nežádoucí, odpadní NPs vytvořené v souvislosti s průmyslovými procesy, ať již při výrobě daného potravinového produktu nebo při jeho balení. V potravě se tak mohou vyskytovat například nanočástice stříbra, oxidu zinečnatého, oxidu železitého, oxidu titaničitého atd., u kterých byl již dříve prokázán jejich negativní účinek na živé organismy (McClements a Xiao, 2017).
3. **Dermální cesta.** NPs se mohou do lidského těla dostat také přes kůži. Do mnoha kosmetických produktů jsou přidávány NPs pro zvýšení vstřebávání daného produktu (jedná se např. o lipidové vesikuly) nebo také pro blokování slunečního UV záření – NPs oxidu zinečnatého a oxidu titaničitého, které navíc dodávají kosmetickému produktu transparentnost (Choksi a kol., 2010; Katz a kol., 2015). Přestože byla u těchto druhů NPs prokázána toxicita při jejich inhalaci (Pujalté a kol., 2017; Rossner a kol., 2018), při dermálním použití produktů obsahujících tyto druhy NPs žádný prokazatelně negativní efekt pozorován nebyl (Katz a kol., 2015).

## 6.2 Pozitivní účinky některých druhů nanočástic na živé organismy

Ačkoli jsou živé organismy vystaveny expozici NPs od jejich samotného vzniku, stále zvyšující se množství NPs v životním prostředí může zásadně ohrozit jejich zdraví. Přestože bylo publikováno mnoho studií zabývajících se negativním vlivem NPs na živé organismy, trend jejich produkce má v současnosti nadále stoupající tendenci. Na druhou stranu existují ideje a koncepty, které ukazují na unikátní vlastnosti NPs a na jejich možnosti využití ke zlepšování kvality života (Freitas, 2005; Jeevanandam a kol., 2018; URL 23).

Jedním z oborů, které mají snahu o využití nanočástic ve prospěch člověka a jeho zdraví, je nanomedicína – aplikace nanotechnologie v medicíně. The European Science Foundation (ESF) definuje nanomedicínu jako vědu a technologii uplatňující se v diagnostice, léčbě, prevenci nemocí a zranění, snižování bolesti, ochraně a zlepšování lidského zdraví s využitím molekulárních nástrojů a poznatků o fungování lidského těla na molekulární úrovni (Aydin a kol., 2012).

Za klíčový pro vznik tohoto nového medicínského oboru lze považovat rok 2002, kdy americký Institut zdraví zveřejnil program nanovědy a nanotechnologie v medicíně. Primárním konceptem nanomedicíny byly tzv. nanoroboti (léčba jednotlivých buněk na molekulární úrovni pomocí robotů o velikosti v řádech nanometrů), který vycházel z idejí fyzika Richarda Feynmana, jenž již v roce 1959 navrhoval použití obráběcích strojů na výrobu menších obráběcích strojů, které by vyráběly ještě menší obráběcí stroje atd., až by vznikly stroje řádově velikosti atomů. Práce se stroji této velikosti by přinesla přesné, spolehlivé, kontrolovatelné a v neposlední řadě ekonomické postupy v medicíně, které mají potenciál zlepšit kvalitu života lidstva. Ačkoli se nanomedicína rozvinula do mnoha různých směrů, Feynmanův pohled na ni zůstává stále aktuální (Freitas, 2005).

Třebaže je nanomedicína dosud poměrně kontroverzním oborem (existují spory o jejím úspěchu a efektivitě), okolo 50 postupů je dnes již součástí lékařské praxe a více než 400 dalších se klinicky testuje. Mezi rozšířené metody patří např. využití nanočástic (nejčastěji o velikosti 5–250 nm) jako nosičů léčiv k cílovým tkáním (nanosized drug delivery system). Tato metodika slouží ke specifické aplikaci léčiv v konkrétních oblastech s cílem snížit jejich toxicitu a zásah do lidského organismu a používá se např. při léčbě akutní myeloidní leukémie (správného poměru léčiv lze kvůli jejich rozdílným vlastnostem dosáhnout pouze „zapouzdřením“ do nanoobjektu). Jedním z největších úspěchů nanomedicíny je bezesporu zavedení metody využívající aplikaci nukleových kyselin pacientům trpícím některým ze vzácných onemocnění (Aydin a kol., 2012, Germain a kol., 2020).

Přes nesporný pozitivní přínos nanočástic v biomedicínských odvětvích je nezbytné zohlednit i jejich negativní působení na organismus. Riziko je např. ve velkých městských aglomeracích, kde se mj. nachází nezanedbatelné množství NPs těžkých kovů. Efekty inhalovaných nanočástic olova na živé organismy byly již v minulosti zkoumány, ale studie používaly nejčastěji NPs oxidu olovnatého (PbO), tedy olova v nerozpustné formě (Coufalík a kol., 2016; Dumková a kol., 2017; Dumková a kol., 2020a; Al Nagar a kol., 2020; Sutunkova a kol., 2020; Lebedová a kol., 2018;

Zhang a kol., 2015; URL 24). Nicméně rozdíly v efektech rozpustné a nerozpustné formy olovnatých nanočástic dosud porovnány nebyly.

Mechanismy imunitní odpovědi a reparační procesy po inhalaci nanočástic těžkých kovů představují komplexní problém, který dosud nebyl zcela objasněn. Tato práce se tedy zabývala vlivem inhalace vysoce rozpustných NPs dusičnanu olovnatého na imunitní systém a reparaci plic a jater a umožnila porovnat rozdíly jejich vlivu oproti nerozpustným formám nanočástic olova (Coufalík a kol., 2016; Dumková a kol., 2020b). Rozdíly v rozpustnosti nanočástic dusičnanu olovnatého a oxidu olovnatého (Dumková a kol., 2020a) jsou na první pohled patrné z analýzy z transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Zatímco nerozpustné nanočástice oxidu olovnatého byly nalezeny v plicích, játrech i ledvinách (Dumková a kol., 2020a), v experimentu s rozpustnou formou olova, dusičnanem olovnatým, žádné nanočástice v TEM nalezeny nebyly (Dumková a kol., 2020b).

### 6.3 Patologické změny v plicích a v játrech

V primárním cílovém orgánu, v plicích, byly rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinami exponovanými statisticky významné, podobně jako v experimentu s nerozpustnou formou olova prováděném s podobným experimentálním designem (Dumková a kol., 2020a). Významné histopatologické změny v plicích byly detekovány také v jiných pracech zabývajících se toxicitou nanočástic, např. při inhalačních experimentech využívajících oxid kademnatý (Dumková a kol., 2016) či oxid ceričitý (Rice a kol., 2015). Podobně byly signifikantní změny nalezeny ve vzorcích plic svářeců, kteří jsou vystaveni NPs různých kovů (největší podíl zde tvoří železo, mangan a chrom) (Andujar a kol., 2014).

V souvislosti s expozicí člověka nanočásticím je v současné době nejvíce diskutovaná chronická obstrukční plicní nemoc (COPD – chronic obstructive pulmonary disease), která se manifestuje jako kombinace bronchiolitidy a emfyzému, tedy změn podobných, jaké byly nalezeny u našich experimentálních jedinců (Agustí a Cosío, 2006). Tato choroba je i v dnešní době moderní medicíny rizikovým stavem, představujícím častou příčinu úmrtí po celém světě. V rozvinutých zemích se jedná o pátou nejčastější příčinu úmrtí (Mannino a Buist, 2007), v USA dokonce čtvrtou (po infarktu, mrtvici a rakovině) (Hurd, 2000) a v rozvojových zemích pak o šestou. Celosvětový podíl COPD na úmrtí je tak vysoký i přesto, že se této chorobě dá podle Světové zdravotnické organizace (WHO) snadno předejít. Mezi důležité faktory ovlivňující COPD patří především kvalita ovzduší a snížení množství nežádoucích inhalovaných částic, dále pak např. i omezení kouření (Mannino a Buist, 2007). V současné době existují koncepty, které navrhují nanočástice některých druhů polymerů jako možný prostředek k aplikaci léčiva při terapii COPD (Yhee a kol., 2016; Mohamed a kol., 2019).

V játrech byly v našich obou experimentálních skupinách nalezeny signifikantní histopatologické změny. V experimentu s nanočásticemi nerozpustné formy olova (Dumková a kol., 2020a) a s obdobným experimentálním designem ale histopatologické změny statisticky významné nebyly. Nicméně histopatologické nálezy byly svým charakterem velmi podobné těm detekovaným po inhalaci PbONPs (Dumková a kol., 2020a; Dumková a kol., 2017). Ovšem nejen NPs olova způsobují závažné histologické změny na játrech. Negativní účinky na stavbu jaterního parenchymu byly potvrzeny i po inhalaci nanočástic stříbra (Sung a kol., 2009), po tracheální injekci nanočástic oxidu železitého (Sadeghi a kol., 2015), po žilní injekci NPs oxidu křemičitého (Nishimori a kol., 2009) nebo také po požití vody obsahující NPs oxidu zinečnatého (Kuang a kol., 2016).

Steatóza jater, přestože byla zachycena v raném stádiu, vždy představuje potenciální riziko pro postiženého jedince. Steatóza jater vzniká při narušení metabolismu tuků. Nadbytečný tuk je ukládán do hepatocytů. Důležitým rizikovým faktorem při vzniku a rozvoji steatózy je konzumace alkoholu. Existují dva základní diagnostické typy jaterní steatózy: NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease), která vzniká u jedinců nekonzumujících alkohol a AFLD (alcoholic fatty liver disease) vznikající u jedinců konzumujících alkohol (URL 19). NAFLD je v současné době nejrozšířenější jaterní chorobou (Byrne a Targher, 2015) a podle odhadů je jí postiženo až 24 % světové populace. Největší procento populace tato choroba postihuje v Jižní Africe, na Blízkém

Východu, v USA, Evropě a Asii (Younossi a kol., 2018), a to především kvůli nezdravému životnímu stylu. NAFLD navíc nepostihuje pouze játra, nýbrž snižuje funkci i jiných orgánů, a tím může způsobovat další komplikace (Byrne a Targher, 2015). Přílišná akumulace lipidů v játrech může pak vést k jaterní fibróze (Hernández-Peréz a kol., 2016). Změna v metabolismu ukládání tuků v játrech je také spojována se změnou akumulace glykogenu (URL 25). Analýza přítomnosti glykogenu v játrech v naší práci provedena nebyla, nicméně výsledky experimentu s použitím nerozpustných nanočástic olova (Smutná, 2018) tento trend potvrzují. Po jedenáctidenní inhalaci PbONPs došlo ke snížení hladiny uloženého glykogenu v játrech (Smutná, 2018).

Fokální nekróza se běžně nachází během akutního i chronického poškození jater a často bývá doprovázena fibrózou (Krishna, 2017). Tuto skutečnost potvrzují i výsledky naší práce. Fokální nekróza byla také nalezena v inhalačním experimentu s využitím nerozpustných nanočástic olova (PbONPs) (Dumková a kol., 2020a). V jiném experimentu s jedenáctidenní inhalací PbONPs (Smutná, 2018) byla přítomnost fokální nekrózy v játrech potvrzena rovněž. U těchto vzorků byla provedena i analýza programované buněčné smrti jaterních buněk, kdy ani u jedenáctidenní expozice PbONPs hladina apoptózy změněna nebyla (Smutná, 2018).

Eliminační období se neukázalo jako zcela efektivní, přestože množství detekovaného olova po inhalaci bylo ve většině cílových orgánů relativně nízké. Naopak ve femuru byly naměřené hodnoty olova i po pětidenním eliminačním období i nadále poměrně vysoké (Dumková a kol., 2020b). Olovo se po inhalaci ukládá do tvrdých tkání a odtud může být kontinuálně uvolňováno do krevního řečiště, kde následně negativně působí na organismus, přestože inhalace olovnatých nanočástic již neprobíhá (Dumková a kol., 2017).

## 6.4 Reparativní procesy a zachování homeostázy plic a jater

Reparativní chování tkání, následující po toxickém poškození, které může vést ke smrti jednotlivých buněk či ke kolapsu celého orgánu, se dá rozdělit do tří kategorií v závislosti na tom, jak efektivně se tkáň dokáže po jejich narušení obnovit (Hogan a kol., 2014; URL 22; URL 26).

1. Tkáň, které se mohou díky vysoce rozvinuté hierarchii kmenových buněk snadno reparovat, např. pokožka, střevo aj. (Hogan a kol., 2014).
2. Tkáň, které mají nízkou obměnu buněk v normálním stavu, ale po poranění dokáže rychle reagovat výměnou poškozených buněk, např. plíce, játra, břišní slinivka atd. (Hogan a kol., 2014).
3. Tkáň, které se díky nízkému počtu kmenových buněk nemohou efektivně reparovat, např. mozek nebo srdce (Hogan a kol., 2014).

Předpokládali jsme, že zvýšená obnova plicní i jaterní tkáň by tedy po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  měla probíhat, což výsledky naší studie skutečně potvrzují.

Nález fibrózy v obou experimentálních skupinách v plicích i v játrech nicméně vypovídá o nevratném poškození tkání obou cílových orgánů. Množství kolagenních vláken ale kvantifikováno nebylo, tudíž není možné určit rozdíly mezi  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  a  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs/CL}$  skupinou.

Plicní choroba, která je způsobena inhalací kovových a minerálních částic je typem plicní fibrózy a je klasifikována jako pneumokonióza. Tato choroba je rozšířena především v rozvojových zemích (nejčastěji vzdušné částice z těžby nerostných surovin). V Mongolsku v letech 1967–2004 tvořila pneumokonióza v kombinaci s chronickou bronchitidou 67,8 % případů nemoci z povolání, v Číně je každoročně diagnostikováno 10 až 15 tisíc nových případů. V rozvinutých zemích mortalita v posledních letech, díky lepším hygienickým podmínkám sice klesá, mezi lety 1968–2000 v USA ale na tuto chorobu zemřelo ročně průměrně skoro 4000 lidí (Byrne a Baugh, 2008). Naproti tomu experiment s inhalací nerozpustných nanočástic olova ( $\text{PbONPs}$ ) žádnou fibrózu či jiné změny v množství kolagenních vláken neprokázal, a to ani v experimentální skupině, která inhalovala nanočástice oxidu olovnatého ( $\text{PbONPs}$ ) po dobu 11 týdnů (ekvivalent  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  skupiny), ani ve skupině, která inhalovala  $\text{PbONPs}$  po dobu 6 týdnů a následně 5 týdnů inhalovala vzduch bez generovaných  $\text{PbONPs}$  (ekvivalent  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs/CL}$  skupiny) (Dumková a kol., 2020a). Plicní fibróza byla nalezena i v dalších experimentech využívající nanočástice; po intratracheální instilaci nanočástic oxidu cerečitého či po injekci uhlíkových nanotrubiček do plic (Ma a kol., 2012; Muller a kol., 2005)

Fibróza v játrech v současnosti představuje významný zdravotní problém a její léčba je stálou medicínskou výzvou (Tsukada a kol., 2006). Jaterní fibróza může vést ke smrtelné cirhóze jater (Hernández-Peréza kol., 2016). Fibróza v játrech je spojena se zvýšenou aktivitou Itoových buněk, které se z klidového stavu aktivují na buňky produkující enormní množství kolagenu. Přestože aktivita Itoových buněk souvisí s expresí prozánětlivých cytokinů, které byly po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  sníženy, fibróza byla u našich vzorků detekována. Vysvětlením je zvýšená exprese proteinu  $\alpha\text{-SMA}$ , který Itoovy buňky aktivuje (Tsukada a kol., 2006; Liu a kol., 2012; Dumková



a kol., 2020b). V experimentu s nerozpustnými nanočásticemi olova (PbONPs) a obdobným experimentálním designem (Dumková a kol., 2020a), nebyly jaterní fibróza a ani jiné změny týkající se množství či umístění kolagenních vláken detekovány (barveno SR) (Dumková a kol., 2020a). Na druhou stranu jsou to právě nanočástice, jež mají značný potenciál jaterní fibrózu léčit. Bylo provedeno mnoho studií zabývajících se tímto tématem a některé z nich přinesly nadějně výsledky (např. nanočástice oxidu cerečitého, nanočástice zlata aj). (Surendran a kol., 2017; Hu a kol., 2019).

Proliferační aktivita tkáně slouží k udržení homeostázy, její nadměrné zvýšení je však často spojováno s výskytem nádorů (Donato a kol., 2002; Chowers a kol., 2001). V souladu s touto skutečností byla vyšší proliferační aktivita zaznamenána v alveolárních oblastech v plicích po jedenáctidenní inhalaci PbONPs (barveno PCNA). V játrech se na druhou stranu množství PCNA-pozitivních buněk po inhalaci nerozpustných nanočástic olova (PbO) neměnilo (Dumková a kol., 2020a). Po aplikaci rozpustných nanočástic olova ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$ ) byl počet Ki67-pozitivních buněk v exponovaných skupinách vyšší než v kontrolní skupině, a to v obou cílových orgánech.

V jiných experimentech bylo nicméně prokázáno, že některé druhy NPs působí na buňky naopak anti-proliferativně (Asharani a kol., 2009). Je ovšem nezbytné zdůraznit, že pro detekci proliferujících buněk po aplikaci rozpustných nanočástic olova byla v našem experimentu použita detekce Ki67-pozitivních buněk, jako jedna z nejpoužívanějších metod v patologii. Pro jejich analýzu v dříve publikovaných studiích bylo ale využito značení PCNA-pozitivních buněk. Tedy celkový počet pozitivních buněk nelze porovnat, jelikož značí různé fáze buněčného dělení (Köhler a kol., 2010) a lze porovnat jen trendy mezi experimentálními skupinami uvnitř jednotlivých experimentů.

Progenitorové buňky, jejich vlastnosti a mechanismy diferenciacce jsou již u řady tkání známy, nicméně v plicích a játrech jsou stále předmětem výzkumu (Rawlins, 2008).

V našem experimentu byly progenitorové buňky v plicích detekovány pomocí markerů SOX9, SOX2 a Nanog. SOX2-pozitivní buňky se nacházely v epitelové vrstvě bronchů a bronchiolů a Nanog-pozitivní buňky v alveolárních oblastech. SOX9-pozitivní buňky se i přes mnoho optimalizací protokolu nepodařilo vizualizovat. Jejich exprese v plicích dospělých jedinců je stále předmětem studií, a proto nelze jednoznačně určit relevanci analýzy genové exprese (může totiž podobně jako u markeru SOX2 záležet na odebrané části vzorku) (Rawlins, 2008).

Výsledky analýzy exprese proteinu SOX2 a genu *Sox2* neprokázaly stejný trend na úrovni proteinové a genové exprese. Zatímco výsledky analýzy genové exprese na mRNA úrovni ukazují statisticky nevýznamný pokles, při detekci pomocí imunohistochemických metod byly SOX2-pozitivní buňky (exprese na proteinové úrovni) detekovány i v alveolárních oblastech, kde se běžně nevyskytují. SOX2-pozitivní buňky normálně udržují homeostázu tkání a v případě poškození se diferencují a zvyšují proliferační aktivitu. V případě inhalace  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  se proliferační aktivita v bronchiolárních oblastech statisticky nevýznamně zvýšila. Výskyt SOX2-pozitivních buněk v alveolárních oblastech lze vysvětlit tím, že SOX2 dokáže částečně přeprogramovat pneumocyty II. typu na různé typy buněk bronchiálního epitelu (Tompkins a kol.,

2011). V inhalačním experimentu s využitím nanočástic oxidu olovnatého zůstala exprese SOX2-pozitivních buněk i po jedenácti týdnech inhalace generovaných nanočástic nezměněná (Smutná, 2018).

Nanog-pozitivní buňky byly pneumocyty II. typu (AT2), které byly již dříve prokázány jako progenitorové buňky plic dospělých jedinců (Barkauskas a kol., 2013). Tyto buňky mají schopnost regulovat imunitní odpověď a jsou klíčovým zdrojem pro reparaci plicního parenchymu při jeho poškození. Jejich zvýšené množství po inhalaci  $Pb(NO_3)_2$ NPs ukazuje intenzivní reparaci poškozených tkání. V současné medicíně mají AT2 velký potenciál, protože by mohly být využívány při terapii kmenovými buňkami (Olajuyin a kol., 2019). Nanog také bývá často označován jako prognostický marker rakoviny plic, který by v budoucnosti mohl být nápomocný i při její léčbě. Výsledky studie ukázaly, že zvýšená exprese proteinu Nanog v plicích vedla k horší prognóze pacientů s rakovinou plic. V Nanog-pozitivních buňkách byl protein pomocí imunohistochemických metod detekován v cytoplasmě (Du a kol., 2013), podobně jako tomu bylo u některých buněk ve vzorcích jedinců z exponovaných skupin v naší práci, ale většina vykazovala expresi i v jádrech.

V játrech byl pro analýzu progenitorových buněk vybrán protein SOX9 a gen *Sox9*, jehož exprese byla detekována okolo cév a portálních triád. Dle výsledků analýzy genové exprese se po inhalaci  $Pb(NO_3)_2$ NPs exprese genu *Sox9* statisticky nevýznamně snížila, ovšem s vysokou variabilitou mezi jedinci v jednotlivých skupinách. Výsledky analýzy SOX9-pozitivních buněk jsou nejednotné, protože jejich množství je podmíněno velikostí dané cévy či portální triády, kde se nacházejí. Změny v expresi *Sox9* a SOX9 tedy není snadné kvantifikovat v malých vzorcích. V inhalačním experimentu s PbONPs byla v exponované skupině po jedenáctitýdenní inhalaci nanočástic detekována zvýšená exprese SOX9-pozitivních buněk (Smutná, 2018).

## 6.5 Imunitní odpověď plic a jater

Imunitní systém je obranný mechanismus organismů, který se skládá ze specializovaných buněk a signálních molekul. Imunitní odpověď lze rozdělit na dvě kategorie, nicméně mezi oběma existují spojitosti (Mackay a kol., 2000):

1. **Vrozená imunitní odpověď.** Využívá imunitní buňky se schopností fagocytózy, makrofágy či neutrofilů atd., dále pak buňky, které dokáží vyloučit mediátory zánětlivé reakce, žírné buňky, bazofilní granulocyty aj. a lymfocyty. Mezi další součásti patří např. cytokiny (Mackay a kol., 2000). Úlohou vrozené imunitní odpovědi je okamžitá obrana organismu hostitele (Parkin a Cohen, 2001).
2. **Adaptivní imunitní odpověď.** Spočívá v antigen-specifických reakcích využívajících lymfocyty. Její vývoj je dlouhý, trvá několik dní až týdnů. Díky specifitě je efektivnější a na rozdíl od vrozené imunitní odpovědi nedochází při jejím uplatnění k poškození tkání (Parkin a Cohen, 2001).

Snížená imunitní reakce způsobuje těžké infekce či se může podílet na vzniku nádorů, zvýšená naopak alergické reakce a autoimunitní onemocnění (Parkin a Cohen, 2001).

Dosud byla publikována již řada studií, zabývajících se imunitní odpovědí organismu po inhalaci nanočástic. Výsledky ovšem nebyly konzistentní, protože imunitní reakce organismu závisí na fyzických i chemických vlastnostech daných nanočástic (Kononenko a kol., 2015). Dlouhodobá inhalace nanočástic může způsobovat chronický zánět, který je pro organismus poškozující a může vést k destrukci tkání (Gabay, 2006), jak bylo již popsáno v několika studiích (Dumková a kol., 2016). Tento trend jednoznačně potvrzují i výsledky našeho experimentu.

Neutrofilní granulocyty se během poškození tkáně pomocí chemotaxe přesunou z krve na poškozené místo. Neutrofilní granulocyty se v plicním parenchymu vyskytují také při sekundárním poškození plic, např. při chronické obstrukční nemoci plic (COPD) nebo syndromu akutní dechové tísně (ARDS) (Hyun a Hong, 2017). Několik studií potvrdilo souvislost neutrofilů a akutního i chronického zánětu s nanomateriály (nanomateriály zvyšují zánět). Přestože neutrofilové tvoří „první vlnu“ imunitní odpovědi, interakce nanočástic a neutrofilů je v současné době stále předmětem výzkumu. Naopak dobře prostudovaným tématem jsou makrofágy, tvořící „druhou vlnu“ imunitní reakce (Keshavan a Fadeel, 2020). Neutrofilové jsou důležitou součástí mechanismu odstraňování nanočástic (pomocí fagocytózy) (Keshavan a Fadeel, 2020). Neutrofilové byly v plicích po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  detekovány v alveolárních oblastech. Tato skutečnost potvrdila závažnost nalezených patologických změn.

Žírné buňky souvisejí s alergickou reakcí, ovšem změna v jejich množství po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  nebyla i přes zaznamenaný nárůst statisticky významná. Reakce žírných buněk záleží na fyzických i chemických vlastnostech konkrétních NPs, jak bylo prokázáno například u NPs stříbra (Aldossari a kol., 2015). Mastocyty jsou také často spojovány s kouřením. Dle provedených studií je množství žírných buněk v plicích kuřáka vyšší, než v plicích nekuřáka (Andersson a kol., 2015). Množství žírných buněk se také zvyšuje za přítomnosti fibrózy (Cha

a kol., 2012), což se potvrzuje i v případě skupin exponovaných  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$ . Rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami nebyly ovšem signifikantní a mezi jedinci v každé skupině byla pozorována vysoká variabilita. Dalším z důležitých aspektů studia žírných buněk je jejich aktivace, která ale v této práci zohledněna nebyla (Andersson a kol., 2015). Přestože počet žírných buněk v plicích byl po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  vyšší, exprese prozánětlivých cytokinů v plicích byla naopak nižší, i přesto, že mastocyty cytokiny vylučují (URL 27). Může to být způsobeno nižším počtem žírných buněk oproti plicním makrofágům. V experimentu, kde byly do buněčné kultury žírných buněk z kostní dřeně aplikovány nanočástice stříbra (Aldossari a kol., 2015), indukovaly stříbrné nanočástice degranulaci žírných buněk, a tím spustily alergickou reakci (Aldosarri a kol., 2015), nicméně proces degranulace jsme zde podrobně nesledovali.

Počet makrofágů byl po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  v obou cílových orgánech statisticky významně nižší, v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$  skupině se hodnoty blížily kontrolní skupině. V  $\text{PbONPs}$  inhalačním experimentu s obdobným experimentálním designem (Dumková a kol., 2020a) se množství makrofágů naopak zvýšilo při detekci makrofágů stejnou metodou i markerem (CD68) (Dumková a kol., 2020a). Po inhalaci  $\text{NPs}$  oxidu titaničitého (Grassian a kol., 2007) (inhalační experiment s obdobným experimentálním designem jako náš experiment) došlo také ke zvýšení množství makrofágů, ve skupině s eliminačním obdobím se ale hodnoty, stejně jako v naší práci přiblížily, k hodnotám kontrolní skupiny (Grassian a kol., 2007).

Snížení počtu plicních makrofágů souvisí také s expresí prozánětlivých markerů (Gabay, 2006). Přestože relativní exprese vybraných prozánětlivých cytokinů se po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  snížila, po inhalaci jiných druhů nanočástic, např. po inhalaci nanočástic oxidu titaničitého (Armand a kol., 2013), se naopak zvýšila. Exprese mnoha prozánětlivých cytokinů je také ovlivněna transkripčním faktorem NF $\kappa$ B1 (Hunter a de Plaen, 2014). Snížení plicních a jatrných makrofágů tedy společně se snížením exprese NF $\kappa$ B1 přispělo ke snížení exprese prozánětlivých cytokinů.

## 7 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo stanovit vliv inhalace rozpustných nanočástic olova na imunitní systém a následnou reparaci plic a jater na modelovém organismu laboratorní myši:

- Hmotnost obou cílových orgánů byla po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  oproti kontrolní skupině nižší.
- Po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  statisticky signifikantně vzrostl rozsah nalezených histopatologických změn v obou cílových orgánech.
  - Eliminační období v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$  skupině v plicích nepřineslo, na rozdíl od jater, zlepšení v počtu nalezených histopatologických změn.
- V obou cílových orgánech probíhala po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  intenzivní reparace tkání:
  - Místy byla tkáň nenávratně poškozena, byla zde nalezena počínající fibróza.
  - Proliferační aktivita se v obou cílových orgánech po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  statisticky nevýznamně zvýšila, mezi jedinci byla ovšem zaznamenána vysoká variabilita.
  - Počet progenitorových buněk se v alveolárních oblastech plic po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  zvýšil.
  - Reparace tkání byla v exponované skupině s eliminačním obdobím vysoce variabilní.
- Po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  došlo ke snížení imunitní odpovědi:
  - Genová exprese vybraných prozánětlivých cytokinů a transkripčního faktoru NF $\kappa$ B1 byla po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  nižší.
  - Počet makrofágů se v obou cílových orgánech po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  snížil.
  - Pětitédenní eliminační období v  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}/\text{CL}$  skupině vedlo k vyšší imunitní odpovědi v játrech.
  - Neutrofilní granulocyty byly v plicích po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  nalezeny také mimo cévy, počet žírných buněk po inhalaci  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$  vzrostl.
- Efekty inhalace rozpustných a nerozpustných nanočástic olova se lišily v nálezu kolagenních vláken, počtu makrofágů, proliferační aktivity v plicích i v játrech a nálezu progenitorových buněk v játrech.

V budoucnu bude nezbytné se podrobněji zaměřit na eliminační mechanismy, především pak na úlohu kmenových buněk a jejich diferenciaci, jež mají zejména v medicíně velký potenciál. Dále bude třeba zkoumat efekty různých koncentrací nanočástic v dlouhodobém měřítku.

Tato práce je součástí článku publikovaného v časopise *International Journal of Molecular Sciences* (IF = 4,5) (P4).

DUMKOVÁ, Jana, Tereza SMUTNÁ, Lucie VRLÍKOVÁ, Bohumil DOČEKAL, Daniela KRISTEKOVÁ, Zbyněk VEČEŘA, Zuzana HUSÁKOVÁ, Veronika JAKEŠOVÁ, Adriena JEDLIČKOVÁ, Pavel MIKUŠKA, Lukáš ALEXA, Pavel COUFALÍK, Michaela TVRDOŇOVÁ, Kamil KŘŮMAL, Tomáš VACULOVÍČ, Viktor KANICKÝ, Aleš HAMPL a Marcela BUCHTOVÁ. **A Clearance Period after Soluble Lead Nanoparticle Inhalation Did Not Ameliorate the Negative Effects on Target Tissues Due to Decreased Immune Response.** *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; **21**(22).



## 8 SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1.</b> Schéma epitelů plicní tkáně (upraveno podle Wong a kol., 2009 a Balko a kol., 2017)..	18
<b>Obrázek 2.</b> Podkovovitá chrupavka v průdušce vyšší úrovně.....	19
<b>Obrázek 3.</b> Mikroskopická stavba plic.....	20
<b>Obrázek 4.</b> Mikroskopická stavba jater.....	22
<b>Obrázek 5.</b> Jaterní lalůčky (upraveno dle Balko a kol., 2017).....	23
<b>Obrázek 6.</b> Experimentální design. ....	26
<b>Obrázek 7.</b> Inhalační komora s inhalačními klecemi (foto Eva Svozilová, DiS., Ústav analytické chemie, AV ČR, v.v.i. ....	26
<b>Obrázek 8.</b> Histologické barvení Hematoxylin-eosin. ....	28
<b>Obrázek 9.</b> Specifické histologické barvení Toluidinová modř.....	28
<b>Obrázek 10.</b> Specifické histologické barvení Massonův zelený trichrom. ....	29
<b>Obrázek 11.</b> Specifické histologické barvení Sirius red. ....	30
<b>Obrázek 12.</b> Schéma nepřímé trojstupňové IHC metody s využitím ABC komplexu.....	31
<b>Obrázek 13.</b> Imunohistochemická nepřímá trojstupňová metoda s využitím ABC komplexu. ...	32
<b>Obrázek 14.</b> Schéma nepřímé imunofluorescenční metody.....	34
<b>Obrázek 15.</b> Nepřímá imunofluorescenční metoda.....	34
<b>Obrázek 16.</b> Podíl hmotnosti plic na celkové hmotnosti jedinců (P2). ....	39
<b>Obrázek 17.</b> Podíl hmotnosti jater na celkové hmotnosti jedinců.....	40
<b>Obrázek 18.</b> Analýza histopatologických změn v plicích.....	43
<b>Obrázek 19.</b> Analýza histopatologických změn v játrech. ....	45
<b>Obrázek 20.</b> Analýza přítomnosti kolagenních vláken v plicích (1).....	47
<b>Obrázek 21.</b> Analýza kolagenních vláken v plicích (2).. ....	48
<b>Obrázek 22.</b> Analýza kolagenních vláken v játrech (1). ....	48
<b>Obrázek 23.</b> Analýza kolagenních vláken v játrech (2). ....	49
<b>Obrázek 24.</b> Analýza Ki67-pozitivních buněk v bronchiolárních oblastech plic. ....	50
<b>Obrázek 25.</b> Analýza Ki67-pozitivních buněk v alveolárních oblastech plic.....	51
<b>Obrázek 26.</b> Analýza Ki67-pozitivních buněk v játrech. ....	53
<b>Obrázek 27.</b> Schéma výskytu detekovaných markerů v progenitorových buňkách plic. ....	53
<b>Obrázek 28.</b> Analýza exprese proteinu SOX2 a genu <i>Sox2</i> v plicích. ....	54
<b>Obrázek 29.</b> Analýza relativní genové exprese <i>Sox9</i> v plicích. ....	55
<b>Obrázek 30.</b> Analýza Nanog-pozitivních buněk v alveolárních oblastech plic. ....	56
<b>Obrázek 31.</b> Analýza exprese proteinu SOX9 a genu <i>Sox9</i> v játrech. ....	58
<b>Obrázek 32.</b> Schéma selektovaných imunitních markerů v plicích a jejich vzájemných souvislostí. .....	59
<b>Obrázek 33.</b> Analýza MPO-pozitivních buněk v plicích. ....	60
<b>Obrázek 34.</b> Analýza mastocytů v plicích.....	61
<b>Obrázek 35.</b> Analýza CD68-pozitivních buněk v plicích. ....	62
<b>Obrázek 36.</b> Analýza relativní genové exprese interleukinu 1- $\alpha$ a interleukinu 1- $\beta$ v plicích.....	63
<b>Obrázek 37.</b> Analýza relativní genové exprese interleukinu 6 v plicích.....	64
<b>Obrázek 38.</b> Analýza relativní exprese genu NF $\kappa$ B1 v plicích.....	64

<b>Obrázek 39.</b> Schéma detekovaných imunitních markerů v játrech a jejich vzájemných souvislostí. ....	65
<b>Obrázek 40.</b> Analýza CD68-pozitivních buněk v játrech. ....	66
<b>Obrázek 41.</b> Analýza relativní genové exprese interleukinu 1- $\alpha$ a interleukinu 1- $\beta$ v játrech. ....	67
<b>Obrázek 42.</b> Analýza relativní genové exprese interleukinu 6 v játrech. ....	67
<b>Obrázek 43.</b> Analýza relativní genové exprese NF $\kappa$ B1 v játrech. ....	68

## 9 SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1.</b> Podrobné informace o postupu při detekci Ki67-pozitivních buněk s využitím imunohistochemické metody.....	32
<b>Tabulka 2.</b> Podrobné informace o postupu při detekci SOX2-pozitivních buněk. ....	32
<b>Tabulka 3.</b> Podrobné informace o postupu při detekci Nanog-pozitivních buněk.....	33
<b>Tabulka 4.</b> Podrobné informace o postupu při detekci MPO-pozitivních buněk.....	33
<b>Tabulka 5.</b> Podrobné informace o postupu při detekci CD68-pozitivních buněk.....	33
<b>Tabulka 6.</b> Podrobné informace o postupu při detekci Ki67-pozitivních buněk s využitím imunofluorescenční metody. ....	35
<b>Tabulka 7.</b> Podrobné informace o postupu při detekci SOX9-pozitivních buněk. ....	35
<b>Tabulka 8.</b> Přehled cyklů při qPCR.....	36
<b>Tabulka 9.</b> Charakteristika generovaných rozpustných nanočástic olova.....	103
<b>Tabulka 10.</b> Analýza hmotnosti cílových orgánů. Kontrolní skupina.....	105
<b>Tabulka 11.</b> Analýza hmotnosti cílových orgánů. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs skupina. ....	105
<b>Tabulka 12.</b> Analýza hmotnosti cílových orgánů. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs/CL skupina. ....	105
<b>Tabulka 13.</b> Souhrn provedených analýz na vzorcích plic.....	105
<b>Tabulka 14.</b> Kritéria pro hodnocení histopatologických změn. ....	106
<b>Tabulka 15.</b> Histopatologická analýza plic. Kontrolní skupina. ....	106
<b>Tabulka 16.</b> Histopatologická analýza plic. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs skupina. ....	107
<b>Tabulka 17.</b> Histopatologická analýza plic. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs/CL skupina.....	107
<b>Tabulka 18.</b> Kvantifikované výsledky Ki67-pozitivních buněk v bronchiolárních oblastech v plicích. Kontrolní skupina. ....	107
<b>Tabulka 19.</b> Kvantifikované výsledky Ki67-pozitivních buněk v bronchiolárních oblastech v plicích. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs skupina. ....	108
<b>Tabulka 20.</b> Kvantifikované výsledky Ki67-pozitivních buněk v bronchiolárních oblastech v plicích. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs/CL skupina.....	109
<b>Tabulka 21.</b> Kvantifikované výsledky Ki67-pozitivních buněk v alveolárních oblastech v plicích. Kontrolní skupina. ....	109
<b>Tabulka 22.</b> Kvantifikované výsledky Ki67-pozitivních buněk v alveolárních oblastech v plicích. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs skupina.....	112
<b>Tabulka 23.</b> Kvantifikované výsledky Ki67-pozitivních buněk v alveolárních oblastech v plicích. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs/CL skupina.....	114
<b>Tabulka 24.</b> Kvantifikované výsledky Nanog-pozitivních buněk v plicích. Kontrolní skupina. ....	116
<b>Tabulka 25.</b> Kvantifikované výsledky Nanog-pozitivních buněk v plicích. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs skupina. ....	120
<b>Tabulka 26.</b> Kvantifikované výsledky Nanog-pozitivních buněk v plicích. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs/CL skupina.....	124
<b>Tabulka 27.</b> Kvantifikované výsledky TB-pozitivních buněk v plicích. Kontrolní skupina. ....	127
<b>Tabulka 28.</b> Kvantifikované výsledky TB-pozitivních buněk v plicích. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs skupina. ....	128

<b>Tabulka 29.</b> Kvantifikované výsledky TB-pozitivních buněk v plicích. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs/CL skupina. .....	128
<b>Tabulka 30.</b> Kvantifikované výsledky CD68-pozitivních buněk v plicích. Kontrolní skupina. ....	129
<b>Tabulka 31.</b> Kvantifikované výsledky CD68-pozitivních buněk v plicích. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs skupina. .....	132
<b>Tabulka 32.</b> Kvantifikované výsledky CD68-pozitivních buněk v plicích. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs/CL skupina.....	136
<b>Tabulka 33.</b> Souhrn provedených analýz na vzorcích jater. ....	140
<b>Tabulka 34.</b> Histopatologická analýza jater. Kontrolní skupina. ....	140
<b>Tabulka 35.</b> Histopatologická analýza jater. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs skupina.....	141
<b>Tabulka 36.</b> Histopatologická analýza jater. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs/CL skupina. ....	141
<b>Tabulka 37.</b> Kvantifikované výsledky Ki67-pozitivních buněk v játrech. Kontrolní skupina. ....	141
<b>Tabulka 38.</b> Kvantifikované výsledky Ki67-pozitivních buněk v játrech. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs skupina. .....	145
<b>Tabulka 39.</b> Kvantifikované výsledky Ki67-pozitivních buněk v játrech. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs/CL skupina.....	149
<b>Tabulka 40.</b> Kvantifikované výsledky CD68-pozitivních buněk v játrech. Kontrolní skupina. ....	152
<b>Tabulka 41.</b> Kvantifikované výsledky CD68-pozitivních buněk v játrech. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs skupina. .....	154
<b>Tabulka 42.</b> Kvantifikované výsledky CD68-pozitivních buněk v játrech. Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs/CL skupina.....	156

## 10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AGUSTÍ, A. G. N., B. S. COSÍO. Ephysema, General. LAURENT, Geoffrey J. a Steven D. SHAPIRO. *Encyclopedia of Respiratory Medicine*. Cambridge: Academic Press, 2006, s. 448-450. ISBN 978-0-12-370879-3.

AL NAGGAR, Yahya, Khaled DABOUR, Saad MASRY, Ahmed SADEK, Elsaied NAIEM a John P. GIESY. Sublethal effects of chronic exposure to CdO or PbO nanoparticles or their binary mixture on the honey bee (*Apis millefera* L.). *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2020, **27**(16), 19004-19015 [cit. 2020-12-08]. DOI: 10.1007/s11356-018-3314-2. ISSN 0944-1344. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-018-3314-2>

ALDOSSARI, Abdullah A., Jonathan H. SHANNAHAN, Ramakrishna PODILA a Jared M. BROWN. Influence of physicochemical properties of silver nanoparticles on mast cell activation and degranulation. *Toxicology in Vitro* [online]. 2015, **29**(1), 195-203 [cit. 2020-12-15]. DOI: 10.1016/j.tiv.2014.10.008. ISSN 08872333. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233314001982>

ALLEN, Judith E, Tara E SUTHERLAND a Dominik RÜCKERL. IL-17 and neutrophils: unexpected players in the type 2 immune response. *Current Opinion in Immunology* [online]. 2015, **34**, 99-106 [cit. 2020-12-05]. DOI: 10.1016/j.coi.2015.03.001. ISSN 09527915. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791515000412>

ALLOUBA, Mona H., Ahmed M. ELGUINDY, Navaneethakrishnan KRISHNAMOORTHY, Magdi H. YACOUB a Yasmine E. AGUIB. Nanog: A pluripotency homeobox (master) molecule. *Global Cardiology Science and Practice* [online]. 2015, **2015**(3), 1-9 [cit. 2020-08-24]. DOI: 10.5339/gcsp.2015.36. ISSN 2305-7823. Dostupné také z: <http://www.qscience.com/doi/10.5339/gcsp.2015.36>

ANDERSSON, Cecilia K., Michiko MORI, Leif BJERMER, Claes-Göran LÖFDAHL a Jonas S. ERJEFÄLT. Alterations in Lung Mast Cell Populations in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. 2010, **181**(3), 206-217 [cit. 2020-12-15]. DOI: 10.1164/rccm.200906-0932OC. ISSN 1073-449X. Dostupné také z: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200906-0932OC>

ANDUJAR, Pascal, Angélique SIMON-DECKERS, Françoise GALATEAU-SALLÉ, *et al.* Role of metal oxide nanoparticles in histopathological changes observed in the lung of welders. *Particle and Fibre Toxicology* [online]. 2014, **11**(1) [cit. 2020-12-16]. DOI: 10.1186/1743-8977-11-23. ISSN 1743-8977. Dostupné také z: <http://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-8977-11-23>

ARANGO DUQUE, Guillermo a Albert DESCOTEAUX. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology* [online]. 2014, **5** [cit. 2021-01-14]. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00491. ISSN 1664-3224. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00491/abstract>



ARMAND, Lucie, Maylis DAGOUASSAT, Esther BELADE, et al. Titanium Dioxide Nanoparticles Induce Matrix Metalloprotease 1 in Human Pulmonary Fibroblasts Partly via an Interleukin-1 $\beta$ -Dependent Mechanism. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* [online]. 2013, **48**(3), 354-363 [cit. 2020-12-18]. DOI: 10.1165/rcmb.2012-0099OC. ISSN 1044-1549. Dostupné také z: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2012-0099OC>

ASHARANI, PV, M Prakash HANDE a Suresh VALIYAVEETIL. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biology* [online]. 2009, **10**(1) [cit. 2020-12-11]. DOI: 10.1186/1471-2121-10-65. ISSN 1471-2121. Dostupné také z: <http://bmccellbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2121-10-65>

AYDIN, Ahmet, SIPAHI, Hande a Mohammad CHAREHSAZ. Nanoparticles Toxicity and Their Routes of Exposures. SEZER, Ali Demir. *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*. 1. Croatia: InTech, 2012, s. 483-495. ISBN 978-953-51-0810-8.

BALKO, Jan, Zbyněk TONAR, Ivan VARGA, Radovan HUDÁK a kolektiv. *Memorix Histologie*. 2. Praha: Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-249-7.

BARKAUSKAS, Christina E., Michael J. CRONCE, Craig R. RACKLEY, et al. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2013, **123**(7), 3025-3036 [cit. 2020-12-12]. DOI: 10.1172/JCI68782. ISSN 0021-9738. Dostupné také z: <http://www.jci.org/articles/view/68782>

BERANOVÁ, Milena a Zbyněk TONAR. *Principy a příklady imunohistochemie: Příručka pro studenty*. Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni, 2002. Dostupné také z: [http://histologie.lfp.cuni.cz/education/guides/ihc\\_hi\\_res.pdf](http://histologie.lfp.cuni.cz/education/guides/ihc_hi_res.pdf)

BUNDSCHUH, Mirco, Juliane FILSER, Simon LÜDERWALD, Moira S. MCKEE, George METREVELI, Gabriele E. SCHAUMANN, Ralf SCHULZ a Stephan WAGNER. Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? *Environmental Sciences Europe* [online]. 2018, **30**(6), 1-2 [cit. 2020-08-18]. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0132-6>. Dostupné také z: <https://enveurope.springeropen.com/track/pdf/10.1186/s12302-018-0132-6>

BUZEA, Cristina, Ivan I. PACHECO a Kevin ROBBIE. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* [online]. 2007, **2**(4), MR17-MR71 [cit. 2020-10-30]. DOI: 10.1116/1.2815690. ISSN 1934-8630. Dostupné také z: <https://avs.scitation.org/doi/pdf/10.1116/1.2815690>

BYRNE, Christopher D. a Giovanni TARGHER. NAFLD: A multisystem disease. *Journal of Hepatology* [online]. 2015, **62**(1), S47-S64 [cit. 2021-01-14]. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.12.012. ISSN 01688278. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827814009337>

BYRNE, James D. a John A. BAUGH. The significance of nanoparticles in particle-induced pulmonary fibrosis. *The McGill Journal of Medicine* [online]. Jan 2008, **11**(1), 43-50 [cit. 2020-11-14]. ISSN 1201026X. Dostupné také z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2322933/>

CHA, Seung-Ick, Christine S CHANG, Eun Kyung KIM, *et al.* Lung mast cell density defines a subpopulation of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Histopathology* [online]. 2012, **61**(1), 98-106 [cit. 2020-12-15]. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2012.04197.x. ISSN 03090167. Dostupné také z:<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2559.2012.04197.x>

CHOKSI, Adrienne N, Tasneem POONAWALLA a Michael G WILKERSON. Nanoparticles: a closer look at their dermal effects. *Journal of Drugs in Dermatology* [online]. 2010, **9**(5), 475-81 [cit. 2020-12-17]. PMID 20480790. Dostupné také z:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20480790/>

CHOWERS, Itay, Jacob PE'ER, Ehud ZAMIR, Nelly LIVNI, Michael ILSAR a Joseph FRUCHT-PERY. Proliferative activity and p53 expression in primary and recurrent pterygia. *Ophthalmology*[online]. 2001, 19 April 2001, **108**(5), 985-988 [cit. 2020-12-11]. DOI: 10.1016/S0161-6420(00)00651-5. ISSN 01616420. Dostupné také z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161642000006515>

COUFALÍK, Pavel, Pavel MIKUŠKA, Tomáš MATOUŠEK a Zbyněk VEČEŘA. Determination of the bioaccessible fraction of metals in urban aerosol using simulated lung fluids. *Atmospheric Environment* [online]. 2016, **140**, 469-475 [cit. 2020-10-31]. DOI:

10.1016/j.atmosenv.2016.06.031. ISSN 13522310. Dostupné také z:<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231016304642>

DENNEY, Laura a Ling-Pei HO. The role of respiratory epithelium in host defence against influenza virus infection. *Biomedical Journal* [online]. 2018, **41**(4), 218-233 [cit. 2020-11-21]. DOI: 10.1016/j.bj.2018.08.004. ISSN 23194170. Dostupné také z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2319417018302592#fig2>

DONATO, Maria Francesca, Eliana AROSIO, Ersilio DEL NINO, Guido RONCHI, Pietro LAMPERTICO, Alberto MORABITO, Maria Rita BALESTRIERI a Massimo COLOMBO. High rates of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with high liver cell proliferative activity. *Hepatology* [online]. 2001, 30 October 2002, **34**(3), 523-528 [cit. 2020-12-11]. DOI: 10.1053/jhep.2001.26820. ISSN 02709139. Dostupné také z:

<http://doi.wiley.com/10.1053/jhep.2001.26820>

DONGARRA, G a D VARRICA. The presence of heavy metals in air particulate at Vulcano island (Italy). *The Science of The Total Environment* [online]. 1998, **212**(1), 1-9 [cit. 2020-12-18]. DOI: 10.1016/S0048-9697(97)00323-9. ISSN 00489697. Dostupné také z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969797003239>

DU, Yaming, Chong MA, Zhongbin WANG, Zhiliang LIU, Hongfeng LIU a Tianyi WANG. Nanog, a novel prognostic marker for lung cancer. *Surgical Oncology* [online]. 2013, **22**(4), 224-

229 [cit. 2020-12-12]. DOI: 10.1016/j.suronc.2013.08.001. ISSN 09607404. Dostupné také z:<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960740413000789>

DUMKOVÁ, Jana, Lucie VRLÍKOVÁ, Zbyněk VEČEŘA, *et al.* Inhaled Cadmium Oxide Nanoparticles: Their in Vivo Fate and Effect on Target Organs. *International Journal of Molecular Sciences*[online]. 2016, **17**(6) [cit. 2020-12-16]. DOI: 10.3390/ijms17060874. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/6/874>

DUMKOVÁ, Jana, Tereza SMUTNÁ, Lucie VRLÍKOVÁ, *et al.* Sub-chronic inhalation of lead oxide nanoparticles revealed their broad distribution and tissue-specific subcellular localization in target organs. *Particle and Fibre Toxicology* [online]. 2017, 21st December 2017, **14**(55), 1-19 [cit. 2020-08-18]. DOI: 10.1186/s12989-017-0236-y. Dostupné také z: <https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12989-017-0236-y>

DUMKOVÁ, Jana, Tereza SMUTNÁ, Lucie VRLÍKOVÁ, *et al.* Variability in the Clearance of Lead Oxide Nanoparticles Is Associated with Alteration of Specific Membrane Transporters. *ACS Nano* [online]. 2020 (a), **14**(3), 3096-3120 [cit. 2020-11-12]. DOI: 10.1021/acsnano.9b08143. ISSN 1936-0851. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.9b08143>

DUMKOVÁ, Jana, Tereza SMUTNÁ, Lucie VRLÍKOVÁ, *et al.* A Clearance Period after Soluble Lead Nanoparticle Inhalation Did Not Ameliorate the Negative Effects on Target Tissues Due to Decreased Immune Response. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020 (b), **21**(22) [cit. 2021-01-14]. DOI: 10.3390/ijms21228738. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/22/8738>

ELSAESSER, Andreas a C. Vyvyan HOWARD. Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2012, **64**(2), 129-137 [cit. 2020-12-17]. DOI: 10.1016/j.addr.2011.09.001. ISSN 0169409X. Dostupné také z:<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X11002328>

ELSHARKAWY, Ahmed M. a Derek A. MANN. Nuclear factor- $\kappa$ B and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis. *Hepatology* [online]. 2007, **46**(2), 590-597 [cit. 2020-12-05]. DOI: 10.1002/hep.21802. ISSN 02709139. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.21802>

FREITAS JR, Robert A. What is nanomedicine? *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2005, 28th March 2005, **1**(1), 2-5 [cit. 2020-10-13]. DOI: 10.1016/j.nano.2004.11.003. ISSN 1549-9634. Dostupné také z:<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1549963404000048?token=44AB143FCA4A22FCD C974E450F7E9C8364B606E47D203645B591FBA9242D49C8508DC50879AADF2389B3492 AE07720B8>

GABAY, Cem. *Interleukin-6 and chronic inflammation* [online]. 2006, 28 July 2006, **8**(Suppl 2), 1-6 [cit. 2020-12-18]. DOI: 10.1186/ar1917. ISSN 14786354. Dostupné také z:<http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar1917>

GENTRY, Patricia, Hilary BURGESS a Darren WOOD. Hemostasis. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* [online]. Elsevier, 2008, 2008, 287-330 [cit. 2021-02-27]. DOI: 10.1016/B978-0-12-370491-7.00010-6. ISBN 9780123704917. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123704917000106>

GERMAIN, Matthieu, Fanny CAPUTO, Su METCALFE, et al. Delivering the power of nanomedicine to patients today. *Journal of Controlled Release* [online]. 2020, **326**, 164-171 [cit. 2020-10-30]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.07.007. ISSN 01683659. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365920303825>

HALOVA, Ivana, Lubica DRABEROVA a Petr DRABER. Mast Cell Chemotaxis – Chemoattractants and Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology* [online]. 2012, **3** [cit. 2021-01-14]. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00119. ISSN 1664-3224. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00119/abstract>

HARKEMA Jack R., Stephan A. CAREY a James G. WAGNER. Nose, Sinus, Pharynx and Larynx., TREUTING, Piper M. a Suzanne T. DINTZIS, ed. *Comparative Anatomy and Histology Atlas: A Mouse and Human Atlas*. Cambridge: Academic Press, 2012, s. 71-85. ISBN 978-0-12-381361-9.

HE, Bangshun, Ying ZHANG, Yuqin PAN, Yeqiong XU, Ling GU, Liping CHEN a Shukui WANG. Interleukin 1 beta (IL1B) promoter polymorphism and cancer risk: evidence from 47 published studies. *Mutagenesis* [online]. 2011, **26**(5), 637-642 [cit. 2021-01-15]. DOI: 10.1093/mutage/ger025. ISSN 1464-3804. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/mutage/article-lookup/doi/10.1093/mutage/ger025>

HEILIGTAG, Florian J. a Markus NIEDERBERGER. The fascinating world of nanoparticle research. *Materialstoday* [online]. Elsevier, 2013, **16**(7/8), 262-243 [cit. 2020-06-24]. DOI: 10.1016/j.mattod.2013.07.004. Dostupné také z: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1369702113002253?token=EEA8B611BAAE49685F176A86277FA70EBFC392D445B887CB78ED038A3E5D93068E43AE4241638C667E431D0E4FF693F4>

HERNÁNDEZ-PÉREZ, Elizabeth, Plácido Enrique LEÓN GARCÍA, Norma Edith LÓPEZ-DÍAZGUERRERO, Fernando RIVERA-CABRERA a Elizabeth DEL ÁNGEL BENÍTEZ. Liver steatosis and nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to therapy. *Medwave* [online]. 2016, **16**(08), e6535-e6535 [cit. 2021-01-14]. DOI: 10.5867/medwave.2016.08.6535. ISSN 07176384. Dostupné také z: <http://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/Revisiones/RevisionClinica/6535>

HIRANO, T. a T. KISHIMOTO. Interleukin-6. SPORN, M. B. a A. B. ROBERTS, ed. *Peptide Growth Factors and Their Receptors I.: Handbook of Experimental Pharmacology* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer, 1990, s. 633-665 [cit. 2021-01-15]. ISBN 978-3-642-49295-2. Dostupné také z: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-49295-2\\_14](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-49295-2_14)

HOGAN, Brigid L.M., Christina E. BARKAUSKAS, Harold A. CHAPMAN, et al. Repair and Regeneration of the Respiratory System: Complexity, Plasticity, and Mechanisms of Lung Stem Cell Function. *Cell Stem Cell* [online]. 2014, **15**(2), 123-133 [cit. 2020-11-14]. DOI: 10.1016/j.stem.2014.07.012. ISSN 19345909. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590914003087>

HU, Qiaobin, Ji-Young LEE a Yangchao LUO. Nanoparticles Targeting Hepatic Stellate Cells for the Treatment of Liver Fibrosis. *Engineered Science* [online]. 2019 [cit. 2020-12-11]. DOI: 10.30919/es8d507. ISSN 2576988X. Dostupné také z: <http://www.espublisher.com/journals/articledetails/49/>

HURD, Suzanne. The Impact of COPD on Lung Health Worldwide. *Chest* [online]. 2000, **117**(2), 1S-4S [cit. 2021-01-14]. DOI: 10.1378/chest.117.2\_suppl.1S. ISSN 00123692. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012369215527475>

HYUN, Young-Min a Chang-Won HONG. Deep insight into neutrophil trafficking in various organs. *Journal of Leukocyte Biology* [online]. 2017, **102**(3), 617-629 [cit. 2020-12-15]. DOI: 10.1189/jlb.1RU1216-521R. ISSN 0741-5400. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1189/jlb.1RU1216-521R>

IANCU, Theodore C. Ferritin and hemosiderin in pathological tissues. *Electron Microscopy Reviews* [online]. 1992, **5**(2), 209-229 [cit. 2021-02-19]. DOI: 10.1016/0892-0354(92)90011-E. ISSN 08920354. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/089203549290011E>

JAMES, H.M., M.E. HILBURN a J.A. BLAIR. Effects of Meals and Meal Times on Uptake of Lead from the Gastrointestinal Tract in Humans. *Human Toxicology* [online]. 1985, **4**(4), 401-407 [cit. 2021-01-15]. DOI: 10.1177/096032718500400406. ISSN 0144-5952. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/096032718500400406>

JEEVANANDAM, Jaison, Ahmed BARHOUM, Yen S. CHAN, Alain DUFRESNE a Michael K DANQUAH. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology* [online]. 2018, 3 April 2018, **9**(1), 1050-1074 [cit. 2020-06-24]. DOI: 10.3762/bjnano.9.98. ISSN 2190-4286. Dostupné také z: <https://www.beilstein-journals.org/bjnano/articles/9/98>

KATZ, Linda M., Kapal DEWAN a Robert L. BRONAUGH. Nanotechnology in cosmetics. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2015, **85**, 127-137 [cit. 2020-12-17]. DOI: 10.1016/j.fct.2015.06.020. ISSN 02786915. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691515300041>

KEMP, Kåre. Trends and sources for heavy metals in urban atmosphere. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*[online]. 2002, **189**(1-4), 227-232 [cit. 2020-12-18]. DOI: 10.1016/S0168-583X(01)01047-3. ISSN 0168583X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X01010473>



KESHAVAN, Sandeep a Bengt FADEEL. Nanomaterials and Neutrophils. BONNER, James C. a Jared M. BROWN, ed. *Interaction of Nanomaterials with the Immune System* [online]. Springer, Cham, 2020, s. 35-53 [cit. 2021-01-13]. ISBN 978-3-030-33962-3. Dostupné také z: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-33962-3\\_3](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-33962-3_3)

KIM, Jin Sik, Jae Hyuck SUNG, Jun Ho JI, Kyung Seuk SONG, Ji Hyun LEE, Chang Soo KANG a Il Je YU. In vivo Genotoxicity of Silver Nanoparticles after 90-day Silver Nanoparticle Inhalation Exposure. *Safety and Health at Work* [online]. 2011, **2**(1), 34-38 [cit. 2020-12-17]. DOI: 10.5491/SHAW.2011.2.1.34. ISSN 20937911. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2093791111210059>

KOBAYASHI, Yoshihiko a Purushothama Rao TATA. Pulmonary Neuroendocrine Cells: Sensors and Sentinels of the Lung. *Developmental Cell* [online]. 2018, **45**(4), 425-426 [cit. 2020-11-21]. DOI: 10.1016/j.devcel.2018.05.009. ISSN 15345807. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580718303666?via%3Dihub>

KONONENKO, Veno, Mojca NARAT a Damjana DROBNE. Nanoparticle interaction with the immune system / Interakcije nanodelcev z imunskim sistemom. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* [online]. 2015, **66**(2), 97-108 [cit. 2020-12-18]. DOI: 10.1515/aiht-2015-66-2582. ISSN 0004-1254. Dostupné také z: <http://content.sciendo.com/view/journals/aiht/66/2/article-p97.xml>

KÖHLER, Christina U., Alexander KREUTER, Martha C. ROZYNKOWSKI, Tim RAHMEL, Waldemar UHL, Andrea TANNAPFEL, Wolfgang E. SCHMIDT a Juris J. MEIER. Validation of different replication markers for the detection of beta-cell proliferation in human pancreatic tissue. *Regulatory Peptides* [online]. 2010, **162**(1-3), 115-121 [cit. 2021-01-08]. DOI: 10.1016/j.regpep.2009.12.021. ISSN 01670115. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167011510000091>

KREYLING, Wolfgang G, Stephanie HIRN a Carsten SCHLEH. Nanoparticles in the lung. *Nature Biotechnology* [online]. 2010, **28**(12), 1275-1276 [cit. 2021-01-15]. DOI: 10.1038/nbt.1735. ISSN 1087-0156. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nbt.1735>

KRISHNA, Murli. Patterns of necrosis in liver disease. *Clinical Liver Disease* [online]. 2017, **10**(2), 53-56 [cit. 2021-01-14]. DOI: 10.1002/cld.653. ISSN 20462484. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cld.653>

KRITEK, P. A. Atelectasis. LAURENT, Geoffrey J. a Steven D. SHAPIRO. *Encyclopedia of Respiratory Medicine*. Cambridge: Academic Press, 2006, s. 215-218. ISBN 978-0-12-370879-3.

KUANG, Huijuan, Pengfei YANG, Lin YANG, Zoraida P. AGUILAR a Hengyi XU. Size dependent effect of ZnO nanoparticles on endoplasmic reticulum stress signaling pathway in murine liver. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2016, **317**, 119-126 [cit. 2020-12-12]. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.05.063. ISSN 03043894. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389416305015>

KUMAR, Prashant, Lidia MORAWSKA, Wolfram BIRMILI, et al. Ultrafine particles in cities. *Environment International* [online]. 2014, **66**, 1-10 [cit. 2020-12-18].

DOI: 10.1016/j.envint.2014.01.013. ISSN 01604120. Dostupné také z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016041201400018X>

LAGASSE, Eric. Liver Stem Cells. LANZA, Robert, Robert LANGER a Joseph VACANTI. *Principles of Tissue Engineering*. Third Edition. Cambridge: Academic Press, 2007, s. 695-701. ISBN 9780123706157.

LANDRIGAN, Philip J. The worldwide problem of lead in petrol. *Bulletin of the World Health Organization: the International Journal of Public Health* [online]. 2002, **80**(10), 68 [cit. 2020-11-21]. Dostupné také z: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/71647>

LEBEDOVÁ, J., Z. NOVÁKOVÁ, Z. VEČEŘA, et al. Impact of acute and subchronic inhalation exposure to PbO nanoparticles on mice. *Nanotoxicology* [online]. 2018, **12**(4), 290-304 [cit. 2020-12-08]. DOI: 10.1080/17435390.2018.1438679- ISSN 1743-5390. Dostupné také z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17435390.2018.1438679>

LEE, Wing-Hin, Ching-Yee LOO, Daniela TRAINI a Paul M. YOUNG. Inhalation of nanoparticle-based drug for lung cancer treatment: Advantages and challenges. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2015, **10**(6), 481-489 [cit. 2020-12-17].

DOI: 10.1016/j.ajps.2015.08.009. ISSN 18180876. Dostupné také

z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1818087615000732>

LI, Qingzhao, Xiaoli HU, Yuping BAI, et al. The oxidative damage and inflammatory response induced by leadsulfide nanoparticles in rat lung. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research*

*Association* [online]. 2013 Oct, **60**, 213-217 [cit. 2020-08-19]. DOI: 10.1016/j.fct.2013.07.046.

Dostupné také z:

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0278691513005012?token=01528E18D69FFFED5D5FFDC5229037028E4ADBC150CC5A5A269FE89C89C1B3D8EDF9AA3029029CCD1BEFA04D015684FC>

LIASKOU, Evaggelia, Daisy V. WILSON a Ye H. OO. Innate Immune Cells in Liver Inflammation. *Mediators of Inflammation* [online]. 2012, **2012**, 1-21 [cit. 2020-12-05]. DOI:

10.1155/2012/949157. ISSN 0962-9351. Dostupné také z:

<http://www.hindawi.com/journals/mi/2012/949157/>

LIU, Tianhui, Xiaoming WANG, Morten A. KARSDAL, Diana J. LEEMING a Federica GENOVESE. Molecular Serum Markers of Liver Fibrosis. *Biomarker Insights* [online].

2012, **7** [cit. 2020-12-18]. DOI: 10.4137/BMI.S10009. ISSN 1177-2719. Dostupné také z:

<http://journals.sagepub.com/doi/10.4137/BMI.S10009>

MA, Jane Y., Robert R. MERCER, Mark BARGER, Diane SCHWEGLER-BERRY, James SCABILLONI, Joseph K. MA a Vincent CASTRANOVA. Induction of pulmonary fibrosis by cerium oxide nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2012, **262**(3), 255-

264 [cit. 2020-11-14]. DOI: 10.1016/j.taap.2012.05.005. ISSN 0041008X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X12002037>

MACKAY, Ian R., Fred S. ROSEN, Peter J. DELVES a Ivan M. ROITT. The Immune System. *New England Journal of Medicine* [online]. 2000, **343**(1), 37-49 [cit. 2021-01-15]. DOI: 10.1056/NEJM200007063430107. ISSN 0028-4793. Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM200007063430107>

MANOUSAKAS, M., E. DIAPOULI, H. PAPAETHYMIU, et al. Source apportionment by PMF on elemental concentrations obtained by PIXE analysis of PM10 samples collected at the vicinity of lignite power plants and mines in Megalopolis, Greece. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* [online]. 2015, **349**, 114-124 [cit. 2021-01-15]. DOI: 10.1016/j.nimb.2015.02.037. ISSN 0168583X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X15001548>

MCINNES, Elizabeth. The respiratory system. SCUDAMORE, Cheryl L. *A Practical Guide to the Histology of the Mouse*. Wiley Blackwell, 2014, s. 180-196. ISBN 978-1-119-94120-0.

MCCLEMENTS, David Julian a Hang XIAO. Is nano safe in foods? Establishing the factors impacting the gastrointestinal fate and toxicity of organic and inorganic food-grade nanoparticles. *Npj Science of Food* [online]. 2017, **1**(1) [cit. 2020-12-17]. DOI: 10.1038/s41538-017-0005-1. ISSN 2396-8370. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/s41538-017-0005-1>

MOHAMED, Adel, Nitesh K. KUNDA, Kehinde ROSS, Gillian A. HUTCHEON a Imran Y. SALEEM. Polymeric nanoparticles for the delivery of miRNA to treat Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2019, **136**, 1-8 [cit. 2021-01-14]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2019.01.002. ISSN 09396411. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641118309421>

MIKUŠKA, Pavel, Martin VOJTĚŠEK, Kamil KŘŮMAL, Martina MIKUŠKOVÁ-ČAMPULOVÁ, Jaroslav MICHÁLEK a Zbyněk VEČEŘA. Characterization and Source Identification of Elements and Water-Soluble Ions in Submicrometre Aerosols in Brno and Šlapanice (Czech Republic). *Atmosphere* [online]. 2020, **11**(7) [cit. 2020-11-27]. DOI: 10.3390/atmos11070688. ISSN 2073-4433. Dostupné také z: <https://www.mdpi.com/2073-4433/11/7/688>

MILLER, Mark R., Jennifer B. RAFTIS, Jeremy P. LANGRISH, et al. Inhaled Nanoparticles Accumulate at Sites of Vascular Disease. *ACS Nano* [online]. 2017, **11**(5), 4542-4552 [cit. 2020-12-17]. DOI: 10.1021/acsnano.6b08551. ISSN 1936-0851. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.6b08551>

MINNEMA, Daniel J. a Paul B. HAMMOND. Effect of lead exposure on patterns of food intake in weanling rats. *Neurotoxicology and Teratology* [online]. 1994, **16**(6), 623-629 [cit. 2021-01-

15]. DOI: 10.1016/0892-0362(94)90040-X. ISSN 08920362. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/089203629490040X>

MONTICELLI, Silvia a Cristina LEONI. Epigenetic and transcriptional control of mast cell responses. *F1000Research* [online]. 2017, **6** [cit. 2020-12-05]. DOI: 10.12688/f1000research.12384.1. ISSN 2046-1402. Dostupné také z: <https://f1000research.com/articles/6-2064/v1>

MUKHTAR, Azam a Andreas LIMBECK. Recent developments in assessment of bio-accessible trace metal fractions in airborne particulate matter: A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2013, **774**, 11-25 [cit. 2020-10-31]. DOI: 10.1016/j.aca.2013.02.008. ISSN 00032670. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267013002225>

MULLER, Julie, François HUAUX, Nicolas MOREAU, et al. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2005, **207**(3), 221-231 [cit. 2020-11-14]. DOI: 10.1016/j.taap.2005.01.008. ISSN 0041008X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X0500013X>

NAVEGANTES, Kely Campos, Rafaelli DE SOUZA GOMES, Priscilla Aparecida Tártari PEREIRA, Paula Giselle CZAİKOSKI, Carolina Heitmann Mares AZEVEDO a Marta Chagas MONTEIRO. Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity. *Journal of Translational Medicine* [online]. 2017, **15**(1) [cit. 2020-12-05]. DOI: 10.1186/s12967-017-1141-8. ISSN 1479-5876. Dostupné také z: <http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-017-1141-8>

NISHIMORI, Hikaru, Masuo KONDOH, Katsuhiko ISODA, Shin-ichi TSUNODA, Yasuo TSUTSUMI a Kiyohito YAGI. Silica nanoparticles as hepatotoxicants. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2009, **72**(3), 496-501 [cit. 2020-12-12]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.02.005. ISSN 09396411. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641109000642>

NOVÁKOVÁ, Zuzana. *Toxicita nanočástic olova* [online]. Brno, 2015 [cit. 2020-08-19]. Dostupné také z: [https://is.muni.cz/th/c00ab/DP\\_Novakova.pdf?fbclid=IwAR2rZv0d7tav7yL-hEHAMRDa7pjwd6Lt5cH1xgCNjAn2IuwjMug6\\_JGVewg](https://is.muni.cz/th/c00ab/DP_Novakova.pdf?fbclid=IwAR2rZv0d7tav7yL-hEHAMRDa7pjwd6Lt5cH1xgCNjAn2IuwjMug6_JGVewg). Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí. Vedoucí práce Mgr. Klára Hilscherová, Ph.D.

ODELL, Ian D. a Deborah COOK. Immunofluorescence Techniques. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2013, **133**(4), 1-2 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1038/jid.2012.455. Dostupné také z: [https://www.jidonline.org/article/S0022-202X\(15\)35954-6/pdf](https://www.jidonline.org/article/S0022-202X(15)35954-6/pdf)

OLAJUYIN, Ayobami Matthew, Xiaoju ZHANG a Hong-Long JI. Alveolar type 2 progenitor cells for lung injury repair. *Cell Death Discovery* [online]. 2019, **5**(1) [cit. 2020-12-12]. DOI: 10.1038/s41420-019-0147-9. ISSN 2058-7716. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/s41420-019-0147-9>

PACYNA, Elisabeth G., Jozef M. PACYNA, Janina FUDALA, *et al.* Current and future emissions of selected heavy metals to the atmosphere from anthropogenic sources in Europe. *Atmospheric Environment* [online]. 2007, **41**(38), 8557-8566 [cit. 2020-12-18]. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2007.07.040. ISSN 13522310. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231007006267>

PARKIN, Jacqueline a Bryony COHEN. An overview of the immune system. *The Lancet* [online]. 2001, **357**(9270), 1777-1789 [cit. 2021-01-15]. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)04904-7. ISSN 01406736. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673600049047>

PUJALTÉ, Igor, Denis DIEME, Sami HADDAD, Alessandra Maria SERVENTI a Michèle BOUCHARD. Toxicokinetics of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles after inhalation in rats. *Toxicology Letters*[online]. 2017, **265**, 77-85 [cit. 2020-12-17]. DOI: 10.1016/j.toxlet.2016.11.014. ISSN 03784274. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427416333148>

QUEROL, X., M. VIANA, A. ALASTUEY, *et al.* Source origin of trace elements in PM from regional background, urban and industrial sites of Spain. *Atmospheric Environment* [online]. 2007, **41**(34), 7219-7231 [cit. 2021-01-15]. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2007.05.022. ISSN 13522310. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231007004700>

RAWLINS, E. L. Lung Epithelial Progenitor Cells: Lessons from Development. *Proceedings of the American Thoracic Society* [online]. 2008, **5**(6), 675-681 [cit. 2020-12-12]. DOI: 10.1513/pats.200801-006AW. ISSN 1546-3222. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2645259/>

RICE, Kevin M., Siva K. NALABOTU, Nandini D.P.K. MANNE, Madhukar B. KOLLI, Geeta NANDYALA, Ravikumar ARVAPALLI, Jane Y. MA a Eric R. BLOUGH. Exposure to Cerium Oxide Nanoparticles Is Associated With Activation of Mitogen-activated Protein Kinases Signaling and Apoptosis in Rat Lungs. *Journal of Preventive Medicine and Public Health* [online]. 2015, **48**(3), 132-141 [cit. 2020-12-16]. DOI: 10.3961/jpmph.15.006. ISSN 1975-8375. Dostupné také z: <http://jpmph.org/journal/view.php?doi=10.3961/jpmph.15.006>

ROSSNER, Pavel, Kristyna VRBOVA, Simona STRAPACOVA, *et al.* Inhalation of ZnO Nanoparticles: Splice Junction Expression and Alternative Splicing in Mice. *Toxicological Sciences* [online]. 2019, **168**(1), 190-200 [cit. 2020-12-17]. DOI: 10.1093/toxsci/kfy288. ISSN 1096-6080. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/toxsci/article/168/1/190/5220776>

RUBERTE, Jesús, Ana CARRETERO a Marc NAVARRO. Respiratory apparatus. RUBERTE, Jesús, Ana CARRETERO a Marc NAVARRO. *Morphological Mouse Phenotyping: Anatomy, Histology and Imaging*. Cambridge: Academic Press, 2017, s. 147-150. ISBN 9780128129722.

SADEGHI, L., V. Yousefi BABADI a H. R. ESPANANI. Toxic effects of the Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on the liver and lung tissue. *Bratislava Medical Journal* [online]. 2015, **116**(06),



373-378 [cit. 2020-12-12]. DOI: 10.4149/BLL\_2015\_071. ISSN 1336-0345. Dostupné také z: <https://europepmc.org/article/med/26084739>

SCHOLZEN, Thomas a Johannes GERDES. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *Journal of Cellular Physiology* [online]. 2000, **182**(3), 311-313 [cit. 2020-10-29], DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:33.0.CO;2-9. ISSN 1097-4652. Dostupné také z: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200003\)182:3%3C311::AID-JCP1%3E3.0.CO;2-9](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3%3C311::AID-JCP1%3E3.0.CO;2-9)

SCHLEH, Carsten, Manuela SEMMLER-BEHNKE, Jens LIPKA, et al. Size and surface charge of gold nanoparticles determine absorption across intestinal barriers and accumulation in secondary target organs after oral administration. *Nanotoxicology* [online]. 2011, **6**(1), 36-46 [cit. 2021-01-15]. DOI: 10.3109/17435390.2011.552811. ISSN 1743-5390. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/17435390.2011.552811>

SIRAGANIAN, Reuben P. Mast Cells. DELVES, Peter J., ed. *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)* [online]. 2nd. Cambridge: Academic Press, 1998, s. 1667 [cit. 2020-04-06]. ISBN 0-12-226765-6. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122267656000876>

SMUTNÁ, Tereza. *Vliv subchronické inhalace nanočástic PbO na cílové orgány* [online]. Brno, 2018 [cit. 2020-11-17]. Dostupné z: <https://socv2.nidv.cz/archiv40/getWork/hash/ea90ab33-f652-11e7-90e4-005056bd6e49>. Středoškolská odborná činnost. Gymnázium Brno-Řečkovice, p. o. Vedoucí práce doc. RNDr. Marcela Buchtová, Ph.D., RNDr. Kateřina Cibulková, Ph.D.

SMYTH, R. L., S. P. BREAREY. Bronchiolitis. LAURENT, Geoffrey J. a Steven D. SHAPIRO. *Encyclopedia of Respiratory Medicine*. Cambridge: Academic Press, 2006, s. 268-272. ISBN 978-0-12-370879-3.

SPRINGER, Jason M., Vineesh V. RAVEENDRAN, Selina A. GIERER, Mehrdad MAZ a Kottarappat N. DILEEPAN. Protective Role of Mast Cells in Primary Systemic Vasculitis: A Perspective. *Frontiers in Immunology* [online]. 2017, **8** [cit. 2021-01-14]. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00990. ISSN 1664-3224. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00990/full>

SUNG, Jae, Jun JI, Jung PARK, et al. Subchronic inhalation toxicity of gold nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology* [online]. 2011, **8**(1) [cit. 2020-12-17]. DOI: 10.1186/1743-8977-8-16. ISSN 1743-8977. Dostupné také z: <http://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-8977-8-16>

SUNG, Jae Hyuck, Jun Ho JI, Jung Duck PARK, et al. Subchronic Inhalation Toxicity of Silver Nanoparticles. *Toxicological Sciences* [online]. 2009, **108**(2), 452-461 [cit. 2020-12-12]. DOI: 10.1093/toxsci/kfn246. ISSN 1096-6080. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/toxsci/article/1664330/Subchronic>

SURENDRAN, Suchithra Poilil, Reju George THOMAS, Myeong-Ju MOON a Yong Yeon JEONG. Nanoparticles for the treatment of liver fibrosis. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2017, **12**, 6997-7006 [cit. 2020-12-11]. DOI: 10.2147/IJN.S145951. ISSN 1178-2013. Dostupné také z: <https://www.dovepress.com/nanoparticles-for-the-treatment-of-liver-fibrosis-peer-reviewed-article-IJN>

SUTUNKOVA, Marina P., Svetlana N. SOLOVYEVA, Ivan N. CHERNYSHOV, et al. Manifestation of Systemic Toxicity in Rats after a Short-Time Inhalation of Lead Oxide Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(3) [cit. 2020-12-08]. DOI: 10.3390/ijms21030690. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/3/690>

TAN, M. G., G. L. ZHANG, X. L. LI, et al. Comprehensive Study of Lead Pollution in Shanghai by Multiple Techniques. *Analytical Chemistry* [online]. 2006, **78**(23), 8044-8050 [cit. 2021-01-15]. DOI: 10.1021/ac061365q. ISSN 0003-2700. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac061365q>

TAYLOR, Clive R. a Shan-Rong SHI. Techniques of immunohistochemistry: Principles, Pitfalls, and Standardization. DABBS, David J. *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications* [online]. 4th. Philadelphia: Elsevier, Saunders, 2002, s. 2-4 [cit. 2020-04-13]. ISBN 978-1-4557-4461-9. Dostupné také z: [https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=KZazAQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=immunohistochemistry&ots=7z2bnINKqh&sig=ytesyBM3LRp6s82450gbc3qirK0&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=true](https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=KZazAQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=immunohistochemistry&ots=7z2bnINKqh&sig=ytesyBM3LRp6s82450gbc3qirK0&redir_esc=y#v=onepage&q&f=true)

TOBLER, Andreas a H. Phillip KOEFFLER. Myeloperoxidase: Localization, Structure, and Function. *Blood Cell Biochemistry Volume 3* [online]. Boston, MA: Springer US, 1991, 1991, 255-288 [cit. 2020-12-05]. Blood Cell Biochemistry. DOI: 10.1007/978-1-4615-3796-0\_10. ISBN 978-1-4613-6692-8. Dostupné také z: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-3796-0\\_10](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-3796-0_10)

TOMPKINS, David H., Valérie BESNARD, Alexander W. LANGE, Angela R. KEISER, Susan E. WERT, Michael D. BRUNO a Jeffrey A. WHITSETT. Sox2 Activates Cell Proliferation and Differentiation in the Respiratory Epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* [online]. 2011, **45**(1), 101-110 [cit. 2020-08-24]. DOI: 10.1165/rcmb.2010-0149OC. ISSN 1044-1549. Dostupné také z: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2010-0149OC>

TSUKADA, Shigeki, Christopher J. PARSONS a Richard A. RIPPE. Mechanisms of liver fibrosis. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2006, **364**(1-2), 33-60 [cit. 2020-12-11]. DOI: 10.1016/j.cca.2005.06.014. ISSN 00098981. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898105004791>

WONG, Amy P., Armand KEATING a Thomas K. WADDELL. Airway regeneration: the role of the Clara cell secretory protein and the cells that express it. *Cytotherapy* [online]. 2009, **11**(6), 676-687 [cit. 2020-11-21]. DOI: 10.3109/14653240903313974. ISSN 14653249. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1465324909703160>

YAN, Yi, Rui WANG, Xiongji HU, Shichao WANG, Liang ZHANG, Chenjiao HOU a Lisheng ZHANG. MiR-126 Regulates Properties of SOX9 Liver Progenitor Cells during Liver Repair by Targeting Hoxb6. *Stem Cell Reports* [online]. 2020, **15**(3), 706-720 [cit. 2020-11-17]. DOI: 10.1016/j.stemcr.2020.07.005. ISSN 22136711. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213671120302824>

YHEE, Ji, Jintaek IM a Richard NHO. Advanced Therapeutic Strategies for Chronic Lung Disease Using Nanoparticle-Based Drug Delivery. *Journal of Clinical Medicine* [online]. 2016, **5**(9) [cit. 2021-01-14]. DOI: 10.3390/jcm5090082. ISSN 2077-0383. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2077-0383/5/9/82>

YOUNOSSI, Zobair, Quentin M. ANSTEE, Milena MARIETTI, Timothy HARDY, Linda HENRY, Mohammed ESLAM, Jacob GEORGE a Elisabetta BUGIANESI. *Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention* [online]. 2018, **15**(1), 11-20 [cit. 2021-01-14]. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.109. ISSN 1759-5045. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nrgastro.2017.109>

ZHANG, Rui, Vincent WILSON, Aixin HOU a Ge No MENG. Source of lead pollution, its influence on public health and the countermeasures. *International Journal of Health, Animal Science and Food Safety* [online]. 2015, **2**(1), 18-25 [cit. 2020-08-18]. DOI: 10.13130/2283-3927/4785. ISSN 2283-3927. Dostupné také z: [https://www.researchgate.net/publication/280777429\\_Source\\_of\\_lead\\_pollution\\_its\\_influence\\_on\\_public\\_health\\_and\\_the\\_countermeasures](https://www.researchgate.net/publication/280777429_Source_of_lead_pollution_its_influence_on_public_health_and_the_countermeasures)

ZHANG, Shuchen a Wei CUI. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World Journal of Stem Cells* [online]. 2014, **6**(3) [cit. 2020-08-24]. DOI: 10.4252/wjsc.v6.i3.305. ISSN 1948-0210. Dostupné také z: <http://www.wjgnet.com/1948-0210/full/v6/i3/305.htm>

## 11 SEZNAM POUŽITÝCH INTERNETOVÝCH ZDROJŮ

(URL 1) DOBSON, Peter, Stephen KING a Helen JARVIE. Nanoparticle. In: *Encyclopædia Britannica* [online]. Encyclopædia Britannica, c2020, 14 May 2019 [cit. 2020-05-25].

Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/nanoparticle#accordion-article-contributors>

(URL 2) THE EDITORS OF ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. Lead: chemical element. *Encyclopaedia Britannica* [online]. Encyclopædia Britannica, c2020 [cit. 2020-07-17].

Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/lead-chemical-element>

(URL 3) Lead Uses – Statistics. *International Lead Association* [online]. London: International Lead Association, c2020 [cit. 2020-08-18]. Dostupné z: <https://www.ila-lead.org/lead-facts/lead-uses--statistics>

(URL 4) The Editors of Encyclopaedia Britannica. Lead poisoning: pathology. *Encyclopaedia Britannica* [online]. Encyclopædia Britannica, c2020 [cit. 2020-08-18]. Dostupné z:

<https://www.britannica.com/science/lead-poisoning>

(URL 5) PREVENTING DISEASE THROUGH HEALTHY ENVIRONMENTS: EXPOSURE TO LEAD: A MAJOR PUBLIC HEALTH CONCERN. *World Health Organization* [online]. WHO, c2020 [cit. 2020-11-27]. Dostupné z: <https://www.who.int/ipcs/features/lead..pdf?ua=1>

(URL 6) Occupational Safety and Health Standards: Toxic and Hazardous Substances: Lead. *U.S. Department of Labor* [online]. 200 Constitution Ave NW Washington, DC 20210: U.S. DEPARTMENT OF LABOR [cit. 2020-11-27]. Dostupné z: <https://www.osha.gov/laws-regs/regulations/standardnumber/1910/1910.1025>

(URL 7) Lead(II) nitrate. *CHEMEUROPE.COM* [online]. LUMITOS, c1997-2020 [cit. 2020-08-18]. Dostupné z: [https://www.chemurope.com/en/encyclopedia/Lead%28II%29\\_nitrate.html](https://www.chemurope.com/en/encyclopedia/Lead%28II%29_nitrate.html)

(URL 8) Lung stem cells in health, repair and disease. *EuroStemCell* [online]. c2008-2020 [cit. 2020-10-29]. Dostupné z: <https://www.eurostemcell.org/lung-stem-cells-health-repair-and-disease>

(URL 9) BAXTER, Rachel. Interpretation of histological sections: Stains used in histology. *KENHUB* [online]. Kenhub, c2020, 08/09/2017 [cit. 2020-04-06]. Dostupné z: <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/interpretation-of-histologic-sections-stains-used-in-histology>

(URL 10) ANDERSON, James. An Introduction to Routine and Special Staining. *Leica Biosystems: Advancing Cancer Diagnostics, Improving Lives* [online]. Buffalo Grove: Leica Biosystems Nussloch, c2020, 2011 [cit. 2020-04-06]. Dostupné z:

<https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/an-introduction-to-routine-and-special-staining/>

- (URL 11) PARRY, Nicola. Toluidine Blue – A Histology Stain for Mast Cells (and Other Things!). *BiteSizeBio* [online]. Science Squared, c2020, 28 January 2014 [cit. 2020-04-06]. Dostupné z: <https://bitesizebio.com/19048/toluidine-blue-a-histology-stain-for-mast-cells-and-other-things/>
- (URL 12) CD68: CD68 Protein | CD68 Antibody. *Sino Biological: Biological Solution Specialist* [online]. Beijing: Sino Biological, c2007-2020 [cit. 2020-05-11]. Dostupné z: <https://www.sinobiological.com/resource/cd68>
- (URL 13) UniProtKB - P48436 (SOX9\_HUMAN). *UniProt* [online]. UniProt Consortium, c2002-2020 [cit. 2020-11-17]. Dostupné z: [https://www.uniprot.org/uniprot/P48436#family\\_and\\_domains](https://www.uniprot.org/uniprot/P48436#family_and_domains)
- (URL 14) UniProtKB - P01582 (IL1A\_MOUSE). *UniProt* [online]. UniProt Consortium, c2002-2020 [cit. 2020-11-17]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P01582>
- (URL 15) Lung – hemorrhage. *National Toxicology Program: U.S. Department of Health and Human Services* [online]. USA: USA.gov, c2020, 3 December 2015 [cit. 2020-07-17]. Dostupné z: <https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/respiratory/lung/hemorr/index.htm>
- (URL 16) Ephysema. *Better Health Channel* [online]. Victoria, Australia: State of Victoria, c2020 [cit. 2020-07-17]. Dostupné z: <https://www.betterhealth.vic.gov.au/health/conditionsandtreatments/emphysema>
- (URL 17) CESTA, Mark F., Darlene DIXON, Ronald A. HERBERT a Lauren M. STASKA. Lung - Inflammation. *Nationa Toxicoloxxy Program: U.S. Department of Health and Human Services* [online]. USA: USA.gov, c2020, December 07, 2015 [cit. 2021-01-13]. Dostupné z: <https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/respiratory/lung/inflamm/index.htm>
- (URL 18) MARONPOT, Robert R. Liver, Hepatocyte – Hypertrophy. *National Toxicology Program: U.S. Department of Health and Human Services* [online]. USA: USA.gov, c2020, January 15, 2014 [cit. 2021-01-13]. Dostupné z: <https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/hepatobiliary/liver/hhypertr/index.htm>
- (URL 19) Everything You Need to Know About Fatty Liver. *Healthline* [online]. HealthlineMedia [cit. 2021-01-14]. Dostupné z: <https://www.healthline.com/health/fatty-liver>
- (URL 20) MARONPOT, Robert R. Liver, Hepatocyte – Karyomegaly. *National Toxicology Program: U.S. Department of Health and Human Services* [online]. USA: USA.gov, c2020 [cit. 2021-01-14]. Dostupné z: <https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/hepatobiliary/liver/hkaryomeg/index.htm>
- (URL 21) KLATT, Edward C. Hemosiderosis. *The Internet Pathology Laboratory for Medical Education* [online]. Savannah, Georgia, USA: WebPath®, c1994-2020 [cit. 2021-01-14]. Dostupné z: <https://webpath.med.utah.edu/LIVEHTML/LIVER017.html>

(URL 22) CESTA, Mark F., Darlene DIXON, Ronald A. HERBERT a Lauren M. STASKA. Lung – Fibrosis. *National Toxicology Program: U.S. Department of Health and Human Services* [online]. USA: USA.gov, c2020, 7 December 2015 [cit. 2020-09-03]. Dostupné z: <https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/respiratory/lung/fibrosis/index.htm>

(URL 23)PubMed.gov. *PubMed.gov* [online]. 8600 Rockville PikeBethesda, MD 20894: National Center for Biotechnology Information [cit. 2020-10-30]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=nanoparticles>

(URL 24)STATISTA RESEARCH DEPARTMENT. World production of lead from 2006 to 2018. *Statista: Global No.1 Business Data Platform* [online]. Apr 16, 2020 [cit. 2020-10-30]. Dostupné z: <https://www.statista.com/statistics/264872/world-production-of-lead-metal/>

(URL 25) MARONPOT, Robert R. Liver - Fatty Change. *National Toxicology Program: U.S. Department of Health and Human Services* [online]. USA: USA.gov, c2020, June 19, 2014 [cit. 2021-01-14]. Dostupné z: [https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/hepatobiliary/liver/fatty\\_change/index.htm](https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/hepatobiliary/liver/fatty_change/index.htm)

(URL 26)Cell Damage and Tissue Repair. *ToxTutor* [online]. USA [cit. 2020-11-14]. Dostupné z: <https://toxtutor.nlm.nih.gov/14-002.html>

(URL 27) RAYMOND, Meriel, Gemma CHING-A-SUE a Oliver VAN HECKE. Mast cell stabilisers, leukotriene antagonists and antihistamines: A rapid review of the evidence for their use in COVID-19. *The Centre for Evidence-Based Medicine: Evidence Service to support the COVID-19 response* [online]. Centre for Evidence-Based Medicine, c2021, 18 May 2020 [cit. 2021-01-14]. Dostupné z: <https://www.cebm.net/covid-19/mast-cell-stabilisers-leukotriene-antagonists-and-antihistamines-a-rapid-review-of-effectiveness-in-covid-19/>

(URL 28) Studentův t-test. *WikiSkripta: projekt 1. lékařské fakulty a Univerzity Karlovy, příspěvek UK k výukovým zdrojům sítě lékařských fakult MEFANET* [online]. 30. 11. 2016 [cit. 2021-01-15]. ISSN 1804-6517. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Student%C5%AFv\\_t-test](https://www.wikiskripta.eu/w/Student%C5%AFv_t-test)



## **Přílohy**

# P1: DAILY PRAKTICKÉ ČÁSTI PRÁCE

## Charakteristika generovaných rozpustných nanočástic olova

Nanočástice dusičnanu olovnatého byly generovány ve spolupráci s Ústavem analytické chemie, v.v.i.

Tabulka 9. Charakteristika generovaných rozpustných nanočástic olova.

forma olova	dusičnan olovnatý – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$
koncentrace	$1,94 * 10^5 \text{ NPs/cm}^3$
hmotnostní koncentrace	$68,6 \mu\text{g/m}^3$
medián generovaných nanočástic	31,3 nm
odhadovaná uložená dávka po 11 týdnech inhalace generovaných nanočástic	$0,774 \mu\text{g/g}$ (generované NPs/gram hmotnosti těla)

## Charakteristika experimentálních skupin

### Kontrolní (ctr) skupina

datum: 6. 3. 2018 – 21. + 23. 5. 2018

průběh inhalace: 11 týdnů bez generovaných  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$

### $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$ skupina

datum: 6. 3. 2018 – 21. + 23. 5. 2018

průběh inhalace: 11 týdnů generovaných  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$

### $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs/CL}$ skupina

datum: 6. 3. 2018 – 21. + 23. 5. 2018

průběh inhalace: 6 týdnů generovaných  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$ ; 5 týdnů bez generovaných  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2\text{NPs}$

## Vyhodnocení analýzy genové exprese

R (ratio)...udává relativní změnu exprese

$\Delta\text{CT}_K$ ...kontrolní vzorek

$\Delta\text{CT}_{\text{Pb}}$ ...testovaný vzorek

$\Delta\text{CT}_{\text{TG}}$ ...testovaný gen

$\Delta\text{CT}_{\text{HG}}$ ...housekeeping gen

$$R = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{Pb} - \Delta CT_K$$

$$\Delta CT_{Pb} = \Delta CT_{TG} - \Delta CT_{HG}$$

$$\Delta CT_K = \Delta CT_{TG} - \Delta CT_{HG}$$

## Nepárový Studentův t-test

Nepárový Studentův t-test testuje statistickou hypotézu na základě porovnání středních hodnot dvou experimentálních skupin (většinou jedné kontrolní a jedné s proměnnou) (URL 28). Test byl proveden navzájem mezi všemi experimentálními skupinami, pro vyhodnocení byl použit GraphPad Prism 5 (P3).

## Přepočet počtu detekovaných buněk na 1 mm<sup>2</sup>

Velikost fotografie z mikroskopu: 2088 x 1550 px (zvětšení 40x)

Velikost měřítka (100 μm): 622 px

Koeficient: 11,954146762016

Výsledná plocha jednoho řezu (10 fotografií): 0,8365298 mm<sup>2</sup>

Výsledná plocha jedné experimentální skupiny při kvantifikaci dvou řezů z pěti jedinců (játra: analýza CD68-pozitivních buněk): 8,365298 mm<sup>2</sup>

Výsledná plocha jedné experimentální skupiny při kvantifikaci čtyř řezů z pěti jedinců (plíce: analýza Nanog-pozitivních a CD68-pozitivních buněk, játra: analýza Ki67-pozitivních buněk): 16,730596 mm<sup>2</sup>

Výsledná plocha jedné experimentální skupiny při kvantifikaci dvou řezů po dvaceti fotografiích ze tří jedinců (plíce: analýza Ki67-pozitivních buněk v alveolárních oblastech): 10,0383576 mm<sup>2</sup>

## P2: PŘÍLOHY K VÝSLEDKŮM

### Analýza hmotnosti cílových orgánů

**Tabulka 10.** Analýza hmotnosti cílových orgánů. Kontrolní skupina.

číslo jedince	hmotnost [g]	plíce [g]	%	průměr	játra [g]	%	průměr
36	28,62	0,3138	1,096436	0,91444	1,4674	5,127184	5,285029
37	31,37	0,3544	1,129742		1,6372	5,218999	
38	37,81	0,4310	1,139910		2,4912	6,588733	
39	29,16	0,1595	0,546982		1,4097	4,834362	
40	39,81	0,2624	0,659131		1,8535	4,655865	

**Tabulka 11.** Analýza hmotnosti cílových orgánů. Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupina.

číslo jedince	hmotnost [g]	plíce [g]	%	průměr	játra [g]	%	průměr
36	29,28	0,2335	0,797473	0,754389	1,6207	5,535178	5,389941
37	32,15	0,2241	0,697045		1,8458	5,741213	
38	27,47	0,2413	0,878413		1,4361	5,227885	
39	34,68	0,2124	0,612457		1,7760	5,121107	
40	28,86	0,2270	0,786556		1,5366	5,324324	

**Tabulka 12.** Analýza hmotnosti cílových orgánů. Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupina.

číslo jedince	hmotnost [g]	plíce [g]	%	průměr	játra [g]	%	průměr
6	34,64	0,2565	0,740473	0,792811	1,6321	4,711605	4,94867
7	31,07	0,2548	0,820084		1,5204	4,893466	
8	25,00	0,2149	0,859600		1,3335	5,334000	
9	28,22	0,2249	0,796953		1,3114	4,647059	
10	31,93	0,2385	0,746946		1,6467	5,157219	

## Plíce

### Souhrn provedených analýz v plicích

**Tabulka 13.** Souhrn provedených analýz na vzorcích plic.

metoda	analýza hmotnosti	histologická barvení				IHC					qPCR					
		histopatologická analýza	M GT	S R	T B	Ki 67	SO X2	Na nog	M PO	CD 68	SO X2	SO X9	IL 1-a	IL 1-b	I L 6	NFk B1
ctr 36	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ctr 37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
ctr 38	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
ctr 39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
ctr 40	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs 36	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs 37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

metoda označení jedince	analýza hmotnosti	histologická barvení				IHC						qPCR				
		histopatologická analýza	M GT	S R	T B	Ki 67	SO X2	Na nog	M PO	CD 68	SO X2	SO X9	IL 1-a	IL 1-b	I L 6	NFκ B1
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NP s 38	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NP s 39	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NP s 40	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NP s/CL 6	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NP s/CL 7	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NP s/CL 8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NP s/CL 9	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NP s/CL 10	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

## Histopatologická analýza vzorků plic

Z každého jedince byly pořízeny dva řezy, které byly obarveny Hematoxylinem-eosinem. Nalezené histopatologické změny byly kvantifikovány (tab. 15–17) dle kritérií v tab. 14.

**Tabulka 14.** Kritéria pro hodnocení histopatologických změn.

+	Změna byla ve vzorku zaznamenána.
++	Změna se ve vzorku vyskytovala několikrát.
+++	Změna se ve vzorku vyskytovala velmi často.

**Tabulka 15.** Histopatologická analýza plic. Kontrolní skupina.

číslo jedince	číslo řezu	infiltrát peribronchiolární	infiltrát perivaskulární	atelek táza	bronchio litida	ztluštěná septa	alveolární emfyzém	hemor agie	hemos táza
36	1					+	+		
	2					+			
37	1		+			+		+	+
	2					+		+	+
38	1	++				++	+	+	
	2	+				++	+	+	
39	1					+	+	+	
	2					+		+	
40	1	+				+	+	+	++
	2	+				++		+	+

**Tabulka 16.** Histopatologická analýza plic. Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupina.

číslo jedince	číslo řezu	infiltrát peribronchiolární	infiltrát perivaskulární	atelek táza	bronchiolida	ztluštěná septa	alveolární emfyzém	hemoragie	hemos táza
36	1	+		+		++	++	+	
	2	+		+		++	++	+	+
37	1	++	+			++		+++	++
	2	+		+		++		++	+
38	1	+++	++	+		++	++	+	+
	2	++	++			++	++	+	+
39	1	+	+			++	+	++	++
	2		+			++	+	++	++
40	1	++	+		++	+	++	+	+++
	2	+		++	+	++	++	++	+

**Tabulka 17.** Histopatologická analýza plic. Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupina.

číslo jedince	číslo řezu	infiltrát peribronchiolární	infiltrát perivaskulární	atelek táza	bronchiolida	ztluštěná septa	alveolární emfyzém	hemoragie	hemos táza
6	1	++	+	+	+	+++	++	+++	+
	2	+++	++	+		++	+	+++	+
7	1	++				+++	+	+++	++
	2	+			+	+++	+	+++	+
8	1		+			+++	+	++	
	2		++			++	+	++	+
9	1	+			++	++	+	++	++
	2	++	+			+++		+	+++
10	1	+++		+	+	+++		+++	++
	2	+++	+			++		++	++

## Kvantifikace Ki67-pozitivních buněk v plicích

Ze tří jedinců byly pomocnépřímé trojstupňové imunohistochemické metody a markeru Ki67 obarveny dva řezu, ve kterých byly kvantifikovány Ki67-pozitivní buňky. Kvantifikace byla rozdělena do dvou částí dle dvou vybraných oblastí plic: bronchiolární a alveolární.

Z bronchiolárních oblastí (tab. 18–20) bylo z každého řezu pořízeno 5 snímků o velikosti 1550 x 2088 px se zvětšením 40x. Výsledné hodnoty byly přepočítány tak, aby odpovídaly ploše 1 mm<sup>2</sup> (P1).

**Tabulka 18.** Kvantifikované výsledky Ki67-pozitivních buněk v bronchiolárních oblastech v plicích. Kontrolní skupina.

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
37	1	1	1	0,2	0,6	0,95
		2	0			
		3	0			
		4	0			



číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
	2	5	0	1		
		1	0			
		2	0			
		3	0			
		4	2			
5	3					
38	1	1	-	-		
		2	-			
		3	-			
		4	-			
		5	-			
	2	1	-	-		
		2	-			
		3	-			
		4	-			
		5	-			
39	1	1	0	1		
		2	3			
		3	2			
		4	0			
		5	0			
	2	1	0	1,6	1,3	
		2	2			
		3	3			
		4	0			
		5	3			

**Tabulka 19.** Kvantifikované výsledky Ki67-pozitivních buněk v bronchiolárních oblastech v plicích. Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupina.

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
36	1	1	3	1,4		
		2	2			
		3	1			
		4	0			
		5	1			
	2	1	3	3	2,2	
		2	5			
		3	2			
		4	1			
		5	4			
37	1	1	4	3,4		
		2	1			
		3	9			
		4	1			
		5	2			
	2	1	3	1,6	2,5	
		2	3			
		3	0			
		4	2			
		5	0			
38	1	1	2	0,6	1,3	2
		2	0			
		3	0			
		4	1			

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
	2	5	0	2		
		1	1			
		2	0			
		3	2			
		4	3			
		5	4			

**Tabulka 20.** Kvantifikované výsledky Ki67-pozitivních buněk v bronchiolárních oblastech v plicích. Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupina.

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
7	1	1	0	0,4		
		2	0			
		3	0			
		4	0			
		5	2			
	2	1	0	0,4	0,4	
		2	2			
		3	0			
		4	0			
		5	0			
8	1	1	0	1,4		
		2	0			
		3	3			
		4	1			
		5	3			
	2	1	3	1,4	1,4	
		2	1			
		3	1			
		4	2			
		5	0			
9	1	1	14	10,6		
		2	4			
		3	21			
		4	7			
		5	7			
	2	1	5	7,6	9,1	
		2	8			
		3	12			
		4	5			
		5	8			
						3,633333333

Z alveolárních oblastí (tab. 21–23) bylo z každého řezu pořízeno 20 snímků o velikosti 1550 x 2088 px se zvětšením 40x. Výsledné hodnoty byly přepočítány tak, aby odpovídaly ploše 1 mm<sup>2</sup> (P1).

**Tabulka 21.** Kvantifikované výsledky Ki67-pozitivních buněk v alveolárních oblastech v plicích. Kontrolní skupina.

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
37	1	1	13	14,3	11,725	12,26666667
		2	15			

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina				
		3	11	9,15						
		4	17							
		5	12							
		6	22							
		7	21							
		8	14							
		9	6							
		10	8							
		11	16							
		12	11							
		13	11							
		14	15							
		15	16							
		16	21							
		17	9							
		18	24							
		19	7							
		20	17							
		2	1				5			
			2				5			
	3		6							
	4		14							
	5		6							
	6		8							
	7		22							
	8		7							
	9		5							
	10		2							
	11		12							
	12		6							
	13		6							
	14		10							
	15		6							
	16		13							
	17		31							
	18		7							
	19		8							
	20		4							
	38	1	1				12	13,15	12,325	
			2				9			
3			20							
4			17							
5			12							
6			13							
7			18							
8			9							
9			17							
10			7							
11			15							
12			14							
13			8							
14			12							
15			18							
16			11							
17			12							
18			9							
19			16							

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
		20	14			
		1	25			
		2	17			
		3	10			
		4	13			
		5	16			
		6	16			
		7	7			
		8	4			
		9	9			
		10	13			
		11	7			
		12	3			
		13	11			
		14	13			
		15	18			
		16	8			
		17	17			
		18	7			
		19	10			
	2	20	6	11,5		
		1	16			
		2	12			
		3	8			
		4	10			
		5	10			
		6	17			
		7	16			
		8	15			
		9	12			
		10	3			
		11	14			
		12	8			
		13	12			
		14	21			
		15	13			
		16	11			
		17	11			
		18	18			
		19	10			
			1			
		1	18			
		2	22			
		3	9			
		4	7			
		5	11			
		6	18			
		7	14			
		8	16			
		9	10			
		10	12			
		11	13			
		12	10			
		13	9			
		14	16			
		15	15			
		39	2			

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
		17	14			
		18	14			
		19	14			
		20	8			

**Tabulka 22.** Kvantifikované výsledky Ki67-pozitivních buněk v alveolárních oblastech v plicích.  
Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupina.

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
		1	18			
		2	6			
		3	16			
		4	10			
		5	10			
		6	7			
		7	8			
		8	4			
		9	11			
		10	10			
		11	10			
		12	16			
		13	14			
		14	11			
		15	2			
		16	11			
		17	10			
		18	12			
		19	11			
	1	20	2	9,95		
		1	5			
		2	5			
		3	15			
		4	14			
		5	12			
		6	11			
		7	14			
		8	14			
		9	5			
		10	13			
		11	16			
		12	9			
		13	7			
		14	7			
		15	10			
		16	6			
		17	5			
		18	9			
		19	9			
36	2	20	11	9,85	9,9	
		1	16			
		2	19			
		3	12			
37	1	4	10	13,55	16,05	13,2

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina					
		5	20								
		6	15								
		7	5								
		8	6								
		9	10								
		10	4								
		11	17								
		12	18								
		13	27								
		14	4								
		15	6								
		16	17								
		17	19								
		18	15								
		19	15								
		20	16								
			2				1	20	18,55		
							2	34			
							3	33			
							4	11			
	5			19							
	6			18							
	7			10							
	8			15							
	9			27							
	10			12							
	11			27							
	12			20							
	13			12							
	14			15							
	15			15							
	16			23							
	17			6							
	18			13							
	19			19							
	20			22							
	38	1	1	17	9,5						
			2	22							
			3	11							
			4	9							
5			10								
6			13								
7			10								
8			6								
9			6								
10			6								
11			6								
12			15								
13			7								
14			3								
15			6								
16			10								
17			14								
18			6								
19			5								
20		8									
	2	1	6	17,8	13,65						



číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
		2	5			
		3	20			
		4	14			
		5	11			
		6	21			
		7	8			
		8	20			
		9	22			
		10	22			
		11	32			
		12	27			
		13	27			
		14	11			
		15	12			
		16	28			
		17	47			
		18	3			
		19	8			
		20	12			

**Tabulka 23.** Kvantifikované výsledky Ki67-pozitivních buněk v alveolárních oblastech v plicích.  
Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupina.

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
		1	13			
		2	13			
		3	6			
		4	10			
		5	2			
		6	9			
		7	20			
		8	11			
		9	13			
		10	6			
		11	5			
		12	5			
		13	9			
		14	18			
		15	19			
		16	11			
		17	7			
		18	8			
		19	21			
	1	20	12	10,9		
		1	10			
		2	10			
		3	9			
		4	13			
		5	9			
		6	11			
		7	18			
		8	22			
		9	1			
		10	15			
7	2	11	6	11,7	11,3	14,68333333

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
		12	5			
		13	9			
		14	5			
		15	19			
		16	4			
		17	18			
		18	23			
		19	17			
		20	10			
		1	27			
		2	20			
		3	20			
		4	11			
		5	15			
		6	13			
		7	26			
		8	18			
		9	31			
		10	17			
		11	15			
		12	20			
		13	24			
		14	19			
		15	24			
		16	15			
		17	19			
		18	11			
		19	14			
	1	20	17	18,8		
		1	19			
		2	16			
		3	13			
		4	20			
		5	24			
		6	25			
		7	19			
		8	16			
		9	8			
		10	10			
		11	12			
		12	22			
		13	10			
		14	13			
		15	14			
		16	8			
		17	13			
		18	13			
		19	8			
8	2	20	9	14,6	16,7	
		1	18			
		2	6			
		3	19			
		4	28			
		5	14			
		6	19			
		7	19			
9	1	8	17	16,2	16,05	

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
		9	22	15,9		
		10	15			
		11	20			
		12	10			
		13	13			
		14	19			
		15	1			
		16	7			
		17	19			
		18	22			
	19	14				
	20	22				
	2	1	3			
		2	13			
		3	8			
		4	15			
		5	16			
		6	16			
		7	18			
		8	16			
9		23				
10		13				
11	13					
12	17					
13	28					
14	23					
15	9					
16	18					
17	24					
18	13					
19	20					
20	12					

## Kvantifikace Nanog-pozitivních buněk v plicích

Z každého jedince byly pomocí nepřímé trojstupňové imunohistochemické metody a markeru Nanog obarveny čtyři řezy. Následně bylo z každého řezu pořízeno 10 fotografií o velikosti 2088 x 1550 px se zvětšením 40x, ve kterých byly kvantifikovány nalezené pozitivní buňky (tab. 24–26). Počet pozitivních buněk byl nakonec přepočítán tak, aby odpovídal ploše 1 mm<sup>2</sup>(P1).

**Tabulka 24.** Kvantifikované výsledky Nanog-pozitivních buněk v plicích. Kontrolní skupina.

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
36	11	1	60	48,1	48,025	42,7
		2	46			
		3	43			
		4	61			
		5	39			
		6	41			
		7	55			
		8	50			
		9	49			
		10	37			

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
	12	1	52	41,2		
		2	36			
		3	46			
		4	33			
		5	36			
		6	51			
		7	36			
		8	50			
		9	34			
		10	38			
	21	1	41	47,7		
		2	48			
		3	54			
		4	41			
		5	51			
		6	43			
		7	55			
		8	42			
		9	37			
		10	65			
	22	1	57	55,1		
		2	51			
		3	59			
		4	50			
		5	43			
		6	49			
		7	54			
		8	60			
		9	61			
		10	67			
37	11	1	43	42,5		
		2	46			
		3	33			
		4	50			
		5	47			
		6	52			
		7	33			
		8	39			
		9	44			
		10	38			
	12	1	38	36,7		
		2	45			
		3	30			
		4	35			
		5	41			
		6	40			
		7	54			
	21	1	70	52,1		
		2	55			
		3	30			
		4	56			
		5	49			
		6	54			
		7	54			
				46,2		

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina	
		8	49	53,5			
		9	53				
		10	51				
		22	1				50
			2				60
			3				52
			4				48
			5				65
			6				65
			7				45
		22	8				39
			9				38
			10				73
	11	1	61	54,4			
		2	59				
		3	51				
		4	64				
		5	51				
		6	46				
		7	67				
		8	43				
		9	48				
		10	54				
	12		1	50			45,9
			2	49			
			3	52			
			4	45			
			5	41			
			6	45			
			7	47			
			8	50			
			9	36			
			10	44			
	21		1	29			30,8
			2	27			
			3	30			
			4	34			
			5	46			
			6	34			
			7	30			
			8	11			
			9	36			
			10	31			
38	22	1	33	35,7	41,7		
		2	40				
		3	41				
		4	40				
		5	39				
		6	39				
		7	44				
		8	28				
		9	27				
		10	26				
39	11	1	42	39,9	33,825		
		2	43				
		3	36				
		4	31				

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
		5	22			
		6	45			
		7	58			
		8	47			
		9	39			
		10	36			
	12	1	45			
		2	42			
		3	19			
		4	45			
		5	41			
		6	49			
		7	38			
		8	44			
		9	50			
		10	43			
	21	1	20			
		2	22			
		3	14			
		4	35			
		5	28			
		6	36			
		7	21			
		8	29			
		9	21			
		10	22			
	22	1	27			
		2	28			
		3	31			
		4	24			
5		24				
6		45				
7		29				
8		29				
9		22				
10		31	29			
40	11	1	52			
		2	51			
		3	51			
		4	54			
		5	56			
		6	60			
		7	45			
		8	38			
		9	43			
		10	28	47,8		
	12	1	43			
		2	53			
		3	44			
		4	30			
		5	44			
		6	44			
		7	38			
		8	46			
		9	37			
		10	43	42,2		
21	1	43	44,9	43,75		



číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
		2	39	40,1		
		3	41			
		4	53			
		5	47			
		6	40			
		7	47			
		8	48			
		9	39			
		10	52			
		22	1			
	2		35			
	3		55			
	4		21			
	5		40			
	6		70			
	7		27			
	8		42			
	9		45			
	10		41			

**Tabulka 25.** Kvantifikované výsledky Nanog-pozitivních buněk v plicích. Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupina.

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina	
36		1	37	77,3	66,8	63,295	
		2	47				
		3	52				
		4	45				
		5	46				
		6	51				
		7	48				
		8	52				
		9	46				
		10	26				
	11	1	80				45
		2	68				
		3	94				
		4	63				
		5	85				
		6	75				
		7	72				
		8	40				
		9	63				
		10	79				
	12	1	60				71,9
		2	89				
		3	71				
		4	50				
		5	71				
		6	78				
		7	75				
		8	82				
		9	91				
		10	63				
	21	1	85				73
		2	87				
		3	71				
		4	50				
		5	71				
		6	78				
7		75					
8		82					
9		91					
10		63					
22	1	85	77,3				
	2	87					

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
		3	69			
		4	59			
		5	81			
		6	83			
		7	87			
		8	79			
		9	68			
		10	75			
		1	68			
		2	69			
		3	64			
		4	55			
		5	61			
		6	50			
		7	65			
		8	65			
		9	67			
	11	10	80	64,4		
		1	67			
		2	66			
		3	49			
		4	60			
		5	58			
		6	41			
		7	52			
		8	61			
		9	56			
	12	10	52	56,2		
		1	65			
		2	68			
		3	69			
		4	53			
		5	67			
		6	68			
		7	40			
		8	60			
		9	56			
	21	10	63	60,9		
		1	58			
		2	75			
		3	80			
		4	54			
		5	70			
		6	66			
		7	57			
		8	74			
		9	68			
37	22	10	53	65,5	61,75	
		1	46			
		2	54			
		3	44			
		4	55			
		5	44			
		6	69			
		7	50			
		8	63			
38	1 1	9	54	53,3	58,725	

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
	12	10	54	50,4		
		1	51			
		2	78			
		3	43			
		4	53			
		5	44			
		6	52			
		7	67			
		8	40			
		9	37			
	10	39				
	2 1	1	65	62,6		
		2	47			
		3	67			
		4	71			
		5	72			
		6	64			
		7	63			
		8	55			
		9	60			
		10	62			
	22	1	53	68,6		
		2	65			
		3	77			
		4	61			
		5	53			
		6	62			
		7	71			
		8	98			
		9	69			
10		77				
39	11	1	56	57		
		2	56			
		3	55			
		4	52			
		5	46			
		6	62			
		7	75			
		8	56			
		9	51			
		10	61			
	12	1	66	54,1		
		2	63			
		3	50			
		4	60			
		5	58			
		6	55			
		7	61			
		8	42			
		9	37			
		10	49			
	21	1	73	72		
		2	80			
		3	74			
		4	75			
5		70				
6		60				
				64,425		

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina		
		7	79					
		8	73					
		9	67					
		10	69					
	22	1	59					
		2	59					
		3	83					
		4	88					
		5	44					
		6	87					
		7	83					
		8	82					
		9	67					
		10	94					
		74,6						
		40	11				1	65
							2	72
							3	58
							4	61
							5	56
6	60							
7	59							
8	64							
9	53							
10	63							
61,1								
12	1		62					
	2		73					
	3		52					
	4		54					
	5		77					
	6		54					
	7		50					
	8		56					
	9		51					
	10		56					
58,5								
21	1		62					
	2		84					
	3		81					
	4		83					
	5		70					
	6		68					
	7		73					
	8		72					
	9	87						
	10	71						
75,1								
22	1	68						
	2	66						
	3	68						
	4	58						
	5	65						
	6	70						
	7	71						
	8	50						
	9	63						
	10	65						
64,4								
64,775								

**Tabulka 26.** Kvantifikované výsledky Nanog-pozitivních buněk v plicích. Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupina.

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
6	1 1	1	69	78,9	76,1	
		2	87			
		3	87			
		4	89			
		5	98			
		6	92			
		7	73			
		8	69			
		9	57			
		10	68			
	1 2	1	88	73,9		
		2	81			
		3	75			
		4	91			
		5	73			
		6	89			
		7	53			
		8	65			
		9	59			
		10	65			
	2 1	1	79	80,8		
		2	81			
		3	97			
		4	82			
		5	78			
		6	70			
		7	66			
		8	86			
		9	99			
		10	70			
2 2	1	67	70,8			
	2	79				
	3	62				
	4	65				
	5	70				
	6	54				
	7	76				
	8	96				
	9	68				
	10	71				
7	1 1	1	56	64,1	64,05	68,305
		2	89			
		3	74			
		4	69			
		5	65			
	1 2	6	56			
		7	51			
		8	70			
		9	56			
		10	55			
	1 2	1	71	59,8		
		2	92			
		3	74			
		4	53			
		5	70			

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
		6	40			
		7	47			
		8	47			
		9	67			
		10	37			
	2 1	1	54			
		2	65			
		3	57			
		4	76			
		5	64			
		6	36			
		7	83			
		8	79			
		9	68			
		10	83			
	2 2	1	81			
		2	77			
		3	84			
		4	69			
		5	26			
6		49				
7		68				
8		82				
9		55				
10		67	65,8			
8	1 1	1	81			
		2	76			
		3	71			
		4	86			
		5	71			
		6	73			
		7	76			
		8	84			
		9	84			
		10	52	75,4		
	1 2	1	80			
		2	78			
		3	75			
		4	59			
		5	71			
		6	68			
		7	52			
		8	74			
		9	72			
		10	77	70,6		
	2 1	1	50			
		2	77			
		3	91			
		4	75			
		5	80			
		6	57			
		7	74			
		8	86			
		9	82			
		10	77	74,9		
2 2	1	63				
	2	59	71,4			
					73,075	

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
		3	78			
		4	83			
		5	75			
		6	68			
		7	66			
		8	62			
		9	94			
		10	66			
		1	65			
		2	37			
		3	39			
		4	56			
		5	57			
		6	59			
		7	63			
		8	65			
		9	66			
	1 1	10	71	57,8		
		1	40			
		2	43			
		3	71			
		4	49			
		5	64			
		6	42			
		7	51			
		8	57			
		9	33			
	1 2	10	68	51,8		
		1	64			
		2	54			
		3	71			
		4	53			
		5	73			
		6	70			
		7	50			
		8	82			
		9	69			
	2 1	10	64	65		
		1	65			
		2	61			
		3	81			
		4	51			
		5	41			
		6	54			
		7	54			
		8	75			
		9	72			
9	2 2	10	51	60,5	58,775	
		1	57			
		2	61			
		3	62			
		4	61			
		5	71			
		6	64			
		7	56			
		8	75			
10	1 1	9	60	64,3	69,525	



číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
	1 2	10	76	69,4		
		1	71			
		2	71			
		3	63			
		4	65			
		5	71			
		6	81			
		7	64			
		8	64			
		9	88			
	10	56				
	2 1	1	66	72,4		
		2	85			
		3	77			
		4	78			
		5	63			
		6	56			
		7	82			
		8	65			
		9	55			
		10	97			
	2 2	1	81	72		
		2	76			
		3	53			
		4	75			
		5	52			
		6	61			
		7	71			
		8	66			
		9	88			
10		97				

## Kvantifikace TB-pozitivních buněk v plicích

Z každého jedince byly obarveny Toluidinovou modří 4 řezy. Následně byl kvantifikován celkový počet pozitivních buněk v jednotlivých řezech (tab. 27–29).

**Tabulka 27.** Kvantifikované výsledky TB-pozitivních buněk v plicích. Kontrolní skupina.

číslo jedince	číslo řezu	počet pozitivních buněk	průměr/jedinec	průměr/skupina
36	1 1	3	1,25	1,9
	1 2	0		
	2 1	2		
	2 2	0		
37	1 1	0	1,25	
	1 2	3		
	2 1	1		
	2 2	1		
38	1 1	0	0	
	1 2	0		
	2 1	0		
	2 2	0		
39	1 1	0	0	
	1 2	0		

	2 1	0		
	2 2	0		
40	1 1	4	7	
	1 2	4		
	2 1	5		
	2 2	15		

**Tabulka 28.** Kvantifikované výsledky TB-pozitivních buněk v plicích. Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupina.

číslo jedince	číslo řezu	počet pozitivních buněk	průměr/jedinec	průměr/skupina
36	1 1	1	3	3,85
	1 2	5		
	2 1	2		
	2 2	4		
37	1 1	8	7,5	
	1 2	9		
	2 1	6		
	2 2	7		
38	1 1	10	5,75	
	1 2	6		
	2 1	5		
	2 2	2		
39	1 1	0	0,5	
	1 2	2		
	2 1	0		
	2 2	0		
40	1 1	5	2,5	
	1 2	1		
	2 1	2		
	2 2	2		

**Tabulka 29.** Kvantifikované výsledky TB-pozitivních buněk v plicích. Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupina.

číslo jedince	číslo řezu	počet pozitivních buněk	průměr/jedinec	průměr/skupina
6	1 1	13	5,75	6,65
	1 2	1		
	2 1	4		
	2 2	5		
7	1 1	0	0,25	
	1 2	0		
	2 1	1		
	2 2	0		
8	1 1	16	16,25	
	1 2	19		
	2 1	14		
	2 2	16		
9	1 1	8	5,25	
	1 2	3		
	2 1	4		
	2 2	6		
10	1 1	5	5,75	
	1 2	5		
	2 1	4		
	2 2	9		

## Kvantifikace CD68-pozitivních buněk v plicích

Z každého jedince byly pomocí nepřímé trojstupňové imunohistochemické metody a markeru CD68 obarveny čtyři řezy. Následně bylo z každého řezu pořízeno 10 fotografií o velikosti 2088 x 1550 px se zvětšením 40x, ve kterých byly kvantifikovány nalezené pozitivní buňky (tab. 30–32). Počet pozitivních buněk byl nakonec přepočítán tak, aby odpovídal ploše 1 mm<sup>2</sup> (P1).

**Tabulka 30.** Kvantifikované výsledky CD68-pozitivních buněk v plicích. Kontrolní skupina.

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotografie	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr skupiny
36	1 1	1	14	16	17,575	19,97
		2	15			
		3	16			
		4	16			
		5	11			
		6	17			
		7	13			
		8	18			
		9	19			
		10	21			
	1 2	1	17	18		
		2	14			
		3	13			
		4	15			
		5	21			
		6	19			
		7	20			
		8	20			
		9	18			
		10	23			
	2 1	1	13	18,6		
		2	23			
		3	17			
		4	15			
		5	17			
		6	24			
		7	20			
		8	24			
		9	18			
		10	15			
	2 2	1	14	17,7		
		2	16			
		3	18			
		4	17			
		5	20			
		6	21			
7		9				
8		22				
9		18				
10		22				
37	1 1	1	36	22,6	20,4	19,97
		2	28			
		3	25			
		4	13			
		5	30			
		6	21			

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotografie	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr skupiny	
		7	12				
		8	17				
		9	23				
		10	21				
	1 2		1				21
			2				18
			3				20
			4				21
			5				14
			6				18
			7				19
			8				16
			9				20
			10				26
	2 1		1				18
			2				48
			3				16
			4				17
			5				16
			6				13
			7				21
			8				16
			9				15
			10				16
	2 2		1				18
			2				18
			3				24
			4				20
			5				19
			6				24
7			18				
8			14				
9			21				
10			25	20,1			
38	1 2	1	17				
		2	17				
		3	15				
		4	17				
		5	16				
		6	19				
		7	16				
		8	12				
		9	17				
		10	12	15,8			
	1 2		1	31			
			2	18			
			3	23			
			4	14			
			5	25			
			6	22			
			7	21			
			8	23			
			9	20			
			10	23	22		
	2 1		1	22			
			2	14			
3			24	20,9			
				19,325			

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotografie	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr skupiny				
		4	29							
		5	27							
		6	23							
		7	16							
		8	21							
		9	21							
		10	12							
		2 2	1				20	18,6		
			2				17			
			3				24			
	4		19							
	5		19							
	6		12							
	7		16							
	8		22							
	9		20							
	10		17							
	39	1 1	1	28	19,1					
			2	25						
			3	11						
4			16							
5			22							
6			19							
7			19							
8			21							
9			11							
10			19							
1 2		1	21	20,5						
		2	21							
		3	27							
		4	22							
		5	11							
		6	20							
		7	24							
		8	14							
		9	17							
		10	28							
2 1		1	25	26						
		2	24							
		3	17							
		4	26							
		5	35							
		6	28							
		7	24							
		8	23							
		9	25							
		10	33							
2 2	1	32	25,4							
	2	26								
	3	28								
	4	28								
	5	24								
	6	31								
	7	18								
	8	24								
	9	17								
	10	26								
				22,75						

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotografie	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr skupiny
40	1 1	1	24	22	19,8	
		2	21			
		3	25			
		4	26			
		5	17			
		6	18			
		7	23			
		8	21			
		9	21			
		10	24			
	1 2	1	23	17,9		
		2	15			
		3	14			
		4	16			
		5	20			
		6	21			
		7	17			
		8	17			
		9	18			
		10	18			
	2 1	1	30	20,9		
		2	25			
		3	20			
		4	18			
		5	21			
		6	14			
		7	20			
		8	16			
		9	23			
		10	22			
	2 2	1	22	18,4		
		2	33			
		3	16			
		4	20			
		5	19			
		6	20			
		7	13			
		8	13			
		9	14			
		10	14			

**Tabulka 31.** Kvantifikované výsledky CD68-pozitivních buněk v plicích. Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupina.

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotografie	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr skupiny
36	1 1	1	16	18,4	16,85	14,955
		2	34			
		3	14			
		4	10			
		5	19			
		6	30			
		7	15			
		8	14			
		9	15			
		10	17			
	1 2	1	12	15,8		
		2	17			

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotografie	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr skupiny				
		3	21							
		4	14							
		5	13							
		6	11							
		7	28							
		8	19							
		9	11							
		10	12							
		2 1	1				10	15,3		
			2				13			
	3		14							
	4		31							
	5		13							
	6		15							
	7		11							
	8		15							
	9		14							
	10		17							
	2 2	1	16	17,9						
		2	25							
3		27								
4		12								
5		15								
6		14								
7		19								
8		16								
9		21								
10		14								
37	1 1	1	13	13,3						
		2	12							
		3	13							
		4	11							
		5	11							
		6	15							
		7	12							
		8	15							
		9	17							
		10	14							
	1 2	1	10	14,8						
		2	10							
		3	15							
		4	15							
		5	14							
		6	18							
		7	22							
		8	14							
		9	11							
		10	19							
2 1	1	20	18							
	2	22								
	3	17								
	4	18								
	5	19								
	6	21								
	7	11								
	8	17								
	9	17								
			15,1							



číslo jedince	číslo řezu	číslo fotografie	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr skupiny
		10	18			
		1	12			
		2	8			
		3	10			
		4	12			
		5	24			
		6	16			
		7	14			
		8	23			
		9	11			
	2 2	10	13	14,3		
		1	22			
		2	14			
		3	10			
		4	20			
		5	14			
		6	15			
		7	10			
		8	7			
		9	25			
	1 1	10	9	14,6		
		1	18			
		2	19			
		3	13			
		4	10			
		5	13			
		6	10			
		7	14			
		8	16			
		9	21			
	1 2	10	17	15,1		
		1	15			
		2	16			
		3	8			
		4	13			
		5	25			
		6	10			
		7	13			
		8	16			
		9	11			
	2 1	10	9	13,6		
		1	23			
		2	15			
		3	11			
		4	15			
		5	16			
		6	14			
		7	18			
		8	10			
		9	17			
38	2 2	10	11	15	14,575	
		1	13			
		2	22			
		3	14			
		4	31			
		5	23			
39	1 1	6	25	19,6	15,9	

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotografie	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr skupiny	
		7	19				
		8	13				
		9	16				
		10	20				
	1 2		1	17	12,6		
			2	14			
			3	11			
			4	12			
			5	10			
			6	13			
			7	11			
			8	16			
			9	13			
			10	9			
	2 1		1	12	15,3		
			2	18			
			3	25			
			4	14			
			5	14			
			6	18			
			7	10			
			8	11			
			9	16			
			10	15			
	2 2		1	9	16,1		
			2	14			
			3	25			
			4	20			
			5	20			
			6	23			
7			24				
8			9				
9			6				
10			11				
40	1 1	1	14	11,5			
		2	10				
		3	7				
		4	13				
		5	11				
		6	12				
		7	10				
		8	12				
		9	18				
		10	8				
	1 2		1	14	13,2		
			2	15			
			3	16			
			4	16			
			5	15			
			6	12			
			7	12			
			8	14			
			9	8			
			10	10			
2 1		1	13	13	12,35		
		2	24				
		3	10				

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotografie	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr skupiny	
		4	14				
		5	8				
		6	17				
		7	8				
		8	10				
		9	15				
		10	11				
	2 2		1	14	11,7		
			2	11			
			3	9			
			4	8			
			5	10			
			6	13			
			7	19			
			8	10			
			9	16			
			10	7			

**Tabulka 32.** Kvantifikované výsledky CD68-pozitivních buněk v plicích. Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupina.

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotografie	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr skupiny	
6	1 1	1	23	18,8			
		2	24				
		3	23				
		4	19				
		5	11				
		6	23				
		7	14				
		8	17				
		9	16				
		10	18				
	1 2		1	22	20,2		
			2	24			
			3	25			
			4	17			
			5	11			
			6	20			
			7	25			
			8	21			
			9	13			
			10	24			
	2 1		1	19	17,7		
			2	21			
			3	15			
			4	22			
			5	20			
			6	20			
			7	14			
			8	15			
			9	15			
			10	16			
2 2		1	9	14,9	17,9	16,595	
		2	13				
		3	15				
		4	20				

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotografie	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr skupiny
		5	13			
		6	15			
		7	12			
		8	12			
		9	15			
		10	25			
		1	29			
		2	11			
		3	15			
		4	9			
		5	24			
		6	21			
		7	24			
		8	19			
		9	16			
	1 1	10	24	19,2		
		1	18			
		2	25			
		3	21			
		4	18			
		5	22			
		6	20			
		7	15			
		8	21			
		9	18			
	1 2	10	18	19,6		
		1	17			
		2	17			
		3	15			
		4	14			
		5	15			
		6	18			
		7	18			
		8	22			
		9	10			
	2 1	10	26	17,2		
		1	12			
		2	22			
		3	16			
		4	26			
		5	11			
		6	18			
		7	17			
		8	18			
		9	17			
7	2 2	10	14	17,1	18,275	
		1	27			
		2	26			
		3	10			
		4	11			
		5	16			
		6	14			
		7	14			
		8	12			
		9	18			
	1 1	10	7	15,5		
8	1 2	1	15	16,6	16,5	

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotografie	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr skupiny
		2	10			
		3	34			
		4	9			
		5	16			
		6	12			
		7	35			
		8	17			
		9	10			
		10	8			
		2 1	1			
	2		15			
	3		18			
	4		20			
	5		12			
	6		36			
	7		18			
	8		15			
	9		10			
	10		17			
	2 2	1	18	16,6		
		2	16			
		3	7			
		4	27			
		5	14			
		6	13			
		7	19			
		8	11			
		9	30			
		10	11			
	9	1 1	1	14	15,2	
2			10			
3			12			
4			19			
5			10			
6			17			
7			23			
8			22			
9			11			
10			14			
1 2		1	15	16,1		
		2	24			
		3	12			
		4	18			
		5	14			
		6	15			
		7	16			
		8	11			
		9	16			
		10	20			
2 1		1	14	16,2		
		2	22			
		3	16			
		4	14			
		5	14			
		6	20			
		7	13			
		8	15			
				15,325		

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotografie	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr skupiny
		9	17	13,8		
		10	17			
		1	13			
		2	16			
		3	8			
		4	17			
		5	13			
		6	11			
		7	24			
		8	16			
		9	8			
	2 2	10	12			
	1 1	1	19	15,7		
		2	10			
		3	18			
		4	14			
		5	18			
		6	19			
		7	10			
		8	20			
		9	12			
		10	17			
	1 2	1	10	15,9		
		2	14			
		3	12			
		4	15			
		5	31			
		6	11			
		7	16			
		8	11			
		9	25			
		10	14			
	2 1	1	15	13,9		
		2	12			
		3	11			
		4	13			
		5	20			
		6	21			
		7	15			
		8	10			
		9	11			
		10	11			
10	2 2	1	14	14,4		
		2	11			
		3	11			
		4	18			
		5	13			
		6	9			
		7	26			
		8	20			
		9	9			
		10	13			
					14,975	

## Játra

### Souhrn provedených analýz v játrech

Tabulka 33. Souhrn provedených analýz na vzorcích jater.

metoda označení jedince	analýza hmotnosti	histologická barvení			IHC		IF		qPCR				
		histopatologická analýza	MG T	S R	Ki 67	CD 68	SO X9	Ki 67	SO X9	IL1 -a	IL1 -b	IL 6	NFκ B1
ctr 36	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
ctr 37	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
ctr 38	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
ctr 39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
ctr 40	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs 36	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs 37	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs 38	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs 39	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs 40	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs/ CL 6	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs/ CL 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs /CL 8	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs /CL 9	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NPs /CL 10	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-

### Histopatologická analýza vzorků jater

Z každého jedince byly pořízeny dva řezy, které byly obarveny pomocí přehledného histologického barvení Hematoxylin-eosin. Nalezené histopatologické změny byly kvantifikovány (tab. 34–36) dle kritérií v tab. 14.

Tabulka 34. Histopatologická analýza jater. Kontrolní skupina.

číslo jedince	číslo řezu	infiltrát leukocytů	fokální nekróza	steat óza	hemos táza	remodelace trámcového epitelu	hepatická dystrofie	karyom egalie	hepatická hypertrofie
36	1	+		+	+				+
	2	+			+				+
37	1	1 1			+			+	
	2				+				
38	1				++		++		
	2	+			++		+		
39	1	+			+				
	2	+			+				

číslo jedince	číslo řezu	infiltrát leukocytů	fokální nekróza	steat óza	hemos táza	remodelace trámcového epitelu	hepatická dystrofie	karyom egalie	hepatická hypertrofie
40	1								
	2	+							

**Tabulka 35.** Histopatologická analýza jater. Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupina.

číslo jedince	číslo řezu	infiltrát leukocytů	fokální nekróza	steat óza	hemos táza	remodelace trámcového epitelu	hepatická dystrofie	karyom egalie	hepatická hypertrofie
36	1	+			+	++	+	+	
	2	++				+	+		
37	1	+			+	+	+	+	+
	2	+			+	++	+	+	
38	1	+	+		++	++	+	+	+
	2	++	+		+	++	+	++	
39	1	+	+	+	++	++	+	++	+
	2	++	+	+	++	++	++	++	+
40	1			++	++	++	+	++	
	2	+		++	+	+++	+	+	

**Tabulka 36.** Histopatologická analýza jater. Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupina.

číslo jedince	číslo řezu	infiltrát leukocytů	fokální nekróza	steat óza	hemos táza	remodelace trámcového epitelu	hepatická dystrofie	karyom egalie	hepatická hypertrofie
6	1	+		+	++	++	+	++	+
	2	++		+	++	+	+	+	+
7	1	++	+	+	+	++	+		++
	2	++	+		+	++	+		+
8	1	+			++	++	+	+	
	2				++	+	+	++	
9	1	+			+	+	+	+	+
	2	++			+	+		+	+
10	1	++	+		++	+	++	+	+
	2	++			++	+	+	+	+

## Kvantifikace Ki67-pozitivních buněk v játrech

Z každého jedince byly pomocí nepřímé trojstupňové imunohistochemické metody a markeru Ki67 obarveny čtyři řezy. Následně bylo z každého řezu pořízeno 10 fotografií o velikosti 2088 x 1550 px se zvětšením 40x, ve kterých byly kvantifikovány nalezené pozitivní buňky (tab. 37–39). Počet pozitivních buněk byl nakonec přepočítán, aby odpovídal ploše 1 mm<sup>2</sup> (P1).

**Tabulka 37.** Kvantifikované výsledky Ki67-pozitivních buněk v játrech. Kontrolní skupina.

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
36	1 1	1	0	1,4	2,45	5,36
		2	0			
		3	0			
		4	0			
		5	2			
		6	3			



číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina	
		7	2				
		8	0				
		9	3				
		10	4				
	12		1	1			0,7
			2	1			
			3	2			
			4	0			
			5	1			
			6	0			
			7	0			
			8	0			
			9	1			
			10	1			
	21		1	6			4,3
			2	5			
			3	2			
			4	4			
			5	3			
			6	7			
			7	6			
			8	2			
			9	4			
			10	4			
	22		1	4			3,4
			2	1			
			3	3			
			4	5			
			5	7			
			6	2			
			7	4			
			8	3			
			9	4			
			10	1			
37	11	1	9	6			
		2	4				
		3	6				
		4	7				
		5	3				
		6	7				
		7	6				
		8	5				
		9	10				
		10	3				
	12		1	8	7,1		
			2	13			
			3	6			
			4	9			
			5	1			
			6	4			
			7	7			
			8	7			
			9	8			
			10	8			
21		1	9	6,3			
		2	9				
		3	6				
				6,225			

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina				
		4	10							
		5	5							
		6	6							
		7	5							
		8	2							
		9	4							
		10	7							
		2 2	1				4	5,5		
			2				6			
			3				11			
	4		6							
	5		4							
	6		3							
	7		4							
	8		5							
	9		6							
	10		6							
	38	1 1	1	9	10,1					
			2	14						
			3	12						
4			5							
5			7							
6			10							
7			7							
8			10							
9			17							
10			10							
1 2		1	6	8,1						
		2	10							
		3	12							
		4	11							
		5	4							
		6	8							
		7	8							
		8	6							
		9	6							
		10	10							
2 1		1	7	9,4						
		2	5							
		3	16							
		4	15							
		5	11							
		6	9							
		7	7							
		8	4							
		9	10							
		10	10							
2 2	1	14	13							
	2	13								
	3	13								
	4	14								
	5	13								
	6	14								
	7	9								
	8	15								
	9	16								
	10	9								
					10,15					

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
39	1 1	1	4	4	4,175	
		2	3			
		3	8			
		4	4			
		5	3			
		6	6			
		7	4			
		8	2			
		9	4			
		10	2			
	1 2	1	2	3,6		
		2	1			
		3	2			
		4	6			
		5	3			
		6	3			
		7	3			
		8	5			
		9	9			
		10	2			
	2 1	1	5	3,8		
		2	3			
		3	5			
		4	5			
		5	4			
		6	2			
		7	3			
		8	4			
		9	4			
		10	3			
2 2	1	5	5,3			
	2	7				
	3	4				
	4	5				
	5	2				
	6	5				
	7	5				
	8	9				
	9	9				
	10	2				
40	1 1	1	2	4,4	3,8	
		2	6			
		3	5			
		4	2			
		5	3			
		6	2			
		7	3			
		8	6			
		9	9			
		10	6			
	1 2	1	4	3,7		
		2	4			
		3	4			
		1 14	5			
	5	3				
	6	3				
	7	2				

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina	
		8	2	3,6			
		9	6				
		10	4				
	2 1		1				3
			2				5
			3				2
			4				4
			5				4
			6				5
			7				3
			8				3
			9				0
			10				7
	2 2		1				5
			2				8
			3				2
			4				0
			5				4
			6				1
			7				5
			8				5
			9				2
10			3				
				3,5			

**Tabulka 38.** Kvantifikované výsledky Ki67-pozitivních buněk v játrech. Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupina.

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina			
36	1 1	1	7	8,7	7,275	7,24			
		2	3						
		3	8						
		4	8						
		5	5						
		6	6						
		7	8						
		8	19						
		9	12						
		10	11						
	1 2		1	9					
			2	7					
			3	6					
			4	10					
			5	9					
			6	6					
			7	11					
			8	9					
			9	5					
			10	5					
	2 1		1	5			6,1		
			2	1					
			3	4					
			4	6					
			5	8					
			6	5					
			7	8					
			8	10					

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
		9	9	6,6		
		10	5			
		1	3			
		2	8			
		3	8			
		4	5			
		5	4			
		6	10			
		7	7			
		8	8			
		9	7			
	2 2	10	6			
	1 1	1	14	9,3		
		2	10			
		3	8			
		4	10			
		5	10			
		6	6			
		7	8			
		8	11			
		9	10			
		10	6			
	1 2	1	10	9,4		
		2	9			
		3	10			
		4	8			
		5	16			
		6	9			
		7	6			
		8	9			
		9	8			
		10	9			
	2 1	1	4	8		
		2	13			
		3	4			
		4	15			
		5	4			
		6	7			
		7	6			
		8	5			
		9	16			
		10	6			
37	2 2	1	9	8,6	8,825	
		2	5			
		3	10			
		4	8			
		5	12			
		6	9			
		7	2			
		8	9			
		9	14			
		10	8			
38	1 1	1	5	4	5,675	
		2	2			
		3	6			
		4	6			
		5	5			

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
		6	3			
		7	4			
		8	4			
		9	2			
		10	3			
	1 2	1	3	3,4		
		2	2			
		3	3			
		4	4			
		5	1			
		6	5			
		7	3			
		8	4			
		9	5			
		10	4			
	2 1	1	5	5,4		
		2	4			
		3	4			
		4	5			
		5	12			
		6	7			
		7	3			
		8	10			
		9	1			
		10	3			
	2 2	1	16	9,9		
		2	6			
		3	16			
		4	12			
		5	8			
6		4				
7		4				
8		20				
9		5				
10		8				
39	1 1	1	4	8,3		
		2	9			
		3	17			
		4	7			
		5	11			
		6	6			
		7	6			
		8	13			
		9	7			
		10	3			
	1 2	1	7	8,2		
		2	8			
		3	12			
		4	10			
		5	4			
		6	6			
		7	6			
		8	18			
		9	3			
		10	8			
2 1	1	9	6,4			
2	8					
				7,925		

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina				
		3	5							
		4	7							
		5	4							
		6	5							
		7	6							
		8	6							
		9	6							
		10	8							
		2 2	1				14	8,8		
			2				4			
	3		9							
	4		15							
	5		6							
	6		7							
	7		12							
	8		2							
	9		11							
	10		8							
	40	1 1	1	10	8,8					
			2	9						
3			5							
4			9							
5			14							
6			8							
7			3							
8			9							
9			11							
10			10							
1 2		1	11	6,3						
		2	10							
		3	8							
		4	3							
		5	3							
		6	10							
		7	4							
		8	5							
		9	5							
		10	4							
2 1		1	3	5						
		2	4							
		3	3							
		4	4							
		5	8							
		6	3							
		7	8							
		8	8							
		9	3							
		10	6							
2 2	1	6	5,9		6,5					
	2	4								
	3	4								
	4	4								
	5	3								
	6	6								
	7	8								
	8	11								
	9	8								

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
		10	5			

**Tabulka 39.** Kvantifikované výsledky Ki67-pozitivních buněk v játrech. Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupina.

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
6	1 1	1	25	28,2	27,425	13,86
		2	26			
		3	26			
		4	33			
		5	37			
		6	31			
		7	37			
		8	23			
		9	23			
		10	21			
	1 2	1	38	27,6		
		2	18			
		3	31			
		4	38			
		5	15			
		6	24			
		7	31			
		8	25			
		9	32			
		10	24			
	2 1	1	21	29,7		
		2	20			
		3	20			
		4	27			
		5	32			
		6	34			
		7	61			
		8	31			
		9	20			
		10	31			
2 2	1	19	24,2			
	2	24				
	3	19				
	4	33				
	5	20				
	6	18				
	7	24				
	8	31				
	9	31				
	10	23				
7	1 1	1	9	19,4		
		2	15			
		3	16			
		4	28			
		5	37			
		6	19			
		7	30			
		8	11			
		9	13			
		10	16			



číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
	1 2	1	17	18,7		
		2	15			
		3	10			
		4	20			
		5	11			
		6	40			
		7	21			
		8	17			
		9	13			
		10	23			
	2 1	1	46	19,1		
		2	12			
		3	52			
		4	9			
		5	6			
		6	9			
		7	10			
		8	7			
		9	19			
		10	21			
	2 2	1	14	21,4		
		2	13			
		3	31			
		4	16			
		5	37			
		6	8			
		7	11			
		8	33			
		9	29			
		10	22			
8	1 1	1	5	7,9		
		2	6			
		3	8			
		4	5			
		5	12			
		6	5			
		7	8			
		8	10			
		9	8			
		10	12			
	1 2	1	14	11		
		2	10			
		3	10			
		4	10			
		5	11			
		6	28			
		7	10			
		8	4			
		9	6			
		10	7			
	2 1	1	6	6,9		
		2	4			
		3	5			
		4	5			
		5	11			
		6	5			
		7	5			

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
		8	5	8,6		
		9	17			
		10	6			
	2 2	1	4			
		2	5			
		3	11			
		4	13			
		5	7			
		6	4			
		7	8			
		8	13			
		9	14			
		10	7			
			1 1			
2	3					
3	5					
4	8					
5	3					
6	1					
7	4					
8	5					
9	8					
10	8					
1 2	1		5	4,3		
	2		1			
	3		8			
	4		5			
	5		5			
	6		4			
	7		4			
	8		2			
	9		1			
	10		8			
2 1	1	4	4,8			
	2	5				
	3	3				
	4	5				
	5	6				
	6	5				
	7	4				
	8	9				
	9	4				
	10	3				
9	2 2	1	5	4,4	4,525	
10	1 1	2	5			
		3	2			
		4	7			
		5	3			
			6			5
			7			5
			8			4
			9			3
			10			5
			11	18		
		2	8	7,2	9,1	
		3	8			
		4	3			

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina						
		5	6									
		6	4									
		7	12									
		8	5									
		9	5									
		10	3									
	1 2		1	9	8,4							
			2	7								
			3	8								
			4	9								
			5	10								
			6	14								
			7	7								
			8	7								
			9	3								
			10	10								
			2 1					1	19	10,3		
								2	11			
								3	11			
								4	16			
	5	13										
	6	8										
	7	9										
	8	4										
	9	6										
	10	6										
	2 2		1	1	10,5							
			2	7								
			3	10								
			4	11								
5			28									
6			22									
7			15									
8			0									
9			8									
10			3									

### Kvantifikace CD68-pozitivních buněk v játrech

Z každého jedince byly pomocí nepřímé trojstupňové imunohistochemické metody markeru CD68 obarveny dva řezy. Následně bylo z každého řezu pořízeno 10 fotografií o velikosti 2088 x 1550 px se zvětšením 40x, ve kterých byly kvantifikovány nalezené pozitivní buňky (tab. 40–42). Počet pozitivních buněk byl nakonec přepočítán, aby odpovídal ploše 1 mm<sup>2</sup>(P1).

**Tabulka 40.** Kvantifikované výsledky CD68-pozitivních buněk v játrech. Kontrolní skupina.

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
36	1	1	40	31,4	32,2	35,86
		2	36			
		3	25			
		4	34			
		5	26			
		6	26			

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina						
		7	40	33								
		8	26									
		9	30									
		10	31									
	22		1				43					
			2				34					
			3				33					
			4				35					
			5				41					
			6				40					
			7				23					
			8				30					
			9				21					
			10				30					
			37				1	1	38	38,6		
								2	33			
								3	45			
								4	41			
								5	39			
6	34											
7	41											
8	38											
9	41											
10	36											
2		1		32								
		2		39								
		3		47								
		4		40								
		5		28								
		6		42								
		7		26								
		8		35								
		9		38								
10	40											
38	1	1	52	43,8								
		2	58									
		3	62									
		4	40									
		5	35									
		6	47									
		7	46									
		8	35									
		9	38									
		10	25									
	2		1				24					
			2				44					
			3				49					
			4				31					
			5				44					
			6				42					
			7				39					
			8				36					
			9				38					
10	46											
39	1	1	27	34,5	34,9							
		2	32									
		3	33									

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina				
		4	39	35,3						
		5	37							
		6	37							
		7	31							
		8	40							
		9	28							
		10	41							
		2	1				30			
			2				35			
			3				35			
	4		43							
	5		28							
	6		45							
	7		36							
	8		43							
	9		21							
	10		37							
	40	1	1				34	29,1		
			2				32			
			3				25			
4			37							
5			29							
6			30							
7			34							
8			26							
9			23							
10			21							
2		1	47	36,9	33					
		2	42							
		3	29							
		4	36							
		5	33							
		6	32							
		7	24							
		8	36							
		9	47							
		10	43							

**Tabulka 41.** Kvantifikované výsledky CD68-pozitivních buněk v játrech. Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs skupina.

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina			
36	1	1	20	23,7					
		2	25						
		3	14						
		4	19						
		5	20						
		6	23						
		7	25						
		8	32						
		9	29						
		10	30						
	2	1	17				22,2	22,95	21,13
		2	20						
		3	25						
		4	27						

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina					
		5	24								
		6	23								
		7	19								
		8	16								
		9	23								
		10	28								
		37	1				1	16	18,2		
							2	22			
							3	7			
							4	17			
5	18										
6	16										
7	20										
8	29										
9	24										
10	13										
37	2	1	22	15,8	17						
		2	12								
		3	21								
		4	18								
		5	15								
		6	13								
		7	9								
		8	18								
		9	11								
		10	19								
38	1	1	35	23,8							
		2	36								
		3	24								
		4	30								
		5	21								
		6	14								
		7	24								
		8	19								
		9	15								
		10	20								
38	2	1	34	26,6	25,2						
		2	23								
		3	27								
		4	30								
		5	23								
		6	27								
		7	23								
		8	26								
		9	26								
		10	27								
39	1	1	13	14,2							
		2	11								
		3	15								
		4	16								
		5	11								
		6	10								
		7	12								
		8	18								
		9	23								
		10	13								
39	2	1	23	19,3	16,75						

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina	
		2	19				
		3	20				
		4	8				
		5	9				
		6	19				
		7	17				
		8	29				
		9	23				
		10	26				
		40	1				1
2	22						
3	21						
4	26						
5	29						
6	26						
7	17						
8	21						
9	26						
10	28						
2			1	21	23	23,75	
			2	19			
			3	24			
			4	30			
			5	23			
			6	16			
			7	21			
			8	25			
			9	25			
			10	26			

**Tabulka 42.** Kvantifikované výsledky CD68-pozitivních buněk v játrech. Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NPs/CL skupina.

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
		1	42			
		2	36			
		3	43			
		4	41			
		5	30			
		6	47			
		7	32			
		8	48			
		9	42			
		10	29			
6	1	1	22	39		
		2	29			
		3	52			
		4	48			
		5	36			
	2	6	30	34,4	36,7	
		7	32			
		8	37			
		9	29			
		10	29			
7	1	1	37	39	34,15	29,5
2		35				

číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina				
		3	48	29,3						
		4	39							
		5	51							
		6	39							
		7	35							
		8	30							
		9	31							
		10	45							
		2	1				14			
			2				28			
	3		36							
	4		33							
	5		27							
	6		39							
	7		28							
	8		33							
	9		30							
	10		25							
	8	1	1				24	30		
			2				35			
3			34							
4			22							
5			26							
6			31							
7			38							
8			36							
9			18							
10			36							
2		1	23	24,6	27,3					
		2	31							
		3	31							
		4	16							
		5	21							
		6	22							
		7	31							
		8	24							
		9	22							
		10	25							
9	1	1	30				25,1			
		2	19							
		3	27							
		4	19							
		5	10							
		6	24							
		7	29							
		8	33							
		9	28							
		10	32							
	2	1	25	21,8	23,45					
		2	10							
		3	36							
		4	20							
		5	23							
		6	18							
		7	25							
		8	22							
		9	26							



číslo jedince	číslo řezu	číslo fotky	počet pozitivních buněk	průměr/řez	průměr/jedinec	průměr/skupina
		10	13			
		1	7			
		2	16			
		3	27			
		4	25			
		5	17			
		6	42			
		7	29			
		8	27			
		9	31			
	1	10	24	24,5		
		1	20			
		2	38			
		3	21			
		4	18			
		5	27			
		6	49			
		7	27			
		8	29			
		9	21			
10	2	10	23	27,3	25,9	

## **P3: SEZNAM POUŽITÉHO MATERIÁLU**

### **Seznam použitých chemikálií**

alciánová modř (Merck)  
dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema)  
dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Lachner)  
Ehrlichův hematoxylin (Carl Roth)  
ethanol (100%) (Dr. Kulich Pharma)  
hydroxid sodný (Lachner)  
chlorid draselný (Lachner)  
chlorid sodný (Lachner)  
jodičnan sodný (Penta)  
kyselina citrónová (Lachner)  
kyselina fosfomolybdenová (Sigma-Aldrich)  
kyselina fosfowolframová (Lachner)  
kyselina chlorovodíková (36 %) (Lachner)  
kyselina octová (Lachner)  
peroxid vodíku (30%) (Lachner)  
ponceau – kyselý fuchsin (Diapath)  
roztok světlé zeleně (Diapath)  
Sirius Red (Diapath)  
Toluidinová modř (Sigma-Aldrich)  
Weigertův hematoxylin – reagensie A (Diapath)  
Weigertův hematoxylin – reagensie B (Diapath)  
xylen (Dr. Kulich Pharma)  
 $\beta$ -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)

## Seznam použitých roztoků

### Roztoky použité při histologických barveních

#### Hematoxylin-eosin

##### Mayerův hematoxylin

destilovaná voda	1000 ml
hematoxylin	1 g
jodičnan sodný	0,2 g
síran hlinitodraselný	50 g
kyselina citrónová	1 g
chloralhydrát	50 g

Postup: 1 g hematoxylinu, 0,2 g jodičnanu sodného a 50 g kamence draselného rozpustíme v 1 l destilované vody. Po úplném rozpuštění přidáme 1 g kyseliny citronové a 50 g chloralhydrátu.

#### Eosin žlutý

eosin žlutý (rozpuštěný ve vodě)	5 g
dichroman draselný	5 g
100% ethanol	100 ml
nasycený roztok kyseliny pikrové	100 ml
destilovaná voda	800 ml

#### Toluidinová modř

##### Toluidine Blue Stock Solution

Toluidinová modř	1 g
70% ethanol	100 ml

##### 1% kyselý roztok chloridu sodného

chlorid sodný	1,5 g
destilovaná voda	150 ml

Postup: pH 1% kyselého roztoku chloridu sodného upravíme na hodnoty 2,0 – 2,5 pomocí 35% kyseliny chlorovodíkové.

##### Toluidine Blue Working Solution

Toluidine Blue Stock Solution	10 ml
1% kyselý roztok chloridu sodného	90 ml

### Roztoky použité při imunohistochemických a imunofluorescenčních metodách

#### Citrátový pufr

kyselina citrónová	42 g
hydroxid sodný	18 g
destilovaná voda	2 l

Postup: 42 g kyseliny citronové a 18 g hydroxidu sodného rozpustíme v 2 litrech destilované vody. Následně upravíme pH pomocí 36% kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 6. Při použití během imunohistochemických a imunofluorescenčních metod 10x zředíme v destilované vodě.

### **Fosfátový pufr**

chlorid sodný	160 g
chlorid draselný	4 g
dihydrogenfosforečnan draselný	4 g
dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného	46,8 g
hydroxid sodný	2 pecky

Postup: Všechny látky umístíme do odměrného válce, který následně dolijeme destilovanou vodou do 2 litrů, mícháme imunohistochemických a imunofluorescenčních metod 10x zředíme v destilované vodě.

## Seznam použitých kitů

### Kity použité při imunohistochemických metodách

**Myší kit** – VECTASTAIN® Elite® ABC Kit, Peroxidase (Mouse IgG) (Vector Laboratories, Inc.)

**Králičí kit** – VECTASTAIN® Elite® ABC Kit, Peroxidase (Rabbit IgG) (Vector Laboratories, Inc.)

**Ředidlo Ab** – DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components (Dako North America, Inc.)

**DAB** – DAKO Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Dako North America, Inc.)

### Kity použité při imunofluorescenčních metodách

**Sekundární protilátka** – Alexa Fluor™ 555 Donkey anti-rabbit (invitrogen by Thermo Scientific)

**Králičí kit** – VECTASTAIN® Elite® ABC Kit, Peroxidase (Rabbit IgG) (Vector Laboratories, Inc.)

**Ředidlo Ab** – DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components (Dako North America, Inc.)

**DAPI** – Fluoroshield™ with DAPI (Sigma)

### Kity použité při analýze genové exprese

**Izolace mRNA** – RNeasy® Mini Kit (QIAGEN)

**Příprava Master Mixu** – gb Ideal PCR Master Mix (GENERI BIOTECH s.r.o.)

## **Seznam použitých protilátek**

### **Protilátky použité při imunohistochemických metodách**

**Ki67** – katalog. č.: RBK027

**Nanog** – katalog. č.: 4903

**SOX2** – katalog. č.: 14962

**MPO** – katalog. č.: ab9535

**CD68** – katalog. č.: ab125212

### **Protilátky použité při imunofluorescenčních metodách**

**Ki67** – katalog. č.: RBK027

**SOX9** – katalog. č.: OAAB10398

## Seznam použitých TaqMan

Actb – ID: Mm00607939\_s1

Sox2 – ID: Mm03053810\_s1

Sox9 – ID: Mm00448840\_m1

IL1- $\alpha$  – ID: Mm00439620\_m1

IL1- $\beta$  – ID: Mm01336189\_m1

IL6 – ID: Mm99999064\_m1

NFkB1 – ID: Mm00476361\_m1

## Seznam použitých přístrojových pomůcek

<b>Váha</b>	A200S (Sartorius Analytic)
<b>Zalévací stanice</b>	DP500 (Bio Optica)
<b>Rotační mikrotom</b>	Leica RM2145 (Leica Microsystems)
<b>Vodní lázeň</b>	Leica IH1210 (Leica Microsystems)
<b>Horká deska</b>	Leica IH1220 (Leica Microsystems)
<b>pH metr</b>	edge pH (Hanna Instruments)
<b>Pipety</b>	Micropipette Research 0–2,5 µl (Eppendorf) Micropipette Research 2–20 µl (Eppendorf) Micropipette Research 2–200 µl (Eppendorf) Micropipette Research 100–1000 µl (Eppendorf)
<b>Mikroskop</b>	Leica DM LB Video Microscope (Leica Microsystems) Leica DM LB2 Video Microscope (Leica Microsystems)
<b>Kamera</b>	Leica DFC320 Release Notes (Leica Microsystems)
<b>Fluorescenční mikroskop</b>	Leica DM2000& 2000 LED system (Leica Microsystems)
<b>Spektrofotometr</b>	NanoDrop One/One Microvolume OD600 (Thermo Scientific)
<b>Termocykler</b>	MasterCycler (Eppendorf)
<b>Centrifuga</b>	D108 (DLAB) Mini Spin Plus (Eppendorf)
<b>Třepačka</b>	M37610-26 (Barnstead/ThermoLyne)
<b>qPCR cykler</b>	LightCycler 480 Instrument II (Roche)



## **Seznam použitých softwarů**

Úprava fotografií – Adobe Photoshop CS4 (Adobe Inc., Mountain View, CA, USA)

Statistické vyhodnocení (P3), grafická úprava grafů – GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)

## **P4: PUBLIKACE**

Publikace v časopise International Journal of Molecular Sciences

Impact factor: 4,5

Impact quartile: Q1

Publikováno 19. 11. 2020

DOI: 10.3390/ijms21228738

DUMKOVÁ, Jana, Tereza SMUTNÁ, Lucie VRLÍKOVÁ, Bohumil DOČEKAL, Daniela KRISTEKOVÁ, Zbyněk VEČEŘA, Zuzana HUSÁKOVÁ, Veronika JAKEŠOVÁ, Adriena JEDLIČKOVÁ, Pavel MIKUŠKA, Lukáš ALEXA, Pavel COUFALÍK, Michaela TVRDOŇOVÁ, Kamil KŘŮMAL, Tomáš VACULOVÍČ, Viktor KANICKÝ, Aleš HAMPL a Marcela BUCHTOVÁ. **A Clearance Period after Soluble Lead Nanoparticle Inhalation Did Not Ameliorate the Negative Effects on Target Tissues Due to Decreased Immune Response.** *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; **21**(22).



Article

# A Clearance Period after Soluble Lead Nanoparticle Inhalation Did Not Ameliorate the Negative Effects on Target Tissues Due to Decreased Immune Response

Jana Dumková <sup>1</sup>, Tereza Smutná <sup>1,2</sup>, Lucie Vrlíková <sup>2</sup>, Bohumil Dočekal <sup>3</sup>,  
Daniela Kristeková <sup>2,4</sup>, Zbyněk Večeřa <sup>3</sup>, Zuzana Husáková <sup>5</sup>, Veronika Jakešová <sup>2</sup>,  
Adriena Jedličková <sup>2</sup>, Pavel Mikuška <sup>3</sup>, Lukáš Alexa <sup>3</sup>, Pavel Coufalík <sup>3</sup>,  
Michaela Tvrdoňová <sup>5</sup>, Kamil Křůmal <sup>3</sup>, Tomáš Vaculovič <sup>5</sup>, Viktor Kanický <sup>5</sup>, Aleš Hampl <sup>1</sup>  
and Marcela Buchtová <sup>2,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic; jdumkova@med.muni.cz (J.D.); terka.smutna12@gmail.com (T.S.); ahamp@med.muni.cz (A.H.)

<sup>2</sup> Laboratory of Molecular Morphogenesis, Institute of Animal Physiology and Genetics, v.v.i., Czech Academy of Sciences, 602 00 Brno, Czech Republic; vrlikova@iach.cz (L.V.); daniela.kristekova@gmail.com (D.K.); veronikam@volny.cz (V.J.); adri.jedlickova@gmail.com (A.J.)

<sup>3</sup> Department of Environmental Analytical Chemistry, Institute of Analytical Chemistry, v.v.i., Czech Academy of Sciences, 602 00 Brno, Czech Republic; docekal@iach.cz (B.D.); vecera@iach.cz (Z.V.); mikuska@iach.cz (P.M.); alexa@iach.cz (L.A.); coufalik@iach.cz (P.C.); krumal@iach.cz (K.K.)

<sup>4</sup> Section of Animal Physiology and Immunology, Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic

<sup>5</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic; zuzka.husakova@seznam.cz (Z.H.); 358018@mail.muni.cz (M.T.); vaca\_777@yahoo.com (T.V.); viktork@chemi.muni.cz (V.K.)

\* Correspondence: buchtova@iach.cz

Received: 22 October 2020; Accepted: 17 November 2020; Published: 19 November 2020



**Abstract:** The inhalation of metal (including lead) nanoparticles poses a real health issue to people and animals living in polluted and/or industrial areas. In this study, we exposed mice to lead(II) nitrate nanoparticles [Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> NPs], which represent a highly soluble form of lead, by inhalation. We aimed to uncover the effects of their exposure on individual target organs and to reveal potential variability in the lead clearance. We examined (i) lead biodistribution in target organs using laser ablation and inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) and atomic absorption spectrometry (AAS), (ii) lead effect on histopathological changes and immune cells response in secondary target organs and (iii) the clearance ability of target organs. In the lungs and liver, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> NP inhalation induced serious structural changes and their damage was present even after a 5-week clearance period despite the lead having been almost completely eliminated from the tissues. The numbers of macrophages significantly decreased after 11-week Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> NP inhalation; conversely, abundance of alpha-smooth muscle actin (α-SMA)-positive cells, which are responsible for augmented collagen production, increased in both tissues. Moreover, the expression of nuclear factor κB (NF-κB) and selected cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNFα), transforming growth factor beta 1 (TGFβ1), interleukin 6 (IL-6), IL-1α and IL-1β, displayed a tissue-specific response to lead exposure. In summary, diminished inflammatory response in tissues after Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> NPs inhalation was associated with prolonged negative effect of lead on tissues, as demonstrated by sustained pathological changes in target organs, even after long clearance period.

**Keywords:** clearance; lead nanoparticles; inhalation; LA-ICP-MS imaging; toxicity

## 1. Introduction

Ambient airborne particulate matter (PM) is considered as an important environmental pollutant with adverse effect on human health [1]. However, recent studies indicated that the adverse health effects of PM cannot be solely explained by the mass concentration of PM, but the size of particulates and their chemical composition play also an important role [2–4].

Ambient PM is a very complex multi-component mixture of organic material and inorganic compounds, including ionic species, crustal elements and metals [3–5]. Metals are present in the PM both in insoluble form as oxides or mineralized species [6], and partly soluble forming a dissolved metal fraction [5]. The water-soluble fraction of the metal was recently found to be responsible for acute respiratory illnesses and child asthma [7–9].

Pb is one of the most abundant metals in aerosols [10–14]. The limit for airborne Pb of  $0.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$  determined by the World Health Organization is regularly exceeded in many cities around the world when the measured concentrations of airborne Pb in some areas have reached  $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$  in urban background sites and even more than  $70 \mu\text{g}/\text{m}^3$  in industrial areas [13]. Recent studies indicate that a substantial fraction ( $\geq 35\%$ ) of total Pb content is soluble in water [5,11,15].

Due to their size, inhaled nanoparticles (NPs) can invade the lower respiratory tract more easily than corresponding larger forms and they are predominantly deposited in the alveolar regions of lungs. Although the inhalation of metal NPs, including those that contain Pb, poses a real threat to humans, only a few studies have evaluated the potential toxicity of Pb in different nanoforms [16–19]. Different approaches have been used for the applications of metal nano-suspensions into animal models, such as intraperitoneal injections [17], intravenous injections [18,20], intratracheal instillation [21], or by using specific inhalation devices for rodents [22] to study systemic intoxication.

Pb NPs in the air can come into contact with various parts of the body, such as the respiratory system, the olfactory region, the skin, the hair or the conjunctiva of the eyes. The animals also take care of their fur and therefore oral exposure to inhaled NPs can be higher than in humans. However, for in both animals and humans, the inhaled NPs exhibit extrapulmonary effects because of the clearance from the lungs through mucociliary transport [23]. Here, we exposed animals to Pb NPs in whole-body inhalation chambers to simulate natural conditions. We used very low Pb NP concentrations in inhaled air to reflect complex real situations of how humans are exposed to metal NPs in the ambient atmosphere. In our previous studies [19,24], we exposed the animals to lead oxide nanoparticles (PbO NPs), which is a poorly soluble Pb compound. Shortly, after subchronic PbONP inhalation, morphological alterations and tissue damage were observed mainly in the lungs as a primary target of the inhaled PbO NPs. After 5-week clearance period, the decreased level of pathological changes in the lungs was observed in all analyzed animals. Similarly, in the liver, a 5-week clearance period after 6-week PbONP inhalation illustrated the ability of this organ to effectively react to an increased lead load during the time of the experiment. Thereafter, clearance of ionic lead and PbONPs (Pb/PbONPs) from the lungs and liver was effective. In this study, we exposed the animals to lead(II) nitrate nanoparticles [ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs] to mimic the effect of the soluble form of Pb in PM. Lead(II) nitrate was selected because of its high solubility in water. Nitrate, the second part of the compound, is very important ionic component of PM [12]; however, its toxicity under normal concentration is low. Nitrate's toxicity results from its conversion to nitrite in the body that at high concentration may cause methemoglobinemia [25].

A mass concentration of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs of  $68.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (i.e.,  $42.9 \mu\text{g Pb}/\text{m}^3$ ), used for exposure of animals, corresponds to the exposure of city inhabitants during pollution peaks. Occupational Safety and Health Administration (OSHA) has set a permissible exposure limit for lead in the workplace air of  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ .

We examined the Pb biodistribution, toxicological effects and clearance ability of target organs (lungs, liver, kidney, spleen, bone and blood) following sub-chronic inhalation of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs using female mice CD-1 (ICR) line as a model organism. Our study revealed diminished inflammatory response in lungs and liver after 11-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation, which was associated with prolonged

negative effect of lead on tissues even after a 5-week clearance period. Therefore, highly soluble  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs evoke distinct effects on target organs than those observed for less soluble  $\text{PbO}$  NPs used in our previous study [24].

## 2. Results and Discussion

There are three typical routes—food, water and air [26]—of human exposure to metal contaminants. An approximate estimate of individual inputs for Pb is 20.5% from diet, 11.9% from drinking water, 43.7% from outdoor soil/dust, 23.7% from indoor dust and 0.1% from air by inhalation [27]. However, resuspended soil can be a significant source of atmospheric Pb [28]. Given that approximately 8–10% of Pb in adults and 40–50% in infants is absorbed through ingestion, compared up to 60% absorption through respiration, the inhalation pathway of this metal has recently gained attention [29,30]. It was predicted that  $1 \mu\text{g Pb}/\text{m}^3$  in the air directly contributes  $19 \mu\text{g Pb}/\text{L}$  blood in children (or  $16 \mu\text{g Pb}/\text{L}$  blood in adults), indirectly (as air Pb increases Pb uptake by indirect pathways) up to  $50 \mu\text{g Pb}/\text{L}$  blood ( $=5 \mu\text{g Pb}/\text{dL}$ ) [31].

For this reason, we selected NP inhalation in whole-body chambers as the delivery method that represents the most typical exposure condition in humans. Specifically, we tested the effect of sub-chronic (11 weeks) inhalation of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs dispersed in the air (Figure 1, Table 1). First, we analyzed the influence of these highly soluble NPs on animals with a focus on their behavior inside living organisms, with mapping the ability of individual organs to eliminate the Pb burden after a clearance period.

**Table 1.** The characterization of generated  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs.

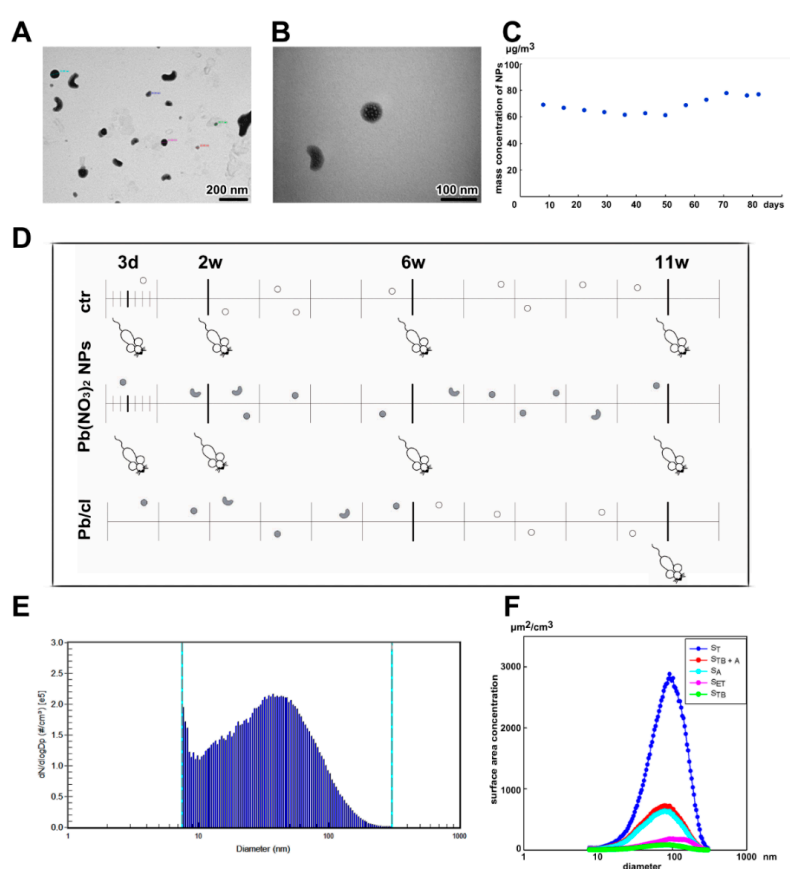
Parameter	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$
Particle count concentration	$1.94 \times 10^5 \text{ NPs}/\text{cm}^3$
Surface area	$1.68 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{cm}^3$
Mode	37.2 nm
Geometric mean diameter	31.3 nm
Geometric standard deviation	2.15
Mass concentration	$68.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$
Estimated deposited dose (after 11w)	$0.774 \mu\text{g}/\text{g}$

Adult female mice divided into control (air) and exposed [ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs] groups were placed into inhalation chambers, where they were exposed to modified air for the entire experimental period. For each designated time point (3 days, 2 weeks, 6 weeks and 11 weeks), 10 biological replicates were evaluated in both control and  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP-exposed groups (Figure 1). In addition, one group of mice inhaled air with  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs for 6 weeks, and thereafter clean air for 5 weeks (this group is further referred to as the clearance group: Pb/cl). Thus, at the end of the inhalation period (11 weeks), 10 biological replicates of control group, each  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP-exposed group and the Pb/cl group were examined in the same way as the previously described experimental groups (Figure 1D).

To assess the toxicological impacts of NPs and their possible risks to human health, information about NP deposition in different human lung regions is required. Therefore, we simulated the deposition of inhaled  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs in different parts of the human respiratory tract, using deposition fractions calculated by the International Commission on Radiological Protection (ICRP) deposition model for the extrathoracic, tracheobronchial and alveolar regions [32]. The total surface area of generated  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs (i.e.,  $1.68 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{cm}^3$ ;  $S_T$ ) was calculated by SMPS spectrometer software from the measured particle size distribution. Based on the surface area of the NPs deposited in the extrathoracic region ( $S_{ET}$ ; the anterior and posterior nasal passage, larynx, pharynx and mouth), tracheobronchial region ( $S_{TB}$ ; trachea, bronchi and bronchioles) and alveolar region ( $S_A$ ; respiratory bronchioles and alveolar ducts), the highest  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP surface area (25.3% of the total) is deposited in alveolar region of lungs, followed by the extrathoracic (7.4%) and tracheobronchial (3.3%) regions (Figure 1F). The deposition of NPs in human respiratory tract was compared with the deposition

in mouse respiratory tract calculated using a MPPD model [33–35] for monodisperse aerosol with geometric mean diameter of 31.3 nm and mass concentration of  $68.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . The depositions calculated using the MPPD model for the extrathoracic, tracheobronchial and alveolar regions of mouse respiratory tract (i.e., 33.2%, 6.69% and 12.8%, respectively) are different from those calculated by the ICRP model for human respiratory tract, which is probably caused mainly by different morphometry (i.e., mouse  $\times$  human) and different aerosol parameters (i.e., polydisperse aerosol in ICRP model  $\times$  monodisperse aerosol in the MPPD model) used for the calculation in both models.

Lung-deposited surface area (LDSA) concentration, another relevant metric for health effects of aerosol particles [36], combines the surface area of the NPs deposited in the alveolar and tracheobronchial regions. Therefore, we evaluated the particle size distribution of  $S_T$ ,  $S_{ET}$ ,  $S_{TB}$  and  $S_A$ , as well as the LDSA ( $S_{TB+A}$ ) (Figure 1F). The LDSA corresponds to 28.6% of total surface area of prospectively inhaled  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs, while the sum of  $S_{ET}$ ,  $S_{TB}$  and  $S_A$  is 36.0% of total surface area of inhaled  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs (Figure 1F).



**Figure 1.** The characterization of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  nanoparticles (NPs) in the inhalation chambers, and the scheme of overall experimental design. (A,B) The characterization of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs analyzed in the scanning transmission electron microscope (STEM). (C) Temporal trend of the mass concentration of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs throughout the inhalation experiment. (D) Design of the inhalation experiment. The groups of animals inhaled clean air for a period of up to 11 weeks (ctr), the other groups inhaled air with  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs for the same period ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP), and one group inhaled air with  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs for 6 weeks and thereafter five weeks of clean air (clearance group—Pb/cl). Symbols of light circles indicate clean air, and symbols of dark circles or dark beans indicate NPs. (E) Particle number-size distribution of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs in the inhalation chambers measured by Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS). (F) Surface area of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs size distribution ( $dS/d\text{Log}D_p$ ). The surface area of fractions of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs deposited in the extrathoracic ( $S_{ET}$ ), tracheobronchial ( $S_{TB}$ ) and alveolar region ( $S_A$ ) of lungs,  $S_T$ —the total surface area of generated  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs,  $S_{TB+A}$ —the lung-deposited surface area.

### 2.1. Pb Accumulates in All Analysed Target Organs upon Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> NP Inhalation

In animals exposed to Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> NPs, the Pb concentration in the organs continuously increased with the increasing exposure time (Table 2). After a 5-week clearance period, the Pb concentration in the lungs and spleen decreased to the limit of detection (LOD). This was not the case for the femur, kidney and liver, in which Pb was clearly detectable even after a 5-week clearance period.

**Table 2.** The concentration of Pb (ng/g) in organs following Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> NP inhalation determined by atomic absorption spectrometry (AAS).

		ctr/3d, 2w, 6w, 11w	Pb/3d	Pb/2w	Pb/6w	Pb/11w	Pb/cl
Lungs	Range		137–246	185–295	215–312	552–1130	
	Mean	<LOD *	184	239	262	752	<LOD *
	SD		40	39	47	225	
Femur	Range		282–372	1095–1423	2397–3120	4042–5576	2523–3941
	Mean	<LOD *	336	1269	2640	4750	3097
	SD		36	123	297	551	584
Kidney	Range		368–655	488–760	560–669	1259–1559	48–91
	Mean	<LOD *	454	599	597	1433	72
	SD		118	102	43	109	15
Liver	Range		46–80	60–80	70–87	159–281	4–10
	Mean	<LOD *	60	68	77	211	7
	SD		13	8	6	49	3
Spleen	Range				42–174	171–293	
	Mean	<LOD *	<LOD *	<LOD *	102	234	<LOD *
	SD				51	49	

Comparison of Pb concentration in lungs, femur, kidney, liver and spleen at different time points. \* Limit of detection in lungs, femur, kidney, liver, and spleen was 26, 21, 9, 3, and 29 ng/g Pb, respectively. LOD—limit of detection.

It needs to be said that because of the technical reasons the Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> NPs concentration in the inhaled air was not absolutely constant and fluctuated slightly during the experiment (Figure 1C). This fact was determined by collecting NPs on the filters and the evaluation of the mass concentration of Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> that was lower after 6 weeks of Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> NP exposure in comparison to the earlier timepoints (Figure 1C). Still, these small irregularities in the mass concentration of inhaled Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> were not reflected by the total Pb concentrations detected in the individual organs and in the blood (Tables 2 and 3), with the exception of kidneys where stagnation of Pb level between the 2nd week and 6th week timepoint was observed.

The response of individual organs studied here, in animals exposed to Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, also slightly varied and caused the changes of their weight coefficients (Figure S1). The weight coefficients of organs were expressed as wet weight of organ (g)/dead body weight (g) × 100. After 2 weeks, the liver weight coefficient significantly increased ( $p < 0.001$ ), while the kidney coefficient decreased ( $p < 0.05$  for left;  $p < 0.01$  for right) and the spleen coefficient decreased ( $p < 0.01$ ) compared with control mice. After 11 weeks, there was a decrease in the liver weight coefficient in the Pb/cl compared with the control group ( $p < 0.05$ ). Some contribution to organ weight variability could be due to organ dissection; however, we observed similar alterations of organ weight coefficients after metal NP exposure, as was described previously in other studies [37,38].



**Table 3.** Pb concentration in blood determined by AAS.

		ctr/3d, 2w, 6w, 11w	Pb/3d	Pb/2w	Pb/6w	Pb/11w	Pb/cl
Erythrocytes (ng/g)	Range		54–92	63–92	72–114	93–213	10–43
	Mean	<LOD *	71	79	88	168	19
	SD		15	13	17	48	14
Precipitate (ng/g)	Range						
	Mean	<LOD *	<LOD *	<LOD *	<LOD *	<LOD *	<LOD *
	SD						
Supernatant (ng/g)	Range						
	Mean	<LOD *	<LOD *	<LOD *	<LOD *	<LOD *	<LOD *
	SD						
Blood (ng/g)		<LOD *	31	40	47	85	10
Blood (µg/dL)		<LOD *	3.1	4.0	4.7	8.5	1.0

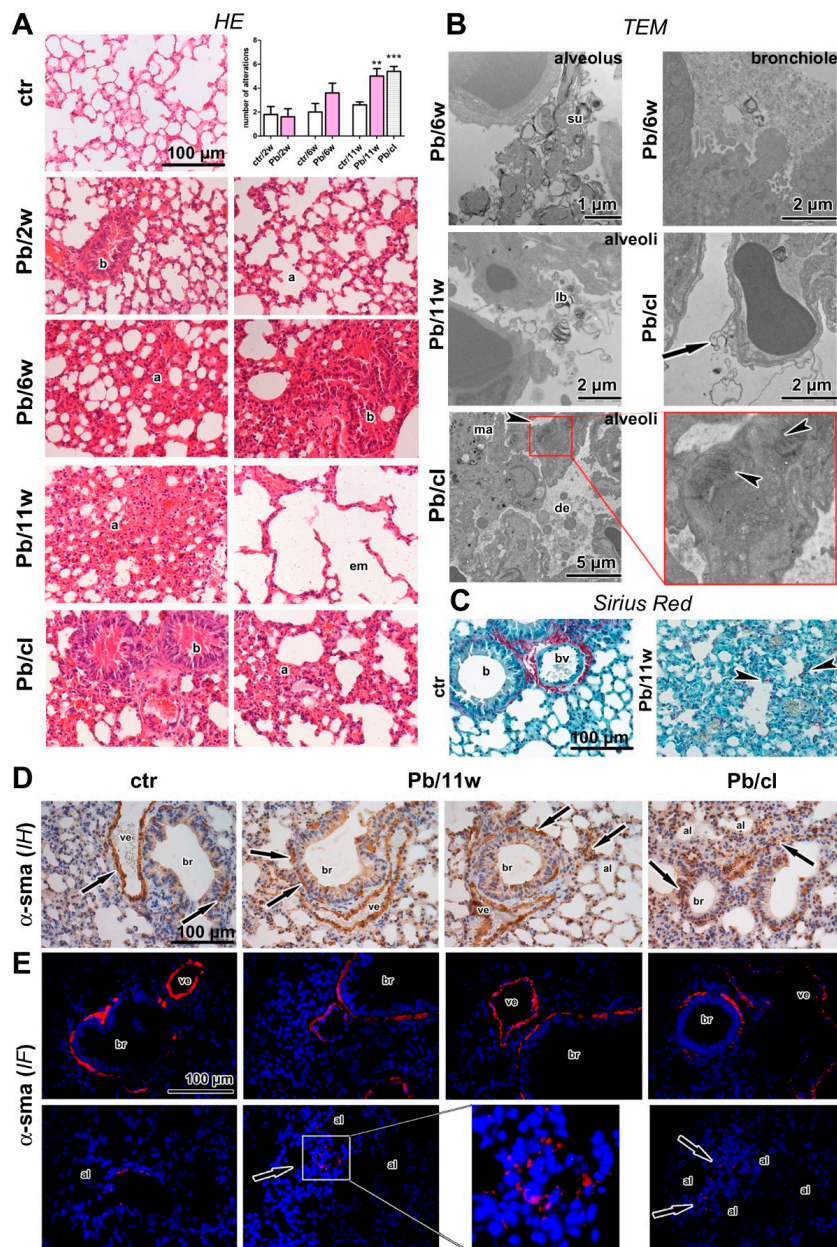
The concentration of Pb in blood at different time points. \* Limit of detection in erythrocytes in control animals, in precipitates (white blood cells, thrombocytes, proteins) at all data points, in supernatant (serum) at all data points and in the whole blood in control animals was 6, 11, 4 and 3 ng/g Pb, respectively.

## 2.2. Inhalation of $Pb(NO_3)_2$ NPs Causes Pulmonary Injury

The lungs are a major portal for the entrance of inhaled particles. Metal NPs, including Pb nanoforms, can invade the lower respiratory passages down to alveolar region more easily than larger forms. First, we analyzed the presence of Pb in lungs after their exposure to  $Pb(NO_3)_2$  NPs at different time points and found a continuous increase in Pb as the NP inhalation period increased (Figure S2, Table 2). A 5-week clearance period positively affected Pb clearance from the lungs; indeed, the Pb concentration decreased almost to the LOD (26 ng/g). Elemental imaging of lungs after  $Pb(NO_3)_2$  NP inhalation revealed Pb being regularly distributed in all parts of the lungs; and after a 5-week clearance period, there was an obvious reduction in the Pb level (Figure S2).

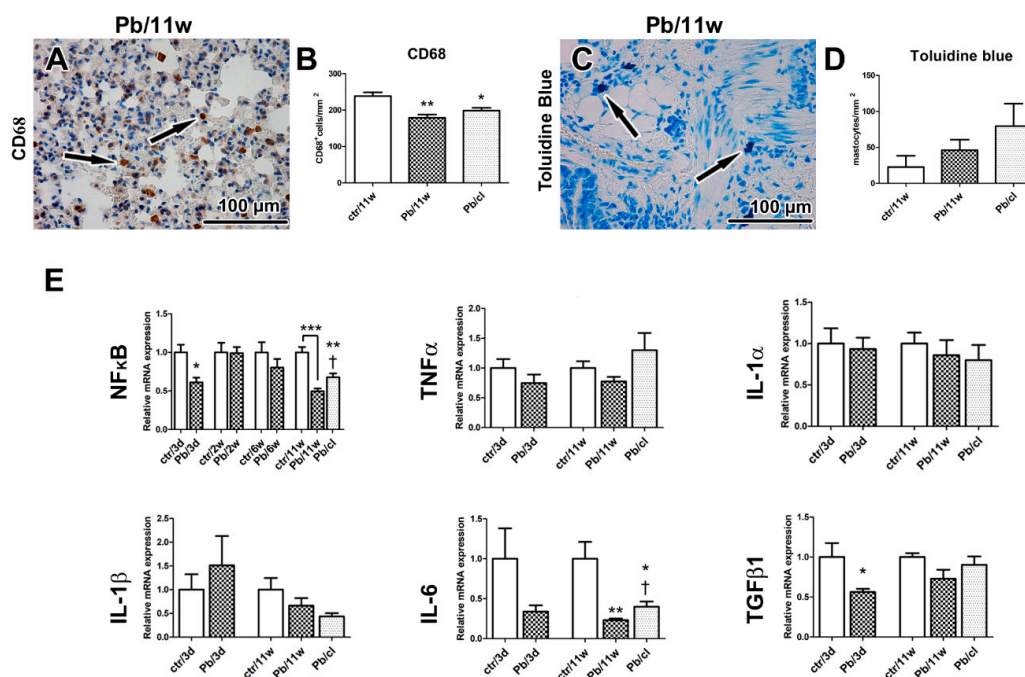
Histological analyses revealed numerous signs of inflammation and focal destruction of lung parenchyma in animals exposed to  $Pb(NO_3)_2$  NPs; the damage depended on the exposure time (Figures 2 and 3, Table S1). These findings were similar to what has been described in the inhalation experiment with other metal NPs: PbO [19], titanium dioxide ( $TiO_2$ ) [39] and cobalt (Co) [40]. The damaged lung parenchyma included destroyed alveolar septa, with alveolar emphysema initiated in some areas. The lungs of exposed animals exhibited several signs of inflammation, such as hyperemia; thickened alveolar septa with increased cellularity; regions with peribronchial and perivascular lymphocyte infiltrates; and areas of atelectasis and focal bronchiolitis. All of these distinct histopathological changes in the lungs were evaluated and scored for individual groups (Table S1). The extent of histopathological changes in lungs was statistically significant after 11 weeks ( $p < 0.01$ ).





**Figure 2.** The effect of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation and its clearance on the lungs. (A) The lungs in control animals, and after 2-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation were without serious pathological changes. The lungs after 6 and 11-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation exhibited remodeling in bronchiolar (b), and alveolar areas (a). The serious damage of lung parenchyma with destroyed alveolar septa and alveolar emphysema detected in some areas (em). Alteration of lung tissue was still detected after a 5-week clearance period. Statistical evaluation of the histopathological changes in both control and  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP-exposed groups in the experiments delineated in Table S1. The graphs values refer to average  $\pm$  SD; \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  compared with the corresponding control group (ctr) by unpaired  $t$ -test. (B) The expressive lung secretion was found in bronchioles, and alveolar spaces by transmission electron microscopy analysis (TEM). The higher amount of surfactant (su), lamellar bodies (lb), cell detritus (de) and enormous macrophages (ma) were in the alveoli. Arrow points to the damaged membranes of alveolar cell, arrowheads indicate high amount of collagen fibrils in the alveolar septa.

The nanoparticles were not present in lung tissue. (C) Collagen fibers (red) were around blood vessels (bv), and bronchioles (b) in controls. After 11-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation, collagen fibers were in alveolar regions (arrowheads). (D) Immunohistochemical detection (IH) of  $\alpha$ -SMA positive cells in the walls of bronchioles (br) or blood vessels (ve) in controls (arrows), and after 11-week of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation in the walls of bronchioles (br), and in the alveolar regions (al, arrows). (E) Immunofluorescent detection (IF) of  $\alpha$ -SMA positive cells in the walls of bronchioles (br) or blood vessels (ve) in controls,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP and  $\text{Pb}/\text{cl}$  inhaled groups.  $\alpha$ -SMA positive cells aggregated in some alveolar regions (al, arrows, in box) after  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation. Scale bar in panels (A,C–E) = 100  $\mu\text{m}$ .



**Figure 3.** The effect of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation and its clearance on the lung inflammation. (A) Detection of CD68-positive cells (marker of macrophages) in lungs (arrows). (B) The number of macrophages was decreased in  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs and  $\text{Pb}/\text{cl}$  groups. The difference in number of CD68-positive cells was statistically significant compared with the control group. The graphs values indicate average  $\pm$  SD; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . (C) Detection of Toluidine Blue-positive cells (marker of mastocytes) in lungs (arrows). (D) The number of mastocytes was slightly increased in  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP and  $\text{Pb}/\text{cl}$  groups. The graphs values indicate average  $\pm$  SD. Scale bar in panels (A,C) = 100  $\mu\text{m}$ . (E) Gene expression of  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  and cytokines at selected time points after  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation. The graphs values indicate average  $\pm$  SD; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  compared with the corresponding control group (ctr), and †  $p < 0.05$  compared with the corresponding  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP group by unpaired  $t$ -test.

While chemical and LA-ICP-MS detection documented the absence of Pb in the lungs after a 5-week clearance period, the histopathological analysis uncovered persistent inflammatory changes in the lungs ( $p < 0.001$ , Figure 2A, Table S1). The lungs of  $\text{Pb}/\text{cl}$  animals still exhibited several signs of inflammation: Hyperemia, thickened alveolar septa with increased cellularity, higher number of lung macrophages, regions with peribronchial and perivascular mononuclear infiltrates and focal bronchiolitis (Figures 2 and 3).

We next performed ultrastructural analysis of lung tissue by transmission electron microscopy (TEM) to identify the localization of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs in lungs (Figure 2B). There were no NPs in bronchioles or alveoli, which documented the rapid solubility of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs during transport through respiratory passages. However, it is necessary to mention that we are only able to distinguish larger particles or aggregates in TEM; small single NPs cannot be unambiguously identified because

of their similarity to ribosomes so that we cannot exclude their presence in pneumocytes using this morphological approach.

The lumens of bronchioles and alveoli contained inflammatory cells, cellular debris and accumulated surfactant; membranes of alveolar epithelial cells were severely damaged (Figure 2B). We also found majority of lamellar bodies being ejected from alveolar type II cells into the alveolar airspaces after 11-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation (Figure 2B). It seems plausible that abundant surfactant seen by TEM may contribute to solubility of NPs in lower respiratory passages.

Collagen fibers were detected in the walls of blood vessels and bronchioles in the control animals. After 11-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation, there were ectopic collagen fibers in the alveolar regions of lungs (Figure 2C). TEM also confirmed the presence of higher amount of collagen fibrils in the alveolar septa (Figure 2B). Augmented collagen production and induction of fibrosis can be associated with activation of myofibroblasts [41,42] and their expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) [43]. Previous studies have reported the upregulation of  $\alpha$ -SMA expression as a progressive fibrosis marker in the lungs after metal NP exposure [44,45]. We observed  $\alpha$ -SMA-positive cells located in the walls of larger bronchioles or blood vessels in the control animals and  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation increased their appearance in the walls of small bronchioles and aggregation in alveolar regions in the  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP and Pb/cl groups (Figure 2D,E). Therefore, interstitial fibrosis was induced after 6-week of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation and was still active after a 5-week clearance period.

### 2.3. Inhalation of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ NPs Alters the Number of Lung Macrophages

Particles smaller than 0.5  $\mu\text{m}$  can accumulate in the alveolar parts of the lung and induce an inflammatory response [21]. Although inflammation is usually protective, it can cause serious injury to the organ in the case of prolonged persistence. We found a reduced number of lung macrophages (detected as CD68-positive cells) after 11-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation ( $p < 0.01$ , compared with the corresponding control group; Figure 3A,B, Figure S3, Table S2). A similar decrease of CD68-positive cells was noticed in Pb/cl animals ( $p < 0.05$ ) compared with the corresponding control animals (Figure 3A,B, Table S2). Especially in lung infiltrates, the number of mastocytes (as visualized by Toluidine Blue) and the presence of neutrophils (as visualized by immunolabeling of myeloperoxidase, MPO) was increased (Figure 3, Figure S3). Taken together, soluble engineered  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs used at a very low concentration—corresponding to environmental levels of metal NPs—induced abnormalities in lung morphology that persisted even after a 5-week clearance period.

Next, we quantified immune system response on mRNA level. NF- $\kappa$ B is a family of transcription proteins that regulate genes involved in different processes of the immune responses [46]. NF- $\kappa$ B belongs to the first responders to variable harmful stimuli or to cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF) or interleukin 1 (IL-1) [47]. Exposure to heavy metal compounds can inhibit binding of NF- $\kappa$ B to DNA and block this signaling pathway. Here, both 3-day and 11-week exposure to  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation has led to significant downregulation of NF- $\kappa$ B in the lungs (Figure 3E) and the clearance period enabled for return of its expression close to its normal level (Figure 3E).

TNF $\alpha$  and IL-6 are major proinflammatory cytokines, while the IL-1 family includes 11 members expressed by numerous cell types, which comprises both proinflammatory and anti-inflammatory responses [48]. Previously, the exposure to NPs was found to deregulate many cytokines, including several IL family members or TNF $\alpha$  [49] and TNF signaling was previously linked to NF- $\kappa$ B activation [48]. Here, we observed downregulation of TNF $\alpha$  in the lungs after the shortest (3 days) and the longest (11 weeks) exposures (Figure 3E). Both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were downregulated in the lungs after the longest (11 weeks) exposure to  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs (Figure 3E) with both IL-1 mRNA levels becoming even lower after a 5-week clearance period (Figure 3E).

IL-6 is produced by a wide range of cells, including macrophages or hepatocytes in response to tissue injuries [50]. While the IL-6 trans-signaling pathway is rather pro-inflammatory, the classic IL-6 signaling through the membrane-bound receptor is mainly involved in regenerative processes [51]. In the lungs, IL-6 was downregulated after the shortest (3 days) and the longest (11 weeks) ( $p < 0.01$ )



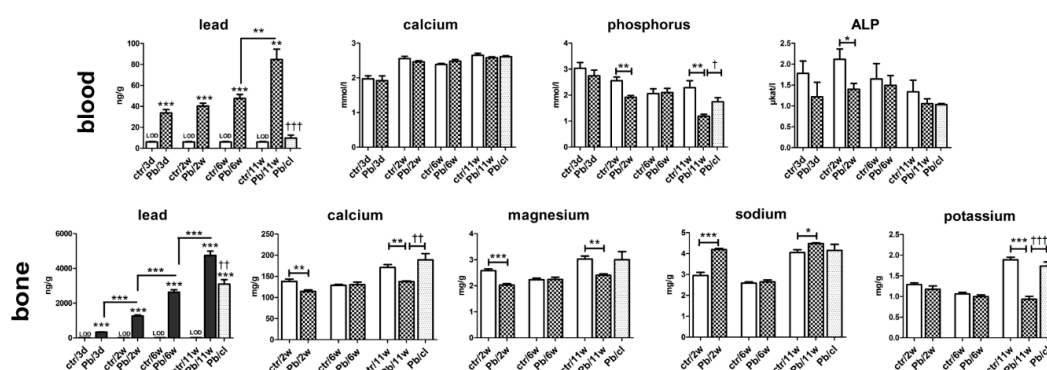
exposures to  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs. A 5-week clearance then has led to upregulation of *IL-6* mRNA in the lungs ( $p < 0.05$  compared with the 11-week exposure).

TGF $\beta$ 1 is an inflammatory cytokine secreted predominantly by leukocytes but also by other cell types, including macrophages [48]. In some conditions, its effect may increase the risk of pathologic fibrosis so that TGF $\beta$ 1 is considered to be a potent profibrotic mediator [41]. However, our study did not confirm the increased level of this profibrotic cytokine after  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation maybe due to mild alteration of lung parenchyma.

Activated macrophages are divided into two subpopulations: Classical (M1, pro-inflammatory) that predominantly produce IL-1 $\beta$ , IL-5 and TNF $\alpha$ ; and alternative (M2, anti-inflammatory) that produce TGF $\beta$ 1, vascular endothelial growth factor (VEGF), IL-10 and IL-12 [52]. Thus, TNF $\alpha$ , and TGF $\beta$  are cytokines produced by different population of macrophages with distinct final effects. In our experimental conditions, the shortest (3 days) and the longest (11 weeks) exposures to  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs were here associated with significant downregulation in *TGF $\beta$ 1* mRNA in the lungs ( $p < 0.05$ ) compared with the corresponding control animals (Figure 3E). The 5-week clearance allowed for some return of the *TGF $\beta$ 1* mRNA towards its original level, when compared to the corresponding  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP-exposed animals. Our findings on the effects of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs on TNF $\alpha$  and TGF $\beta$  mRNA levels are similar to those seen in animals exposed to other metal NPs [53], which also revealed that M1 and M2 populations of macrophages remained unaffected.

#### 2.4. Concentration of Pb in Blood Decreased after a 5-Week Clearance Period

The blood Pb level is a sensitive indicator of whole-body Pb exposure as it distributes the lead into secondary target tissues. Over recent decades, the United States Centers for Disease Control and Prevention (USCDC) has gradually lowered the blood Pb level at which medical intervention is necessary: From 60  $\mu\text{g}/\text{dL}$  before 1975 to 10  $\mu\text{g}/\text{dL}$  in 1991 [26]. The current limit recommended by the WHO is 5  $\mu\text{g}/\text{dL}$ . In our experimental animals, the blood Pb concentration continuously increased as the exposure time to  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs increased (Figure 4, Table 3).



**Figure 4.** The concentrations of selected elements and alkaline phosphatase (ALP) in the blood and bone after  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation. The graphs of selected elements (Pb, Ca, P, Mg, Na, K) and ALP in the blood and/or in the bone tissue. The graphs values indicate average  $\pm$  SD for 5 mice/group; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  compared with the corresponding control group (ctr) or between adjacent time points, and †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$ , and †††  $p < 0.001$  compared with the corresponding  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP group by unpaired *t*-test. The concentrations of Pb in controls were below limit of detection (LOD). LOD for Pb in the blood was 6, 11, 4 and 3 ng/g Pb at individual time points, for Pb in the bone 21 ng/g Pb.

The concentration of Pb in blood increased slightly from 31 ng/g (3.1  $\mu\text{g}/\text{dL}$ ) after 3-day  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP exposure, to 47 ng/g (4.7  $\mu\text{g}/\text{dL}$ ) after 6-week exposure, and to 85 ng/g (8.5  $\mu\text{g}/\text{dL}$ ) after 11-week exposure. Following a 5-week clearance period, such Pb concentration decreased approximately fivefold compared with the level in the 6-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP exposure group (10 ng/g or 1  $\mu\text{g}/\text{dL}$ ).

Moreover, the exposure to inhaled  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs did not influence the blood level of Ca at any time point (Figure 4); however, the blood level of phosphorus (P) was affected (Figure 4). After 2 and 11 weeks of exposure to  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP, the blood concentration of P was significantly decreased ( $p < 0.01$ ) compared with control animals. The blood level of P in Pb/cl mice was similar to control animals.

ALP is an enzyme required to generate free P for hydroxyapatite formation during bone mineralization [54]. During hypophosphatemia (in our experiment, predominantly after 2 and 11 weeks of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP exposure), ALP activity could increase in order to compensate mineral dysregulation and to provide more phosphate to the bones [55]. However, the ALP level in mice exposed to  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs was decreased compared with control animals at all analyzed time points; this difference was only significant after 2 weeks of exposure due to high variability among animals. Nevertheless, the biological significance and consequences of low P levels accompanied by low ALP levels will require additional research.

### 2.5. A 5-Week Clearance Period Did Not Affect the Pb Level in Bones

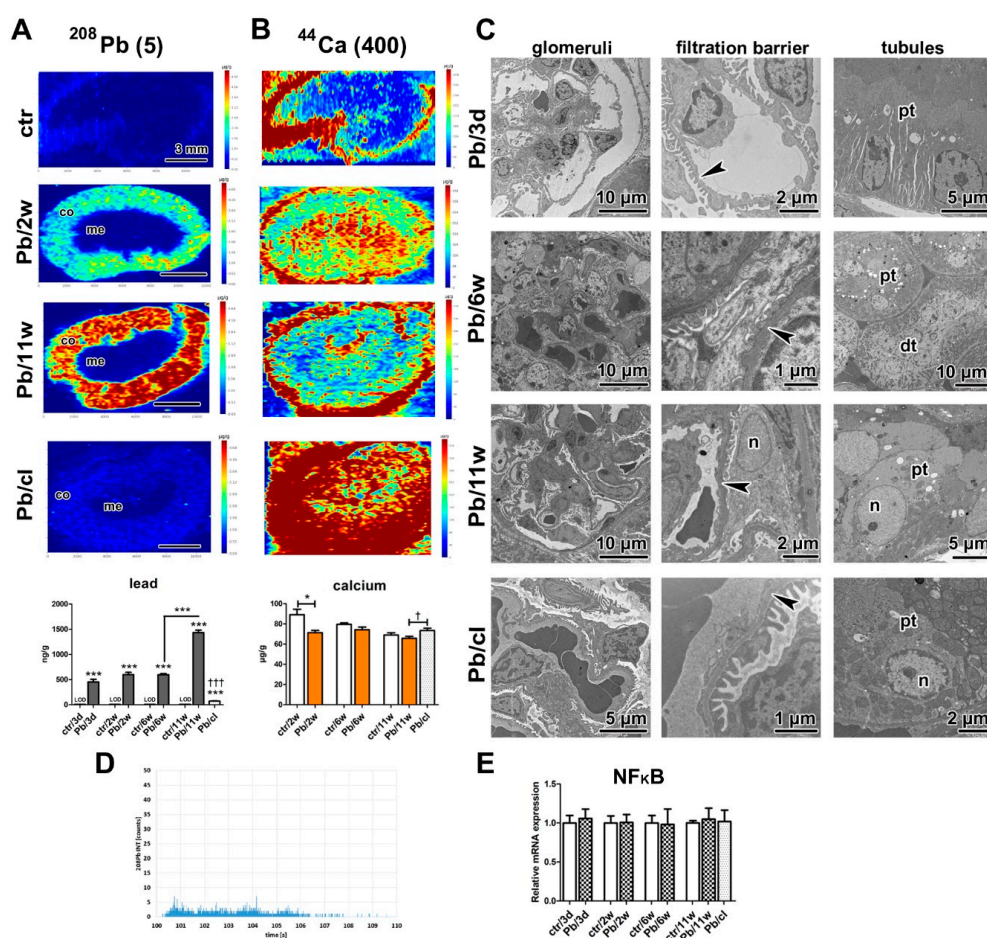
Based on previous studies, the most of total body Pb burden occurs in the skeleton as the bone is the major target tissue for Pb storage [56,57]. The affinity of Pb for bone has been described predominantly after gastrointestinal exposure to Pb in solutions [58,59]. However, Pb can also persist for prolonged periods in the atmosphere due to its nature, representing thus the exposure route for humans [56]. Here, we analyzed mouse femurs as models of the axial skeleton. Only a few studies have analyzed the effect of inhaled Pb in the form of submicrometric particles on bone [60,61].

The concentration of Pb in femur was the highest among the studied organs (lung, liver, kidney and spleen) at all designated  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP exposure times except for 3 days (Figure 4, Table 2). At this time, the Pb concentration was the highest in the kidney, followed by the femur (Table 2). The pattern of bone Pb content contrasted with the blood Pb level during  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation. The increase of the Pb concentration in the inhaled air between 6 and 11 weeks corresponded with a rapid Pb increase in the blood, lungs, liver and kidneys (Table 2), but not in the bones.

The femur concentrations of Ca ( $p < 0.01$ ) and Mg ( $p < 0.001$ ) were significantly reduced after 2-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation. Following 11-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation, Ca ( $p < 0.01$ ), Mg ( $p < 0.01$ ) and K ( $p < 0.001$ ) concentrations were significantly diminished in the femur compared with control animals (Figure 4). On the other hand, the Na level significantly increased in bones after 2- and 11-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP exposure. This finding is in agreement with our previous study [24], which revealed the same trends in bone mineral content changes after inhalation of PbO NPs: Ca, Mg and K concentrations were significantly decreased, while Na was increased (not significantly). A 5-week clearance period increased the concentrations of Mg (not significantly), Ca ( $p < 0.01$ ) and K ( $p < 0.001$ ) in the bone relative to the corresponding control animal values. The effect of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation on femur weight (Figure S1) was similar to their alteration after exposure to PbO NPs [24]. There was only a small effect (slight reduction) in the Pb level in bones (femurs) after a 5-week clearance period (Figure 4).

### 2.6. Lead Is Stored in Ionic Forms in the Kidney Cortex after $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ NP Exposure

Next, we studied the kidneys because Pb is primarily excreted by this organ [62,63]. The concentration of Pb in kidneys continuously increased with the increasing length of exposure to  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP ( $p < 0.001$  at all time points; Figure 5A, Table 2).



**Figure 5.** The effect of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation and its clearance on the kidney. **(A)** Distribution of Pb in kidney samples using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) after  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation. The control kidney was without Pb positivity, Pb was detected in kidney cortex (co) after  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation but not in the medulla (me). After a 5-week clearance period, Pb was still present in kidney cortex. The graph of Pb level in the kidney at designated time points. The graphs values denote average  $\pm$  SD for 5 mice/group, \*\*\*  $p < 0.001$  compared with the corresponding control group (or between adjacent time points), and †††  $p < 0.001$  compared with the corresponding  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP group by unpaired  $t$ -test. Limit of detection (LOD) for Pb in the kidney was 9 ng/g. Number in parentheses shows maximal value ( $\mu\text{g/g}$ ) of Pb on a scale. **(B)** Distribution of Ca in kidney samples using LA-ICP-MS after  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation. The map of Ca exhibited higher distribution in kidney in Pb/cl group compared with the control and  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP group. The graph of Ca level in the kidney at designated time points. Kidney Ca was significantly decreased after 2-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation (\*  $p < 0.05$ ) compared with the corresponding control group (ctr) and significantly increased in Pb/cl group (†  $p < 0.05$ ) compared with the corresponding  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP group. Number in parentheses shows maximal value ( $\mu\text{g/g}$ ) of Ca on a scale. Scale bar in panels (A,B) = 3 mm. **(C)** Analysis of kidney ultrastructure in the transmission electron microscope (TEM). Proximal (pt) and distal tubules (dt) were without pathological changes up to 6-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation. After 11-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation, the proximal tubules of kidney exhibited changes both in nuclear (n) and cytoplasmic (c) architecture. A 5-week clearance period conducted to rescue of proximal tubule cells. The glomerular filtration membrane (GFM, arrowheads) was altered after 6-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation. The nuclear alterations were observed also in nuclei (n) of podocyte (po) after 11-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation. Scale bars are displayed individually for each picture. **(D)** Time-resolved signal originated from kidney tissue exposed to  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs. **(E)** Gene expression of  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  at selected time points after  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation.

As determined by both chemical and elemental analysis, upon 5-week clearance period, the level of Pb in kidneys was much lower compared to the state after 6 weeks of inhalation of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs ( $p < 0.001$ , Figure 5A). Specifically, the level of Pb in kidneys decreased by about eightfold after 5-week inhalation of clean air (Table 2).

Elemental imaging revealed high Pb concentrations in the kidney cortex at all analyzed time points (Figure 5A). The kidney medulla exhibited no evident presence of Pb. A similar inhomogeneous distribution of Pb has been previously found in the kidney; however, the area with the highest Pb concentration was located more deeply in the kidney parenchyma (at the cortico-medullary junction) [64]. The levels of Pb in kidneys were, however, much higher both in so-called low (about eightfold) and high (fortyfold) conditions compared with our experiment, which could affect the Pb distribution in kidney tissue [64].

As the kidney cortex is the part of the imaged organs with the highest concentration of lead, we selected this area to confirm that Pb is present in the secondary target organ only in ionic form. For this purpose, different imaging mode was used (laser beam diameter was diminished, the signal of lead was monitored with the shortened integration time) and a small region of kidney cortex was analyzed ( $1.4 \times 1.0$  mm). The lead in nanoparticle form can be identified in this analysis by the presence of a high signal observed as yellow or red color in color-coded maps corresponding to sharp peaks on the graph displaying time-resolved signal. However, there were no  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs found in analyzed kidney cortex (Figure 5D) and the lead was present only in the ionic form, which was different from our previously published PbO NPs study, where distinct PbO NPs were identified [24].

The nephrotoxic effects of Pb are usually noted as high blood Pb concentrations  $> 50$   $\mu\text{g}/\text{dL}$  in children and  $>40$   $\mu\text{g}/\text{dL}$  in adults. Here, the blood Pb concentration reached rather low level of 8.5  $\mu\text{g}/\text{dL}$  after 11-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP exposure but we still observed morphological changes in kidney tissue at the ultrastructural level following the treatment. There were differences in the arrangement of filtration barrier in glomeruli of animals exposed to  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs (Figure 5C). The filtration membrane was diffusely thickened with intramembranous electron-dense deposits. Both *laminae rarae* were filled by electron-dense material, with a thicker *lamina densa* compared with controls. Pedicles (foot processes) of podocytes were irregularly arranged or lost after 11-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP exposure.

Renal tubules (proximal and distal) displayed the typical physiological appearance even after 6-weeks of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation; however, after 11 weeks, there were obvious morphological alterations of the epithelial cells in proximal tubules. These findings are consistent with previously detected Pb nephrotoxicity that predominantly resulted in the damage of proximal renal tubules [62]. The apical parts of the epithelial cells were dilated, brush border was absent and cell organelles were randomly dispersed in the cytoplasm of some proximal tubules (Figure 5C). The cell nuclei were altered to euchromatin-rich structures, a change indicative of augmented transcriptional activity both in glomerular and tubular parts of the kidney after 11-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation (Figure 5C). It is of note that there was evident regeneration of glomerular and tubular kidney tissue after the 5-week clearance period. Moreover, the level of *NF- $\kappa$ B* in kidneys remained unaffected even after 11-week exposure to  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs (Figure 5E).

The kidney participates in the maintenance of physiological homeostasis via regulation of the extracellular fluid volume, acid-base balance and electrolyte blood concentrations. Especially sodium, potassium and calcium regulation in the body relies on key physiological processes in the kidney. We have not observed any alterations in blood concentrations of Na and K in animals that were exposed to  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs (Table S3), the finding that documents the capability of kidney to maintain both the blood and kidney levels of these fundamental minerals in the physiological limits even after  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation.

The sodium and potassium kidney concentrations determined by LA-ICP-MS were similar to those determined by atomic absorption spectrometry (AAS) (Figure S4). Our results are consistent with the previously published data on element distribution in mouse organs [65]. The potassium



distribution was similar in the kidney parenchyma of the control,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP-treated and Pb/cl animals (Figure S4), with the strongest K positivity in the kidney medulla.

The blood level of Ca is typically maintained within a relatively narrow range. There are three main processes involved in the control of its level: Intestinal absorption, renal reabsorption and/or excretion and interchange between the bones and the blood [66]. Here, the blood levels of Ca were maintained constant in all experimental groups at each time points (Table S3). This finding demonstrates the ability of kidneys to maintain blood level of Ca level in physiological limits. Nevertheless, the levels of Ca in kidneys were changed upon  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation. Previous studies have demonstrated an elevated Ca concentration in the kidney after exposure to Pb and/or Cd [67,68]. On the other hand, we previously reported decreased Ca levels after exposure to PbO NP [24]. In the present study, the Ca concentrations in kidneys (Figure 5B) also significantly decreased in  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP-exposed animals in comparison to the controls, with a significant reduction after 2 weeks ( $p < 0.05$ ). The lead may compete with Ca in kidney tubules and impaired Ca reabsorption can decrease the kidney Ca level; however, the precise mechanism that explains Ca behavior after metal exposure has not been uncovered yet.

### 2.7. Severe Pathological Changes Are Visible in Liver Even after a 5-Week Clearance Period

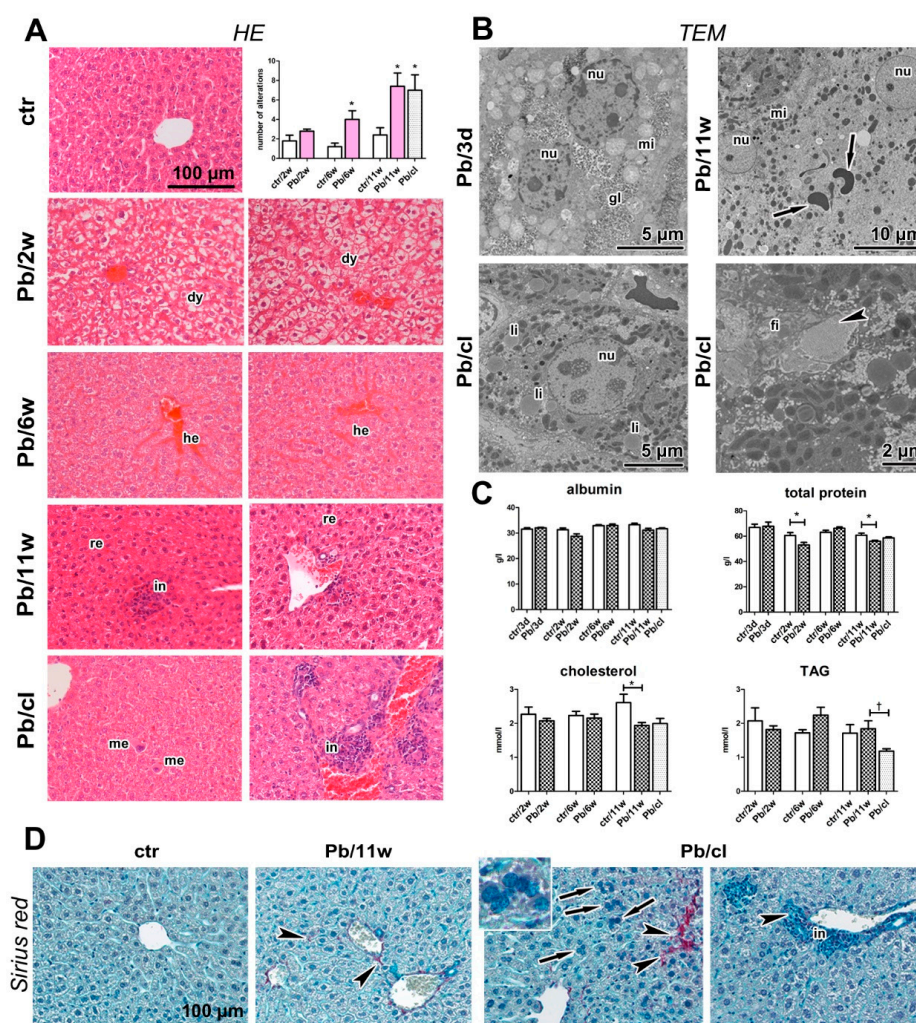
The liver represents the central organ involved in the metabolic processes leading to Pb intoxication. Our previous analyses uncovered toxic effects of insoluble metal NPs on liver cells [19,69]. The inhalation of highly soluble  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs caused serious remodeling of the liver parenchyma, hydropic degeneration of some hepatocytes, focal necrosis, hemostasis in small veins and liver sinusoids, and resulted in fewer small vessels (Figure 6A).

We observed megakaryoblasts and megakaryocytes in the liver parenchyma. There were large inflammatory infiltrates in the parenchyma and the portal areas. There were also more hypertrophic hepatocytes and binucleated and polynucleated hepatocytes (up to seven nuclei) after  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation; some hepatocyte nuclei contained large vacuoles. These histopathological changes in liver were statistically significant after 6 ( $p < 0.05$ ) and 11 weeks ( $p < 0.05$ ) of inhalation. There were also pathological changes in liver parenchyma after a 5-week clearance period; their number and extent were significantly greater in Pb/cl animals compared with control animals ( $p < 0.05$ ). Interestingly, some Pb/cl animals displayed even more serious alterations than animals after 11 weeks of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation (Figure 6A, Table S4), although AAS analysis determined a marked decrease in the liver Pb after the clearance period (Figure 7A, Table 2).

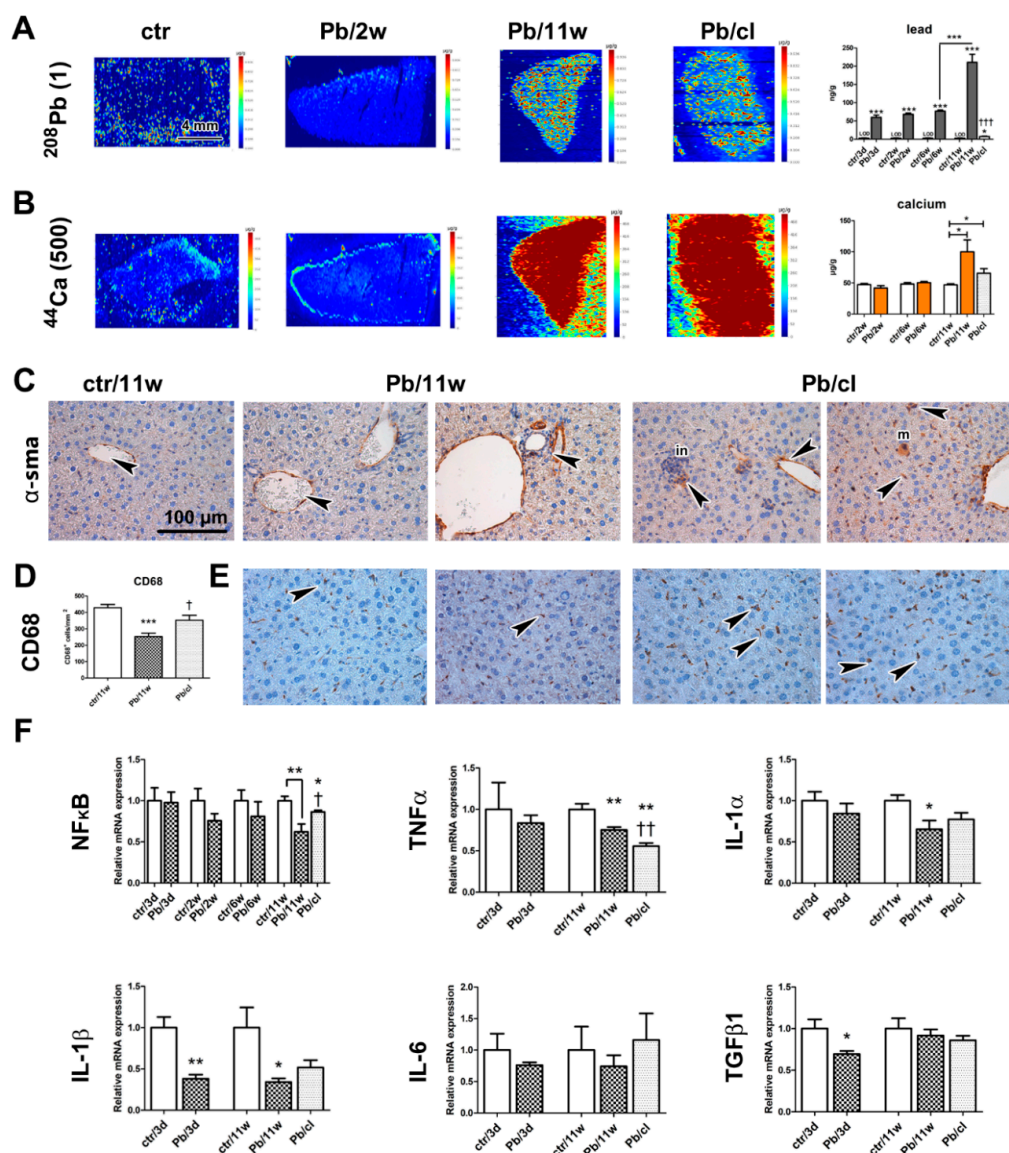
Ultramicroscopic analyses uncovered the presence of numerous erythrocytes inside hepatocyte cytoplasm, alteration of hepatocyte nuclei to euchromatin rich, indicating increased transcriptional activity, and randomly dispersed cell organelles in the cytoplasm after 11 weeks of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation (Figure 6B). There was microvesicular steatosis in the  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP-exposed and Pb/cl mice. Perisinusoidal fibroblasts exhibited high protein synthesis activity, and perisinusoidal space (of Disse) contained accumulated collagen fibrils (Figure 6B). Sirius Red staining revealed the presence of scattered collagen fibers in liver parenchyma (Figure 6D), predominantly after 6 and 11 weeks of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP exposure as well as in the clearance animals.

There were  $\alpha$ -SMA-positive cells (Figure 7C) in the walls of hepatic blood vessels in the controls. In  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP-exposed and Pb/cl mice,  $\alpha$ -SMA-positive cells were also scattered in parenchyma or they were associated with cellular infiltrates. The number of hepatic macrophages (detected as CD-68-positive cells) was significantly decreased ( $p < 0.001$ ) compared with the corresponding control animals after 11 weeks of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation (Figure 7D,E; Table S5). By contrast, there were more ( $p < 0.05$ ) hepatic macrophages in Pb/cl animals compared with the corresponding  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP animals.





**Figure 6.** The effect of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation and its clearance on the liver. **(A)** The liver in control animals was without serious pathological changes (HE staining). The liver after 2, 6, and 11-weeks of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation exhibited hepatocyte dystrophy (dy), remodeling in liver parenchyma (re) and expressive hemostasis (he). We observed infiltrates (in) and megakaryocytes (me) in liver. Statistical evaluation of the histopathological changes in both control and  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP-exposed groups in the experiments delineated according to Table S4. The graphs values denote average  $\pm$  SD; \*  $p < 0.05$  compared with the corresponding control group (ctr) by unpaired  $t$ -test. **(B)** Ultrastructure of liver in TEM. Binucleated hepatocyte with regularly distributed organelles (mitochondria, mi) and glycogen (gl) in a 3-day  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ NP group. Enlarged binucleated hepatocyte with altered nuclei (nu), randomly distributed organelles, and free erythrocytes (arrows) in cytoplasm in an 11-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ NP group. Hepatocyte with physiological morphology of nucleus and regularly arranged organelles in Pb/cl; however, lipid droplets (li) present in increased number. Perisinusoidal fibroblast (fi) and accumulated collagen fibrils (arrowhead) in space of Disse in a Pb/cl group. Scale bars are displayed individually for each picture. **(C)** The blood levels of albumin, total protein, cholesterol, and triacylglycerols after  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation. The graphs values denote average  $\pm$  SD for 5 mice/group; \*  $p < 0.05$  compared with the corresponding control group (ctr), †  $p < 0.05$  compared with the corresponding  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP group by unpaired  $t$ -test. **(D)** Sirius Red staining of liver samples to detect collagen fibrils. After 11-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation and in Pb/cl group, the collagen fibrils were observed around small blood vessels and inside liver parenchyma (arrowheads). Polynucleated hepatocytes were observed in Pb/cl group (inbox, arrows). Scale bar in panels (A,D) = 100  $\mu\text{m}$ .



**Figure 7.** The distribution of selected metals at designated time points after  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation in the liver, and immunohistochemical analyses of liver. **(A)** Distribution of Pb in liver samples using laser ablation and inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). The graph of Pb level in the liver at designated time points. **(B)** Distribution of Ca in liver samples using LA-ICP-MS. The graph of Ca level in the liver at designated time points. The graphs values denote average  $\pm$  SD for 5 mice/group, \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  compared with the corresponding control group (or between adjacent time points), and +++  $p < 0.001$  compared with the corresponding  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP group by unpaired  $t$ -test. LOD for Pb in the liver was 3 ng/g. Numbers in parentheses show maximal value ( $\mu\text{g/g}$ ) of elements on a scale. Scale bar in panels **(A,B)** = 4 mm. **(C)** Immunohistochemical detection of alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) signal was located in the walls of blood vessels in control (arrowhead), and additionally  $\alpha$ -SMA-positive cells were observed in liver parenchyma after  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation (arrowheads), megakaryocyte (m) and focal infiltrate (in). **(D)** Statistical evaluation of the number of CD68-positive cells after  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation. The graphs values denote average  $\pm$  SD; \*\*\*  $p < 0.001$  compared with the corresponding controls, and †  $p < 0.05$  compared with the  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP group by unpaired  $t$ -test. **(E)** Detection of CD68-positive cells (marker of macrophages) in liver (arrowheads). Scale bar in panels **(C,E)** = 100  $\mu\text{m}$ . **(F)** Gene expression of nuclear factor  $\kappa\text{B}$  ( $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ) and cytokines at selected time points after  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation. The graphs values denote average  $\pm$  SD for 4-5 mice/group, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  compared with the corresponding control group; †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$  compared with the corresponding  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP group by unpaired  $t$ -test.

Moreover, we observed some expression changes in liver on mRNA level. Downregulation of *NF- $\kappa$ B* was detectable already after 2 and 6 weeks and became statistically significant after 11-week exposure to  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs and the clearance period enabled for return of *NF- $\kappa$ B* expression close to its normal level (Figure 7F). Downregulation of *TNF $\alpha$*  occurred in the liver already after the shortest (3 days) as well as the longest (11 weeks) exposures (Figure 7F). Interestingly, the level of *TNF $\alpha$*  further decreased after a 5-week clearance period below its level at 11-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP exposure ( $p < 0.01$ ).

Also, *IL-1 $\alpha$*  and *IL-1 $\beta$*  mRNA expressions were significantly downregulated after 3-day ( $p < 0.01$  for *IL-1 $\beta$* ) and 11-week ( $p < 0.05$  for both) exposures to  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs. The levels of *IL-1 $\alpha$*  and *IL-1 $\beta$*  increased upon the 5-week clearance. The changes in the level of *IL-6* in the liver upon exposure to  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs were minimal and statistically insignificant.

The shortest (3 days) and the longest (11 weeks) exposures to  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs were also associated with significant downregulation in *TGF $\beta$ 1* mRNA in the liver ( $p < 0.05$ ) compared with the corresponding control animals (Figure 7F). The 5-week clearance did not cause any return of the *TGF $\beta$ 1* mRNA towards its original level.

$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation also caused expressive changes in blood biochemical parameters that manifested mainly as altered hepatic function (Table 4, Figure 6C). The level of total protein was significantly decreased after 2 ( $p < 0.05$ ) and 11 ( $p < 0.05$ ) weeks of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation. The albumin blood level, which also reflects liver function, was not significantly altered during the inhalation experiment (Table 4, Figure 6C). The association of the liver as the main organ involved in lipid metabolism was manifested in altered blood lipid levels. Total cholesterol (TCH) was significantly reduced ( $p < 0.05$ ) in blood after 11 weeks of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation. Blood triacylglycerols (TAG) levels were increased after 6 and 11 weeks of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation compared with control animals. The TAG decrease was significant even after the clearance period ( $p < 0.05$ ). Consistently, increased TAG levels after Pb exposure have been reported in rats that received Pb intragastrically [70] and in mice that received Pb orally [71]. However, not all reports have demonstrated the same trend in blood levels of TCH after Pb exposure [72]. One previous study described reduced TCH [70] similar to our findings, while another study described increased TCH levels [71]. Based on these findings, we conclude that sub-chronic exposure to a low level of Pb alters lipid homeostasis and affects thus blood lipid levels. This phenomenon, in turn, may disturb other tissues/organs in the organism.

The values of bilirubin and specific hepatic enzymes such as alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and gamma-glutamyl transferase (GGT) were in the physiological range after exposure to Pb (Table S3). Taken together, these data indicate that engineered highly soluble  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs used at a very low concentration cause persistent inflammatory changes in liver with impaired hepatic function.

The contents of Na and K in liver, as determined by AAS, were not altered at the analyzed time points (Figure S5). Interestingly, the Ca level after 11 weeks of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation was significantly increased ( $p < 0.05$ ) compared with the corresponding control animals, while there was only a small difference in the Pb/cl animals ( $p < 0.05$ ). We previously found a similar increase in Ca after 11 weeks of PbO NP inhalation [24]. Elemental imaging of liver samples revealed elevated Ca levels in  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP-exposed and Pb/cl animals correspondingly to the quantitative AAS data (Figure 7B).



**Table 4.** Blood biochemical analysis following Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> NP inhalation.

		ctr/2w	Pb/2w	ctr/6w	Pb/6w	ctr/11w	Pb/11w	Pb/cl	CD-1 (ICR)
TP (g/L)	Range	56–66	46–59	58–67	63–69	57–62	54–58	56–60	53–60
	Mean	61	53 *	63	66	60	56 *	59	
	SD	5	5	4	3	3	2	2	
Alb (g/L)	Range	29–32	25–31	32–34	32–34	31–35	29–33	31–33	36–43
	Mean	31	29	33	33	33	31	32	
	SD	1	2	1	1	2	2	1	
Ca (mmol/L)	Range	2.44–2.74	2.35–2.56	2.30–2.47	2.31–2.59	2.50–2.80	2.51–2.68	2.54–2.67	2.48–2.88
	Mean	2.56	2.46	2.39	2.48	2.68	2.58	2.61	
	SD	0.14	0.08	0.06	0.11	0.13	0.06	0.06	
P (mmol/L)	Range	2.31–2.96	1.74–2.13	1.75–2.66	1.73–2.61	1.82–2.95	1.00–1.40	1.37–2.25	2.30–4.52
	Mean	2.56	1.92 **	2.16	2.10	2.40	1.18 **	1.74 †	
	SD	0.28	0.15	0.40	0.37	0.62	0.17	0.35	
ALP (μkat/L)	Range	1.8–2.9	1.1–1.8	0.6–2.7	0.8–2.0	1.17–2.27	0.7–1.4	1.0–1.1	0.8–2.2
	Mean	2.1	1.4 *	1.6	1.5	1.5	1.1	1.0	
	SD	0.5	0.3	0.8	0.5	0.5	0.2	0.1	
Urea (mmol/L)	Range	6.9–8.5	5.8–7.7	6.2–7.7	6.1–13.0	7.6–10.0	4.0–7.5	6.6–8.6	4.6–7.5
	Mean	7.8	6.9	7.2	9.2	8.6	5.9 *	7.5 †	
	SD	0.7	0.8	0.6	3.0	1.0	1.3	0.8	
Crea (mmol/L)	Range	33.7–40.3	35.1–40.4	29.5–36.5	31.9–32.9	33.5–39.5	28.8–35.4	33.1–34.8	26.5–35.4
	Mean	36.7	36.2	32.2	32.5	37.0	32.4 *	34.1 *	
	SD	2.8	3.8	2.8	0.4	2.5	2.8	0.6	
Chol (mmol/L)	Range	1.76–2.76	1.87–2.26	1.83–2.54	1.92–2.54	1.88–3.39	1.75–1.93	1.48–2.35	1.84–3.81
	Mean	2.27	2.07	2.23	2.16	2.66	1.94 *	2.00	
	SD	0.42	0.16	0.27	0.26	0.62	0.19	0.34	
TAG (mmol/L)	Range	1.55–3.18	1.48–2.09	1.41–1.99	1.73–3.11	1.05–2.38	1.14–2.49	0.94–1.34	0.27–2.44
	Mean	2.07	1.82	1.72	2.24	1.67	1.84	1.18 †	
	SD	0.77	0.24	0.21	0.51	0.64	0.52	0.16	

Data were obtained from five animals per every group. As reference values were used values of female mice crl:CD-1 (ICR) BR according to previously published data [73]. Reference biochemical values were converted to our used units. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  compared with the corresponding control group (ctr) by unpaired  $t$ -test, †  $p < 0.05$  compared with the corresponding Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> NP group by unpaired  $t$ -test.

### 2.8. Comparison of Effects of Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> NP and PbO NP Inhalation on Liver Parenchyma

The concentration of Pb in liver parenchyma continuously increased in parallel with lengthening of Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> NP inhalation ( $p < 0.001$ , Figure 7, Table 2) and then decreased practically to the LOD after a 5-week clearance period (3 ng/g). The distribution of Pb in the liver parenchyma was practically homogeneous (Figure 7A).

When we compared the effects of highly soluble Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> NPs applied in this study with the analogous effects observed previously upon application of less soluble PbO NPs [24] we came to the following conclusions: (1) While the total Pb concentrations in analyzed secondary organs in animals exposed to Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> NPs were almost twofold lower compared with less soluble PbO NPs, the histopathological changes in liver were more serious than those caused by PbO NP inhalation. (2) A 5-week clearance period following Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> NP exposure hardly promoted a positive effect on reparative processes in liver, although there was significant improvement and enhanced regeneration for a clearance period after PbO NP exposure. Obviously, higher solubility of Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> NPs results in additional serious alteration of liver parenchyma compared to less soluble PbO NPs.

While the total Pb concentrations in lungs, kidneys and spleen in animals exposed to Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> NPs (Table 2, Figure 5, Figure S6) was nearly twofold lower (corresponding with the inhaled mass concentration of Pb NPs) compared with less soluble PbO NPs [24], the liver Pb concentration was nearly fivefold lower compared with less soluble PbO NPs. Thus, the lead from inhaled Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> NPs exhibited much lower propensity for liver accumulation than Pb contained in PbO NPs. This effect indeed requires further investigation since it could shed light on molecular processes involved in the

initiation of reparative processes by more stable PbO NPs and/or their inhibition in the case of more soluble Pb particles.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Animals

Adult female mice (CD-1(ICR) BR strain) were obtained from the Animal Facility of the Masaryk University (Brno, Czech Republic). Females of ICR line were selected as they can be kept in larger groups and they are not aggressive. Animals were allowed to acclimatize to laboratory conditions for at least one week before the inhalation experiments. Commercial feeding and drinking water were provided ad libitum. The experiment was approved by the Ethical Board of the Institute of Analytical Chemistry, v.v.i., Czech Academy of Sciences, Brno (Approval No. 64/2016, 15 August 2016).

#### 3.2. Generation of $Pb(NO_3)_2$ Nanoparticles

Lead(II) nitrate nanoparticles, ( $Pb(NO_3)_2$  NPs), were generated continuously in situ in a home-made generator [74] by pneumatic atomization of 4 mM lead(II) nitrate solution (Lach\_Ner, Neratovice, Czech Republic) in a nebulizer. The nebulizer was screwed in the wall of the atomizer (stainless steel tube, ID 14 mm, length 65 mm), which was oriented vertically. The solution was delivered to the nebulizer by means of a peristaltic pump (Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Switzerland; type ISM 852; the flow rate 0.5 mL/min) was atomized at the nebulizer by the high-speed air jet (the flow rate of 12 L/min). The produced droplets were rapidly accelerated to the speed of the airstream and coarse droplets in the produced spray impacted the opposite wall of the atomizer and the formed liquid flows down due to gravity to the bottom from which it was continuously removed. The fine aerosol spray left the atomizer at the top and passed through a water trap, where large droplets were collected. The spray was then mixed in a drying chamber with dry filtered air (the flow rate of 3 L/min). Finally,  $Pb(NO_3)_2$  NPs were diluted in the second step by a stream of air (20 L/min) and used for whole-body inhalation experiments.

#### 3.3. Exposure to $Pb(NO_3)_2$ Nanoparticles

Mice treatment was performed in same inhalation chambers, the main characteristics of which we have been described previously [75]. Adult female mice with an average weight of approximately 24 g (about 6–8 weeks old) at the beginning of the inhalation experiment were continuously exposed to  $Pb(NO_3)_2$  nanoparticles for 11 weeks (24/7). The food was sealed in a special box protected from deposition of nanoparticles from air. Control animals were exposed to the same air as treated animals without the addition of nanoparticles.

The samples from the controls and the  $Pb(NO_3)_2$  NPs inhaled group of mice were collected at the designated time points of the inhalation period (three days, two weeks, six weeks). Ten biological replicates were harvested from the control (ctr/3d, ctr/2w, ctr/6w) and inhaling groups for each organ ( $Pb/3d$ ,  $Pb/2w$ ,  $Pb/6w$ ). The lung, liver, kidney, spleen, femur and blood were collected and processed for chemical, biochemical, histopathological, ultramicroscopic, immunohistochemical, histochemical and immunofluorescent analyses, elemental imaging and to study the gene expression of selected markers.

Additionally, one group of mice inhaled air with  $Pb(NO_3)_2$  NPs for six weeks (24/7) and then inhaled clean air for the next five weeks (this group is annotated as the clearance group  $Pb/cl$ ). The 5-week clearance time point was selected to mirror our previous experiment with less soluble PbO nanoparticles [24]. This period was shown by us to be sufficient for reparation processes to be initiated at the end of the inhalation period (11 weeks). Ten biological replicates were harvested from the control (ctr/11w),  $Pb(NO_3)_2$  NPs exposed ( $Pb/11w$ ) and the clearance groups ( $Pb/cl$ ), and selected organs were examined in the same way as previously collected samples of shorter time points.

### 3.4. Characterization of Generated $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ Nanoparticles

Generated  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs were first characterized to obtain information about total future mice exposure (Table 1).

The size distribution of NP concerning particle count concentration was continuously measured directly inside the exposure cages using a Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS; model 3936L72, TSI Inc., Shoreview, MN, USA). The average mass concentration of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs was  $68.6 \mu\text{g Pb}(\text{NO}_3)_2/\text{m}^3$  (i.e.,  $42.9 \mu\text{g Pb}/\text{m}^3$ ) during the inhalation experiment. Mass concentration of generated  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs was calculated by dividing the mass of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs collected on the filter by the volume of the air sample that passed through the filter. Generated  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs were sampled on nitrocellulose filters (pore size  $0.45 \mu\text{m}$ , diameter  $25 \text{ mm}$ , Millipore, Bedford, MA, USA) for 24 h, one filter per day. Filters were dissolved in  $\text{HNO}_3$  using a UniClever microwave mineralizer (Plazmatronika, Wroclaw, Poland) and Pb content in the sample was determined using AAS (AAAnalyst 600, PerkinElmer Inc., Shelton, CT, USA).

Size and shape of the generated  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs were characterized by electron microscopy (EM). Immediately after generation at the generator output,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs were collected by electrostatic precipitation using a Nanometer aerosol sampler (model 3089, TSI) on EM grids (copper S160-4,  $3 \text{ mm}$  in diameter, 400 mesh grids, Agar Scientific, Electron Technology, Stansted, Essex, UK). The samples were analyzed using a Magellan 400 L XHR microscope (FEI Company, Hillsboro, OR, USA), operating in the scanning transmission electron microscope (STEM) mode. The STEM analyses revealed that the  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs consist of spherical and irregular shaped bean-like formations without clear internal structure whose size correlates with the size obtained by SMPS.

The estimated deposited dose was calculated for pulmonary deposition fraction of 10% [76]. It corresponded to  $0.774 \mu\text{g}$  of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs (or  $0.484 \mu\text{g Pb}$ ) per gram of mouse body weight over the 11-week inhalation period, and  $0.422 \mu\text{g}$  of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs (or  $0.264 \mu\text{g Pb}$ ) per gram of mouse body weight for the clearance group over the 6-week inhalation period. Data used for calculation are shown in Supplementary Materials. The pulmonary deposition fraction calculated using the MPPD model [33–35] for the generated  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs (geometric mean diameter of  $31.3 \text{ nm}$ , mass concentration of  $68.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , BALB/c strain, FRC of  $0.30 \text{ mL}$ , breathing frequency of  $300 \text{ min}^{-1}$ , tidal volume of  $0.2 \text{ mL}$ , inspiratory fraction of  $0.4$ ) was 12.8%. This value is slightly higher than the value from the literature [76]. The corresponding deposition dose of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  calculated for  $\text{DF} = 0.128$  was  $0.991 \mu\text{g}$  of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs (or  $0.620 \mu\text{g Pb}$ ) per gram of mouse body weight for 11 weeks and  $0.540 \mu\text{g}$  of  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs (or  $0.338 \mu\text{g Pb}$ ) per gram of mouse body weight for 6-week inhalation period.

### 3.5. Histological Analysis

Samples of organs (lung, liver, kidney and spleen) designated for histological analyses were fixed overnight in 10% buffered neutral formaldehyde in a fridge and after that immersed in series of increasing concentrations of ethanol, xylene and paraffin wax. Serial histological sections of  $5 \mu\text{m}$  thickness were prepared, and selected slices were stained by Hematoxylin–Eosin, and Sirius Red–Alcian Blue for analysis of collagen fibers. Toluidine Blue was used to detect mastocytes. The sections were examined by light microscopy in a blinded fashion by two histologists. We evaluated at least 8–10 slides per organ in 5 animals from the control group and 5 animals from the Pb-treated group after 2-week, 6-week and 11-week  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NP inhalation and assessed alterations in histopathological changes in whole sections (Tables S1 and S4).

Selected samples of lungs, liver, and kidneys were also immersed in 10% sucrose in PBS in a fridge overnight. Next day, samples were embedded into O.C.T. Compound (Agar Scientific Gardena, CA, USA), and stored at  $-25 \text{ }^\circ\text{C}$  for subsequent analysis. Further, the cryosections of  $20 \mu\text{m}$  thickness of the lung, liver, and kidney samples were prepared, and used for LA-ICP-MS imaging.

Photos of the slices were taken by light microscope (Leica DM5000 B, Leica Microsystem GmbH, Vienna, Austria) and a digital color camera (Leica DFC480, Leica Microsystem GmbH, Vienna, Austria).

### 3.6. Immunohistochemistry

After deparaffinization and rehydration of the sections, citrate buffer (pH = 6) was used as a pre-treatment in a 97 °C water bath. For inhibition of non-specific secondary antibody binding, sections were incubated with a blocking serum (VECTASTAIN ABC Kit, Rabbit IgG, PK-4001, Vector Laboratories, USA; VECTASTAIN ABC Kit, Mouse IgG, PK-4002, Vector Laboratories, USA) for at least 20 min at room temperature (RT) and then, they were incubated with the primary antibody ( $\alpha$ -SMA, CD68, MPO; detailed information Table S6).

After application of biotinylated secondary antibody (VECTASTAIN ABC Kit, Rabbit IgG, PK-4001, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA; VECTASTAIN ABC Kit, Mouse IgG, PK-4002, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 40 min at RT, slices were incubated with the peroxidase-conjugated avidin-biotin complex (VECTASTAIN ABC Kit, Rabbit IgG, PK-4001, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA; VECTASTAIN ABC Kit, Mouse IgG, PK-4002, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 30 min at RT. Chromogen substrate diaminobenzidine (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, K3468, DAKO, Carpinteria, CA, USA) was used for visualization of positive cells. Counterstaining of slices was performed by Hematoxylin. A negative control of the sample was obtained by omitting the primary antibody from the labeling protocol.

Photos were taken by light microscope (Leica DM5000 B, Leica Microsystem GmbH, Vienna, Austria) and a digital color camera (Leica DFC480, Leica Microsystem GmbH, Vienna, Austria). Number of macrophages in lungs and liver is presented as the mean  $\pm$  SD. Analyses were performed on five mice per each group after 11-week inhalation (control group, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> NP group and Pb/cl group; Tables S2 and S5). The values of CD68+ macrophages were counted per square millimeter. Number of CD68+ macrophages was evaluated from two (liver) slides or four (lungs) slides (10 images/slide) in each animal. The total area of analyzed lungs was 3.346 mm<sup>2</sup> per each animal and in case of liver it was 1.673 mm<sup>2</sup> per each animal.

### 3.7. Immunofluorescence

After deparaffinization and rehydration, samples were pre-treated in citrate buffer (pH = 6) in a 97 °C water bath. Blocking serum (VECTASTAIN ABC Kit, Rabbit IgG, PK-4001, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) was applied for at least 20 min at RT to inhibit non-specific secondary antibody bindings.

Then, samples were incubated with primary antibody for 1 h at RT ( $\alpha$ -SMA; detailed information Table S6). Secondary antibody (Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488, R37116, Invitrogen, USA) was applied for 40 min at RT. Sections were covered with a coverslip in reagent containing DAPI (Fluoroshield with DAPI, D9564, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA). Photos were taken under a fluorescence microscope (Leica DM LB2, Leica Microsystems GmbH, Vienna, Austria) and a digital color camera (Leica DFC480, Leica Microsystems GmbH, Vienna, Austria).

### 3.8. Transmission Electron Microscopy (TEM)

Samples of lungs, livers and kidneys were fixed in 3% glutaraldehyde for 24 h, washed three times in 0.1 M cacodylate buffer and post-fixed in 1% OsO<sub>4</sub> solution for 1.5 h. After washing in cacodylate buffer, all samples were dehydrated in a series of increasing concentrations of ethanol, followed by acetone and embedded in the epoxy resin Durcupan ACM followed by 3 days of polymerization. The ultrathin sections (about 60 nm thick) were prepared for TEM analysis. The sections were cut using an ultramicrotome Leica EM UC6 (Leica Microsystem GmbH, Vienna, Austria) and placed on formvar-coated nickel grids. Some sections were without further contrasting for analysis of nanoparticles in electron microscope, the others were contrasted with uranyl citrate and lead acetate. Minimally four electron microscopy grids with 3–5 sections on each were analyzed for all organ samples at designated time points. All sections were observed using Morgagni™ 268 TEM (FEI Company,

Eindhoven, Netherlands) working at 80 kV, designated structures were measured using iTEM software. The photographs were taken using a Veleta CCD camera (Olympus, Münster, Germany).

### 3.9. Biochemical Analysis of Blood

Blood samples (5 animals for each group: The control group, the experimental group exposed to the  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  NPs and the clearance group at each selected time points) were collected by cardiac puncture into 1 mL lithium heparin tubes (TAPVAL, Dispolab, Czech Republic). The blood samples were centrifuged at  $1000\times g$  for 15 min. Biochemical parameters were determined using a clinical chemistry analyzer, Abbott Architect c4000 (Abbott Laboratories, IL, USA), wet chemistry system.

### 3.10. Determination of Lead in Mouse Blood and Organs

Blood samples (5 animals from each analyzed group at each time point) were collected by cardiac puncture into 1 mL plastic Eppendorf tubes containing a small amount of heparin. Whole-blood (0.3–0.8 g) was divided by centrifugation into erythrocytes, white blood cells and plasma. After centrifugation, 300  $\mu\text{L}$  of methanol was added to the fraction of white blood cells and the plasma (55% of mass of whole blood) and formed precipitate (plasma proteins, white blood cells etc.) was separated by another centrifugation from remaining supernatant. The separated samples were stored at 5 °C for subsequent analysis.

The weights of individual organs were determined, and the values were recorded for later quantitative evaluation.

The individual organs and blood fractions were decomposed by microwave (MW) assisted digestion in concentrated subboil grade (quartz distillation system model MSBQ 2, Maasen, Eningen, Germany) nitric acid, i.e., liver in 5 mL, lungs, spleen and kidneys in 3 mL, blood cells in 2 mL, femur and other blood fractions in 1 mL of acid. The samples were treated in pre-cleaned quartz tubes of a closed pressurized autoclave system (UltraWave, Milestone s.r.l., Sorisole, Italy). The decomposition program consisted of four steps: 1st step—10 min with temperature ramp between 100 and 120 °C; 2nd step—5 min with temperature ramp between 120 and 200 °C; 3rd step—3 min with temperature ramp between 200 and 250 °C; 4th step—5 min at 250 °C. After cooling down (a duration of approx. 10 min), digests were quantitatively transferred to high-density polyethylene vials, diluted and adjusted with ultrapure water (Ultra Clear system-Evoqua Water Technologies, Barsbüttel, Germany) to the final mass of 10 g for organs, 4 g for blood cells and 3 g for femur and other blood components, respectively. Simultaneously, blank samples (typically  $n = 30$  per sampling series) were processed analogously. The detection limit (LOD) of the method was calculated as three times the standard deviation of process blanks. All samples as well as blanks were processed in a clean laboratory with flowboxes.

The content of lead in the digests was determined by electrothermal atomic absorption spectrometry (ET AAS) employing AAnalyst 600 PerkinElmer (Waltham, MA, USA) instrumentation under recommended conditions. A mixture of ammonium phosphate and magnesium nitrate was used as a combined chemical modifier. The method of standard addition calibration was applied for quantitation.

In determination of lead in blood and organ samples, QA/QC (quality assurance/quality control) was performed on the day to day basis by recovery tests, and on the long-term basis by running CRM (certified reference material) along with samples. CRM of Lead Standard for AAS (TraceCERT®, 1000 mg/L Pb in nitric acid, Sigma-Aldrich) was used for the calibration and standard additions to the samples.

### 3.11. Determination of Element Content (Na, K, Mg, Ca) in Mouse Organs

The content of basic element components (Na, K, and Ca) in mouse organs was determined in the same sample solution prepared for determination of lead concentration. After dilution of samples, the concentrations of Na, K, Mg and Ca were determined by flame atomic absorption spectrometry, employing ContrAA 300 Analytik Jena (Germany) High Resolution Continuum Source AAS instrumentation under recommended conditions, using acetylene-air flame (Na, K, Mg) and



acetylene-nitrous oxide flame (Ca), respectively. Measurement was performed at prominent analytical lines (Na 589.0 nm, K 766.5 nm, Mg 285.2 nm and Ca 422.7 nm). Calibration was based on certified analyte standard solutions Astasol<sup>®</sup> ( $1 \pm 0.002$  g/L) (Analytika Ltd. Prague, Czech Republic).

### 3.12. LA-ICP-MS Analysis

The cryosections of lungs, kidneys and livers were analyzed by Laser ablation with Mass spectrometry of inductively coupled plasma (LA-ICP-MS) to obtain elemental distribution in these sections. The LA-ICP-MS setup consists of a laser ablation system UP213 (NewWave Research, USA), and ICP-MS Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Japan). The laser ablation of the samples was done with a laser spot diameter of 100  $\mu\text{m}$ , scan speed of 200  $\mu\text{m}/\text{s}$ , repetition rate of 10 Hz and a laser beam fluence of 3 J/cm<sup>2</sup>. The content of lead (Pb), sodium (Na), potassium (K), calcium (Ca), iron (Fe) and zinc (Zn) was quantified using a series of agarose gels doped with a known amount of Pb, Na, K, Ca, Fe and Zn.

Imaging of Pb in kidney tissue sections was performed under different LA-ICP-MS parameters than elemental imaging of tissues. For this purpose, the laser beam diameter was diminished to 20  $\mu\text{m}$  and the scan speed was 200  $\mu\text{m}/\text{s}$ . During this imaging, isotope <sup>208</sup>Pb with the integration time of 1 ms was measured. The size of exposed kidney tissue samples was 1.0  $\times$  1.4 mm.

### 3.13. qRT-PCR Analysis

Total RNA was extracted using the RNeasy Plus Mini Kit (Cat. No. 74136, Qiagen, Germantown, MD, USA). Complementary DNA was synthesized according to the manufacturer's instructions using a gb Elite Reverse Transcription Kit (cat. No. 3012, Genri Biotech, CR). qRT-PCR was analyzed with a LightCycler<sup>®</sup> 480 (Roche). The number of analyzed cDNA samples was  $n = 3\text{--}5$  for each group.

TaqMan Gene Expression Assay (cat. No. 4351372, Applied Biosystems, USA) for *Nf-kB1* (ID: Mm00476361\_m1), *Tgfb1* (ID: Mm03024053\_m1), *Il-6* (ID: Mm99999064\_m1), *Il-1 $\alpha$*  (ID: Mm00439620\_m1), *Il-1 $\beta$*  (ID: Mm01336189\_m1) and *Tnfa* (Mm\_00443258\_m1) were used and gene expression was analyzed with the following program: Initial activation step at 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles at 95 °C for 15 s, annealing temperature at 62 °C for 60 s. Gene expression values for each sample were expressed in terms of the threshold cycle normalized to beta-actin (*Actb*; ID: Mm00607939\_s1) expression.

### 3.14. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Unpaired student *t*-test was used to determine differences between experimental and control groups. Results were reported as the mean value  $\pm$  standard deviation. The values of  $p < 0.05$  were considered to be statistically significant.

## 4. Conclusions

In summary, by combining the current data with previously published findings, we demonstrate that form (solubility) of metal nanoparticles determines on the final effects on the individual organs. Furthermore, we also demonstrated that the exposure to soluble Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> NPs impairs functionality of immune system in both lungs and liver, and that many aspects of this loss prevent tissue recovery even after 5 weeks long clearance.

**Supplementary Materials:** Supplementary Materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/22/8738/s1>.

**Author Contributions:** M.B. and P.M. conceived and designed the experiments. T.S., L.V., Z.V., V.J., B.D., P.M., K.K., L.A., A.J., Z.H., D.K., M.T., and P.C. performed experiments. J.D., T.S., M.T., T.V., V.K., and M.B. analyzed the data. M.B., V.K., and A.H. contributed reagents and materials. J.D., T.S., M.B., P.M., and A.H. wrote the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The work was supported by the Czech Science Foundation (grant no. 20-02203S).

**Acknowledgments:** Authors would like to thank Dobromila Klemová for help with the collection and processing of samples and Daniela Dumková for the assistance and advice with the graphic editing.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Yang, W.; Omaye, S.T. Air pollutants, oxidative stress and human health. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagenesis* **2009**, *674*, 45–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Oberdörster, G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **2001**, *74*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Davidson, C.I.; Phalen, R.F.; Solomon, P.A. Airborne particulate matter and human health: A review. *Aerosol Sci. Technol.* **2005**, *39*, 737–749. [[CrossRef](#)]
4. Stone, V.; Miller, M.R.; Clift, M.J.; Elder, A.; Mills, N.L.; Møller, P.; Schins, R.P.; Vogel, U.; Kreyling, W.G.; Alstrup Jensen, K. Nanomaterials versus ambient ultrafine particles: An opportunity to exchange toxicology knowledge. *Environ. Health Perspect.* **2017**, *125*, 106002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Mukhtar, A.; Limbeck, A. Recent developments in assessment of bio-accessible trace metal fractions in airborne particulate matter: A review. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *774*, 11–25. [[CrossRef](#)]
6. Schroeder, W.; Dobson, M.; Kane, D.; Johnson, N. Toxic trace elements associated with airborne particulate matter: A review. *Japca* **1987**, *37*, 1267–1285. [[CrossRef](#)]
7. Peel, J.L.; Tolbert, P.E.; Klein, M.; Metzger, K.B.; Flanders, W.D.; Todd, K.; Mulholland, J.A.; Ryan, P.B.; Frumkin, H. Ambient air pollution and respiratory emergency department visits. *Epidemiology* **2005**, *16*, 164–174. [[CrossRef](#)]
8. Sinclair, A.H.; Edgerton, E.S.; Wyzga, R.; Tolsma, D. A two-time-period comparison of the effects of ambient air pollution on outpatient visits for acute respiratory illnesses. *J. Air Waste Manag. Assoc.* **2010**, *60*, 163–175. [[CrossRef](#)]
9. Strickland, M.J.; Darrow, L.A.; Klein, M.; Flanders, W.D.; Sarnat, J.A.; Waller, L.A.; Sarnat, S.E.; Mulholland, J.A.; Tolbert, P.E. Short-term associations between ambient air pollutants and pediatric asthma emergency department visits. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2010**, *182*, 307–316. [[CrossRef](#)]
10. Iijima, A.; Tago, H.; Kumagai, K.; Kato, M.; Kozawa, K.; Sato, K.; Furuta, N. Regional and seasonal characteristics of emission sources of fine airborne particulate matter collected in the center and suburbs of Tokyo, Japan as determined by multielement analysis and source receptor models. *J. Environ. Monit.* **2008**, *10*, 1025–1032. [[CrossRef](#)]
11. Coufalík, P.; Mikuška, P.; Matoušek, T.; Večeřa, Z. Determination of the bioaccessible fraction of metals in urban aerosol using simulated lung fluids. *Atmos. Environ.* **2016**, *140*, 469–475. [[CrossRef](#)]
12. Mikuška, P.; Vojtěšek, M.; Křůmal, K.; Mikušková-Čampulová, M.; Michálek, J.; Večeřa, Z. Characterization and Source Identification of Elements and Water-Soluble Ions in Submicrometre Aerosols in Brno and Šlapanice (Czech Republic). *Atmosphere* **2020**, *11*, 688. [[CrossRef](#)]
13. Querol, X.; Viana, M.; Alastuey, A.; Amato, F.; Moreno, T.; Castillo, S.; Pey, J.; De la Rosa, J.; De La Campa, A.S.; Artíñano, B. Source origin of trace elements in PM from regional background, urban and industrial sites of Spain. *Atmos. Environ.* **2007**, *41*, 7219–7231. [[CrossRef](#)]
14. Götschi, T.; Hazenkamp-von Arx, M.E.; Heinrich, J.; Bono, R.; Burney, P.; Forsberg, B.; Jarvis, D.; Maldonado, J.; Norbäck, D.; Stern, W.B. Elemental composition and reflectance of ambient fine particles at 21 European locations. *Atmos. Environ.* **2005**, *39*, 5947–5958. [[CrossRef](#)]
15. Manousakas, M.; Diapouli, E.; Papaefthymiou, H.; Migliori, A.; Karydas, A.; Padilla-Alvarez, R.; Bogovac, M.; Kaiser, R.; Jaksic, M.; Bogdanovic-Radovic, I. Source apportionment by PMF on elemental concentrations obtained by PIXE analysis of PM10 samples collected at the vicinity of lignite power plants and mines in Megalopolis, Greece. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. Atmos* **2015**, *349*, 114–124. [[CrossRef](#)]
16. Bláhová, L.; Nováková, Z.; Večeřa, Z.; Vrlíková, L.; Dočekal, B.; Dumková, J.; Křůmal, K.; Mikuška, P.; Buchtová, M.; Hampl, A. The effects of nano-sized PbO on biomarkers of membrane disruption and DNA damage in a sub-chronic inhalation study on mice. *Nanotoxicology* **2020**, *14*, 214–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

17. Minigalieva, I.A.; Katsnelson, B.A.; Panov, V.G.; Privalova, L.I.; Varaksin, A.N.; Gurvich, V.B.; Sutunkova, M.P.; Shur, V.Y.; Shishkina, E.V.; Valamina, I.E. In vivo toxicity of copper oxide, lead oxide and zinc oxide nanoparticles acting in different combinations and its attenuation with a complex of innocuous bio-protectors. *Toxicology* **2017**, *380*, 72–93. [[CrossRef](#)]
18. Amiri, A.; Mohammadi, M.; Shabani, M. Synthesis and toxicity evaluation of lead oxide (PbO) nanoparticles in rats. *Electron. J. Biol.* **2016**, *12*, 110–114.
19. Dumková, J.; Smutná, T.; Vrlíková, L.; Le Coustumer, P.; Večeřa, Z.; Dočekal, B.; Mikuška, P.; Čapka, L.; Fictum, P.; Hampl, A.; et al. Sub-chronic inhalation of lead oxide nanoparticles revealed their broad distribution and tissue-specific subcellular localization in target organs. *Part Fibre Toxicol.* **2017**, *14*, 55. [[CrossRef](#)]
20. Elgrabli, D.; Beaudouin, R.; Jbilou, N.; Floriani, M.; Pery, A.; Rogerieux, F.; Lacroix, G. Biodistribution and clearance of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in rats after intravenous injection. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0124490. [[CrossRef](#)]
21. Bai, K.; Chuang, K.; Chen, J.; Hua, H.; Shen, Y.; Liao, W.; Lee, C.; Chen, K.; Lee, K.; Hsiao, T.; et al. Investigation into the pulmonary inflammopathology of exposure to nickel oxide nanoparticles in mice. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2018**, *14*, 2329–2339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Sutunkova, M.P.; Solovyeva, S.N.; Chernyshov, I.N.; Klinova, S.V.; Gurvich, V.B.; Shur, V.Y.; Shishkina, E.V.; Zubarev, I.V.; Privalova, L.I.; Katsnelson, B.A. Manifestation of Systemic Toxicity in Rats after a Short-Time Inhalation of Lead Oxide Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Pietroiusti, A.; Bergamaschi, E.; Campagna, M.; Campagnolo, L.; De Palma, G.; Iavicoli, S.; Leso, V.; Magrini, A.; Miragoli, M.; Pedata, P. The unrecognized occupational relevance of the interaction between engineered nanomaterials and the gastro-intestinal tract: A consensus paper from a multidisciplinary working group. *Part Fibre Toxicol.* **2017**, *14*, 47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Dumková, J.; Smutná, T.; Vrlíková, L.; Kotasová, H.; Docěkal, B.; Čapka, L.S.; Tvrdoněová, M.; Jakesřová, V.; Pelková, V.; Krůmal, K. Variability in the Clearance of Lead Oxide Nanoparticles Is Associated with Alteration of Specific Membrane Transporters. *ACS Nano* **2020**, *14*, 3096–3120. [[CrossRef](#)]
25. Bruning-Fann, C.S.; Kaneene, J. The effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds on human health: A review. *Vet. Hum. Toxicol.* **1993**, *35*, 521–538.
26. Sharma, M.; Maheshwari, M.; Morisawa, S. Dietary and inhalation intake of lead and estimation of blood lead levels in adults and children in Kanpur, India. *Risk Anal. Int. J.* **2005**, *25*, 1573–1588. [[CrossRef](#)]
27. Zartarian, V.; Xue, J.; Tornero-Velez, R.; Brown, J. Children’s lead exposure: A multimedia modeling analysis to guide public health decision-making. *Environ. Health Perspect.* **2017**, *125*, 097009. [[CrossRef](#)]
28. Zahran, S.; Laidlaw, M.A.; McElmurry, S.P.; Filippelli, G.M.; Taylor, M. Linking source and effect: Resuspended soil lead, air lead, and children’s blood lead levels in Detroit, Michigan. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 2839–2845. [[CrossRef](#)]
29. Air Quality Guidelines for Europe. Available online: [https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0020/123077/AQG2ndEd\\_6\\_7Lead.pdf](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0020/123077/AQG2ndEd_6_7Lead.pdf) (accessed on 11 November 2020).
30. Oflaherty, E.J. Physiologically based models for bone-seeking elements: IV. Kinetics of lead disposition in humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1993**, *118*, 16–29. [[CrossRef](#)]
31. Air Quality Guidelines for Europe, 2nd ed. Available online: <https://www.euro.who.int/en/publications/abstracts/air-quality-guidelines-for-europe> (accessed on 11 November 2020).
32. International Commission on Radiological Protection. *Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection*; International Commission on Radiological Protection: Stockholm, Sweden, 1994.
33. MPPD: Multiple-Path Particle Dosimetry Model. Available online: <https://www.ara.com/mppd/> (accessed on 10 November 2020).
34. De Winter-Sorkina, R.; Cassee, F. From Concentration to Dose: Factors Influencing Airborne Particulate Matter Deposition in Humans and Rat. *National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), The Netherlands. Report 650010031/2002*. Available online: <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/650010031.pdf> (accessed on 10 November 2020).
35. Miller, F.J.; Asgharian, B.; Schroeter, J.D.; Price, O. Improvements and additions to the multiple path particle dosimetry model. *J. Aerosol Sci.* **2016**, *99*, 14–26. [[CrossRef](#)]
36. Kuuluvainen, H.; Rönkkö, T.; Järvinen, A.; Saari, S.; Karjalainen, P.; Lähde, T.; Pirjola, L.; Niemi, J.V.; Hillamo, R.; Keskinen, J. Lung deposited surface area size distributions of particulate matter in different urban areas. *Atmos. Environ.* **2016**, *136*, 105–113. [[CrossRef](#)]

37. Oszlanczi, G.; Papp, A.; Szabo, A.; Nagymajtenyi, L.; Sapi, A.; Konya, Z.; Paulik, E.; Vezer, T. Nervous system effects in rats on subacute exposure by lead-containing nanoparticles via the airways. *Inhal. Toxicol.* **2011**, *23*, 173–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Mate, Z.; Horvath, E.; Kozma, G.; Simon, T.; Konya, Z.; Paulik, E.; Papp, A.; Szabo, A. Size-Dependent Toxicity Differences of Intratracheally Instilled Manganese Oxide Nanoparticles: Conclusions of a Subacute Animal Experiment. *Biol. Trace Elem. Res.* **2016**, *171*, 156–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Shakeel, M.; Jabeen, F.; Shabbir, S.; Asghar, M.; Khan, M.; Chaudhry, A. Toxicity of Nano-Titanium Dioxide (TiO<sub>2</sub>-NP) through Various Routes of Exposure: A Review. *Biol. Trace Elem. Res.* **2016**, *172*, 1–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Wan, R.; Mo, Y.; Zhang, Z.; Jiang, M.; Tang, S.; Zhang, Q. Cobalt nanoparticles induce lung injury, DNA damage and mutations in mice. *Part. Fibre Toxicol.* **2017**, *14*, 38. [[CrossRef](#)]
41. Scotton, C.J.; Chambers, R.C. Molecular targets in pulmonary fibrosis: The myofibroblast in focus. *Chest* **2007**, *132*, 1311–1321. [[CrossRef](#)]
42. Zhang, K.; Rekhter, M.D.; Gordon, D.; Phan, S.H. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am. J. Pathol.* **1994**, *145*, 114.
43. Ma, J.; Bishoff, B.; Mercer, R.; Barger, M.; Schwegler-Berry, D.; Castranova, V. Role of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and fibroblast function in cerium oxide nanoparticles-induced lung fibrosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2017**, *323*, 16–25. [[CrossRef](#)]
44. Rossner, P.; Vrbova, K.; Rossnerova, A.; Zavodna, T.; Milcova, A.; Klema, J.; Vecera, Z.; Mikuska, P.; Coufalik, P.; Capka, L. Gene Expression and Epigenetic Changes in Mice Following Inhalation of Copper (II) Oxide Nanoparticles. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 550. [[CrossRef](#)]
45. Lai, X.; Zhao, H.; Zhang, Y.; Guo, K.; Xu, Y.; Chen, S.; Zhang, J. Intranasal delivery of copper oxide nanoparticles induces pulmonary toxicity and fibrosis in C57BL/6 mice. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 4499. [[CrossRef](#)]
46. Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.-C. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2017**, *2*, 17023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Jeon, K.-I.; Jeong, J.-Y.; Jue, D.-M. Thiol-reactive metal compounds inhibit NF- $\kappa$ B activation by blocking I $\kappa$ B kinase. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 5981–5989. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Turner, M.D.; Nedjai, B.; Hurst, T.; Pennington, D.J. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2014**, *1843*, 2563–2582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Kabadi, P.K.; Rodd, A.L.; Simmons, A.E.; Messier, N.J.; Hurt, R.H.; Kane, A.B. A novel human 3D lung microtissue model for nanoparticle-induced cell-matrix alterations. *Part. Fibre Toxicol.* **2019**, *16*, 15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Čokić, V.P.; Mitrović-Ajtić, O.; Beleslin-Čokić, B.B.; Marković, D.; Buač, M.; Diklić, M.; Kraguljac-Kurtović, N.; Damjanović, S.; Milenković, P.; Gotić, M. Proinflammatory cytokine IL-6 and JAK-STAT signaling pathway in myeloproliferative neoplasms. *Mediat. Inflamm.* **2015**, *2015*, 453020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Schaper, F.; Rose-John, S. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2015**, *26*, 475–487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Dukhinova, M.S.; Prilepskii, A.; Shtil, A.A.; Vinogradov, V.V. Metal Oxide Nanoparticles in Therapeutic Regulation of Macrophage Functions. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1631. [[CrossRef](#)]
53. Ortega, V.; Katzenback, B.; Stafford, J.; Belosevic, M.; Goss, G. Effects of polymer-coated metal oxide nanoparticles on goldfish (*Carassius auratus* L.) neutrophil viability and function. *Nanotoxicology* **2015**, *9*, 23–33. [[CrossRef](#)]
54. Penido, M.G.M.; Alon, U.S. Phosphate homeostasis and its role in bone health. *Pediatric Nephrol.* **2012**, *27*, 2039–2048. [[CrossRef](#)]
55. Imel, E.A.; Econs, M.J. Approach to the hypophosphatemic patient. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97*, 696–706. [[CrossRef](#)]
56. Pal, M.; Sachdeva, M.; Gupta, N.; Mishra, P.; Yadav, M.; Tiwari, A. Lead Exposure in Different Organs of Mammals and Prevention by Curcumin–Nanocurcumin: A Review. *Biol. Trace Elem. Res.* **2015**, *168*, 380–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Pounds, J.G.; Long, G.J.; Rosen, J.F. Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environ. Health Perspect.* **1991**, *91*, 17–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

58. Lu, H.; Yuan, G.; Yin, Z.; Dai, S.; Jia, R.; Xu, J.; Song, X.; Li, L.; Lv, C. Effects of subchronic exposure to lead acetate and cadmium chloride on rat's bone: Ca and Pi contents, bone density, and histopathological evaluation. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2014**, *7*, 640–647. [[PubMed](#)]
59. Cretacci, Y.; Parsons, P. Localized accumulation of lead within and among bones from lead-dosed goats. *Environ. Res.* **2010**, *110*, 26–32. [[CrossRef](#)]
60. Griffin, T.B.; Coulston, F.; Wills, H.; Russell, J.C. Biologic effects of airborne particulate lead on continuously exposed rats and rhesus monkeys. *Environ. Qual. Saf. Suppl.* **1975**, *2*, 202–220.
61. Leonas, R.; Noor, Z.; Rasyid, H.N.; Madjid, T.H.; Tanjung, F.A. Effect of Lead Nanoparticles Inhalation on Bone Calcium Sensing Receptor, Hydroxyapatite Crystal and Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B in Rats. *Acta Inform. Med.* **2016**, *24*, 343. [[CrossRef](#)]
62. Daley, G.M.; Pretorius, C.J.; Ungerer, J.P. Lead Toxicity: An Australian Perspective. *Clin. Biochem. Rev.* **2018**, *39*, 61.
63. Takano, T.; Okutomi, Y.; Mochizuki, M.; Ochiai, Y.; Yamada, F.; Mori, M.; Ueda, F. Biological index of environmental lead pollution: Accumulation of lead in liver and kidney in mice. *Environ. Monit. Assess.* **2015**, *187*, 744. [[CrossRef](#)]
64. Togao, M.; Nakayama, S.M.; Ikenaka, Y.; Mizukawa, H.; Makino, Y.; Kubota, A.; Matsukawa, T.; Yokoyama, K.; Hirata, T.; Ishizuka, M. Bioimaging of Pb and STIM1 in mice liver, kidney and brain using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS) and immunohistochemistry. *Chemosphere* **2020**, *238*, 124581. [[CrossRef](#)]
65. Bonta, M.; Török, S.; Hegedus, B.; Döme, B.; Limbeck, A. A comparison of sample preparation strategies for biological tissues and subsequent trace element analysis using LA-ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 1805–1814. [[CrossRef](#)]
66. Massry, S.G. Renal handling of calcium. In *Disorders of Mineral Metabolism*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1982; pp. 189–235.
67. Victory, W.; Miller, C.; Zhu, S.; Goyer, R. Effect of different levels and periods of lead-exposure on tissue-levels and excretion of lead, zinc, and calcium in the rat. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1987**, *8*, 506–516. [[CrossRef](#)]
68. Zhang, D.; Gao, J.; Zhang, K.; Liu, X.; Li, J. Effects of Chronic Cadmium Poisoning on Zn, Cu, Fe, Ca, and Metallothionein in Liver and Kidney of Rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **2012**, *149*, 57–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Dumkova, J.; Vrlíkova, L.; Vecera, Z.; Putnova, B.; Docekal, B.; Mikuska, P.; Fictum, P.; Hampl, A.; Buchtova, M. Inhaled Cadmium Oxide Nanoparticles: Their in Vivo Fate and Effect on Target Organs. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Skocznyńska, A.; Smolik, R.; Jeleń, M. Lipid abnormalities in rats given small doses of lead. *Arch. Toxicol.* **1993**, *67*, 200–204. [[CrossRef](#)]
71. Xia, J.; Jin, C.; Pan, Z.; Sun, L.; Fu, Z.; Jin, Y. Chronic exposure to low concentrations of lead induces metabolic disorder and dysbiosis of the gut microbiota in mice. *Sci. Total Environ.* **2018**, *631*, 439–448. [[CrossRef](#)]
72. Ademuyiwa, O.; Agarwal, R.; Chandra, R.; Behari, J.R. Lead-induced phospholipidosis and cholesterologenesis in rat tissues. *Chem. Biol. Interact.* **2009**, *179*, 314–320. [[CrossRef](#)]
73. Serfilippi, L.M.; Stackhouse Pallman, D.R.; Russell, B.; Spainhour, C.B. Serum clinical chemistry and hematology reference values in outbred stocks of albino mice from three commonly used vendors and two inbred strains of albino mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **2003**, *42*, 46–52.
74. Mikuška, P. Generator of fine polydisperse aerosol. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **2004**, *69*, 1453–1463. [[CrossRef](#)]
75. Večeřa, Z.; Mikuška, P.; Moravec, P.; Smolík, J. *Unique Exposure System for the Whole Body Inhalation Experiments with Small Animals*; Tanger Ltd. Nanocon: Brno, Czech Republic, 2011; pp. 652–654.
76. Miller, F.J. Dosimetry of particles in laboratory animals and humans in relationship to issues surrounding lung overload and human health risk assessment: A critical review. *Inhal. Toxicol.* **2000**, *12*, 19–57. [[CrossRef](#)]

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).