

LÉKAŘSKÁ FAKULTA
UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Pevné anorganické nano- a
mikročástice a nosní sliznice: jejich role
v chronické rinosinusitidě

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor práce: MUDr. Lenka Čábalová
Vedoucí práce: prof. MUDr. Pavel Komínek, Ph.D., MBA

2022

FACULTY OF MEDICINE
PALACKÝ UNIVERSITY OLOMOUC

Solid anorganic nano- and microparticles and nasal mucosa: their role in chronic rhinosinusitis

THESIS

Author: MUDr. Lenka Čábalová
Supervisor: prof. MUDr. Pavel Komínek, Ph.D., MBA

2022

ABSTRAKT

Úvod: Patologické působení pevných anorganických nano- a mikročástic (NMČ) coby součásti znečištění prostředí je jednoznačně vědecky prokázáno. Přesto, že velmi pravděpodobně indukují zánětlivé změny, jasný průkaz asociace mezi expozicí NMČ a zánětlivými onemocněními sliznice horních dýchacích cest chybí. Minimálně prozkoumaná je zejména role nanočástic, které mají specifické vlastnosti a odlišné chování při interakci s živými buňkami než mikročástice stejného složení. Vzhledem k narůstajícímu množství důkazů o jejich cytotoxickém a prozánětlivém působení přirozeně vyvstává otázka, jakou roli mohou hrát v patogenezi chronické rinosinusitidy (CRS).

Metody: Bylo vyšetřeno 40 vzorků nosní sliznice pacientů s CRS odebraných při mukotomii a 10 kontrolních vzorků od kadaverů bez anamnézy CRS. U 9 pacientů s CRS byl předoperačně odebrán vzorek hlenu z dolní skořepy. Byla zjištěna profesní a kuřácká anamnéza. U všech vzorků bylo provedeno rutinní histologické vyšetření a vyšetření skenovací elektronovou mikroskopií a Ramanovou mikrospektroskopií (RMS). V první části studie bylo zkoumáno složení, distribuce a možnost kvantifikace NMČ. V druhé části byla srovnána přítomnost a složení NMČ ve sliznici pacientů s CRS a ve sliznici kontrolní skupiny. V třetí části byla srovnávána přítomnost a složení NMČ v hlenu z povrchu sliznice se složením částic deponovaných ve sliznici.

Výsledky: Byla vyvinuta metoda detekce částic a mapování tkáně pomocí RMS a u 6 vzorků byla takto zjištěna přítomnost NMČ v povrchové i v hlubokých vrstvách sliznice. Dále byla zjištěna přítomnost anorganických NMČ u 90,0 % z celkem 40 vzorků sliznice pacientů s CRS a u 20,0 % vzorků z kontrolní skupiny, převážně sloučenin uhlíku a titanu. Histologické známky chronického zánětu vykazovalo 95,0 % vzorků z CRS skupiny; histologie vzorků kontrolní skupiny byla normální. Byla zjištěna asociace kouření a profesionální anamnézy a přítomnosti NMČ ve sliznici. V hlenu i ve sliznici byly detekovány NMČ obsahující shodné prvky.

Závěr: Pevné anorganické NMČ přítomné v ovzduší vstupují do nosní sliznice a deponují se i v submukóze. Asociace mezi přítomností NMČ a zánětlivými změnami sliznice se jeví jako velmi pravděpodobná, stejně jako souvislost s kouřením a profesionální anamnézou. Úloha NMČ v patogenezi CRS je však nadále nejasná a představuje výzvu pro budoucí výzkum.

Klíčová slova: anorganické nano- a mikročástice, vzdušné znečištění prostředí, chronická rinosinusitida, skenovací elektronová mikroskopie, Ramanova mikrospektroskopie

ABSTRACT

Background: Pathological effect of solid anorganic nano- and microparticles (NMPs) present in the environment as airborne pollutants has been proven by numerous studies. Although they most probably induce inflammatory changes, there is no clear proof of association of exposure to NMPs and inflammatory diseases of upper airways. Especially the role of nanoparticles, having specific properties and interacting with living cells in a different manner than microparticles of the same composition, is unclear. Despite the rising evidence of their cytotoxic and pro-inflammatory effect, the question whether and what role they play in chronic rhinosinusitis (CRS) remains to be answered.

Methods: Forty samples of nasal mucosa obtained by mucotomy from patients with CRS and 10 samples from cadavers without history of CRS were examined. In 9 patients with CRS, a sample of mucus from inferior turbinates was obtained. Occupational and smoking history was investigated. In all the samples, a routine histological examination and examination by scanning electron microscopy and Raman microspectroscopy (RMS) was performed. In the first part of the study, composition, distribution, and possibility of quantification of NMPs was examined. In the second part, the presence and composition of NMPs in the CRS samples was compared to the control group. In the third part, the presence and composition of NMPs in the mucus was compared to the NMPs inside the mucosa.

Results: A novel method of detection of NMPs and RMS tissue mapping was developed. Using this method, NMPs were present both in the superficial and deep layers of the mucosa of 6 samples. In the whole cohort, NMPs were present in 90,0% of 40 CRS samples and in 20,0% of control samples of mucosa, predominantly carbon and titanium compounds. Histological signs of chronic inflammation were detected in 95,0% of CRS samples while histology of the control group was normal in all samples. There was a clear association between smoking and occupational history and presence of NMPs. NMPs of similar composition were detected in the mucus and in the mucosa.

Conclusions: Solid anorganic NMPs, present in the environment as airborne pollutants, enter not only the superficial, but also the deep layers of the nasal mucosa. There is a probable association between presence of NMPs and inflammatory changes of the mucosa, as well as smoking and occupational history. The role of NMPs in CRS remains unclear and poses a challenge for future research.

Keywords: anorganic nano- and microparticles, airborne pollution, chronic rhinosinusitis, scanning electron microscopy, Raman microspectroscopy

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Já, níže podepsaná studentka, tímto čestně prohlašuji, že text mnou odevzdané závěrečné práce v písemné podobě je totožný s textem závěrečné práce vloženým v databázi DIPL2.

V Ostravě dne

.....
podpis studentky

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala školiteli prof. MUDr. Pavlu Komínkovi, Ph.D., MBA za odborné vedení mé práce. Poděkování patří také doc. MUDr. Karolu Zeleníkovi, Ph.D., MBA, doc. MUDr. Janě Dvořáčkové, Ph.D., MIAC a Mgr. Haně Bielníkové a kolektivu Centra nanotechnologií Vysoké školy báňské-Technické univerzity Ostrava, zejména Mgr. Kristině Čabanové, Ph.D. a prof. Mgr. Janě Kukutschové, Ph.D. za spolupráci na výzkumu a veškeré podnětné připomínky.

Prohlašuji, že předložená práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerou literaturu a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, v práci řádně cituji a jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Ostravě dne

.....

(podpis)

OBSAH

ÚVOD	10
1 CÍLE PRÁCE	12
2 TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1 Pevné anorganické částice.....	13
2.1.1 Jemné a ultrajemné částice, mikro- a nanočástice.....	13
2.1.2 Vlastnosti mikro- a nanočástic	13
2.1.3 Nanočástice a jejich působení na organismus	15
2.2 Detekce, zobrazování a charakterizace mikro- a nanočástic v tkáních	20
2.2.1 Skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie	20
2.2.2 Ramanova spektroskopie a mikrospektroskopie	23
2.3 Chronická rinosinitida	26
2.3.1 Základní anatomie a fyziologie dutiny nosní a nosní sliznice	26
2.3.2 Definice a klasifikace chronické rinosinitidy	29
2.3.3 Epidemiologie a patogeneze chronické rinosinitidy	29
2.3.4 Diagnostika chronické rinosinitidy	31
2.3.5 Konzervativní léčba chronické rinosinitidy	32
2.3.6 Chirurgická léčba chronické rinosinitidy	32
3 PRAKTICKÁ ČÁST	33
3.1 Materiál a metodika	33
3.1.1 Charakteristika studie	33
3.1.2 Vstupní kritéria	34
3.1.3 Vylučující kritéria	34
3.1.4 Odběr vzorků a jejich zpracování	34
3.1.5 Analytické metody užití k detekci a charakterizaci částic	37
3.1.6 Hodnocení histologického nálezu	39
3.1.7 Korelace detekovaných částic, histologického nálezu a kuřácké a profesní anamnézy	42
3.1.8 Statistické zpracování	42

3.2	Výsledky	44
3.2.1	Detekce, zjištění složení, distribuce a možnosti kvantifikace nano- a mikročástic v nosní sliznici u pacientů s CRS	44
3.2.2	Srovnání přítomnosti a molekulárního složení částic ve sliznici CRS skupiny a kontrolní skupiny	48
3.2.3	Srovnání přítomnosti a složení částic v hlenu z povrchu sliznice se složením částic ve sliznici u pacientů s CRS	57
4	DISKUSE	61
4.1	Detekce, zjištění složení, distribuce a možnosti kvantifikace nano- a mikročástic v nosní sliznici u pacientů s CRS	61
4.2	Srovnání přítomnosti a molekulárního složení částic ve sliznici CRS skupiny a kontrolní skupiny	63
4.3	Srovnání přítomnosti a složení částic v hlenu z povrchu sliznice se složením částic ve sliznici u pacientů s CRS	65
	ZÁVĚR	67
	RESUMÉ	69
	SUMMARY	71
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	73
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	85
	SEZNAM OBRÁZKŮ	87
	SEZNAM TABULEK	89
	SEZNAM ODBORNÝCH PUBLIKACÍ AUTORA	90

ÚVOD

Patologické působení jemných a ultrajemných pevných částic přítomných ve vzduchu coby součást znečištění prostředí je jednoznačně vědecky prokázáno. Jasný průkaz asociace mezi expozicí těmto částicím a zánětlivými onemocněními sliznice horních dýchacích cest ale stále chybí. V popředí zájmu současného výzkumu, zejména díky rozvíjejícím se možnostem jejich detekce a charakterizace, jsou především ultrajemné částice, definované jako aerosol s aerodynamickým průměrem pod 0,1 μm (100 nm). Jsou přítomné v ovzduší ve velkých objemech a vstupují do organismu především dýchacím a trávicím ústrojím.

Vzhledem k tomu, že termíny „jemné“ a „ultrajemné“ částice se vztahují k částicím přítomným ve vzduchu, o částicích vstupujících do organismu mluvíme jako o mikro- a nanočásticích. Obdobně jako ultrajemné částice jsou nanočástice definovány jako částice v jednom či více rozměrech menší než 100 nm.

Je pravděpodobné, že jsou to právě nanočástice, které hrají stěžejní roli v indukci zánětlivých změn v tkáních, v nichž se deponují. Nanočástice mají jiné chemické a fyzikální vlastnosti a vykazují zvýšenou reaktivitu i odlišné chování při interakci s živými buňkami než mikročástice stejného složení, které jsou považovány za netoxické a „neškodné“. Nanočástice produkované lidskou činností jsou buď sekundárním produktem (průmyslového a dopravního znečištění, kouření, smažení, sváření aj.) anebo jsou cíleně připravované (barviva, pigmenty, kosmetika aj.). Mohou také vznikat při přírodních procesech (např. vulkanická činnost). Jedná se především o sloučeniny uhlíku nebo oxidy kovů (železa, titanu, chromu, zinku aj.).

V posledním desetiletí byl vliv nanočástic zkoumán řadou autorů a bylo prokázáno jejich patologické působení na úrovni buněk, organel i DNA. Většina výzkumu na poli nanotoxikologie a nanopatologie ale doposud probíhala in vitro, na buněčných kulturách či zvířecích modelech, převážně na hlodavcích. Při cílené expozici těmto částicím byl prokázán jejich prozánětlivý potenciál, schopnost indukovat oxidativní stres i přímé genotoxické působení. Klinických studií zaměřených na přítomnost nanočástic vyskytujících se v prostředí a jejich eventuální patologické působení na lidský organismus bylo ale prozatím provedeno minimum.

Detekci a charakterizaci nanočástic vstupujících do organismu z prostředí ale v praxi nelze oddělit od zkoumání přítomnosti a složení částic větších rozměrů. Nanočástice totiž mají při vstupu do organismu tendenci se shlukovat, pravděpodobně v důsledku interakce

s živými buňkami, a proto jsou ve vzorcích tkání nalézány ve formě clusterů – jednotlivé nanočástice jsou detekovány jen výjimečně.

Dýchací soustava představuje jednu z hlavních cest vstupu mikro- a nanočástic do organismu a dutina nosní je první etáží, kde se mohou usazovat. I přesto, že má chronická rinosinusitida (CRS) v populaci vysokou prevalenci, její patogeneze je stále nejasná. Nejaktuálnější pohled vnímá CRS jako syndrom s multifaktoriální etiologií, v němž hraje hlavní roli interakce imunitního systému a environmentálních faktorů. Je pravděpodobné, že vzdušné znečištění přispívá k poruše obranných mechanismů sliznice a narušení sinonazální epiteliální bariéry a tím pádem k indukci chronických zánětlivých změn. Doposud ale není jasná role specifických polutantů v CRS či mechanismus a synergie jejich působení. Vzhledem k narůstajícímu množství důkazů o cytotoxickém a prozánětlivém působení nanočástic přirozeně vyvstává otázka, jakou roli mohou hrát v chronických zánětlivých onemocněních, jako je právě CRS.

1 CÍLE PRÁCE

1. Ověřit přítomnost, složení a distribuci pevných anorganických nano- a mikročástic v nosní sliznici odebrané při endoskopické mukotomii u pacientů s CRS:
 - *Hypotéza 1: Při CRS vstupují pevné anorganické nano- a mikročástice přítomné v ovzduší jako součást jeho znečištění přes porušenou slizniční bariéru do submukózy a deponují i v hlubších vrstvách sliznice.*
2. Srovnat přítomnost a molekulární složení částic ve sliznici pacientů s CRS s kontrolní skupinou (kadavery bez anamnézy CRS), porovnat s histologickým nálezem a ovlivnění zevními faktory:
 - *Hypotéza 2: U zdravých jedinců na rozdíl od pacientů s CRS anorganické nano- a mikročástice do sliznice nevstupují a nedeponují se v ní.*
 - *Hypotéza 3: Složení částic detekovaných ve sliznici je ovlivněno profesionální expozicí jejich zdrojům (např. při sváření) a kouřením.*
3. Srovnat přítomnost a složení částic detekovaných v hlenu odebraném z povrchu nosní sliznice se složením částic detekovaných ve sliznici a ověřit tak původ částic deponovaných ve sliznici ve vdechovaném vzduchu:
 - *Hypotéza 4: Složení částic detekovaných v hlenu odpovídá složení částic detekovaných ve sliznici, jejich původ není hematogenní, ale ve vzdušném znečištění.*

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Pevné anorganické částice

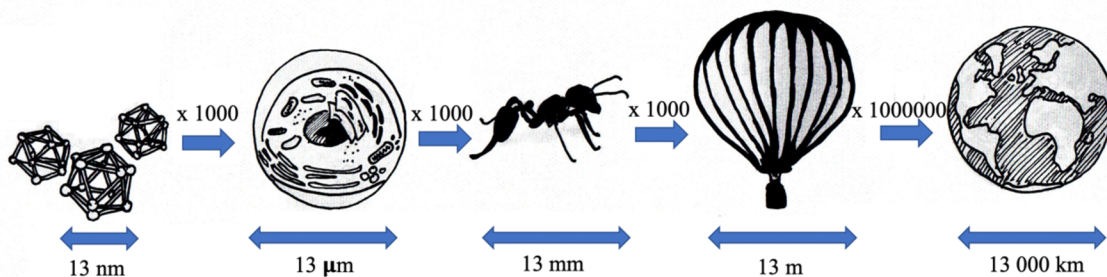
2.1.1 Jemné a ultrajemné částice, mikro- a nanočástice

- *Pevné částice* (PM – particulate matter) přítomné v ovzduší jako součást jeho znečištění představují jasné riziko pro lidské zdraví. Tyto částice mají různé chemické složení a jsou různých velikostí, v závislosti na zdrojích, které je emitují. PM jsou rozděleny do jednotlivých frakcí podle jejich aerodynamického průměru na hrubé (2,5 – 10 μm), jemné (0,1 – 2,5 μm) a ultrajemné (<0,1 μm) (1,2).
- *Ultrajemné částice*, označované jako $\text{PM}_{0,1}$, jsou definovány jako aerosoly s aerodynamickým průměrem pod 0,1 μm (100 nm). Ultrajemné částice jsou přítomny v ovzduší ve velkých celkových objemech a vstupují do organismu především dýchacím a trávicím ústrojím (3). Termíny *jemné* a *ultrajemné* částice jsou ale určeny pro popis částic přítomných v ovzduší; o částicích vstupujících do organismu proto hovoříme jako o *mikro- a nanočásticích*. Definovaná hranice velikosti mezi „mikro-“ a „nano-“ je stejná – 100 nm.

2.1.2 Vlastnosti mikro- a nanočástic

- *Nanočástice* jsou tradičně definovány jako částice v jednom či více rozměrech menší než 100 nm a větší než 1 nm. To, co je odlišuje od *mikročásteček*, jsou vlastnosti, jichž částice daného materiálu nabývají typicky pod kritickou velikostí 100 nm (4,5) (obr. 2.1). Jedná se o částice na bázi uhlíku (např. saze), oxidy kovů (železo, chrom, nikl, hliník, měď, zinek, titan aj.), ale také částice plastů (6).
- *Indukce zánětlivých změn*
Nanočástice se zdají být hlavními „podezřelými“ v indukci zánětlivých změn v tkáních, v nichž se deponují. Mívají jiné chemické a fyzikální vlastnosti a vykazují zvýšenou reaktivitu i odlišné chování při interakci s živými buňkami než mikročástice stejného chemického složení, které jsou považovány za netoxické a „neškodné“.

Obrázek 2.1 Jak „velké“ je „nano-“ a „mikro-“? Srovnání velikosti nanokrystalu (průměr 13 nm), eukaryotické buňky (průměr 13 μm), mravence (délka 13 mm), horkovzdušného balónu (průměr 13 m) a zeměkoule (rovníkový průměr přibližně 13 000 km).



- *Výskyt nanočástic*

Nanočástice jsou v prostředí všudypřítomné. Kromě přírodních procesů (vulkanická činnost, lesní požáry) jsou jejich významným zdrojem antropogenní činnosti – jsou buď sekundárním produktem (např. metalurgického průmyslu, jsou produkovány dopravou při spalování fosilních paliv či při otěru brzdových destiček, při kouření, smažení aj.) anebo jsou cíleně připravované – syntetické. S rychlým rozvojem nanotechnologií a pronikáním syntetických nanomateriálů nejen do nejrůznějších výrobků denní potřeby (kosmetika, barviva, baterie, výroba aut aj.), ale také medicínských přípravků (např. koloidní stříbro) roste význam zkoumání potenciálního toxického vlivu také těchto záměrně produkováných nanočástic (7).

- *Vlastnosti nanočástic*

Vzhledem ke svým velmi malým rozměrům mohou vykazovat jiné vlastnosti než částice stejného chemického složení o velikosti v řádech mikrometrů. Pro jejich chování a ev. toxické působení je důležitá zejména velikost částic, jejich tvar a krystalická struktura. Se zmenšující se velikostí částic se mění jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. Platí, že čím menší je částice, tím větší je její biologická aktivita a potenciální toxicita, a to i u materiálů, kdy mikročástice stejného složení toxické vlastnosti nevykazují (6,8). Nanočástice totiž mají na velmi malou hmotnost obrovský celkový povrch. Na povrchu molekul je odhaleno větší procento atomů a se zmenšujícím se rozměrem roste exponenciálně počet potenciálně reaktivních skupin. Nemusí proto platit přímý vztah toxického účinku na dávce (koncentraci) látky jako u částic mikro-rozměrů (9–11). Dále nanočástice se zmenšující se velikostí vykazují zvýšenou difuzivitu a tím pádem i opožděnou sedimentaci. Tím se prodlužuje doba jejich setrvání v ovzduší (12). Vlastnosti nanočástic v porovnání s mikročásticemi jsou shrnuty v tabulce 2.1.

Tabulka 2.1 Srovnání vlastností nanočástic a mikročástic.

	Nanočástice	Mikročástice
velikost	pod 100 nm	nad 100 nm
biologická aktivita	stoupá s klesající velikostí	nemění se
reaktivita a toxicita	stoupá s klesající velikostí	nemění se
počet reaktivních skupin na povrchu na jednotku hmotnosti	obrovský	menší
vztah toxického účinku v závislosti na dávce	neplatí	platí
difuzivita a sedimentace	zvýšená difuzivita, opožděná sedimentace	nedifundují, sedimentují

2.1.3 Nanočástice a jejich působení na organismus

- *Vědecké disciplíny zabývající se studiem nanočástic*

Studiem nanočástic se zabývají dva příbuzné spolupracující obory – nanotechnologie a nanotoxikologie.

- *Nanotechnologie*

Zabývá se vývojem materiálů na úrovni atomů, molekul a makromolekul, zkoumá jejich vlastnosti a vytváří struktury, zařízení a systémy s novými vlastnostmi a funkcemi, které vycházejí z jejich malé velikosti (definice podle The Nanoscale Science, Engineering, and Technology Subcommittee, 2000). Jde o multidisciplinární obor, v němž se spojují poznatky základního i aplikovaného výzkumu v biofyzice, molekulární biologii a bioinženýrství a lze předpokládat, že v budoucnu bude mít zásadní dopad na rozličná odvětví medicíny a farmakologie. Nanotechnologie poskytuje nové systémy, zařízení a materiály pro zlepšení možnosti aplikace nových farmak. V souvislosti s tím dochází k rozvoji oboru farmaceutická nanotechnologie, která se zabývá aplikací poznatků vědeckých „nanodisciplín“ ve farmakologii (nanomateriály, systémy cíleného transportu léčiv, diagnostické a zobrazovací systémy, biosenzory aj.) (13).

Náplní oboru nanomedicíny, který spojuje a využívá poznatky nanotechnologie a farmakologie, je diagnostika, léčba a prevence chorob a zranění, léčba bolesti a snaha o uchování či zlepšení lidského zdraví s využitím znalostí struktury

lidského těla a fyziologických pochodů na molekulární úrovni a terapeutických a diagnostických nástrojů vycházejících z nanotechnologie (14,15).

- *Nanotoxikologie*

Toto odvětví toxikologie studuje vlastnosti nanočástic a nanomateriálů a jejich toxické působení in vitro a in vivo (16). Posuzování rizika expozice nanočásticím a zkoumáním možností prevence nežádoucích účinků terapeutických nano-produktů pak podporuje rozvoj nanotechnologie a nanomedicíny (17).

- *Působení nanočástic na organismus*

- *Vstup a chování nanočástic v organismu*

Hlavní branou vstupu nanočástic do organismu, kromě kůže a gastrointestinálního traktu, jsou dýchací cesty a plíce. Nanočástice jsou schopné penetrovat paracelulárně i skrz buňky do krve, redistribuovat se v organismu, akumulovat se v různých orgánech, např. v plicích, mozku, játrech, ledvinách či slezině a vyvolávat v nich patologické změny (16,18). Do buněk vstupují jednak endocytózou, jednak ne zcela jasným non-vezikulárním mechanismem (16). Možnost jejich degradace pomocí lyzozomálního systému je ale omezená. Nanočástice se tak mohou v buňkách hromadit a vyvolávat změny na úrovni buněčných organel i na úrovni genetické informace buňky (18,19).

- *Genotoxický účinek*

Přesný mechanismus genotoxického účinku nanočástic prozatím není znám. Většina prací poukazuje na jejich genotoxické působení spuštěním oxidativního stresu a s tím spojenou indukci apoptózy, zánětu a zástavy buněčného cyklu (7,20–24). Prostřednictvím oxidativního stresu tedy mohou způsobovat zlomy v DNA, nestabilitu chromozomů a narušení mechanismů mitózy, což může vést k maligní transformaci buňky. Jiné studie ale také ukazují, že nanočástice mohou pronikat do buněčného jádra a přímo interagovat s DNA (25–27).

- *Klinické studie*

I přesto, že je zřejmé, že nanočástice jako součást znečištění životního prostředí představují riziko pro lidské zdraví, prozatím bylo provedeno jen minimum klinických studií. Zeleník a kol. (2012) zkoumali přítomnost a složení nanočástic v patrových mandlích - převládajícími nalezenými kovy byly železo, chrom, nikl, hliník a měď (28). Dvořáčková a kol. (2012) potvrdili přítomnost nanočástic v plodové vodě, v tkáních mrtvě rozených plodů i v nádorové tkáni glioblastomů,

což ukazuje na schopnost nanočástic přecházet placentární a hematoencefalickou bariéru (29). Munger a kol. (2014) pak analyzovali moč a hematologické a metabolické parametry u zdravých dobrovolníků po orálním podání komerčně vyráběných roztoků nanočástic stříbra o koncentraci 10 a 32 mg/l: nebyly zjištěny žádné signifikantní metabolické a hematologické změny či změny v močových parametrech, stejně tak nebyly zaznamenány morfologické změny vnitřních orgánů; toxická dávka těchto nanočástic tedy nebyla stanovena (30).

Shrnutí jednotlivých kazuistických nálezů anorganických mikro- a nanočástic v lidských orgánových systémech je uvedeno v tabulce 2.2 (31).

- *Toxické působení nanočástic v dýchacím ústrojí*

- *Výzkum nanočástic in vitro a na zvířecích modelech*

Toxické působení nanočástic v dýchacích cestách je v současnosti intenzivně zkoumáno především in vitro, případně na hlodavcích. V několika studiích na krysách a na lidských studiích in vitro byl již prokázán toxický účinek nanočástic na plicní tkáň ve smyslu vyvolání akutních i chronických zánětlivých změn (akutní alveolitida, bronchiální hyperreaktivita, poškození mukociliárního transportu, dysfunkce plicních makrofágů, formace mikrogranulomů) (7,32–34).

- *Profesionální expozice nanočásticím*

Až 11 % celkového objemu a 80 % celkového počtu částic uvolňovaných při sváření tvoří nanočástice. Řada autorů se proto věnovala profesionální expozici nanočásticím obsaženým v plynech vznikajících při sváření, ale především ve vztahu k respiračním příznakům pacientů (35,36). Studií zabývajících se přítomností nanočástic přímo v tkáních těchto pacientů bylo provedeno prozatím minimum (37–39). Andujar a kol. (2014) potvrdili přítomnost nanočástic v plicích svářečů pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) a také in vitro zjistili indukci produkce růstových faktorů fibroblastů lidskými plicními makrofágy (39). Další podobné práce zabývající se přítomností nanočástic v lidských plicích mají formu kazuistických sdělení; studie s velkými soubory pacientů prozatím zcela chybí (40,41).

- *Distribuce nanočástic v dýchacích cestách*

Distribuce a akumulace nanočástic v různých etážích dýchacích cest byla studována na hlodavcích a pomocí počítačových modelů. Pomocí počítačového modelování bylo zkoumáno chování nanočástic při distribuci v tkáních při jejich

vdechování. Předpokládá se, že se řídí jinými zákonitostmi než částic větších rozměrů. Nejvíce nanočástic se stejně jako mikročástice zachycuje v dutině nosní na skořepách, ale na druhém místě je u nanočástic hltan; větší částice mají tendenci deponovat se spíše v hrtanu (42,43).

○ *Klinické studie zkoumající nanočástice v dýchacích cestách:*

Zatím bylo provedeno jen velmi málo klinických studií zkoumajících přítomnost a působení nanočástic na sliznici dýchacích a polykacích cest, např. výše zmíněná studie Zeleníka a kol. (28). Klinické studie zabývající se nanotoxicitou a nanopatologií prozatím narážejí na omezené možnosti stanovení koncentrace nanočástic ve vyšetřovaných tkáních, neboť jejich detekce v tkáni se provádí na zcela jiném principu než u větších částic, s nutností využití elektronové mikroskopie a spektroskopických metod. V nano-měřítku navíc nelze tkáň jednoduše mapovat a přítomnost nanočástic statisticky hodnotit. Důvodem je především velmi malý, prakticky až zanedbatelný objem částic v poměru k celkovému objemu vzorku tkáně (28).

Tabulka 2.2 Příklady nálezů mikro- a nanočástic v lidských orgánových systémech (31).

	zjištěné histologické změny/analyzované patologie	příklady spektrometricky detekovaných částic (elementární složení)
dýchací systém (plíce)	silikóza, azbestóza, pleurální mezoteliom	částice křemíku, azbest
	plicní sarkoidóza	rtuť, síra, křemík
	dlaždicobuněčný karcinom	hliník, wolfram, fosfor, titan, železo
	adenokarcinom	železo, síra, hliník, křemík, chrom, nikl
	alergický zánět	stříbro
krev (krevní sraženiny)		antimon, kobalt, křemík, chrom, železo, wolfram, bismut, olovo, barium aj.
játra	granulom	zlato, křemík, železo, hliník
	sideróza	železo
	karcinom	barium, železo, měď, zinek
	fibróza	olovo, křemík, železo
gastrointestinální trakt	Crohnova choroba (granulomatózní zánět střeva)	olovo, hliník
	karcinom tlustého střeva	zirkon, křemík, cín, železo, stříbro
	peritoneální mezoteliom	železo, hliník, yttrium, thorium, niob, titan, mangan, cerium, měď, uran,
ledviny	akutní renální selhání	chrom, železo, cín
sperma		hliník, wolfram, titan, měď, kobalt, olovo, chrom

2.2 Detekce, zobrazování a charakterizace mikro- a nanočástic v tkáních

Většina dostupných metod, které dokáží detekovat a určit chemické složení nejen částic mikrorozměrů, ale také nanorozměrů, pracuje s měřením částic v plynném či kapalném skupenství. Toto není aplikovatelné na histopatologické preparáty. Proto nástroje, kterými by bylo možno zkoumat přítomnost a potenciálně patologické působení mikro- a nanočástic vstupujících do organismu z prostředí přímo v buňkách a tkáních, jsou předmětem zkoumání a používání jednotlivých metod prozatím není ustálené.

Rozměry nanočástic jsou typicky v dimenzi menší, než je rozsah vlnových délek viditelného světla, a proto je běžně jejich detekce pod rozlišovacími schopnostmi optické mikroskopie (12). Ani chemickou analýzu exogenních mikro- a nanočástic detekovaných v tkáních není standardně možno vzhledem k jejich celkovému velmi malému objemu provádět konvenčními metodami. Metody, které spolehlivě detekují tyto částice a měří jejich fyzikálně-chemické vlastnosti nejen v prostředí, ale také ve spotřebních produktech, se postupně rozvíjejí teprve v posledních dvou desetiletích (44).

- *Nejčastěji užívané metody detekce mikro- a nanočástic* je možno rozdělit do čtyř skupin v závislosti na principu detekce (45):
 - optické detekční metody (Ramanova mikrospektroskopie, techniky rozptylu rentgenového záření, laserová interferometrie, laserová difrakční analýza);
 - elektrické detekční metody (elektronová mikroskopie, Coulter counter);
 - mechanické detekční metody (centrifugální sedimentace, mikroskopie atomárních sil, metoda Brunauer-Emmett-Teller);
 - metody založené na jiném principu (ultrazvukové metody, hmotnostní spektrometrie, elektrosprejová ionizace aj.).

V této práci bylo k detekci a charakterizaci částic využito metod Ramanovy mikrospektroskopie a skenovací (rastrovací) elektronové mikroskopie, které budou dále blíže popsány. Detailní popis dalších vyjmenovaných metod přesahuje rámec této práce.

2.2.1 Skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie

Skenovací elektronová mikroskopie je jednou ze základních metod elektronové mikroskopie. V současnosti má možnost rozlišení až pod 1 nm a je metodou volby pro zkoumání velikosti a struktury mikro- a nanočástic. Ve spojení se spektrometrickými metodami může být stanoveno i chemické složení částic (12).

Obrázek 2.2 Skenovací elektronový mikroskop SEM (Quanta FEG 450, FEI) s rentgenovou mikroanalýzou APOLLO X (EDAX).



- *Princip elektronové mikroskopie*

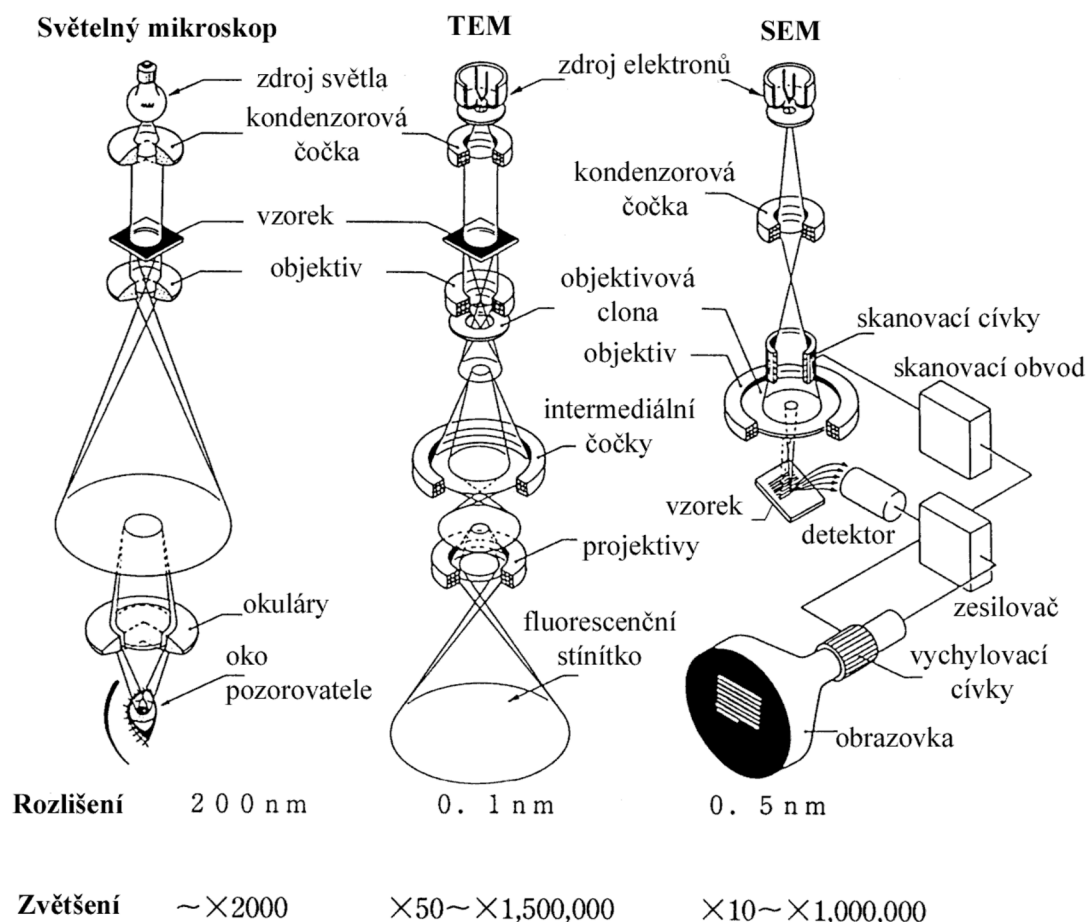
Princip elektronové mikroskopie je analogický optické (fotonové) mikroskopii. Optický mikroskop využívá viditelné světlo (fotony) fokusované pomocí čoček. Vzhledem k tomu, že rozměry nanosvětla jsou menší než vlnová délka viditelného světla (asi 400 – 750 nm, což jsou vlnové délky, na které je citlivé lidské oko), je fyzikální mezí rozlišovací schopnosti optického mikroskopu necelých 200 nm (46). V elektronové mikroskopii funkci čoček zastávají vhodně tvarovaná elektromagnetická pole, která fokusují svazek elektronů, přičemž vlnová délka elektronu je při urychlovacím napětí 10 kV pouze 0,0123 nm (46,47). Elektronový mikroskop (EM) má proto mnohem vyšší rozlišovací schopnost.

- *Rozdělení elektronových mikroskopů*

Elektronovou mikroskopii lze rozdělit na dva základní typy: transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) a skenovací elektronovou mikroskopii (SEM); jejich kombinací lze získat další typy mikroskopů (skenovací transmisní EM či SEM s detektorem prošlých

elektronů) (48). Schématické srovnání stavby a principu optického mikroskopu, TEM a SEM je na obrázku 2.3.

Obrázek 2.3 Srovnání optického mikroskopu, TEM a SEM. Zdroj: Soubusta J. Optoelektronické systémy: Elektronová mikroskopie transmisní a rastrovací. (49).



- Transmisní elektronová mikroskopie*

TEM, jehož rozlišení dosahuje u moderních přístrojů až kolem 0,1 nm, detekuje elektrony prošlé skrz zkoumaný vzorek, který musí být velmi tenký (přibližně 200 nm) (45,48). Z toho důvodu není možno TEM využít k detekci částic v rutinním histopatologickém preparátu.
- Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)*

U SEM je obraz tvořen tzv. řádkovým snímáním povrchu preparátu pomocí zaostřeného elektronového paprsku, přičemž tento mikroskop je schopen zobrazit částice až o velikosti řádově jednotek nanometrů, lze jím zobrazit povrch zkoumaných objektů, určit

jejich velikost a vytvořit tzv. „pseudo-3D obraz“ (47). Vzorek může být až 2 – 3 cm tlustý a 15 cm dlouhý (49). Nevýhodou SEM pro potřeby vyšetření histologických vzorků je ale právě ultra-vysoké rozlišení, což znamená, že na skenované části vzorku nemusí být zachyceno reprezentativní množství částic, a tak jsou výsledky spíše náhodné, a ne statisticky signifikantní (45).

Metoda založená na SEM, která je nejčastěji využívána k analýze vzorků tkání, je SEM s energiově disperzní spektrometrií (EDS), SEM-EDS. EDS je založena na detekci charakteristického rentgenového záření, což je další ze signálů získaných dopadem primárního svazku elektronů na zkoumaný vzorek. Signál nám dává informaci o chemickém složení materiálu, tzv. prvková spektra (prvkové složení). Metoda dokáže zjistit, jaké prvky a v jakém množství se nacházejí ve vzorku (50).

Obecnou nevýhodou elektronové mikroskopie je degradace vzorku. Vzhledem k využití svazku elektronů musí být vzorek vodivý; konkrétně u SEM je nutno ho pokovit (48). Elektronový svazek má navíc značnou energii, a proto dochází k deformaci tvaru částic a jejich tavení – vzorek tedy není možno pomocí EM zkoumat opakovaně (47). Další nevýhodou SEM je značná finanční nákladnost samotného zařízení (45).

2.2.2 Ramanova spektroskopie a mikrospektroskopie

Princip Ramanovy spektroskopie (RS) spočívá v neelastickém rozptylu fotonů, jinak zvaném Ramanův rozptyl (51). Ten je pojmenován po indickém fyzikovi Chandrasekharu Venkату Ramanovi, který za výsledky své práce při studiu rozptylu světla a objev Ramanova rozptylu (nebo také Ramanova jevu) získal v roce 1930 Nobelovu cenu za fyziku.

RS založena na měření rozdílů energií tzv. vibračních hladin molekul. Tyto vibrace jsou změny délek a úhlů chemických vazeb mezi atomy v molekulách; pokud jsou molekuly v klidu, nacházejí se na tzv. základní vibrační hladině a jejich energie je rovna energii nulových kmitů (52). Ramanův jev si lze zjednodušeně představit jako energetický přechod molekuly mezi dvěma vibračními hladinami, k němuž dochází po interakci molekuly s fotonem (51).

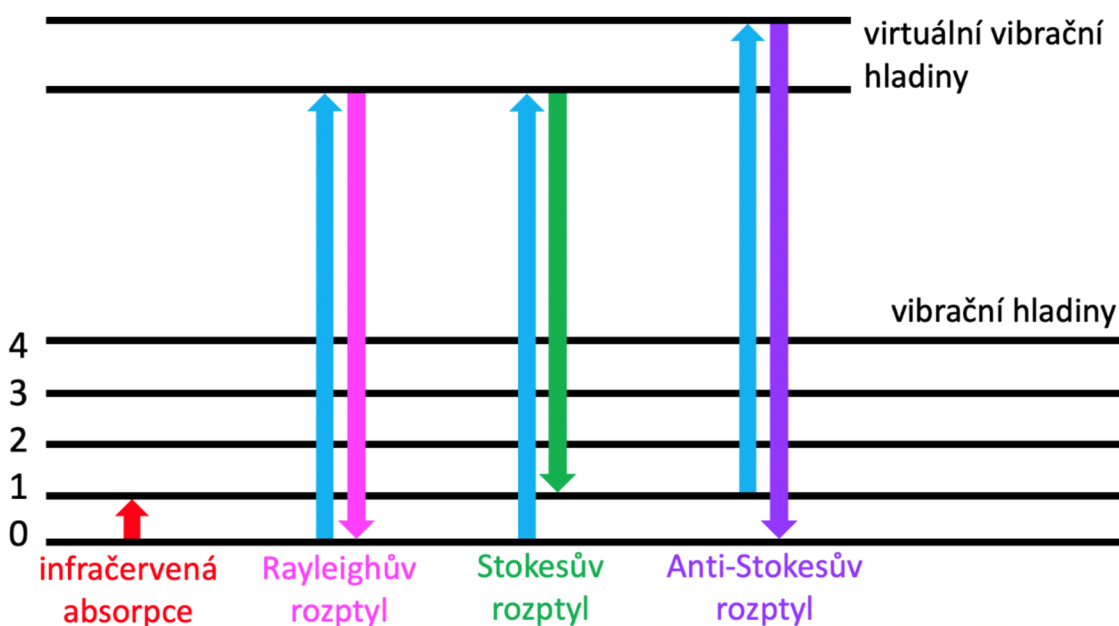
Interakce fotonů s molekulami (obr. 2.4)

- Excitují molekulu na vyšší vibrační hladinu a ta při deexcitaci vyzáří foton o stejné energii – tento jev se nazývá Rayleighův (elastický) rozptyl, který nenes žádnou analytickou informaci (není rozdíl energií, které by bylo možno měřit). Excitují molekulu na vyšší vibrační hladinu, ta při deexcitaci vyzáří foton o jiné energii a dostává

se na vyšší vibrační hladinu, než je její základní vibrační stav. Tento rozptyl je tedy neelastický a označuje se jako Stokesův.

- Pokud je molekula již před interakcí s fotonem na vyšší vibrační hladině než základní, může se po dopadu fotonu vrátit na základní vibrační hladinu – energie vyzářeného fotonu je tedy opět jiná než fotonu původního. Tento rozptyl (stejně jako Stokesův neelastický) se nazývá anti-Stokesův.
- Stokesův a anti-Stokesův rozptyl se souhrnně označuje jako Ramanův rozptyl. Oba v sobě nesou analytickou informaci, neboť rozdíl energií (vlnových délek) původního a rozptýleného (vyzářeného) fotonu lze měřit a na základě toho je možno provést kvalitativní analýzu molekul – každá molekula má totiž jiné (specifické) hodnoty energií vibračních hladin (51,52).

Obrázek 2.4 Rayleighův a Ramanův rozptyl.



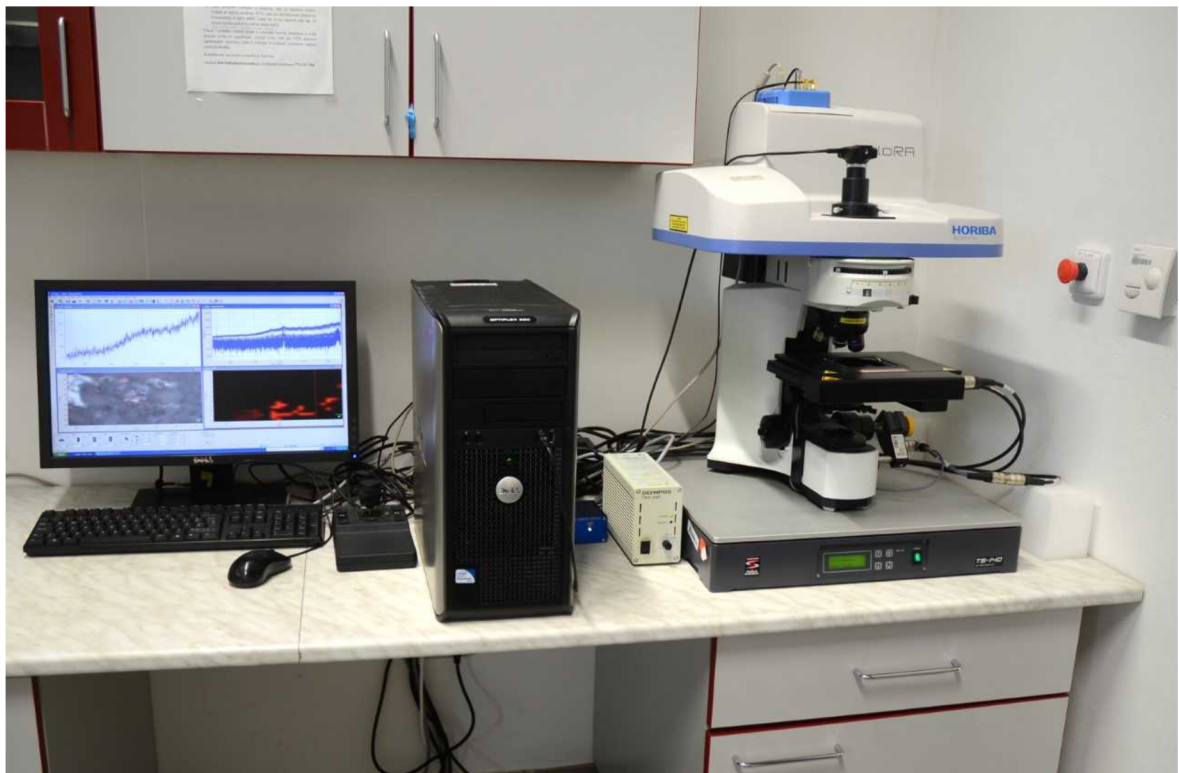
Při RS jsou zkoumané molekuly ozářeny zdrojem monochromatického světla – nejčastěji laserem, který interaguje s vibracemi molekul, a výsledkem je zvýšení či snížení energie fotonů. Tento energetický posun pak dává informaci o vibračních módech ve zkoumaném vzorku, tedy o jeho molekulárním složení. Výstupem RS je potom spektrum, tedy závislost rozdílu energie (vlnové délky) fotonů oproti původním fotonům, které interagovaly se zkoumanou molekulou (52).

Až do 70. let 20. století se RS používala pouze pro studium makroskopických materiálů, ale s využitím zdroje intenzivního monochromatického záření, laseru, se objevila možnost užití RS i pro mikroanalýzu – zrodila se tedy Ramanova mikrospektroskopie (RMS).

RMS kombinuje Ramanovu spektroskopii s optickou mikroskopií a umožňuje měřit spektra Ramanova rozptylu s prostorovým rozlišením v řádu μm^3 . Neinvazivním způsobem tak lze studovat nejen anorganické složky vzorku, ale také složení tkání, jednotlivých buněk i organel (53).

Zatímco SEM-EDS, která poskytuje informaci pouze o elementárním složení detekovaných částic či jejich clusterů, RMS přináší informaci o chemickém složení částic, které je často podstatnější než jejich pouhé elementární složení (54). Ramanovu spektroskopii je možno využít k analyzování složení biomolekul (lipidů, proteinů i DNA), ale prozatím je její využití k detekci anorganických částic vstupujících do organismů a tkání z prostředí omezené (54,55).

Obrázek 2.5 Ramanův mikrospektrometr: Smart Raman Microscopy System XploRATM (HORIBA Jobin Yvon, France).



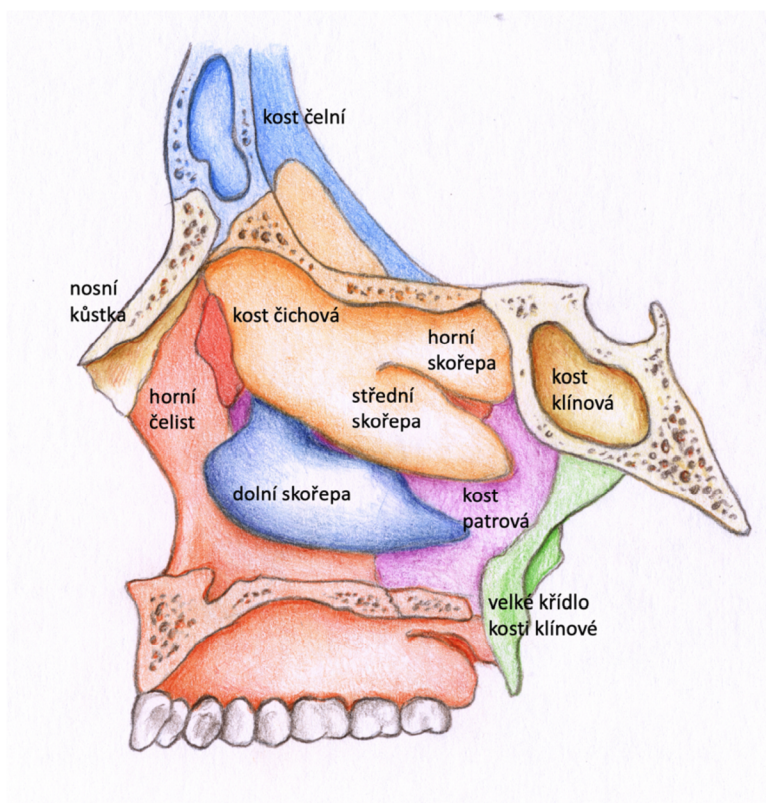
2.3 Chronická rinosinusitida

2.3.1 Základní anatomie a fyziologie dutiny nosní a nosní sliznice

- *Makroskopická a mikroskopická anatomie dutiny nosní a vedlejších dutin nosních*

Dutina nosní je párová dutina, jejímž mediálním ohraničením je nosní septum. Vpředu začíná nosními dírkami (nostrilami) a vzadu ústí do nosohltanu prostřednictvím choan; kaudálně ji od dutiny ústní odděluje tvrdé a měkké patro. Z její laterální stěny odstupují 3, vzácněji 4 skořepy (concha nasalis inferior, media, superior a event. suprema), které ohraničují horní, střední a dolní nosní průchod (obr. 2.6).

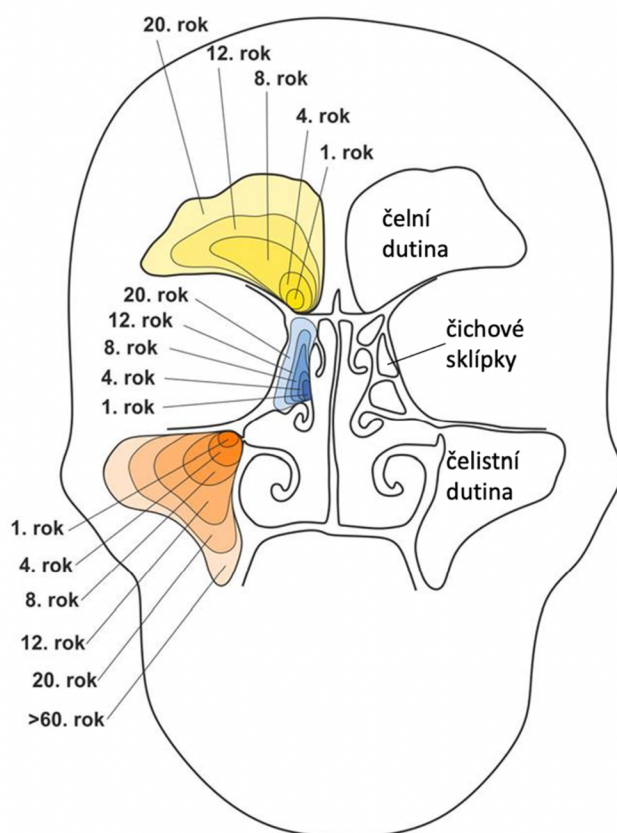
Obrázek 2.6 Kostěná laterální stěna dutiny nosní. Modifikováno podle Lipiny a kol. (56).



Sliznice skořep sehraává významnou úlohu ve fyziologické funkci nosní dutiny jako součásti dýchacích cest. Střídající se fyziologická kongesce dolní skořepy jedné strany podmiňující rozdíly v nosní průchodnosti při zachovaném celkovém odporu je podkladem tzv. nosního cyklu (58).

Do nosních průduchů se otevírají vývody vedlejších dutin nosních (VDN): čelistní a čelní dutiny, přední a zadní čichové sklípky a klínové dutiny (obr. 2.7).

Obrázek 2.7 Vedlejší dutiny nosní a jejich postnatální vývoj.



Povrch sliznice dutiny nosní a vedlejších dutin nosních je kryt vícevrstevným cylindrickým řasinkovým epitelem s pohárkovými buňkami neboli respiračním epitelem. Jeho povrchové buňky jsou spojeny pomocí tight junctions (59). Od lamina propria sliznice je epitel oddělen vrstvou kolagenního vaziva – bazální membránou. Její ztlustění běžně ukazuje na přítomnost chronického zánětu, ale histologické studie prokázaly její ztlustění i ve vzorcích sliznice pacientů bez potíží ve smyslu chronické rinosinuitidy (60). Dá se tedy předpokládat, že „normální nos neexistuje“, vzhledem k tomu, že je nosní sliznice permanentně vystavena noxám z vnějšího prostředí (59).

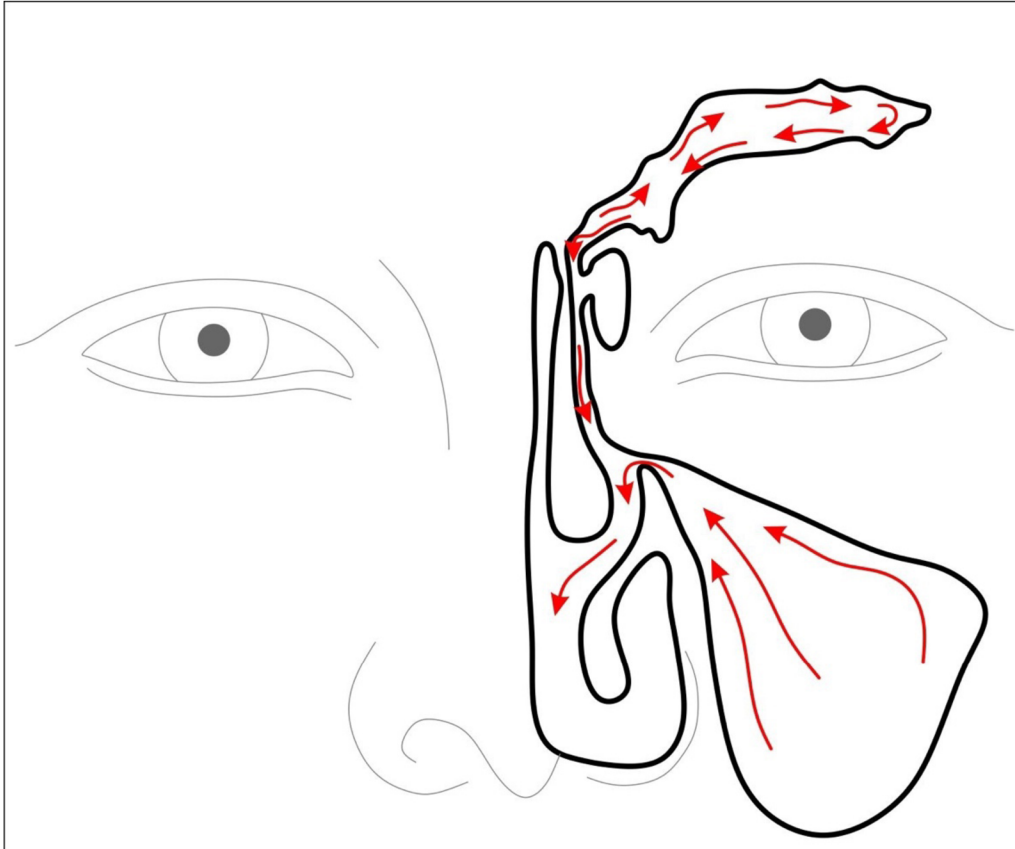
- *Fyziologie dutiny nosní a nosní sliznice*

Zevní nos, nosní dutina a vedlejší dutiny nosní představují funkční jednotku, která čistí, zvlhčuje a ohřívá vdechovaný vzduch. Sinonazální sliznice navíc hraje významnou roli v ochraně organismu před nečistotami a infekčními agens obsaženými ve vdechovaném vzduchu.

Sinonazální mukociliární clearance hraje primární roli v ochraně dutiny nosní a VDN. Řasinky epitelu jsou schopné svým koordinovaným, přesně cíleným pohybem posouvat

hlen z VDN směrem k jejich ostiím a dále do dutiny nosní, kde je posunován dále dorzálně do nosohltanu, až je nakonec spolknut a patogeny jsou zlikvidovány v gastrointestinálním traktu (obr. 2.8) (57).

Obr. 2.8 Schéma mukociliární clearance.



Normální mukociliární clearance může být narušena infekcí horních cest dýchacích, otoky sliznice, anatomickými anomáliemi či iatrogeně po operacích v dutině nosní. Epitel sinonazální sliznice je pokryt vrstvou hleny, která zachycuje odloučené buňky, patogeny a pevné částice, které precipitují ve vdechovaném vzduchu. Hlenová vrstva se skládá z vnější viskózní gelové vrstvy, která leží nad řasinkami, a vnitřní řídké vrstvy složené převážně z vody a elektrolytů, která obklopuje řasinky (sol) (62).

2.3.2 Definice a klasifikace chronické rinosinuitidy

Aktuálně je obecně přijímaná definice rinosinuitidy dospělých dle dokumentu European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020 (tab. 2.3) (63).

Tabulka 2.3 Definice rinosinuitidy dle EPOS 2020 (63).

Rinosinuitida – zánětlivé onemocnění dutiny nosní a VDN charakterizované 2 či více symptomy:	
jeden z nich je vždy <ul style="list-style-type: none">• nosní obstrukce/kongesce nebo• nosní sekrece	a zároveň <ul style="list-style-type: none">• bolest/tlak v obličeji• zhoršení nebo ztráta čichu
a zároveň	
endoskopické známky <ul style="list-style-type: none">• nosní polypózy a/nebo• hlenohnisavá sekrece primárně ze středního průduchu a/nebo• otok/slizniční obstrukce primárně ve středním průduchu	a/nebo změny na výpočetní tomografii (CT) VDN <ul style="list-style-type: none">• slizniční změny ostiomeatálního komplexu a/nebo• slizniční změny ve VDN

Chronickou rinosinuitidu (CRS) u dospělých s polypy či bez polypů EPOS 2020 definuje jako rinosinuitidu s trváním 12 a více týdnů. Akutní i chronická rinosinuitida dětí jsou v EPOS 2020 definovány jako samostatné klinické jednotky se specifickou symptomatikou a diagnostickými kritérii (63). Tato práce se věnuje pouze problematice u dospělých, proto rinosinuitida u dětí nebude diskutována.

2.3.3 Epidemiologie a patogeneze chronické rinosinuitidy

- *Epidemiologie a predisponující faktory chronické rinosinuitidy*

CRS je celosvětově jedno z nejčastějších chronických onemocnění – celková prevalence se dle studií založených na subjektivním hodnocení symptomů u pacientů pohybuje od 5,5 do 28 %; studie hodnotící kromě symptomů i endoskopický nebo CT nález pak prevalenci odhadují na 3 – 6 % (63).

Vedle faktorů jako alergie na inhalační alergeny, bronchiální astma, imunodeficience či dysfunkce řasinek ukazují moderní studie silnou asociaci aktivního pasivního kouření

(a to i kouření v minulosti) coby predisponujícího faktoru CRS. Tabákový kouř je pro nosní sliznici toxický, působí prozánětlivě a indukuje oxidativní stres ve sliznici. Vyšší prevalence CRS byla zjištěna i u jedinců vystavených vysokému environmentálnímu znečištění – např. u hasičů zasahujících po teroristických útocích na Světové obchodní centrum, u pacientů s nízkým sociálním standardem žijících v přelidněných oblastech a staré zástavbě a u různých zaměstnání, při jejichž výkonu jsou pracovníci vystaveni např. papírovému prachu, dezinfekci, kovovému prachu, zvířecí srsti, plísním nebo toxickým plynům (63).

- *Patogeneze chronické rinosinusitidy*

Z hlediska patogeneze pod termín CRS spadá velká skupina heterogenních zánětlivých onemocnění nosní sliznice. Mechanismy, které se podílejí na vzniku symptomatologie CRS a patologických změn sliznice, navíc ještě nejsou dokonale prozkoumány. Obecně je přijímáno, že hlavními mechanismy, které se na vývoji zánětlivých změn podílejí, jsou dysfunkce mukociliární clearance, porucha sinonazální epiteliální bariéry a zánětem indukovaná přestavba tkání, a že významnou roli hraje i adaptivní imunita (73).

- *Genetický podklad*

U většiny chronických zánětlivých onemocnění se předpokládá, že se na jejich vývoji podílí řada genetických faktorů, resp. jejich kombinace a interakce s epigenetickými faktory (63).

- *Mechanismy zánětu*

Aktuálně přijímaná (ale doposud neprokázaná) hypotéza předpokládá, že spouštěčem zánětlivých mechanismů je dysfunkční interakce mezi sliznicí a vlivy prostředí. Na straně sliznice to jsou genetické a epigenetické faktory imunitního systému a na straně prostředí jsou to inzulty jako kouření, mikroorganismy, vzdušné znečištění či alergeny (63,74). Na průnik patogenu do sliznice reaguje organismus spuštěním dráhy imunologických odpovědí typu 1, 2 nebo 3 nebo jejich kombinací; v souvislosti s CRS je prozatím nejvíce prostudována imunitní odpověď typu 2 (63).

- *Faktory prostředí*

Vedle vlivu virů, které se podílejí zejména na akutních exacerbacích chronického zánětu porušením integrity epitelu a funkce řasinek, indukci nadprodukce hlenu a tím pádem porušením mukociliární clearance, a

respiračních alergenů, je diskutována role bakterií v CRS coby komenzálů a/nebo patogenů. Není jasné, zda přítomnost určitých bakterií je příčinou či následkem CRS – spíše je pravděpodobné, že komenzální bakterie hrají roli v udržování homeostázy na zdravé sinonazální sliznici a že většina bakteriální kolonizace je benigní anebo dokonce prospěšná (63,75,76). Expozice tabákovému kouři indukuje ve sliznici expresi prozánětlivých cytokinů, porušuje proteiny mezibuněčných spojů v epitelu a indukuje ve sliznici oxidativní stres (77–79). Vliv znečištění vdechovaného vzduchu (z dopravy, spalování fosilních paliv, z průmyslu aj.) na rozvoj akutních a chronických onemocnění dýchacího traktu (především dolních dýchacích cest a plic) je dobře zdokumentován, podobně je velká pozornost věnována také profesionální expozici vzdušnému znečištění vznikajícímu při výkonu povolání (80–82). Souvislosti expozice znečištěnému vzduchu, především pak vlivu solidních částic, a patogeneze CRS se ale prozatím věnovalo jen málo autorů – většina studií zkoumala vliv polutantů na buněčné kultury či byla prováděna na zvířecích modelech, případně se jednalo o retrospektivní epidemiologické studie (83,84). Prospektivní studie na tomto poli výzkumu prozatím chybí.

2.3.4 Diagnostika chronické rinosinuitidy

Diagnostika chronické rinosinuitidy je založena primárně na anamnéze (přítomnost příznaků dle EPOS 2020, viz 2.3.2) a rinoendoskopickým vyšetření. Pro diagnózu chronické rinosinuitidy v endoskopickém obraze svědčí přítomnost otoku (hypertrofie) sliznic a/nebo polypů a/nebo sekrece. Zobrazovací vyšetření, v případě CRS především výpočetní tomografie (CT) VDN, potom tyto metody doplňují, zejména v případě zvažované chirurgické léčby (85). V indikovaných případech je možno využít také testů na alergie, laboratorní vyšetření krve (např. ANCA protilátky, ASA senzitivita aj.), provést vyšetření čichu (např. Sniffing Sticks test, UPSIT, test parfémovaných fixů) či objektivní vyšetření nosní průchodnosti (akustická rinometrie a rinomanometrie) aj. Mikrobiologické vyšetření se v případě CRS zpravidla neprovádí, jelikož jeho výsledek pravděpodobně nemá význam v léčbě chronického stavu ani akutních exacerbací CRS. Neodmyslitelnou součástí rinologického vyšetření je zhodnocení kvality života pacienta pomocí standardizovaných dotazníků (RhinoVAS, NOSE score, SNOT-22 aj.) (86).

2.3.5 Konzervativní léčba chronické rinosinuitidy

Cílem léčby CRS je kontrola onemocnění, tedy dosažení stavu, kdy pacient nepocítuje příznaky onemocnění nebo ho příznaky neobtěžují (85).

Konzervativní léčba CRS nespočívá pouze v medikamentózní terapii, ale také režimových opatřeních a opatřeních s účelem zmírnění expozice predisponujícím a rizikovým faktorům (snížení expozice faktorům vnějšího prostředí – virovým infekcím, alergenům, tabákovému kouři a smogu; léčba imunodeficiencí, astmatu a gastroezofageálního refluxu) (91).

- *Kortikoterapie*

Základem léčby CRS je vždy lokální kortikoterapie ve formě nazálních sprejů. Významným způsobem zlepšuje příznaky CRS a zvyšuje kvalitu života pacientů, snižuje otok nosní sliznice, zmenšuje velikost polypů a pooperačně zamezuje jejich rekurenci, přičemž mají jen minimum nežádoucích účinků (63). Krátkodobá systémová kortikoterapie se užívá především u CRS s polypy (63,85).

- *Solné roztoky*

Benefit laváží izotonickými roztoky byl prokázán četnými studiemi, přičemž laváže většími objemy roztoků mají pravděpodobně větší efekt než jejich užívání ve formě sprejů (63,92).

- *Biologická léčba*

V současné době je intenzivně zkoumána role biologické léčby monoklonálními protilátkami, např. antiinterleukiny dupilumabem nebo mepolizumabem u pacientů s obtížně léčitelnou CRS s prokázanou zánětlivou odpovědí typu 2 a současným astmatem (93).

2.3.6 Chirurgická léčba chronické rinosinuitidy

Chirurgická léčba je indikována v případě selhání medikamentózní léčby. Zlatým standardem chirurgické léčby CRS je funkční endoskopická chirurgie vedlejších nosních dutin – FESS (functional endoscopic sinus surgery) (85). Nejčastěji prováděnými endoskopickými endonazálními výkony jsou mukotomie (klasická „cold steel“ mukotomie či její modifikace – podslizniční shaverová či laserová turbinoplastika či radiofrekvenčně indukovaná termoterapie skořep), ošetření ostiomeatální jednotky, čichových sklípků či čelistní dutiny (uncinektomie, etmoidektomie, supraturbanální antrostomie), případně i rozšíření vývodu čelní dutiny (frontální sinotomie) a otevření klínové dutiny (sfenoidotomie). Otevření všech VDN do dutiny nosní (tzv. nasalizace) se nazývá endoskopická pansinusoperace.

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Materiál a metodika

3.1.1 Charakteristika studie

Prospektivní studie probíhala na Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku Fakultní nemocnice Ostrava v období od září 2013 do března 2015. Byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Ostrava (identifikátor FNO-ENT-Nanoparticles, 2 RVO-FNOs/2013), registrována jako klinická studie v databázi ClinicalTrials.gov (identifikátor NCT02270125) a provedena v souladu s Helsinskou deklarácí.

Do studie bylo zařazeno celkem 40 pacientů ve věku 20 – 78 let (průměr 41,3), 31 mužů a 9 žen, s klinicky diagnostikovanou CRS s nedostatečnou odpovědí na konzervativní terapii. Pacienti byli indikováni k endoskopické „cold steel“ mukotomii (jako samostatný výkon či jako součást rozsáhlejšího endoskopického výkonu v dutině nosní a VDN). U části pacientů byl zároveň předoperačně odebrán vzorek hlenu z dolní skořepy. Formou dotazníkového šetření byla zjištěna demografická data, profesní a kuřácká anamnéza. Nábor pacientů do studie probíhal v ORL ambulanci Fakultní nemocnice Ostrava, podmínkou zařazení pacienta do studie byl jeho souhlas a podpis informovaného souhlasu. Jako kontrolní skupina bylo zvoleno 10 kadaverů bez anamnézy CRS v průběhu jejich života, od nichž byla sliznice získána stejnou technikou jako v případě pacientů s CRS.

Všichni pacienti zařazení do studie včetně kontrol měli obdobné životní podmínky ve smyslu vzdušného znečištění životního prostředí – všichni pocházeli ze stejného regionu (Moravskoslezský kraj, Česká republika).

Vzorky sliznice a hlenu byly zpracovány na Ústavu patologie Fakultní nemocnice Ostrava a bylo provedeno rutinní histologické, resp. cytologické vyšetření. Tato vyšetření byla u všech pacientů i kontrol provedena jedním patologem. Zpracované vzorky byly po anonymizaci následně vyšetřeny skenovací elektronovou mikroskopií a Ramanovou mikrospektroskopií v Centru nanotechnologií Vysoké školy báňské – Technické univerzity Ostrava s cílem detekovat ve vzorcích anorganické nano- a mikročástice a zjistit jejich molekulární složení.

3.1.2 Vstupní kritéria

- Pacienti s CRS (CRS skupina)
 - věk více než 18 let;
 - klinická diagnóza CRS dle kritérií dle EPOS 2012 (pozn.: kritéria jsou totožná s diagnostickými kritérii dle EPOS 2020) (63,94);
 - endoskopicky verifikovaná hypertrofie dolních skořep;
 - subjektivně hodnocená nedostatečná odpověď na konzervativní terapii (nazální kortikoidní sprej) po minimálně 6 měsících jeho užívání;
 - souhlas se zařazením do studie stvrzený podepsáním informovaného souhlasu;
- Kontrolní skupina (kadaverózní dárce)
 - věk více než 18 let;
 - bez zjištěné anamnézy chronického zánětlivého onemocnění nosní sliznice (CRS, alergická fungální rinosinusitida, alergická rinitida) či jiných významných patologií a operací v oblasti nosu a VDN v průběhu života (např. tumory dutiny nosní);
 - při endoskopickém vyšetření sliznice dolních skořep nevykazovala známky hypertrofie.

3.1.3 Vylučující kritéria

Ze studie byli vyřazeni pacienti nerozumějící česky a nesouhlasící s vyšetřením a operací, pacienti s anamnézou předchozích operací nosních skořep, tumorem dutiny nosní v anamnéze a pacienti neschopni celkové anestézie. V případě kadaverů byla vylučujícím kritériem anamnéza chronického zánětlivého onemocnění sinonazální sliznice či jiných významných patologií a operací v oblasti nosu a VDN (např. tumoru dutiny nosní) a přítomnost hypertrofie sliznice dolní skořepy při endoskopickém vyšetření.

3.1.4 Odběr vzorků a jejich zpracování

Studie byla rozdělena na 3 části:

- *Část 1: Detekce, zjištění složení, distribuce a možnosti kvantifikace nano- a mikročástic v nosní sliznici u pacientů s CRS*

Prvních 6 vzorků nosní sliznice pacientů z CRS skupiny bylo odebráno pomocí endoskopické „cold steel“ mukotomie v celkové anestézii (obr. 3.1). Odebraná tkáň byla přichycena na parafinové destičky pomocí sterilních jehel (povrchem sliznice nahoru); orientace sliznice byla označena na destičce (vepředu a vzadu) a vzorky byly takto odeslány na Ústav patologie Fakultní nemocnice Ostrava. Tam byly fixovány pomocí 10% formalinu a vertikálně rozděleny na čtyři části, v závislosti na vzdálenosti od nostril: část 1 – nejbliže k nostrilám, části 2 a 3 – uprostřed a část 4 – nejbliže choanám (obr. 3.2). Po alkohol-xylenové dehydrataci vzorků a zalití do parafinu byly vzorky nakrájeny na řezy o tloušťce 2 – 4 μm . Řezy byly vedeny tak, aby byly kolmé na dlouhou osu vzorku sliznice a aby každý vyšetřovaný řez obsahoval povrchovou část sliznice (epitel) i hlubší vrstvy sliznice (tedy přibližně „příčné“ řezy sliznicí). Byly fixovány na skleněná mikroskopická sklíčka a nabarveny hematoxylin-eosinem pro potřeby rutinního histopatologického vyšetření. Toto vyšetření bylo ve všech případech provedeno jedním patologem. Tenké řezy určené pro další analýzu barveny nebyly – byly deparafinovány v xylenu a alkoholu a anonymizované byly odeslány do Centra nanotechnologií VŠB-TUO (95).

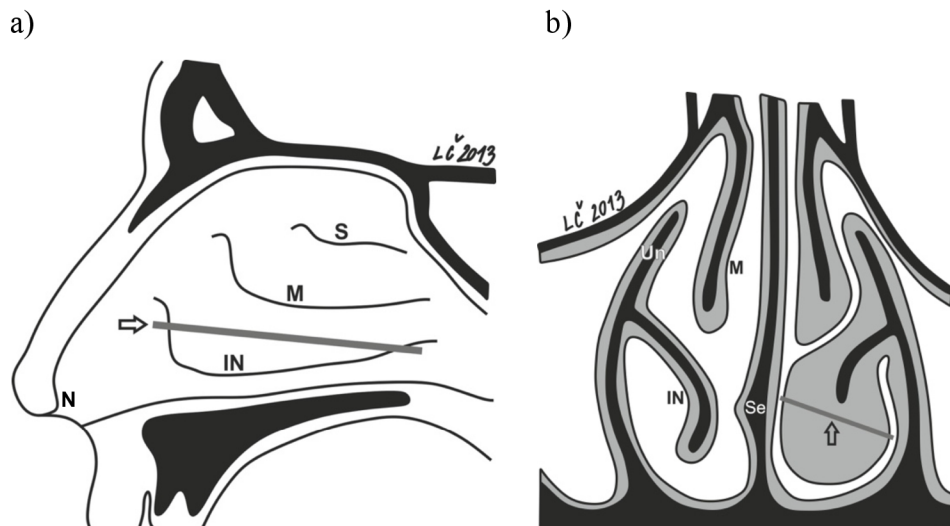
- *Část 2: Srovnání přítomnosti a molekulárního složení částic ve sliznici CRS skupiny a kontrolní skupiny*

Dalších 34 vzorků nosní sliznice pacientů z CRS skupiny a 10 vzorků kontrolní skupiny bylo odebráno, fixováno a vyšetřeno patologem analogickým způsobem jako v bodě 1. Na rozdíl od první části vzorků nebyly děleny na části podle vzdálenosti od nostril.

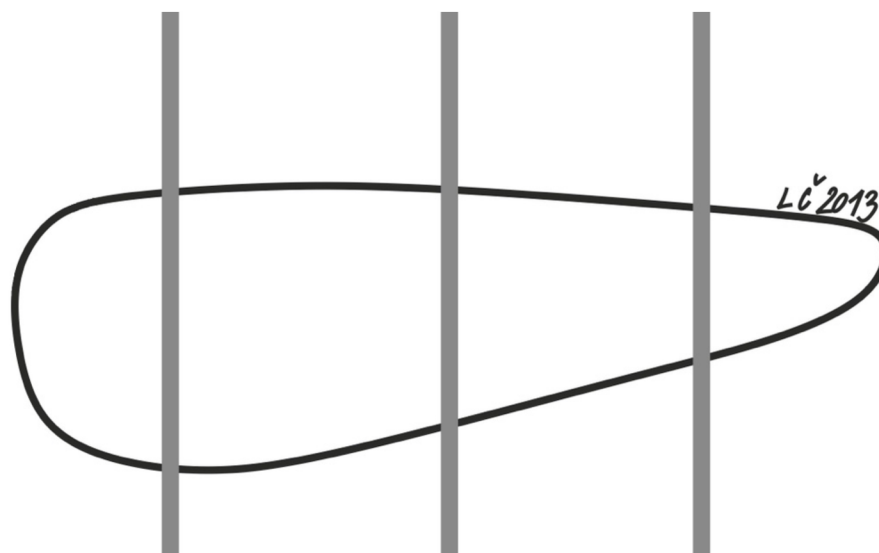
- *Část 3: Srovnání přítomnosti a složení částic v hleny z povrchu sliznice se složením částic ve sliznici u pacientů s CRS*

Od 9 náhodně vybraných pacientů z CRS skupiny byl předoperačně odebrán vzorek hlenu z hlavy dolní skořepy pomocí sterilní vatové štětičky, hlen byl natřen na mikroskopické sklíčko, vysušen a vzorky byly cytologicky vyšetřeny jedním patologem na Ústavu patologie FNO. Anonymizované vzorky byly odeslány k analýze v Centru nanotechnologií VŠB-TUO (96).

Obrázek 3.1 Schéma odběru nosní sliznice z dolní skořepky nosní při endoskopické mukotomii (šipka): a) sagitální řez (pohled na laterální stěnu dutiny nosní), b) koronární řez. S – horní nosní skořepka, M – střední nosní skořepka, N – nostrila, IN – dolní nosní skořepka, Un – processus uncinatus, Se – nosní septum.



Obrázek 3.2 Schéma vzorku nosní sliznice odebraného při mukotomii; vertikální linie ukazují rozdělení vzorku na části podle vzdálenosti od nostril: vlevo – nejbliže nostrilám (sliznice hlavy dolní skořepky), vpravo – nejdále od nostril (dorzální konec dolní skořepky).



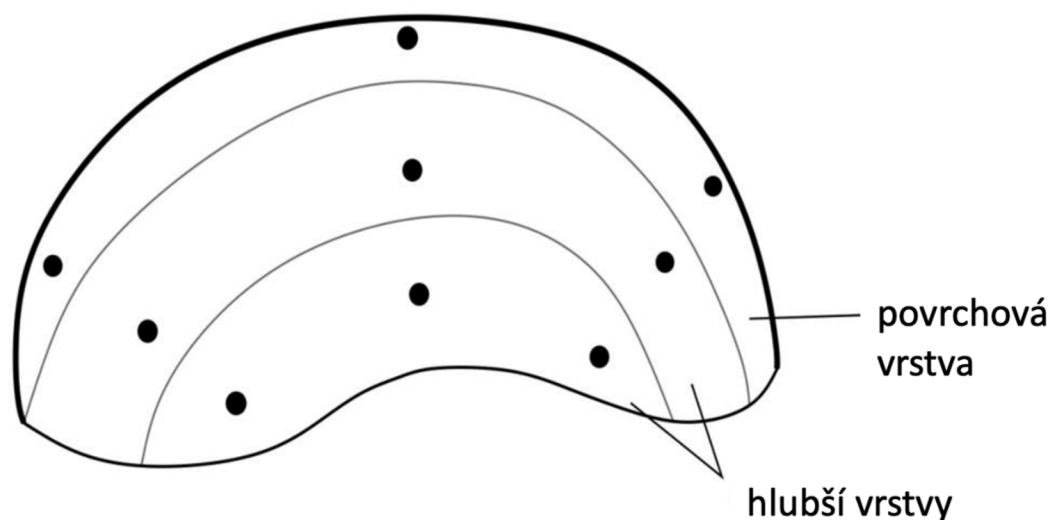
3.1.5 Analytické metody užité k detekci a charakterizaci částic

- *Část 1: Detekce, zjištění složení, distribuce a možnosti kvantifikace nano- a mikročástic v nosní sliznici u pacientů s CRS*

Pro morfologickou charakterizaci a zjištění elementárního složení částic detekovaných ve vzorcích sliznice byl použit skenovací elektronový mikroskop SEM (Quanta FEG 450, FEI) s rentgenovou mikroanalýzou APOLLO X (EDAX) a SEM Philips XL 30 pracující na 30 keV. Vzorky byly vyšetřeny v BSE (back-scattered electrons) módu umožňujícím vizuální detekci změn v elementárním složení – částice kovu, které rozptylují elektrony, například vypadají jako světlé tečky ve srovnání s tkání, která elektrony absorbuje, a proto se v BSE módu jeví jako tmavá. V tomto módu tedy byla vyšetřena celá plocha řezu tkání a byly analyzovány všechny světlé tečky.

Ramanova spektra charakterizující molekulární složení anorganických částic nebo jejich clusterů v tkáni byla získána pomocí Smart Raman Microscopy System XploRATM (HORIBA Jobin Yvon, France), s použitím 532 nm excitačního laserového zdroje, 100x objektivu a mřížkování 1200 žlábků/mm v rozsahu od 80 do 2000 cm^{-1} . Laserový paprsek s průměrem přibližně 0,5 μm umožňuje bodovou fázovou analýzu mikročástic. Ramanova mikrospektroskopická analýza byla provedena vždy ve 4 řezech z každého vzorku, každý řez z jiné části vzorku dle vzdálenosti od nostril. Pro kvantifikaci distribuce částic bylo zvoleno pole sestávající z 9 bodů s přibližně stejnými vzájemnými vzdálenostmi pokrývajícími celou plochu vzorku (obr. 3.3). Analyzované body byly vybrány tak, aby zahrnovaly oblast přímo pod povrchem sliznice (označena jako „povrchová vrstva“ – přibližná tloušťka 1 mm) a také oblasti hlouběji ve sliznici („hluboké vrstvy“ – 2 a více mm pod povrchem). Byla změřena a interpretována Ramanova spektra všech takto zvolených bodů (95).

Obrázek 3.3 Řez sliznicí s vyznačenými 9 body, které byly analyzovány pomocí RMS.



- *Část 2: Srovnání přítomnosti a molekulárního složení částic ve sliznici CRS skupiny a kontrolní skupiny*

Ramanova spektra charakterizující molekulární složení anorganických částic nebo jejich clusterů v tkáni byla získána pomocí Smart Raman Microscopy System XploRATM (HORIBA Jobin Yvon, France), s použitím 532 nm excitačního laserového zdroje (20-25 mW), 100x objektivu a mřížkování 1200 gr/mm v rozsahu od 100 do 2000 cm^{-1} . Intenzita laseru byla regulována s ohledem na povahu vzorku – byla nastavena nižší intenzita laserového paprsku, aby se snížilo riziko poškození organických složek. Zařízení XploRA umožňuje nastavit intenzitu laserového paprsku na 0,1, 1, 10, 25, 50 a 100 %. Akviziční čas a počet akumulací byly nastaveny u každého vzorku tak, aby byl maximálně redukován poměr signál/ruch. Bylo nastaveno mřížkování s 1200 žlábků/mm. Pomocí mikroskopu byly vizualizovány a vybrány oblasti zájmu, které byly analyzovány. Dále bylo provedeno Ramanovo mapování vybraných oblastí po 1 μm krocích. Změřená Ramanova spektra byla korigována pomocí LabSpec software od XploRATM (97).

- *Část 3: Srovnání přítomnosti a složení částic v hleny z povrchu sliznice se složením částic ve sliznici u pacientů s CRS*

Vzorky hlenu předoperačně odebrané od 9 náhodně vybraných pacientů a vzorky sliznice týchž pacientů byly vyšetřeny pomocí skenovací elektronové mikroskopie obdobným způsobem jako v části 1. Aby byla vyloučena možná kontaminace vzorků

štetíčkou použitou k nátěru hleny na sklíčko, byl zároveň vyšetřen „nulový“ vzorek nátěru fyziologického roztoku provedeného stejnou štetíčkou.

3.1.6 Hodnocení histologického nálezu

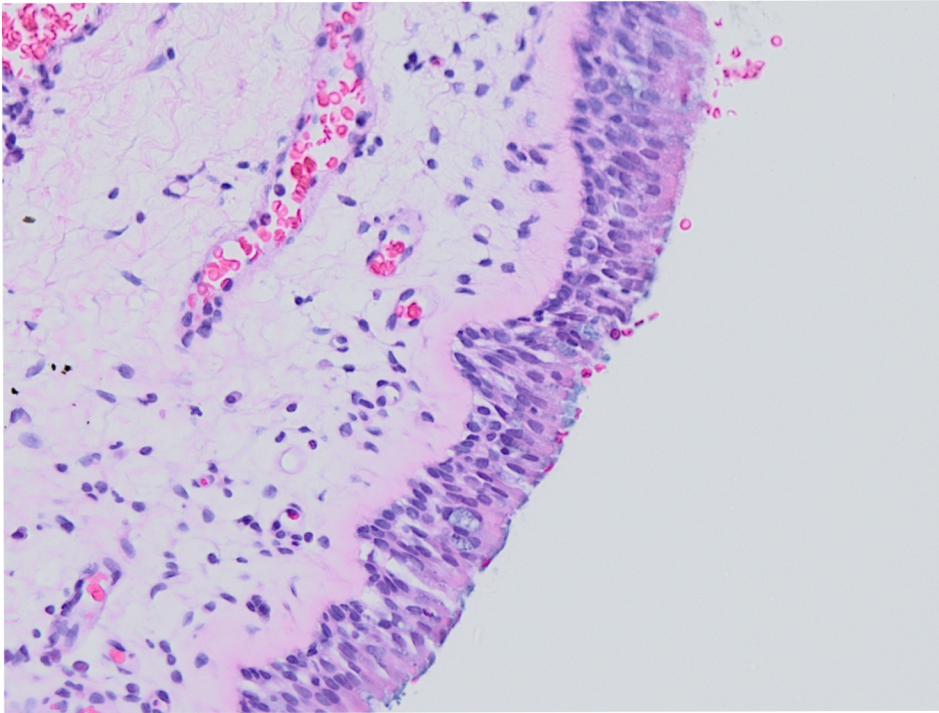
Histologický nálezn ve sliznici byl hodnocen v druhé části studie. Histologické známky zánětu byly vizuálně subjektivně posouzeny a hodnoceny podle známek závažnosti zánětu:

- 0 – normální histologie (bez zánětu);
- 1 – hyperplázie epitelu;
- 2 – hyperplázie epitelu s mírnými známkami zánětu v podslizničním vazivu;
- 3 – chronický zánět.

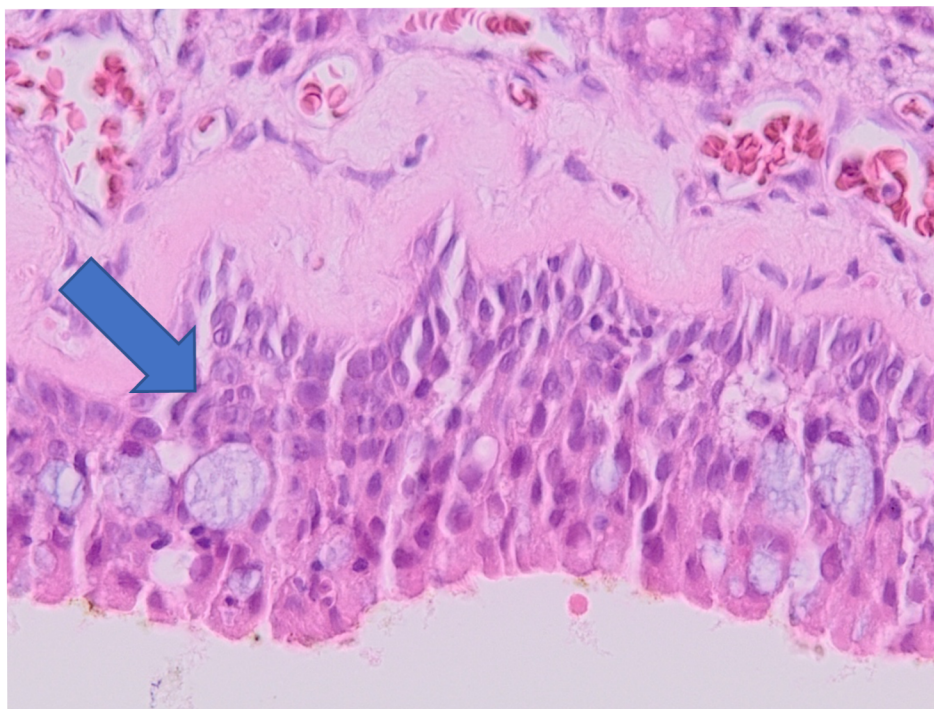
Hyperplázie epitelu byla definována jako přítomnost hyperplastického cylindrického epitelu se ztluštělou bazální membránou. Mírné známky zánětu v podslizničním vazivu byly definovány jako přítomnost „diskrétní“, „fokální“ či „minimální“ zánětlivé celulizace (lymfoplazmocytární celulizace s občasou přítomností neutrofilů a eozinofilů). Chronický zánět byl definován jako masivní přítomnost zánětlivé celulizace (přítomnost velkých clusterů lymfocytů s přítomností plazmocytů, makrofágů a fibroblastů a/nebo celkově masivní zánětlivá infiltrace tkáně – tedy ne fokální). Všechny vzorky byly hodnoceny jedním patologem.

Reprezentativní příklady histologických nálezů podle hodnocení závažnosti zánětu jsou prezentovány na obrázcích 3.4 - 3.7.

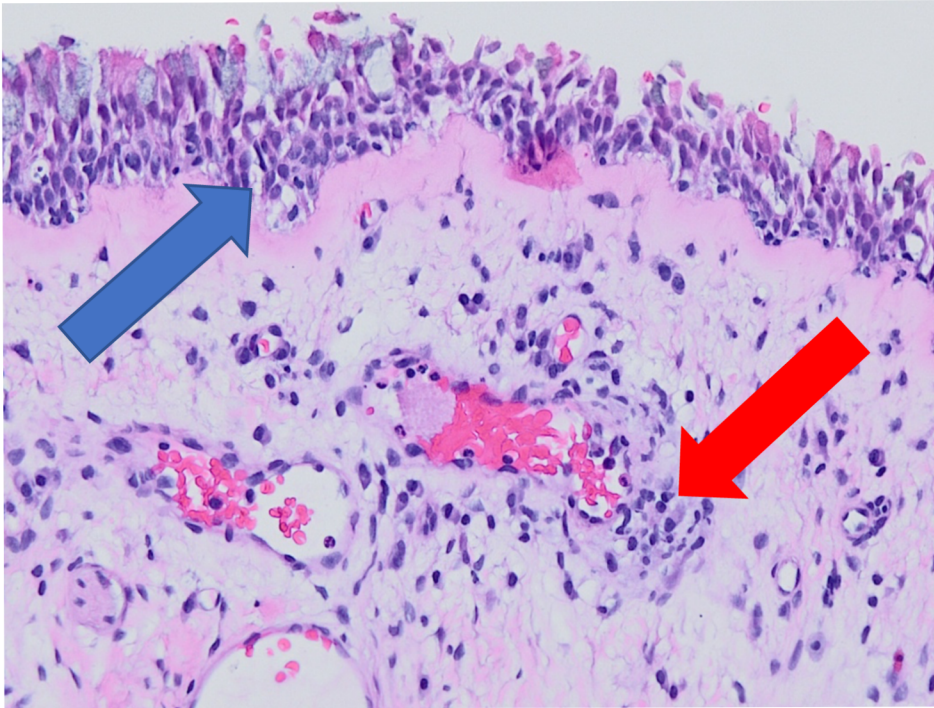
Obrázek 3.4 Normální histologie (bez známek zánětu, závažnost zánětu – stupeň 0). Optická mikroskopie, zvětšení 200x.



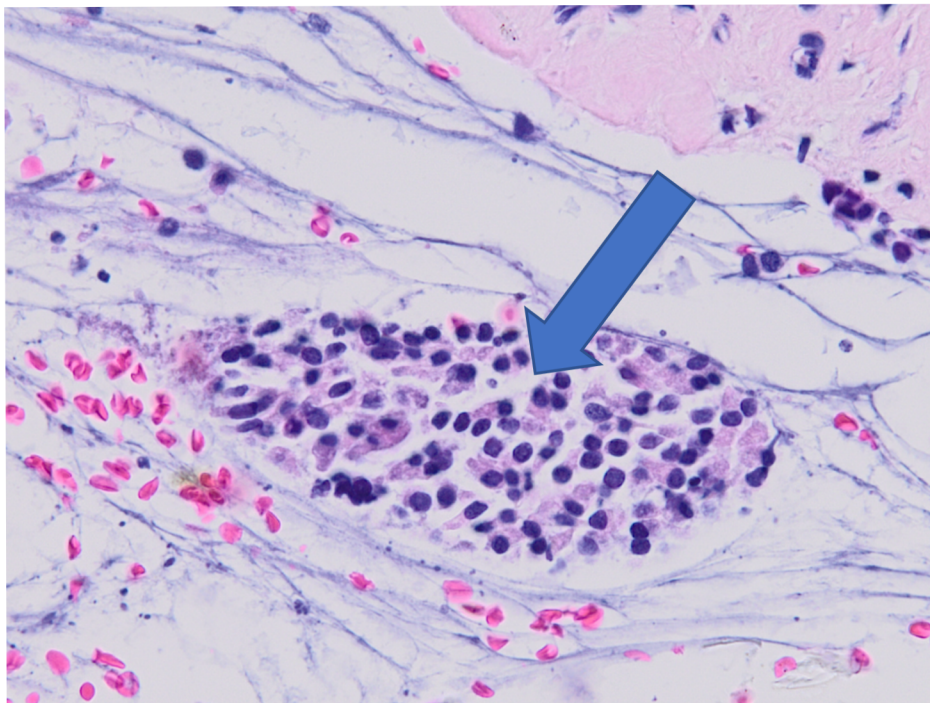
Obrázek 3.5 Hyperplázie epitelu (závažnost zánětu – stupeň 1). Šipka ukazuje na hyperplastický epitel. Optická mikroskopie, zvětšení 200x.



Obrázek 3.6 Hyperplázie epitelu s mírnými známkami zánětu v podslizničním vazivu (závažnost zánětu – stupeň 2). Modrá šipka ukazuje hyperplastický epitel a červená fokální zánětlivou celulizaci. Optická mikroskopie, zvětšení 200x.



Obrázek 3.7 Chronický zánět v podslizničním vazivu (závažnost zánětu – stupeň 3). Šipka ukazuje velký cluster zánětlivé celulizace. Optická mikroskopie, zvětšení 400x.



3.1.7 Korelace detekovaných částic, histologického nálezu a kuřácké a profesní anamnézy

Korelace detekovaných částic pomocí RMS, histologického nálezu a kuřácké a profesní anamnézy byla provedena ve druhé části studie.

- *Skupina CRS*

Pro tyto potřeby byla CRS skupina rozdělena na dvě podskupiny:

- skupina A (histologické známky zánětu 0 – 2, tj. žádný nebo minimální zánět)
- skupina B (histologické známky zánětu 3, tj. chronický zánět)

Přítomnost a chemické složení částic bylo porovnáno u obou skupin.

- *Kuřácká anamnéza*

Podle kuřácké anamnézy byla CRS skupina a kontrolní skupina rozdělena na podskupiny:

- kuřáci
- nekuřáci

- *Profesní anamnéza*

Podle profesní anamnézy byla CRS skupina kontrolní skupina rozdělena na podskupiny:

- skupina M - „manuální“ pracovníci
- skupina K - „kancelářští“ pracovníci

Do podskupin M a K byli pacienti rozděleni podle odhadovaného rizika profesionální expozice vzdušným polutantům (M – vysoké riziko, např. svářeč, klempíř, strážník; K – nízké riziko, např. manažer, programátor, student).

3.1.8 Statistické zpracování

Výsledky 1. a 3. části studie jsou čistě popisného charakteru o malém počtu obdržených dat, a proto nebyly zpracovány statisticky.

Data 2. části studie byla zpracována mnohorozměrnou korespondenční analýzou (multiple correspondence analysis, MCA) k posouzení obecných trendů variací obdržených výsledků. Pro potřeby statistické analýzy byly upraveny výsledky RMS – jmenovitě amorfní uhlík a grafit byly zahrnuty pod jednu jednotku, podobně jako ankerit a uhličitán vápenatý, síran barnatý a síran vápenatý, oxidy železa a sloučeniny titanu. Vztah histopatologického nálezu k detekovaným částicím byl zpracován popisnou statistikou. Byly posouzeny i další doplňkové proměnné (diagnóza – CRS vs. kontrolní skupina), kouření (kuřáci vs. nekuřáci), věk, pohlaví a povolání (manuální vs. „kancelářská“ práce). Multivariantní analýza byla

následována bivariantním srovnáním všech párů proměnných – t-testy pro kombinace číselných dat a jednotlivých kategorií a chí-kvadrát pro kombinace dvou různých kategorií.

3.2 Výsledky

3.2.1 Detekce, zjištění složení, distribuce a možnosti kvantifikace nano- a mikročástic v nosní sliznici u pacientů s CRS

Hypotéza 1: Při CRS vstupují pevné anorganické nano- a mikročástice přítomné v ovzduší jako součást jeho znečištění přes porušenou slizniční bariéru do submukózy a deponují i v hlubších vrstvách sliznice.

Bylo vyšetřeno celkem 6 vzorků (M1 – M6) od pacientů s CRS s cílem ověřit přítomnost mikro- a nanočástic v nosní sliznici odebrané při endoskopické mukotomii, jejich složení a distribuci v nosní sliznici a možnost jejich kvantifikace pomocí skenovací elektronové mikroskopie a Ramanovy mikrospektroskopie (tab. 3.1) (95).

Tabulka 3.1 Demografická data pacientů M1 – M2.

vzorek	pohlaví	věk (roky)	profese
M1	m	78	svářeč v důchodu
M2	m	38	programátor
M3	m	38	svářeč
M4	m	65	strážník
M5	ž	26	studentka
M6	ž	44	dělnice

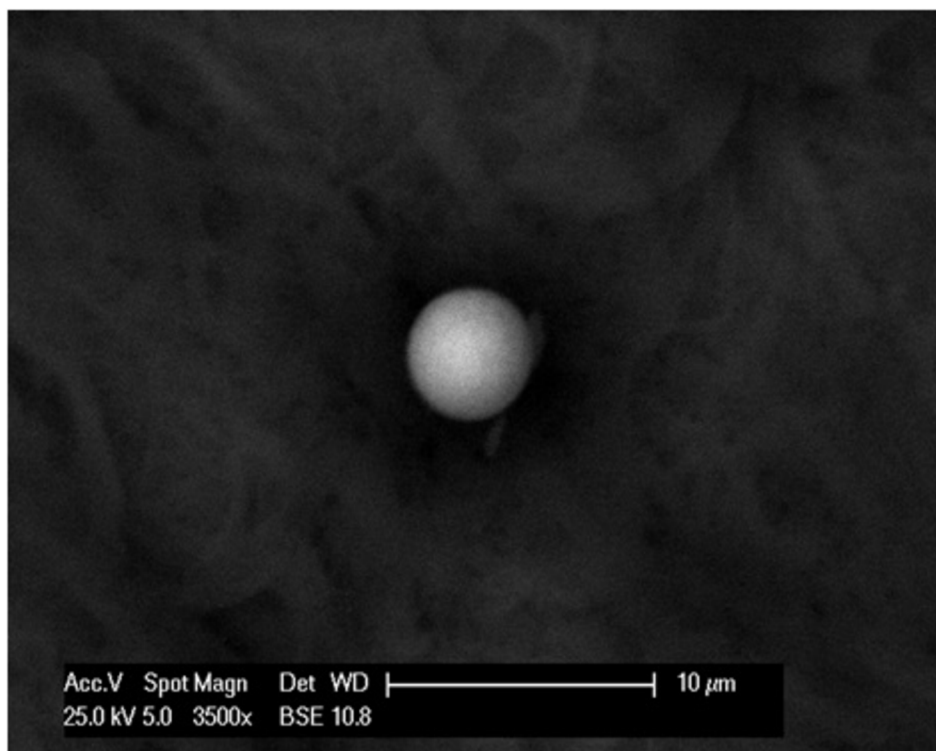
- *Složení částic*

Ve všech vzorcích byly nalezeny mikročástice různého elementárního a molekulárního složení, mnohdy jako shluky menších částic. Prvky detekované pomocí SEM v různých částech vzorků v závislosti na vzdálenosti od nostril jsou vyjmenovány v tabulce 3.2. Nejvíce zastoupený prvek bylo železo, dále barium, měď, titan a zinek.

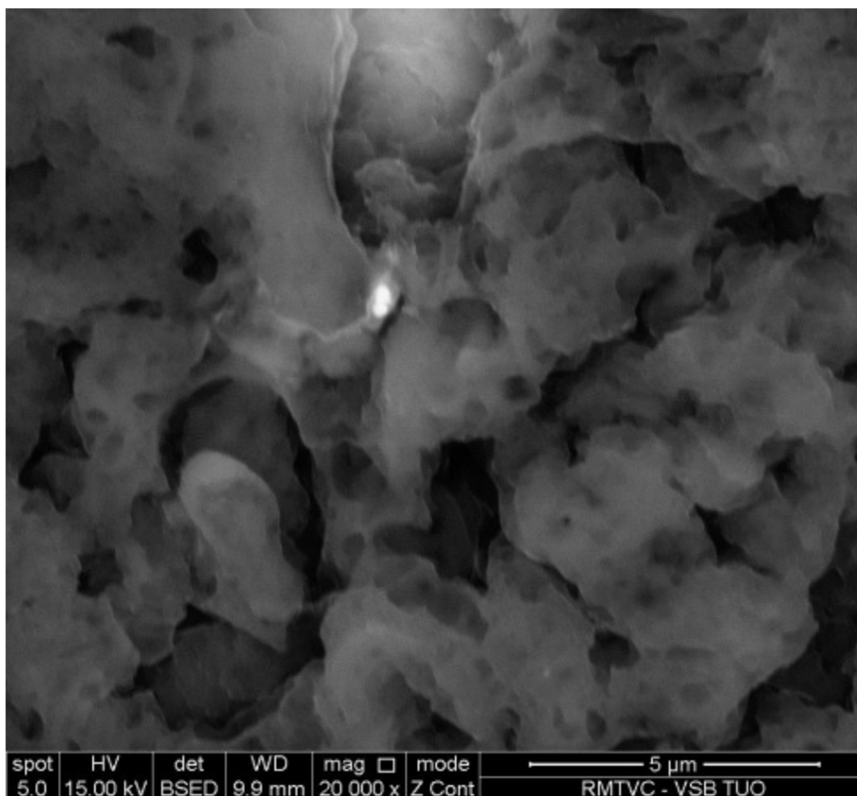
- *Velikost a tvar částic*

Částice detekované pomocí SEM byly velikosti od nanorozměrů po přibližně 10 μm , většina ve formě agregátů nebo aglomerátů; morfologicky byly kulovité či polygonální (obr. 3.8 a 3.9). Reprezentativní příklad kulovité částice kovu (železa) byl nalezen ve sliznici svářeče (vzorek M1) (obr. 3.8).

Obrázek 3.8 Kulovitá částice železa ve vzorku M1 v obrazu SEM (zvětšení 3500x).



Obrázek 3.9 Agregát obsahující barium ve vzorku M3 v obrazu SEM (zvětšení 20000x).



- *Interindividuální rozdíly mezi vzorky*

Byly zjištěny interindividuální rozdíly elementárního složení mezi jednotlivými vzorky (tab. 3.2). Největší zastoupení různých prvků bylo zjištěno u pacientů, kteří byli profesionálně vystaveni emisím vznikajícím při sváření (vzorky M1 a M3). U těchto pacientů bylo nalezeno železo ve všech analyzovaných řezech.

Tabulka 3.2 Prvky detekované ve sliznici pomocí SEM. 1 – část nejbližšího nostrilu, 2 a 3 – střední části, 4 – část nejbližšího choanu.

		Vzorky																							
Prv- ky	M1				M2				M3				M4				M5				M6				
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
Ba	x	x				x	x			x	x	x	x		x										x
Cd																									
Cu				x			x	x	x	x	x	x													
Cr				x						x	x														
Fe	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mn			x									x													
Mo	x																								
Ni				x							x	x	x												
Pb									x																
Ti								x	x	x	x	x			x	x									
Zn		x		x				x		x		x													

- *Analýza distribuce a množství částic pomocí RMS*

Analýza distribuce částic byla provedena pomocí systému zvolených 9 bodů, který byl popsán výše. Detekované částice a jejich molekulární složení jsou uvedeny v tabulce 3.3. Byla zjištěna větší incidence částic v částech dále od nostril (části 2 – 4), zatímco v části 1 (nejblíže k nostrilám) bylo nalezeno méně částic.

Tabulka 3.3 Částice detekované v různých částech vzorků sliznice pomocí RMS. P – povrchová vrstva sliznice, H – hluboké vrstvy sliznice. Anatas - TiO₂, rutil - TiO₂, kalcit - CaCO₃, magnetit - Fe₃O₄, barit - BaSO₄, siderit - FeCO₃. Anatas a rutil jsou rozdílné krystalické formy oxidu titaničitého (TiO₂). Grafit je krystalická forma elementárního uhlíku.

		Vzorky																							
Částice	M1				M2				M3				M4				M5				M6				
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
Anatas	H	H				P				P				P		P									
Rutil								H																	
Kalcit		H			H	P																			
Magnetit								P			P														
Barit																									
Siderit				H												P	P				P				
Grafit		H									P*		P		P		H				P			P	
Amorfni uhlík	H	H	P										P	H										P	

*detekován dvakrát

Částice byly detekovány jak v povrchových, tak v hlubokých vrstvách sliznice (tab. 3.3). Byly zjištěny interindividuální rozdíly – ve vzorku M1 (svářeč v důchodu) bylo více částic nalezeno v hlubokých vrstvách sliznice, zatímco ve vzorcích M3, M4 a M6 (M3 – svářeč, M4 – strážník, M6 – dělnice) byly částice nalezeny především v povrchové vrstvě sliznice. Ve vzorcích M2 a M5 (M2 – programátor, M5 – studentka) bylo nalezeno přibližně stejné množství částic v povrchové i v hlubokých vrstvách sliznice.

Hypotéza 1 byla potvrzena: Při CRS vstupují pevné anorganické nano- a mikročástice přítomné v ovzduší přes porušenou slizniční bariéru do submukózy a deponují se i v hlubších vrstvách sliznice.

3.2.2 Srovnání přítomnosti a molekulárního složení částic ve sliznici CRS skupiny a kontrolní skupiny

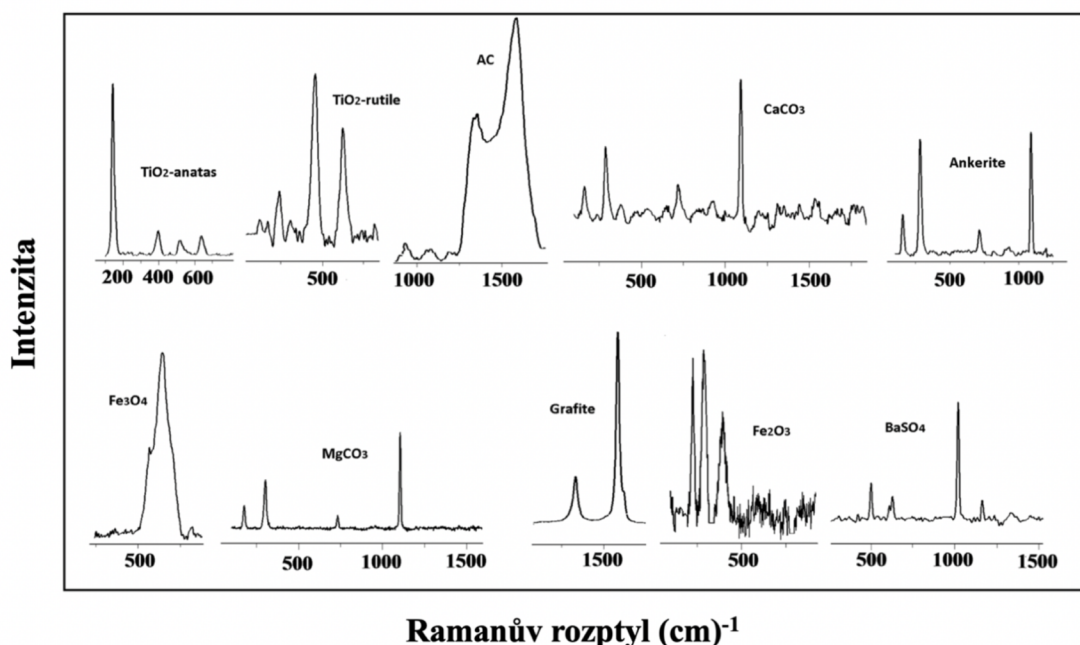
Hypotéza 2: U zdravých jedinců na rozdíl od pacientů s CRS anorganické nano- a mikročástice do sliznice nevstupují a nedeponují se v ní.

Hypotéza 3: Složení částic detekovaných ve sliznici je ovlivněno profesionální expozicí jejich zdrojům (např. při sváření) a kouřením.

Byla zjištěna a srovnána přítomnost a molekulární složení částic ve sliznici pacientů s CRS a ve sliznici kontrolní skupiny (kadaveři bez anamnézy CRS). Tato data byla korelována s histologickým nálezem, kouřením a profesionální expozicí s cílem stanovit možnou souvislost přítomnosti detekovaných částic s mírou zánětlivých změn ve sliznici a tím jejich možnou roli v etiopatogenezi CRS.

Bylo vyšetřeno celkem 40 vzorků od pacientů s CRS (M1 – M4) a 10 vzorků od kadaverózních dárců bez anamnézy CRS (R1 – R10) (tab. 3.4 a 3.5). Bylo provedeno histologické vyšetření jedním patologem a k detekci částic a jejich charakterizaci co do molekulárního složení byla použita RMS (obr. 3.10).

Obrázek 3.10 Vybraná Ramanova spektra částic detekovaných ve sliznici v CRS skupině, získaná Ramanovou mikrospektroskopií. $\text{TiO}_2\text{-A}$ – anatas, $\text{TiO}_2\text{-R}$ – rutil, AC – amorfni uhlík, CaCO_3 – kalcit, $\text{CaFe}(\text{CO}_3)_2$ – ankerit, Fe_3O_4 – magnetit, Fe_2O_3 – hematit, MgCO_3 – uhličitan hořečnatý, GR – grafit, BaSO_4 – barit. Upraveno podle Čabanové a kol. (97).



Tabulka 3.4 Skupina pacientů s CRS: demografické údaje, kuřácká anamnéza, detekované částice a míra zánětlivých změn; upraveno podle Čabanové a kol. (97).

vzorek	pohlaví	věk	kouření	profese	detekované částice	histologie
M11	m	42	A	zedník (M)	GR	0
M32	m	31	N	administrátor (K)	AC, Al comp., ankerite	0
M1	m	78	N	svářeč v důchodu (M)	AC, ankerite, CaCO ₃ , GR, TiO ₂ -A	1
M2	m	38	N	programátor (K)	CaCO ₃ , Fe ₃ O ₄ , TiO ₂ -A, TiO ₂ -R	1
M3	m	38	N	svářeč (M)	AC, CaSO ₄ , Fe ₃ O ₄ , GR, TiO ₂ -A	1
M4	m	65	A	strážník (M)	AC, ankerite, GR, TiO ₂ -A, TiO ₂ -R	1
M14	m	32	N	strážník (M)	AC, Fe ₂ O ₃ , GR, TiO ₂ -A	1
M16	m	44	A	řidič (M)	CaCO ₃ , GR, TiO ₂ -A, TiO ₂ -R	1
M17	ž	42	N	skladnice (M)	ankerite, BaSO ₄ , TiO ₂ -A	1
M18	m	34	A	kurýr (M)	AC, CaCO ₃ , GR, SiO ₂ , TiO ₂ -A	1
M20	m	35	A	klempíř (M)	ankerite, CaCO ₃ , GR, SiO ₂	1
M33	m	43	N	operátor výroby (M)	AC, GR, TiO ₂ -A	1
M35	ž	65	N	manažerka (K)	CaCO ₃ , TiO ₂ -R	1
M40	m	54	N	exekutor (K)	-	1
M8	m	44	A	dělník (M)	CaCO ₃ , GR	2
M10	m	37	N	manažer (K)	GR, TiO ₂ -A	2
M21	m	31	N	dělník (M)	ankerite, GR	2
M22	m	28	N	kovoobráběč (M)	TiO ₂ -A	2
M25	m	44	N	výkonný ředitel (K)	AC, Si comp., TiO ₂ -A, TiO ₂ -R	2
M28	m	42	A	policista (M)	AC, ankerite, BaSO ₄ , GR	2
M29	m	25	A	nezaměstnaný (K)	AC, GR, TiO ₂ -A	2
M30	m	39	A	svářeč (M)	AC, Al comp., (Ca, Mg)CO ₃	2
M5	ž	26	N	studentka (K)	Fe ₃ O ₄ , GR	3
M6	ž	44	N	dělnice (M)	AC, CaCO ₃	3
M7	m	28	N	studentka (K)	GR	3
M9	ž	58	N	umělkyně (K)	GR, TiO ₂ -A	3
M12	ž	45	N	manažerka (K)	GR, TiO ₂ -A	3
M13	m	40	N	úředník (K)	Fe ₂ O ₃ , TiO ₂ -A	3
M15	ž	53	N	prodavačka (M)	ankerite, GR, TiO ₂ -A	3
M19	m	48	N	číšník (M)	ankerite, CaCO ₃ , Fe ₂ O ₃ , SiO ₂ , TiO ₂ -A	3
M23	m	28	N	operátor výroby (M)	TiO ₂ -A	3
M24	m	54	N	policista (M)	AC, GR	3
M26	m	42	N	výpravčí (M)	AC, CaCO ₃ , GR	3
M27	m	25	N	student (K)	AC	3
M31	ž	20	N	studentka (K)	GR, TiO ₂ -A, TiO ₂ -R	3
M34	ž	41	N	švadlena (M)	GR, TiO ₂ -A	3
M36	m	36	N	IT technik (K)	GR, TiO ₂ -A	3
M37	m	44	N	vedoucí výroby (M)	-	3
M38	m	34	N	elektrikář (M)	-	3
M39	m	55	N	podnikatel (K)	-	3

Zkratky: m – muž, ž – žena, A – ano, N – ne, M – manuální práce, K – kancelářská práce, GR – grafit, AC – amorfni uhlík, comp. – kompositum, TiO₂-A – anatas, TiO₂-R – rutil
 Histologie (míra zánětlivých změn): 0 – normální histologie (bez zánětu), 1 – hyperplázie epitelu, 2 – hyperplázie epitelu s mírnými známkami zánětu, 2 – chronický zánět

Tabulka 3.5 Kontrolní skupina: demografické údaje, kuřácká anamnéza a detekované částice.

vzorek	pohlaví	věk	kouření	povolání	detekované částice
R1	m	71	N	M	-
R2	m	57	A	M	-
R3	m	77	N	M	TiO ₂
R4	ž	78	N	K	AC
R5	m	44	N	M	-
R6	m	67	A	M	-
R7	m	37	A	M	-
R8	ž	87	N	K	-
R9	ž	84	N	K	-
R10	ž	84	N	K	-

Zkratky: m – muž, ž – žena, A – ano, N – ne, M – manuální práce, K – kancelářská práce, AC – amorfni uhlík

- *Detekované částice*

Pevné anorganické mikročástice a cluster nanočástice průměrné velikosti 0,5 μm byly detekovány v 90 % (36/40) vzorků sliznice z CRS skupiny a u 20 % (2/10) vzorků z kontrolní skupiny. Úplný přehled detekovaných částic je uveden v tabulce 3.4. Nejčastěji detekované částice v CRS skupině byly TiO₂ (anatas, rutil), amorfni uhlík, CaCO₃ (kalcit), Ca(Fe, Mg, Mn)(CO₃)₂ (ankerit) and oxidy železa - Fe₃O₄ (magnetit) a Fe₂O₃ (hematit). BaSO₄ (barit), hliník a křemíky byly detekovány sporadicky. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 3.6.

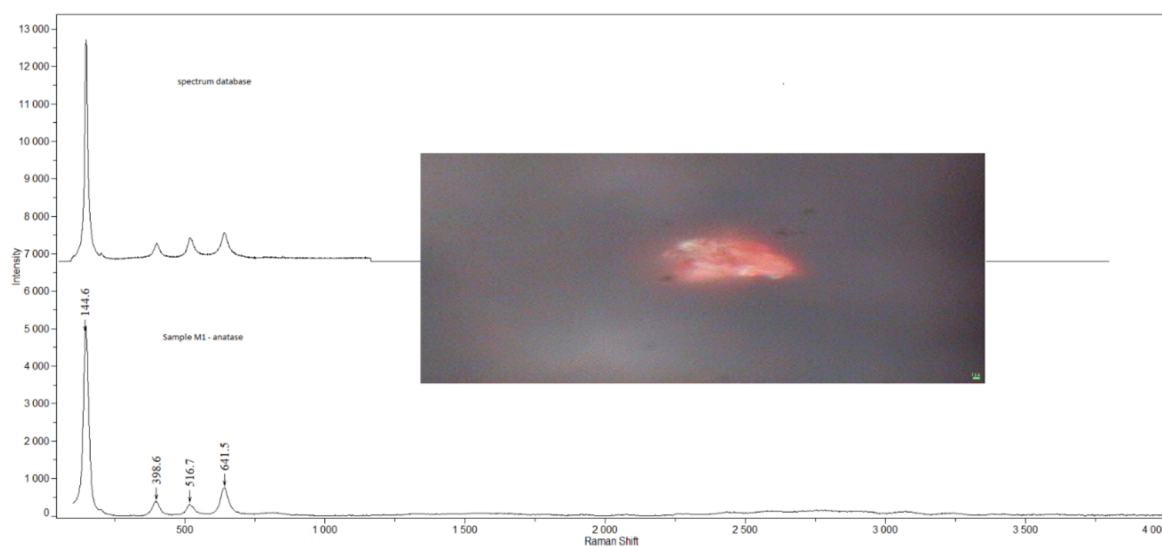
V kontrolní skupině byly pevné anorganické částice detekovány pouze ve dvou vzorcích - TiO₂ (anatas) ve vzorku R3 a amorfni uhlík ve vzorku R4; v ostatních vzorcích tyto částice nebyly detekovány.

Příklady Ramanových spekter a zobrazení pomocí EM jsou uvedeny na obrázcích 3.11 - 3.13.

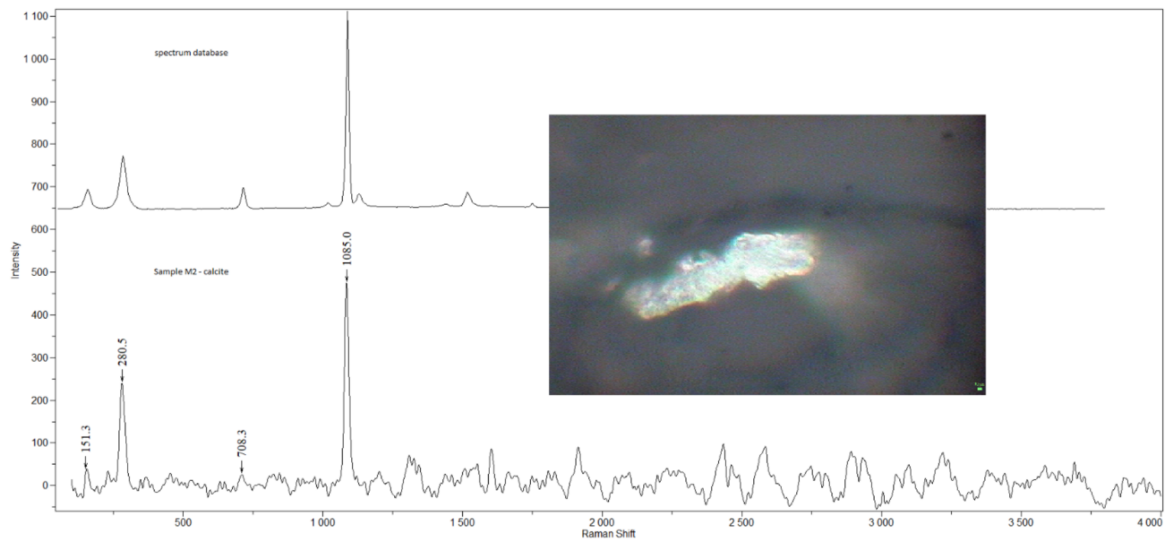
Tabulka 3.6 Nejčastěji detekované částice v CRS skupině (celkem 40 vzorků).

Částice	Počet vzorků/40	Procento vzorků
grafit	24	60,0%
TiO ₂	23	57,5%
amorfní uhlík	15	37,5%
CaCO ₃	10	25,0%
Ca(Fe, Mg, Mn)(CO ₃) ₂	9	22,5 %
oxidy železa	6	15,0%

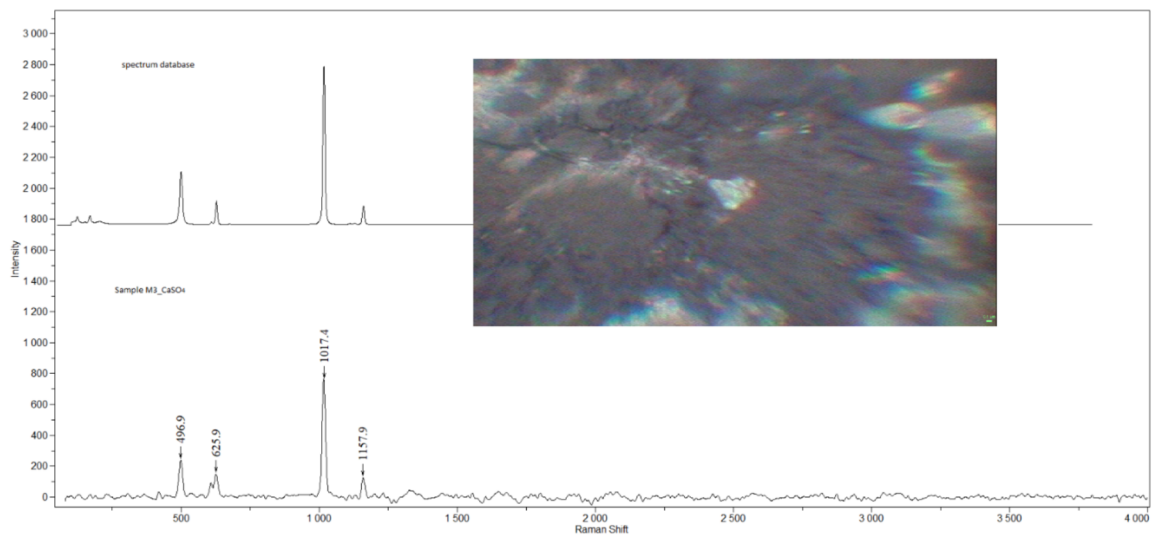
Obrázek 3.11 Ramanova spektra a EM zobrazení anatasu ve vzorku M1.



Obrázek 3.12 Ramanova spektra a EM zobrazení kalcitu ve vzorku M2.



Obrázek 3.13 Ramanova spektra a EM zobrazení CaSO_4 ve vzorku M3.



- *Histologie*

Alespoň mírné známky zánětu byly zjištěny v 95 % (38/40) vzorků CRS skupiny (tab. 3.7). Histologie všech vzorků z kontrolní skupiny byla hodnocena jako normální.

Tabulka 3.7 Závažnost zánětu v CRS skupině (celkem 40 vzorků).

Závažnost zánětu	Počet vzorků/40	Procento vzorků
0 (bez zánětu)	2	5,0%
1 (hyperplázie epitelu)	13	32,5%
2 (mírné známky zánětu)	7	17,5%
3 (chronický zánět)	18	45,0%

- *Korelace histologického nálezu a detekovaných částic v CRS skupině*

Ve skupině A (míra zánětu 0 – 2) byly nejčastěji detekovány grafit a oxid titaničitý, stejně jako ve skupině B (míra zánětu 3). Další detekované částice v obou skupinách jsou shrnuty v tabulce 3.8.

Tabulka 3.8 Detekované částice ve vztahu k histologickému nálezu. Skupina A: míra zánětu 0 – 2 – 55 % (22/40) vzorků / skupina B: míra zánětu 3 – 45 % (18/40) vzorků.

Detekované částice	Skupina A	Skupina B
grafit	63,0 % (14/22)	55,6 % (10/18)
TiO ₂ (anatas, rutil)	63,0 % (14/22)	50,0 % (9/18)
amorfní uhlík	31,8 % (7/22)	22,2 % (4/18)
CaCO ₃ (kalcit)	31,8 % (7/22)	16,7 % (3/18)
Ca(Fe,Mg,Mn)(CO ₃) ₂ (ankerit)	31,8 % (7/22)	11,1 % (2/18)
Fe ₃ O ₄ (magnetit) a Fe ₂ O ₃ (hematit)	13,6 % (3/22)	16,7 % (3/18)

- *Korelace anamnézy kouření a detekovaných částic*

V CRS skupině bylo 9/40 kuřáků (22,5 %) a v kontrolní skupině 3/10 (30,0 %). Všechny vzorky kuřáků v CRS skupině náležely k histologické skupině A (žádný nebo mírný zánět) (tab. 3.9). V kontrolní skupině náležely oba vzorky, v nichž byly detekovány anorganické částice (TiO₂ a amorfni uhlík), nekuřákům.

Tabulka 3.9 Detekované částice ve vztahu k anamnéze kouření u CRS skupiny.

Detekované částice	Kuřáci	Nekuřáci
grafit	88,9 % (8/9)	51,6 % (19/31)
TiO ₂ (anatas, rutil)	44,4 % (4/9)	61,3 % (19/31)
amorfni uhlík	55,6 % (5/9)	32,3 % (10/31)
CaCO ₃ (kalcit)	44,4 % (4/9)	19,4 % (6/31)
Ca(Fe,Mg,Mn)(CO ₃) ₂ (ankerit)	33,3 % (3/9)	19,4 % (6/31)
Fe ₃ O ₄ (magnetit) a Fe ₂ O ₃ (hematit)	0 % (0/9)	19,4 % (6/31)

- *Korelace pracovní anamnézy a detekovaných částic*

V CRS skupině byl nejčastěji nalezenou částicí u „manuálních“ pracovníků grafit. U „kancelářských“ pracovníků byl nejčastěji nalezen oxid titaničitý. U „manuálních“ pracovníků byly všechny analyzované částice nalezeny častěji než u „kancelářských“ pracovníků, s výjimkou oxidů železa (tab. 10).

V kontrolní skupině byl TiO₂ nalezen u „manuálního“ pracovníka a amorfni uhlík u „kancelářského“ pracovníka.

Tabulka 3.10 Detekované částice ve vztahu k pracovní anamnéze v CRS skupině. Skupina M – „manuální“ práce, skupina K – „kancelářská“ práce.

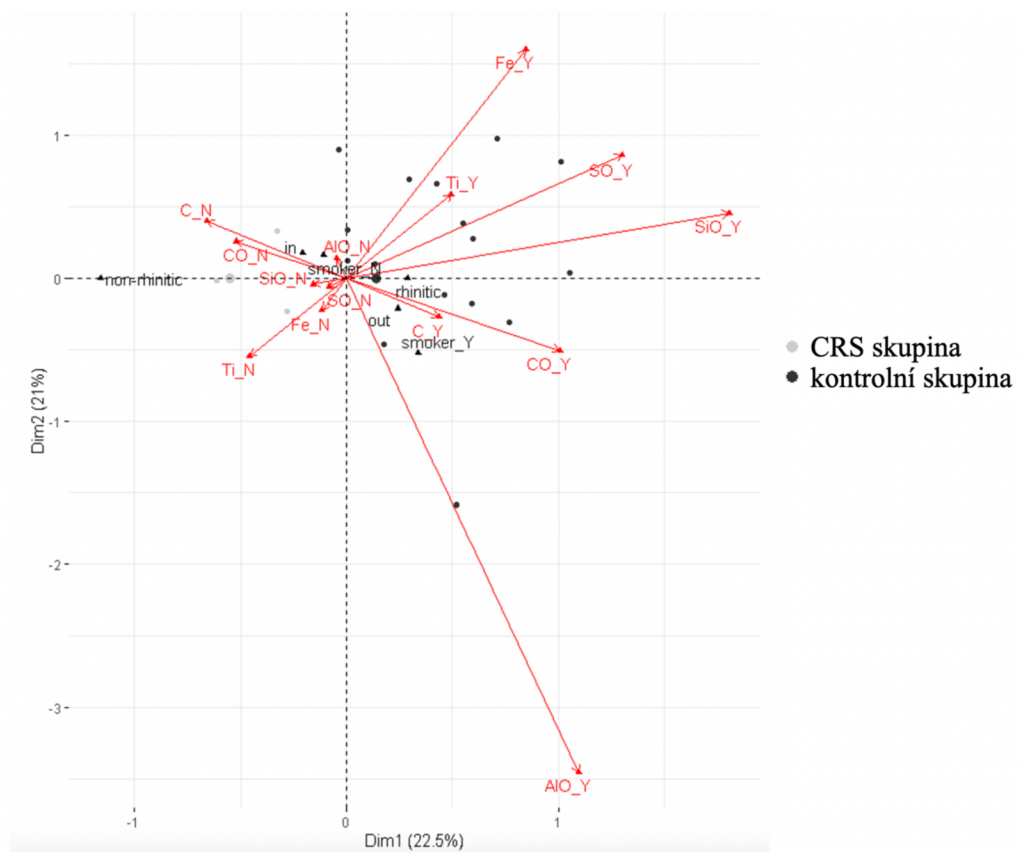
Detekované částice	Skupina M	Skupina K
grafit	77,3 % (17/22)	38,9 % (7/18)
TiO ₂ (anatas, rutil)	59,1 % (13/22)	55,5 % (10/18)
amorfni uhlík	50,0 % (11/22)	22,2 % (4/18)
CaCO ₃ (kalcit)	36,4 % (8/22)	11,1 % (2/18)
Ca(Fe,Mg,Mn)(CO ₃) ₂ (ankerit)	36,4 % (8/22)	5,6 % (1/18)
Fe ₃ O ₄ (magnetit) a Fe ₂ O ₃ (hematit)	14,6 % (3/22)	16,7 % (3/18)

- *Multivariantní analýza*

Biplot mnohorozměrné korespondenční analýzy (MCA) je na obrázku 3.16. Z proměnných použitých pro konstrukci modelu, přítomnost uhličitanu (CO, $\cos^2 = 0,524$), uhlíku (C, $\cos^2 = 0,288$) a SiO ($\cos^2 = 0,284$) je dobře reprezentována na první ose; AlO ($\cos^2 = 0,497$) a Ir ($\cos^2 = 0,35$) na druhé ose a Ti na prvních dvou osách ($\cos^2 = 0,227$ na první a $0,318$ na druhé). Doplňkové proměnné jsou seřazeny především podle první osy, přičemž nejnápadnější proměnná je diagnóza – jediná signifikantně vyjádřená z doplňkových proměnných na první ose ($\cos^2 = 0,336$). Ostatní doplňkové proměnné nemají korelaci s žádnou osou, s výjimkou kouření a druhé osy.

Tyto výsledky ukazují na rozdíl mezi částicemi nalezenými ve sliznici CRS a kontrolní skupinou. Korelace kouření a druhé osy ukazuje možný vztah kouření a přítomnosti AlO, Ir a Ti.

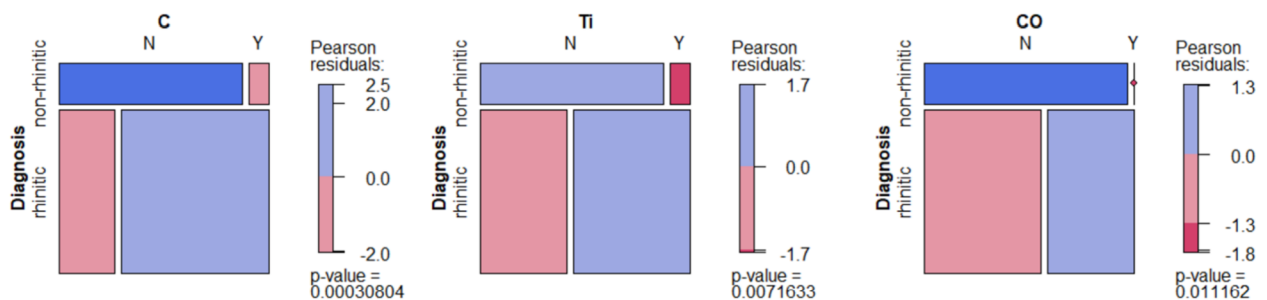
Obrázek 3.16 MCA biplot. Upraveno podle Čabanové a kol. (97).



- *Bivariantní analýza*

- Byla zjištěna signifikantní asociace pracovní anamnézy a kouření. Kuřáci v datovém souboru měli ve sliznici častěji přítomné CO (oxidy uhlíku) ($p = 0,04$); nicméně toto pozorování nelze oddělit od „manuální“ práce a přítomnosti CO ($p = 0,01$) – manuální pracovníci měli větší tendenci ke kouření.
- S ohledem na kritérium diagnózy (CRS skupina/kontrolní skupina) byla pozorována signifikantní asociace pro C (elementární uhlík – grafit nebo amorfni uhlík), Ti (titan) a CO pomocí chi-kvadrátu testu dobré shody ($p < 0,01$, $p = 0,01$ a $p = 0,01$). V CRS skupině byly tyto částice přítomny ve sliznici častěji než v kontrolní skupině (obr. 3.17).

Obrázek 3.17 Asociace C, Ti a CO s diagnózou (rhinitic = CRS skupina, non-rhinitic = kontrolní skupina; červená – málo zastoupená kategorie, modrá – významně zastoupená kategorie). Upraveno podle Čabanové a kol. (97).



Hypotéza 2 byla potvrzena: U zdravých jedinců narozdíl od pacientů s CRS částice do sliznice nevstupují a nedeponují se v ní.

Hypotéza 3 byla potvrzena: Složení částic detekovaných ve sliznici je ovlivněno profesionální expozicí jejich zdrojům a kouřením.

3.2.3 Srovnání přítomnosti a složení částic v hlenu z povrchu sliznice se složením částic ve sliznici u pacientů s CRS

Ve třetí části studie bylo pomocí SEM a RMS vyšetřeno 9 vzorků hlenu od pacientů z CRS skupiny (tab. 3.11). Výsledky měření RMS vzorků hlenu nejsou uvedeny, neboť pomocí této metody nebyly ve vzorcích nalezeny žádné částice (96).

Tabulka 3.11 Přehled prvků/sloučenin detekovaných v hlenu, resp. nosní sliznici pomocí SEM a RMS. Upraveno podle Čabanové a kol. (96).

vzorek	pohlaví	věk	kouření	povolání	částice v hlenu (SEM)	částice ve sliznici (SEM)	částice ve sliznici (RMS)
M10/C5	m	37	N	manažer	<i>Fe, Mn, Zn</i>	<i>Ba, Fe</i>	GR, TiO ₂ -A
M12/C9	ž	45	N	manažerka	<i>Fe, Ti</i>	<i>Fe, Cu</i>	GR, TiO ₂ -A
M15/C8	ž	53	N	prodavačka	<i>Cr, Fe, Ni</i>	<i>Fe</i>	ankerit, GR, TiO ₂ -A
M17/C3	ž	42	N	skladnice	<i>Ba</i>	<i>Ba, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Ti, Zn</i>	ankerit, BaSO ₄ , TiO ₂ -A
M18/C2	m	34	A	kurýr	<i>Ba, Fe</i>	<i>Ba, Cu, Fe, Ti, Zn</i>	AC, CaCO ₃ , GR, SiO ₂ , TiO ₂ -A
M21/C4	m	31	N	dělník	<i>Fe, Cr, Zn</i>	<i>Ba, Fe, Ti</i>	ankerit, GR
M22/C7	m	28	N	kovoobráběč	<i>Ti, Zn</i>	<i>Fe, Ti, Zn</i>	TiO ₂ -A
M23/C6	m	28	N	operátor výroby	<i>Cr, Fe, Mn, Ti</i>	<i>Fe</i>	TiO ₂ -A
M25/C1	m	44	N	výkonný ředitel	<i>Fe, Zn</i>	<i>Ba, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Zn</i>	AC, Si comp., TiO ₂ -A, TiO ₂ -R

Vyznačení kurzívou znamená podobné složení částic detekovaných v hlenu a ve sliznici.

- *Složení a velikost detekovaných částic*

Ve všech případech byly v hľenu a ve sliznici nalezeny částice nebo jejich clustery obsahující shodné prvky. Jednalo se především o částice obsahující železo, zinek, barium a titan (tab. 3.11). V hľenu i sliznici byly nalezeny částice mikro- i nanorozměřů (tab. 3.12). Částice nalezené v hľenu měly v průměru menší velikost než částice nalezené ve sliznici.

Tabulka 3.12 Velikost částic kovu měřená pomocí SEM v hľenu a nosní sliznici.

Upraveno podle Čabanové a kol. (96).

vzorek	Přibližná velikost detekovaných částic (μm)								
	Ba	Cu	Cr	Fe	Mn	Mo	Ni	Ti	Zn
M10/C5	-/4	-/-	-/-	6/≤ 1	7/-	-/-	-/-	-/-	6/-
M12/C9	-/-	-/5	-/-	10/3	-/-	-/-	-/-	2/-	-/-
M15/C8	-/-	-/-	2/-	≤ 1/3	-/-	-/-	2/-	-/-	-/-
M17/C3	1/≤ 1	-/≤ 1	-/2	-/2	-/2	-/2	-/≤ 1	-/2	-/≤ 1
M18/C2	≤1/2	-/≤ 1	-/-	1/2	-/-	-/-	-/-	-/≤ 1	-/10
M21/C4	-/3	-/-	2/-	2/2	-/-	-/-	-/-	-/≤ 1	3/-
M22/C7	-/-	-/-	-/-	-/8	-/-	-/-	-/4	2/-	≤ 1/7
M23/C6	-/-	-/-	5/-	2/2	5/-	-/-	-/-	5/-	-/-
M25/C1	-/4	-/5	-/2,5	≤ 1/4	-/8	-/-	-/2.5	-/-	2/3

- *Korelace přítomnosti prvků v hľenu a sliznici*

Ve všech případech byly v hľenu a ve sliznici nalezeny částice nebo jejich clustery obsahující shodné prvky. Jednalo se především o částice obsahující železo, zinek, barium a titan (tab. 3.11). Co do velikosti částic, v hľenu i sliznici byly nalezeny částice mikro- i nanorozměřů; přibližná velikost částic v jednotlivých vzorcích je uvedena v tabulce 3.12. Částice nalezené v hľenu měly v průměru menší velikost než částice nalezené ve sliznici.

Nejčastěji detekovaným prvkem v hľenu bylo železo, které bylo zároveň nalezeno pomocí SEM ve většině analyzovaných vzorků sliznice (s výjimkou vzorků M17 a M22). Co do tvaru, byly detekovány nepravidelné i sférické částice železa (obr. 3.18).

Druhým prvkem, který byl nejčastěji detekován shodně v hleny i ve sliznici, byl titan (elementární Ti pomocí SEM, pomocí RMS pak jako TiO_2 – anatas), a to ve vzorcích M12/C9, M22/C7 a M23/C6.

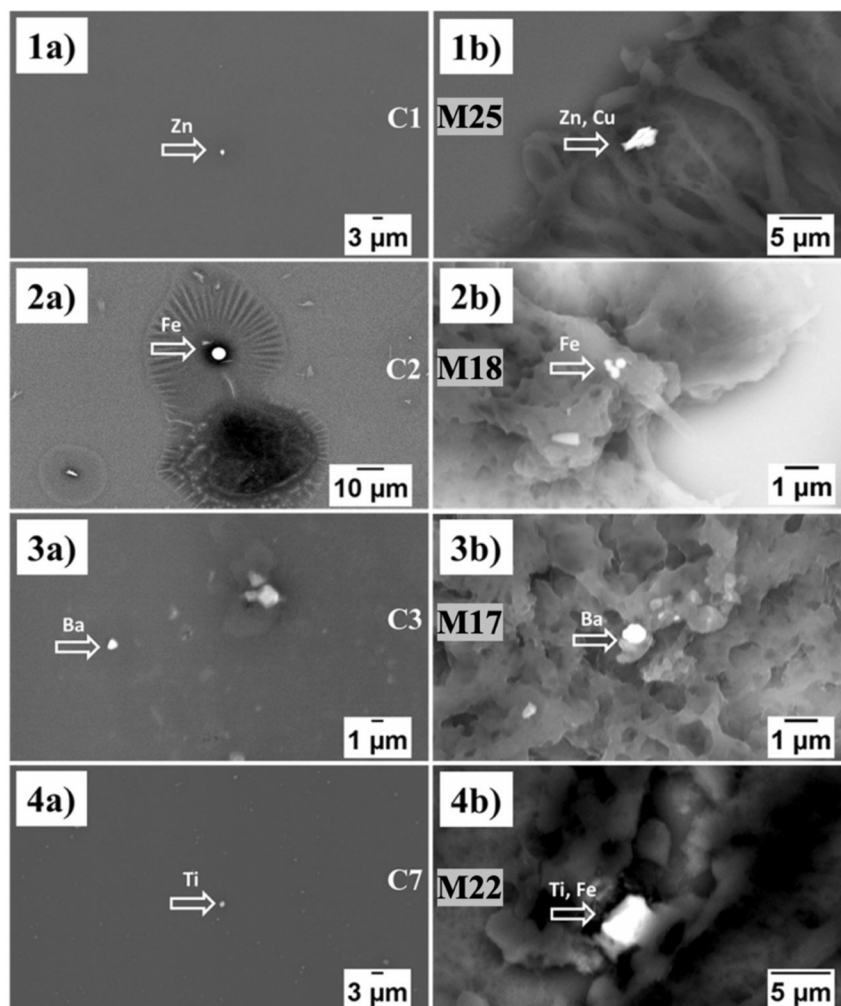
Barium (resp. BaSO_4 – barit) bylo nalezeno shodně v hleny i ve sliznici u vzorků M17/C3 a M18/C2. Zinek byl detekován v hleny i ve sliznici u vzorků M22/C7 a M25/C1.

V „nulovém“ vzorku (nátěru fyziologického roztoku) nebyly pomocí SEM nalezeny žádné opticky aktivní částice.

Ve všech vyšetřených vzorcích byla zjištěna shoda v elementárním složení vždy alespoň jednoho druhu částic v hleny i ve sliznici, z čehož je možné usuzovat na jejich původ ve vdechovaném vzduchu.

Hypotéza 4 byla potvrzena: Složení částic detekovaných v hleny odpovídá složení částic detekovaných ve sliznici.

Obrázek 3.18 Příklady částic kovu/jejich aglomerátů detekovaných SEM v hlenu (1a-4a) a ve sliznici (1b-4b). Upraveno podle Čabanové a kol. (96).



4 DISKUSE

4.1 Detekce, zjištění složení, distribuce a možnosti kvantifikace nano- a mikročástic v nosní sliznici u pacientů s CRS

Četnými studiemi bylo prokázáno, že inhalované nanočástice různého elementárního a molekulárního složení mohou způsobovat chronické zánětlivé změny v plicích a také indukovat maligní transformaci buněk. Jejich role v patologických změnách sliznice horních cest dýchacích ale ještě není dostatečně prostudována (8,16,33,98–100). Doposud bylo provedeno jen minimum klinických studií; např. Zeleník a kol. studovali přítomnost a složení částic v tkáni patrových mandlí (28). Chování nanočástic v lidských tkáních je nejasné a imunitní reakce organismu na ně není doposud uspokojivě prozkoumána. Bližší porozumění role nanočástic v indukci zánětu může napomoci lepšímu porozumění patofyziologickým mechanismům chronických zánětlivých změn v nosní sliznici.

První část studie byla zaměřena na detekci částic mikro- a nano-rozměrů v nosní sliznici, jejich elementární a molekulární složení, lokalizaci a distribuci ve vzorcích sliznice a na srovnání interindividuálních rozdílů ve složení a kvantitě částic u různých pacientů. V této části studie nebyly posuzovány histologické změny ve sliznici.

Možnost kvantifikace částic nano-rozměrů ve vzorcích v praxi doposud nebyla možná vzhledem k tomu, že princip jejich detekce se zásadně liší od detekce částic větších rozměrů kvůli extrémně malým rozměrům „nanosvěta“ (28). Předložená studie navrhla novou metodu možnosti kvantifikace nano- a mikročástic v nosní sliznici.

Nejpestřejší zastoupení kovových prvků bylo pozorováno u pacientů profesionálně vystaveným emisím vznikajícím při sváření (vzorky M1 a M3); nejvíce zastoupené bylo železo, které bylo nalezeno ve všech částech sliznice (nejblíže k nostrilám, ve středních částech i částech nejdále od nostril). Toto není překvapující zjištění, protože plyny vznikající při sváření obsahují především železo a mangan (101,102). Nicméně i svářeči jsou vystaveni podobnému vzdušnému znečištění jako obecná populace (doprava, průmyslové znečištění, kouření atd.). Dále je třeba vzít do úvahy nástroje z nerezové oceli, které mohou při operačním výkonu kontaminovat vzorky tkání. Tomu napovídá i fakt, že částice železa byly nalezeny ve všech vzorcích vyšetřených v této části studie. Na druhou stranu takovýto způsob kontaminace nemůže vysvětlit jejich přítomnost i v hlubokých částech sliznice, s nimiž chirurgické nástroje nemohly přijít do přímého styku.

Morfologie detekovaných částic byla studována pomocí SEM. Byly nalezeny částice polygonální i sférické. Sférické částice železa byly nalezeny např. ve vzorku M1 (svářeč). Takovéto částice jsou nejčastěji produkovány při procesech probíhajících za vysoké teploty a jsou popsány jako ty nejhojněji zastoupené částice v plynech vznikajících při sváření (obr. 3.4) (102).

Největší incidence detekovaných částic byla ve všech vzorcích v částech sliznice nejdále od nostril, zatímco v částech nejbliže nostrilám bylo detekováno méně částic. Zjištění je v kontrastu s výsledky některých počítačových modelů – např. Ghalati a kol. (2012) na základě počítačového modelování předpokládali, že se maximum částic bude usazovat na nejpřednější části nosních skořep (42). Možným vysvětlením rozdílu mezi provedenou studií a počítačovým modelem může být to, že nosní sliznice je dynamická struktura, na níž se částice pomocí mukociliární clearance mohou přemísťovat, a mohou se deponovat i redistribuovat v jejích hlubších vrstvách. Nicméně kohorta této studie je příliš malá, aby z ní bylo možno vyvodit jasné závěry, jak se liší distribuce částic v různých částech sliznice nosních skořep. V naší kohortě také nelze hodnotit a jasně vysvětlit interindividuální rozdíly v distribuci částic co do hloubky (povrchová vrstva vs. hlubší vrstvy sliznice) (tab. 3.3). Vzhledem k přítomnosti částic v hlubších částech sliznice bez možného kontaktu s povrchem či spodinou, která mohla být kontaminována chirurgickými nástroji, lze ale usuzovat, že částice do sliznice vstupují z vnějšího prostředí a deponují se v ní.

I přesto, že tato část studie přinesla několik zajímavých výsledků, nelze z ní vyvozovat jednoznačné závěry. Jejím účelem nebylo přinést statistický či kvantitativní důkaz prevalence částic v nosní sliznici, jejich složení, zdrojů či rizikovosti pro lidské zdraví. Hlavním cílem bylo navrhnout a otestovat novou metodu analýzy tkání, která by byla aplikovatelná na vyšetření většího množství vzorků.

I přes iniciálně slibné výše prezentované výsledky ale takto navržená metoda nemohla být použita pro analýzu významně většího počtu vzorků. Vzhledem k absenci jakékoliv možnosti automatizace tohoto procesu se ukázala být neúměrně náročná na lidské zdroje (vyšetření jednoho řezu sliznicí, tedy $\frac{1}{4}$ ze vzorku od jednoho pacienta, trvalo přibližně 10 hodin, což znamená, že vyšetření tkáně odebrané od jednoho pacienta trvalo jeden celý pracovní týden). Navržená 9bodová metoda je nicméně ve svém principu jednoduchá a aplikovatelná na vyšetření jakéhokoliv typu tkáně. Představuje příslib do budoucna, neboť se s postupující automatizací řady vědeckých i průmyslových procesů dá předpokládat, že bude vyvinut i systém zjednodušující a významně urychlující proces RMS analýzy.

4.2 Srovnání přítomnosti a molekulárního složení částic ve sliznici CRS skupiny a kontrolní skupiny

Cílem této části studie byla detekce mikro- a nanočástic v nosní sliznici pacientů s CRS a porovnat jejich přítomnost a chemické složení s kontrolní skupinou bez CRS v anamnéze. Protože absolutní většina částic byla nalezena v CRS skupině, zatímco v kontrolní skupině nebyly nalezeny téměř žádné částice, výsledky studie naznačují, že může být asociace mezi přítomností těchto částic a CRS.

Původním záměrem studie bylo vyšetřit všech 50 vzorků sliznice z obou skupin výše navrženou 9-bodovou semikvantitativní RMS analýzou (95). Především vzhledem k neúměrné časové náročnosti bylo od tohoto záměru upuštěno. Tato část studie se zaměřila na vyšetření přítomnosti a složení částic v co možná největším množství vzorků bez analýzy jejich distribuce a kvantifikace. I přesto, že absence kvantifikace představuje hlavní limitaci této studie, mohou být obdržené výsledky (především přítomnost částic prakticky jen v CRS skupině a jejich absence u „zdravých“ kontrol) přínosem k lepšímu pochopení patogeneze CRS.

Nejčastěji detekované částice ve sliznici byly částice obsahující uhlík (grafit, amorfni uhlík, kalcit a ankerit) a oxid titaničitý (v krystalických formách anatasu a rutilu). Jak částice obsahující uhlík, tak titan byly v posledních dvou dekadách zkoumány v řadě studií v oboru nanotoxikologie – studie zaměřené na jejich toxicitu, genotoxicitu a prozánětlivé vlastnosti byly prováděny především *in vitro* nebo na zvířecích modelech (7,33,103–107). Výsledky naší studie jsou tedy v souladu s obecným směřováním nanotoxikologie, která se zaměřuje na zkoumání a posuzování rizikovosti uměle vyráběných nanomateriálů s obsahem uhlíku a titanu (uhlíkové nanotrubičky, tiskařský inkoust, pigmenty, složky kosmetiky aj.) (97).

Mikro- a nanočástice exogenního původu obsahující železo byly již dříve detekovány pomocí RMS ve vzorcích různých tkání (28,29). Škodlivost prашných částic a kouře obsahujících oxidy železa pro dýchací ústrojí (tedy že způsobují chronické zánětlivé onemocnění plicní tkáně, pneumosiderózu) je již dlouhou dobu prokázána a dobře dokumentována u svářečů dlouhodobě profesionálně vystavených emisím vznikajícím při sváření (108). Zároveň je významným zdrojem těchto vzdušných polutantů také spalování fosilních paliv (29).

Barit, hliník a křemík byly ve vyšetřených vzorcích detekovány sporadicky. Částice obsahující tyto složky bývají součástí dopravního znečištění, a to nejen v důsledku spalování fosilních paliv, ale také např. z otěru brzdových destiček (109).

Lze tedy konstatovat, že složení částic detekovaných v naší studii v nosní sliznici je shodné se složením běžných vzdušných polutantů, případně částic, jimž jsou pracovníci vystavováni v rámci profesionální expozice - tedy že jsou exogenního původu.

Limitací naší studie je sice absence kontrolní skupiny pacientů žijících v jiném životním prostředí, a tedy potenciálně jiném složení vzdušného znečištění, nicméně všechny zjištěné částice jsou považovány buď za v prostředí všudypřítomné vzdušné polutanty anebo je jejich výskyt ve vzduchu spojen s kouřením nebo profesionální expozicí. Žádná ze zjištěných částic tedy nemůže být považována za specifickou pro moravskoslezský region.

Nejvýznamnějším výsledkem naší studie je jistě nápadný rozdíl mezi přítomností částic téměř výhradně v CRS skupině a jejich praktickou absencí v kontrolní skupině. Dysfunkce epiteliální bariéry a její zvýšená permeabilita je jedním z patogenetických mechanismů podílejících se na chronickém slizničním zánětu a byla studována i v souvislosti s CRS (110,111). Popsaný mechanismus může vysvětlovat výsledky naší studie: ve zdravé sliznici je přestup anorganických částic a jejich depozice v hlubších vrstvách tkáně omezena či úplně znemožněna funkčními mechanismy epiteliální bariéry (mukociliární transport, mezibuněčné spoje, intaktní bazální membrána atd.). U CRS je naproti tomu slizniční epitel pro částice nacházející se ve vdechovaném vzduchu zvýšeně permeabilní. Vezmou-li se do úvahy cytotoxické a prozánětlivé vlastnosti detekovaných částic, jejich přítomnost ve sliznici může být jedním ze spouštěčů procesů chronického zánětu anebo se mohou podílet na jeho udržování, a tak přispívat k refrakterním příznakům CRS.

Míra zánětu ve všech vzorcích sliznice byla subjektivně posuzována jedním patologem. U všech vzorků bylo provedeno standardní histologické vyšetření optickou mikroskopií. V kontrolní skupině nebyly nalezeny známky zánětu u žádného ze zkoumaných vzorků, zatímco v CRS skupině byly alespoň minimální známky zánětu zjištěny u 95 % vzorků. Zjištěné výsledky jsou v korelaci s přítomností zkoumaných částic v 90 % vzorků v CRS skupině a jejich absencí v 80 % vzorků zdravé sliznice v kontrolní skupině.

Přestože již byly navrženy semikvantitativní histologické stupnice hodnotící míru zánětu u různých zánětlivých onemocnění (např. u ulcerativní kolitidy), podobná stupnice u CRS neexistuje (112). Z tohoto důvodu bylo navrženo hodnocení míry zánětu sinonazální sliznice dle subjektivního hodnocení patologem (stupně 0-3, 0 = normální histologie, 3 = chronický zánět). Vzorky CRS skupiny tak byly rozděleny na dvě podskupiny – skupina A: bez zánětu či s minimálními známkami zánětu, skupina B: jednoznačné známky chronického zánětu (tab. 3.4). Proti očekávání bylo nalezeno více částic a jejich složení bylo variabilnější ve

skupině A než ve skupině B. Použité hodnocení má své limitace – především subjektivní hodnocení histologického nálezu, vyšetření řezů částí sliznice, které nemusí být reprezentativní pro stav sinonazální sliznice jako celku a samozřejmě omezená možnost kvantifikace částic. Z uvedeného pozorování nelze vyvodit jednoznačný závěr a je nutný další výzkum k určení významu přítomnosti (a pokud možno i množství) anorganických částic ve sliznici pro rozvoj chronických zánětlivých změn. Nicméně je možno konstatovat, že výsledek této studie potvrzuje koncept CRS především jako primárně klinické, nikoliv histologické diagnózy (63).

Kuřáci a jedinci vykonávající určité „rizikové“ profese jsou vystaveni inhalaci vzdušných polutantů ve zvýšené míře proti nekuřákům a jedincům s „nerizikovým“ povoláním (97). Studie ukázala signifikantní asociaci kouření a „rizikových“ („manuálních“) povolání s přítomností anorganických částic s obsahem uhlíku v nosní sliznici. Uvedené charakteristiky byly neoddělitelné (všichni kuřáci v CRS skupině byli z řad „manuálních“ pracovníků), což potvrzuje asociaci kouření a socioekonomického statutu (113).

4.3 Srovnání přítomnosti a složení částic v hlenu z povrchu sliznice se složením částic ve sliznici u pacientů s CRS

Tato část studie měla za cíl srovnat přítomnost a složení částic v hlenu na sliznici a přímo ve sliznici u týchž pacientů a posoudit tedy původ částic deponovaných ve sliznici ve vdechovaném vzduchu.

Bylo prokázáno, že nanočástice vstupují do organismu nejen ve vdechovaném vzduchu, ale také orálně či transdermálně, a že mají schopnost se v organismu hematogenně redistribuovat (16,18,114). Předpokladem této studie tedy bylo, že pokud by složení anorganických částic v hlenu a přímo ve sliznici bylo zásadně rozdílné, bylo by možno zvažovat hematogenní původ těchto částic. Ve všech vyšetřených vzorcích byla zjištěna shoda v elementárním složení vždy alespoň jednoho druhu částic v hlenu i ve sliznici, z čehož je možné usuzovat na jejich původ ve vdechovaném vzduchu.

Částice nalezené v hlenu byly spíše menších rozměrů než ve sliznici. Může to být vysvětleno tím, že malé částice lépe pronikají slizniční bariérou a v tkáni poté při interakci s imunitním systémem tvoří větší clustery (115).

Nejčastěji detekovaným prvkem v hlenu i ve vzorcích sliznice bylo železo. To se v organismu vyskytuje přirozeně, a to dokonce i ve formě větších agregátů (např. biogenní částice magnetitu/maghemitu v lidském hipokampu), většinou nepravidelného tvaru

s ostrými okraji (116–118). Na rozdíl od těchto částic mají exogenní částice na bázi železa, emitované do prostředí vysokoteplotními procesy, tvar spíše okrouhlý až sférický (119–121). Částice obsahující železo nalezené v této studii byly okrouhlého a sférického tvaru (obr. 3.14), lze tedy usuzovat na jejich exogenní původ, a to především ve vdechovaném vzduchu.

Druhým prvkem, který byl nejčastěji detekován shodně v hlenu i ve sliznici, byl titan (elementární Ti pomocí SEM, pomocí RMS pak jako TiO_2 – anatas). Oxid titaničitý je široce užívaný ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu a v obalových materiálech, přičemž přirozeně se v živých organismech nevyskytuje (122–124).

Barium (resp. BaSO_4 – barit) bylo nalezeno shodně v hlenu i ve sliznici u vzorků dvou pacientů. Barium je uvolňováno do prostředí jak z přírodních zdrojů (kamenný prach), tak antropogenními procesy – je produkováno důlním průmyslem, rafinériemi a při spalování fosilních paliv (125). Barit je také používán například jako plnivo při výrobě brzdových destiček a je uvolňován do atmosféry při brždění a přirozeně se v organismu nevyskytuje (109).

Zinek, který byl nalezen shodně v hlenu i sliznici dvou pacientů, se přirozeně vyskytuje ve svých dvojmocných sloučeninách, nejčastěji jako oxid zinečnatý (ZnO). Je to jeden z esenciálních prvků, je široce využíván zejména pro své antimikrobiální, fotokatalytické, fotooxidační a další vlastnosti ve farmaceutickém, kosmetickém, dřevozpracujícím, textilním aj. průmyslu, a proto jsou jeho sloučeniny v prostředí všudypřítomné (126).

Dle výsledků této části studie a charakteristik detekovaných částic je možno zvažovat, že do sliznice z vdechovaného vzduchu vstupuje železo a barium. Vzhledem k tomu, že orální a transdermální biologická dostupnost TiO_2 je nízká a TiO_2 je podobně jako železo široce užívaný a do atmosféry uvolňovaný při řadě antropogenních činností, je možno zvažovat i původ titanu ve sliznici ve vzdušném znečištění (114). Podobný závěr u zinku (esenciální prvek) učinit ale jistě nelze.

ZÁVĚR

- 1) Byla navržena metoda kvantifikace a analýzy distribuce částic nano- a mikrorozměrů ve vzorcích nosní sliznice:
 - Na malém počtu vzorků byly zjištěny interindividuální rozdíly ve složení a distribuci částic a jejich přítomnost jak v povrchových, tak hlubokých vrstvách sliznice. Výsledky jsou v souladu s hypotézou č. 1, že při CRS mohou pevné anorganické částice přítomné v ovzduší jako součást jeho znečištění vstupovat přes porušenou slizniční bariéru do submukózy a deponovat se i v hlubších vrstvách sliznice.
 - I přesto, že z malé vyšetřené kohorty nelze vyvozovat statistické závěry a metoda RMS mapování vzorků tkání pomocí 9 předdefinovaných bodů poskytla iniciálně slibné výsledky, v navazující studii na větším počtu vzorků se ukázala pro nemožnost jakékoliv automatizace procesu jako neúměrně náročná na lidské zdroje.
 - Navržená metoda je ale ve svém principu jednoduchá a aplikovatelná na vyšetření jakéhokoliv typu tkáně a představuje příslib do budoucna, neboť se s postupující automatizací řady vědeckých i průmyslových procesů dá předpokládat, že bude vyvinut i systém zjednodušující a významně urychlující proces RMS analýzy.
- 2) Byla zjištěna přítomnost mikročástic a clusterů nanočástic ve vzorcích nosní sliznice pacientů s CRS:
 - Jednalo se převážně o sloučeniny uhlíku a titanu.
 - Ve sliznici kontrolní skupiny, kadaverů bez anamnézy CRS, tyto částice prakticky chyběly, což je v souladu s hypotézou č. 2, tedy že do zdravé sliznice pevné anorganické částice nevstupují a nedeponují se v ní.
 - Výsledky ukazují na možnou asociaci diagnózy CRS a detekovaných částic.
 - Byla zjištěna signifikantní asociace přítomnosti částic na bázi uhlíku s kouřením a profesemi rizikovými z expozice vzdušnému znečištění (např. svářeči, klempíři či strážníci), což potvrzuje hypotézu č. 3, tedy že složení částic detekovaných ve sliznici je ovlivněno profesionální anamnézou a kouřením.

- 3) Dle výsledků třetí části studie srovnávající elementární složení pevných anorganických částic přítomných v hlenu a ve sliznici samotné lze usuzovat, že:
- Původ částic deponovaných ve sliznici je v případě těch nejvíce zastoupených (železo, titan, bariem) pravděpodobně ve vzdušném znečištění.
 - Jejich hematogenní původ je málo pravděpodobný, což potvrzuje hypotézu č. 4.

Není tedy jasné, zda přítomnost pevných anorganických částic přispívá k vyšší míře závažnosti chronického zánětu nosní sliznice. V tomto ohledu výsledky studie neposkytly jasný závěr; nicméně asociace mezi jejich přítomností a přítomností zánětlivých změn jakékoliv míry se jeví jako poměrně jasná. Je však otázkou pro budoucí výzkum, zda je přítomnost těchto částic ve sliznici postižené chronickým zánětem kauzální, anebo je naopak výsledkem pre-existujícího poškození chronicky zánětlivě změněné sliznice.

RESUMÉ

Disertační práce je věnována detekci a posouzení elementárního a chemického složení částic nano- a mikrorozměrů v nosní sliznici odebrané pacientům s chronickou rinosinuitidou a možné souvislosti jejich přítomnosti a chronických zánětlivých změn sliznice.

V úvodu teoretické části jsou shrnuty vlastnosti nano- a mikročástic, možnosti jejich detekce a charakterizace, je vysvětlen princip skenovací elektronové mikroskopie a Ramanovy mikrospektroskopie a je diskutována problematika chronické rinosinuitidy se zaměřením na možné patogenetické mechanismy.

V experimentální části práce je popsána metodika studie, která byla rozdělena do tří částí. První část studie se zaměřila na detekci, zjištění složení, distribuce a možnosti kvantifikace nano- a mikročástic v nosní sliznici u pacientů s chronickou rinosinuitidou. Byla navržena nová metoda RMS mapování vzorků tkání pomocí 9 předdefinovaných bodů. Metoda je při aktuálních přístrojových možnostech sice časově velmi náročná, ale ve svém principu jednoduše aplikovatelná na vyšetření jakéhokoliv typu tkáně. Představuje tedy příslib do budoucna, neboť se s postupující automatizací řady vědeckých i průmyslových procesů dá předpokládat, že bude vyvinut i systém zjednodušující a významně urychlující proces RMS analýzy.

V druhé části studie byla zjištěna přítomnost anorganických částic nano- a mikrorozměrů ve vzorcích nosní sliznice pacientů s CRS, převážně sloučenin uhlíku a titanu, zatímco ve sliznici kontrolní skupiny, kadaverů bez anamnézy CRS, tyto částice prakticky chyběly. To může ukazovat na možnou asociaci diagnózy CRS a detekovaných částic. Byla zjištěna signifikantní asociace přítomnosti částic na bázi uhlíku s kouřením a profesemi rizikovými z expozice vzdušnému znečištění (např. svářeči, klempíři či strážníci).

Dle výsledků třetí části studie srovnávající elementární složení částic přítomných v hlenu a ve sliznici samotné lze usuzovat, že původ částic deponovaných ve sliznici je v případě těch nejvíce zastoupených (železo, titan, bariem) pravděpodobně ve vzdušném znečištění a jejich hematogenní původ je málo pravděpodobný.

Není jasné, zda přítomnost anorganických částic nano- a mikrorozměrů přispívá k vyšší míře závažnosti chronického zánětu nosní sliznice - v tomto ohledu výsledky studie neposkytly jasný závěr; nicméně asociace mezi jejich přítomností a přítomností zánětlivých změn jakékoliv míry se jeví jako poměrně jasná. Je však otázkou pro budoucí výzkum, zda je přítomnost těchto částic ve sliznici postižené chronickým zánětem kauzální, anebo je naopak

výsledkem pre-existujícího poškození a tím pádem zvýšené permeability dysfunkční epiteliální bariéry chronicky zánětlivě změněné sliznice.

I když všechny výsledky studie neposkytly jasné naplnění stanovených cílů, na poli „nanovědy“ se jedná o zcela unikátní a průkopnickou práci. Takto rozsáhlá studie na lidských tkáních doposud nikdy provedena nebyla a může sloužit jako jeden ze základních kamenů v klinickém výzkumu v oborech nanotoxikologie a nanopatologie.

Na základě předložené studie byla zahájena rozsáhlá spolupráce nejen otorinolaryngologů, ale také dalších odborníků jiných klinických oborů z Fakultní nemocnice Ostrava, s Centrem nanotechnologií Vysoké školy báňské-Technické univerzity Ostrava. Výsledky autorského kolektivu Kliniky ORL a chirurgie hlavy a krku FNO a Centra nanotechnologií byly prezentovány na národních i mezinárodních konferencích a publikovány v recenzovaných a impaktovaných periodících.

SUMMARY

The thesis focuses on detection and characterization of elemental and chemical composition of nanosized and microsized particles in the nasal mucosa of patients diagnosed with chronic rhinosinusitis and possible association of these particles and chronic inflammatory changes of the nasal mucosa.

In the introduction of the theoretical part, the properties of these particles are summarized, as well as possibilities of their detection and characterization, the principle of the scanning electron microscopy and Raman microspectroscopy is explained and chronic rhinosinusitis is discussed, with the focus on the pathogenetic mechanisms.

In the experimental part, the methodology of the study is described. The study was divided into three parts. The first part was focused on detection, characterization of composition and possibility of quantification of nanosized and microsized particles in the nasal mucosa of patients diagnosed with chronic rhinosinusitis. A novel method of RMS tissue examination was developed, based on a 9-point mapping protocol. Given the current state of technical possibilities and equipment, this method has shown to be time consuming, however applicable to investigation of any type of tissue. Considering ongoing automatization of numerous scientific and industrial processes, it can be assumed that even this method would become automated, therefore showing great promise for the future of nanopathology.

In the second part of the study, anorganic nano- and microsized particles were detected in the mucosa samples of the patients with CRS. As to their composition, mostly carbon and titanium compounds were detected. In the control group samples obtained from cadavers without history of CRS almost no such particles were detected. There was a significant association between presence of the carbon compounds and smoking and history of occupation with high levels of exposure to airborne pollution (for example welders of patrol officers).

The third part of the study compared the elemental composition of the particles present in the mucus and inside the mucosa. The results show that the origin of the particles (mainly iron, titanium and barium) deposited inside the mucosa is probably airborne and that their hematogenous origin is not probable.

It is not clear if the presence of the anorganic nano- and microsized particles plays a role in the level of chronic inflammation of the nasal mucosa. In this aspect, the results of the study are inconclusive. However, the association between the presence of these particles and presence of inflammatory changes of any level of severity seems to be quite clear. Only the

future research will show whether the association is causal or if it is a result of the pre-existing impairment and higher permeability of the dysfunctional epithelial barrier of the chronically inflamed mucosa.

Although not all the results fulfilled the set goals, the study is still unique and innovative in the context of the field of "nanoscience". To the authors' best knowledge, this is the first clinical study with such a large cohort of human tissue samples and could serve as one of the cornerstones of the clinical research in nanotoxicology and nanopathology.

With this study, extensive cooperation of otorhinolaryngologists and also of professionals of other clinical specialties from the University Hospital Ostrava with the Centre of Nanotechnologies VŠB-TUO has begun. The results of the authors' collective of the Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery of University Hospital Ostrava and the Centre of Nanotechnologies were presented at national and international congresses and published in reviewed and impact journals.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Schraufnagel DE. The health effects of ultrafine particles. *Experimental & Molecular Medicine*. 2020 Mar 17;52(3):311–7.
2. Moreno-Ríos AL, Tejeda-Benítez LP, Bustillo-Lecompte CF. Sources, characteristics, toxicity, and control of ultrafine particles: An overview. *Geoscience Frontiers*. 2022 Jan;13(1):101147.
3. Kwon HS, Ryu MH, Carlsten C. Ultrafine particles: unique physicochemical properties relevant to health and disease. *Experimental & Molecular Medicine*. 2020 Mar 17;52(3):318–28.
4. Strambeanu N, Demetrovici L, Dragos D, Lungu M. Nanoparticles: Definition, Classification and General Physical Properties. In: *Nanoparticles' Promises and Risks*. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 3–8.
5. Powers KW, Brown SC, Krishna VB, Wasdo SC, Moudgil BM, Roberts SM. Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials. Part VI. Characterization of Nanoscale Particles for Toxicological Evaluation. *Toxicological Sciences*. 2006 Apr 1;90(2):296–303.
6. Čábalová L, Komínek P, Zeleník K, Kukutschová J, Čabanová K. Nanočástice, nanotoxikologie, nanomedicína: definice pojmů, perspektivy v otorinolaryngologii. *Otorinolaryngol Foniatr*. 2016;65(3):179–83.
7. Hackenberg S, Scherzed A, Technau A, Kessler M, Froelich K, Ginzkey C, et al. Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro. *Toxicology in Vitro*. 2011 Apr;25(3):657–63.
8. HSE. Health Effects of Particles Produced for Nanotechnologies. Vol. EH75/6. HSE Books EH75/6; 2004.
9. Demir E, Turna F, Vales G, Kaya B, Creus A, Marcos R. In vivo genotoxicity assessment of titanium, zirconium and aluminium nanoparticles, and their microparticulated forms, in *Drosophila*. *Chemosphere*. 2013 Nov;93(10):2304–10.
10. Murthy SK. Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges. *Int J Nanomedicine*. 2007;2(2):129–41.
11. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Concepts of nanoparticle dose metric and response metric. *Environ Health Perspect*. 2007 Jun;115(6):A290.

12. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR). The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies . Adopted by the SCENIHR during the 10th plenary meeting of 10 March 2006 after public consultation. Dostupné z http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_003b.pdf.
13. Demetzos C. Pharmaceutical Nanotechnology: Fundamentals and Practical Applications. Singapore: Springer; 2018.
14. Kreyling WG. Nanomedicine : An ESF-European Medical Councils (EMRC) forward look report 2005. Strasbourg: European Science Foundation; 2005.
15. Philpott CM, Gane S, McKiernan D. Nanomedicine in otorhinolaryngology: what does the future hold? *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2011 Apr;268(4):489–96.
16. Monteiro-Riviere NA, Lang CT. Nanotoxicology: Characterization, Dosing and Health Effects. Informa Healthcare USA, Inc.; 2007.
17. Weiss C, Diabaté S. A special issue on nanotoxicology. *Archives of Toxicology*. 2011 Jul 17;85(7):705–6.
18. Garnett MC, Kallinteri P. Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles. *Occup Med (Lond)*. 2006 Aug;56(5):307–11.
19. Srinivas A, Rao PJ, Selvam G, Murthy PB, Reddy PN. Acute inhalation toxicity of cerium oxide nanoparticles in rats. *Toxicol Lett*. 2011 Aug 28;205(2):105–15.
20. Al-Rawi M, Diabaté S, Weiss C. Uptake and intracellular localization of submicron and nano-sized SiO₂ particles in HeLa cells. *Arch Toxicol*. 2011 Jul;85(7):813–26.
21. Foldbjerg R, Dang DA, Autrup H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Arch Toxicol*. 2011 Jul;85(7):743–50.
22. Gehrke H, Pelka J, Hartinger CG, Blank H, Bleimund F, Schneider R, et al. Platinum nanoparticles and their cellular uptake and DNA platination at non-cytotoxic concentrations. *Arch Toxicol*. 2011 Jul;85(7):799–812.
23. Ng CT, Li JJ, Gurung RL, Hande MP, Ong CN, Bay BH, et al. Toxicological profile of small airway epithelial cells exposed to gold nanoparticles. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013 Dec;238(12):1355–61.
24. Xu J, Li Z, Xu P, Xiao L, Yang Z. Nanosized copper oxide induces apoptosis through oxidative stress in podocytes. *Arch Toxicol*. 2013 Jun;87(6):1067–73.

25. Ahlinder L, Ekstrand-Hammarström B, Geladi P, Osterlund L. Large uptake of titania and iron oxide nanoparticles in the nucleus of lung epithelial cells as measured by Raman imaging and multivariate classification. *Biophys J*. 2013 Jul 16;105(2):310–9.
26. Dam DHM, Lee JH, Sisco PN, Co DT, Zhang M, Wasielewski MR, et al. Direct observation of nanoparticle-cancer cell nucleus interactions. *ACS Nano*. 2012 Apr 24;6(4):3318–26.
27. Kumar A, Dhawan A. Genotoxic and carcinogenic potential of engineered nanoparticles: an update. *Arch Toxicol*. 2013 Nov;87(11):1883–900.
28. Zeleník K, Kukutschová J, Dvořáčková J, Bielníková H, Peikertová P, Čábalová L, et al. Possible role of nano-sized particles in chronic tonsillitis and tonsillar carcinoma: a pilot study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2013 Feb;270(2):705–9.
29. Dvorackova J, Bielnikova H, Kukutschova J, Peikertova P, Filip P, Zelenik K, et al. Detection of nano- and micro-sized particles in routine biopsy material - pilot study. *Biomedical Papers*. 2015 Mar 9;159(1):087–92.
30. Munger MA, Radwanski P, Hadlock GC, Stoddard G, Shaaban A, Falconer J, et al. In vivo human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2014 Jan;10(1):1–9.
31. Gatti Antonietta M, Montanari Stefano. *Nanopathology: The Health Impact of Nanoparticles*. Singapore: Pan Stanford Publishing Pte. Ltd.; 2008.
32. Genter MB, Newman NC, Shertzer HG, Ali SF, Bolon B. Distribution and systemic effects of intranasally administered 25 nm silver nanoparticles in adult mice. *Toxicol Pathol*. 2012 Oct;40(7):1004–13.
33. Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, et al. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A*. 2002 Oct 25;65(20):1531–43.
34. Srinivas A, Rao PJ, Selvam G, Murthy PB, Reddy PN. Acute inhalation toxicity of cerium oxide nanoparticles in rats. *Toxicology Letters*. 2011 Aug 28;205(2):105–15.
35. Dasch J, D’Arcy J. Physical and Chemical Characterization of Airborne Particles from Welding Operations in Automotive Plants. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 2008 May 27;5(7):444–54.

36. Stephenson D, Seshadri G, Veranth JM. Workplace Exposure to Submicron Particle Mass and Number Concentrations From Manual Arc Welding of Carbon Steel. *AIHA Journal*. 2003 Jul;64(4):516–21.
37. Hedmer M, Karlsson JE, Andersson U, Jacobsson H, Nielsen J, Tinnerberg H. Exposure to respirable dust and manganese and prevalence of airways symptoms, among Swedish mild steel welders in the manufacturing industry. *Int Arch Occup Environ Health*. 2014 Aug;87(6):623–34.
38. Berger F, Bernatíková Š, Kocůrková L, Přichystalová R, Schreiberová L. Occupational exposure to nanoparticles originating from welding - case studies from the Czech Republic. *Med Pr*. 2021 Jun 30;72(3):219–30.
39. Andujar P, Simon-Deckers A, Galateau-Sallé F, Fayard B, Beaune G, Clin B, et al. Role of metal oxide nanoparticles in histopathological changes observed in the lung of welders. *Part Fibre Toxicol*. 2014 May 13;11:23.
40. Antonini JM, Roberts JR, Schwegler-Berry D, Mercer RR. Comparative microscopic study of human and rat lungs after overexposure to welding fume. *Ann Occup Hyg*. 2013 Nov;57(9):1167–79.
41. Hull MJ, Abraham JL. Aluminum welding fume-induced pneumoconiosis. *Human Pathology*. 2002 Aug;33(8):819–25.
42. Farhadi Ghalati P, Keshavarzian E, Abouali O, Faramarzi A, Tu J, Shakibafard A. Numerical analysis of micro- and nano-particle deposition in a realistic human upper airway. *Comput Biol Med*. 2012 Jan;42(1):39–49.
43. Shanley KT, Zamankhan P, Ahmadi G, Hopke PK, Cheng YS. Numerical Simulations Investigating the Regional and Overall Deposition Efficiency of the Human Nasal Cavity. *Inhalation Toxicology*. 2008 Jan 24;20(12):1093–100.
44. European Commission, DG Health and Consumer Protection: Public Health - Nanotechnologies. https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinion_layman/en/nanotechnologies/index.htm.
45. Zhang X, Zhao X, Li H, Hao X, Xu J, Tian J, et al. Detection Methods of Nanoparticles Synthesized by Gas-Phase Method: A Review. *Frontiers in Chemistry* [Internet]. 2022 Feb 28 [cited 2022 Apr 2];0:54. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2022.845363/full>

46. Černý M. Přednášky z fyziky (BF) pro studenty v profesních oborech bakalářského studia: Měření vlnové délky světla. <https://physics.fme.vutbr.cz/~mcerny/BF/labiny/lambda.pdf>.
47. Šafářová K. Transmisní elektronová mikroskopie nanopráškových materiálů [Internet]. [Olomouc]; 2010 [cited 2022 Apr 3]. Available from: https://theses.cz/id/3vmiww/dizertace_Safarova.pdf
48. Kopecká J, Šalamúnová P. Elektronová mikroskopie – [EM] . http://fchi.vscht.cz/files/uzel/0010367/0060~c_WNDwtRSE3JLAEA.pdf?redirected.
49. Soubusta J. Optoelektronické systémy: Elektronová mikroskopie transmisní a rastrovací. https://jointlab.upol.cz/soubusta/OSYS/El_mikr/El_mikr.html.
50. Cais J. Elektronová mikroskopie. Metalografie: Metodická příručka [Internet]. Praha: Centrum pro studium vysokého školství, v.v.i.; 2015 [cited 2022 Apr 3]. Available from: http://vyvoj.csvs.cz/projekty/2014_veda_pro_zivot/data/11_KA3_Jaromir_Cais_2_Elektronova_%20mikroskopie_a_%20EDS_%20analyza_metodicka_prirucka.pdf
51. Gardiner DJ, Graves PR, editors. Practical Raman Spectroscopy. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1989.
52. Sharpe AG, Housecroft CE. Anorganická chemie. 1. vydání. Praha: VŠCHT; 2014.
53. Gregorová Š. Ramanova mikrospektroskopie a mapování jednotlivých buněk [Internet]. [Praha]; 2013 [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/60991/120119331.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
54. Čabanová K, Peikertová P, Bielníková H, Barošová H, Motyka O, Čábalová L, et al. Raman microspectroscopy as a useful tool for nanopathology. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2017 Mar;48(3):357–62.
55. Kline NJ, Treado PJ. Raman Chemical Imaging of Breast Tissue. *Journal of Raman Spectroscopy*. 1997 Feb;28(2–3):119–24.
56. Lipina R, Matoušek P. Transnazální endoskopická chirurgie spodiny lební. 1. vydání. Havlíčkův Brod: Tobiáš; 2014. 347.
57. Kennedy DW, Bolger WE, Zinreich SJ. Diseases of the Sinuses: Diagnosis and Management. Hamilton, Ontario: B.C. Decker Inc.; 2001.

58. Pendolino AL, Lund VJ, Nardello E, Ottaviano G. The nasal cycle: a comprehensive review. *Rhinology Online*. 2018 Jun 1;1(1):67–76.
59. Mygind N, Dahl R. Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1998 Jan 5;29(1–2):3–12.
60. Mygind N, Viner AS, Jackman N. Histology of nasal mucosa in normals and in patients with perennial rhinitis. A blind study of plastic embedded specimens. *Rhinology*. 1974;12(3–4):131–6.
61. Widdicombe J. Microvascular anatomy of the nose. *Allergy*. 1997 Dec;52:7–11.
62. Beule AG. Physiology and pathophysiology of respiratory mucosa of the nose and the paranasal sinuses. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2010;9:Doc07.
63. Fokkens WJ, Lund VJ, Hopkins C, Hellings PW, Kern R, Reitsma S, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinology journal*. 2020 Feb 1;0(0):1–464.
64. Cho SW, Kim DW, Kim JW, Lee CH, Rhee CS. Classification of chronic rhinosinusitis according to a nasal polyp and tissue eosinophilia: limitation of current classification system for Asian population. *Asia Pac Allergy*. 2017 Jul;7(3):121–30.
65. Grayson JW, Hopkins C, Mori E, Senior B, Harvey RJ. Contemporary Classification of Chronic Rhinosinusitis Beyond Polyps vs No Polyps. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. 2020 Sep 1;146(9):831.
66. Kašák V. *Astma bronchiale. Průvodce ošetřujícího lékaře*. Praha: Maxdorf; 2013. 261.
67. Kim D, Pantanowitz L, Schüffler P, Yarlagadda DVK, Ardon O, Reuter VE, et al. (Re) Defining the High-Power Field for Digital Pathology. *J Pathol Inform*. 2020;11:33.
68. Ference EH, Tan BK, Hulse KE, Chandra RK, Smith SB, Kern RC, et al. Commentary on gender differences in prevalence, treatment, and quality of life of patients with chronic rhinosinusitis. *Allergy Rhinol (Providence)*. 2015 Jan;6(2):82–8.
69. Vaitkus J, Vitkauskienė A, Simuntis R, Vaitkus Ž, Šiupšinskienė N, Vaitkus S. Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps: Age and Disease Severity Differences in the Levels of Inflammatory Markers. *Medicina (B Aires)*. 2021 Mar 18;57(3):282.
70. Schlosser RJ, Gage SE, Kohli P, Soler ZM. Burden of Illness: A Systematic Review of Depression in Chronic Rhinosinusitis. *American Journal of Rhinology & Allergy*. 2016 Jul 1;30(4):250–6.

71. Albu S. Chronic Rhinosinusitis-An Update on Epidemiology, Pathogenesis and Management. *J Clin Med*. 2020 Jul 18;9(7).
72. Leland EM, Zhang Z, Kelly KM, Ramanathan M. Role of Environmental Air Pollution in Chronic Rhinosinusitis. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2021 Aug 9;21(8):42.
73. Stevens WW, Lee RJ, Schleimer RP, Cohen NA. Chronic rhinosinusitis pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015 Dec;136(6):1442–53.
74. van Crombruggen K, Zhang N, Gevaert P, Tomassen P, Bachert C. Pathogenesis of chronic rhinosinusitis: Inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011 Oct;128(4):728–32.
75. Earl JP, Adappa ND, Krol J, Bhat AS, Balashov S, Ehrlich RL, et al. Species-level bacterial community profiling of the healthy sinonasal microbiome using Pacific Biosciences sequencing of full-length 16S rRNA genes. *Microbiome*. 2018 Dec 23;6(1):190.
76. Wang BF, Cao PP, Long XB, Zhang XH, Xu K, Cui YH, et al. Distinct mucosal immunopathologic profiles in atopic and nonatopic chronic rhinosinusitis without nasal polyps in Central China. *International Forum of Allergy & Rhinology*. 2016 Oct;6(10):1013–9.
77. Xie L, Liu AG, Peng LY, Wang SJ, Zhang YP, Wang XS. Expression of E-prostanoid receptors in nasal polyp tissues of smoking and nonsmoking patients with chronic rhinosinusitis. *PLOS ONE*. 2018 Jul 24;13(7):e0200989.
78. Mulligan JK, O’Connell BP, Pasquini W, Mulligan RM, Smith S, Soler ZM, et al. Impact of tobacco smoke on upper airway dendritic cell accumulation and regulation by sinonasal epithelial cells. *International Forum of Allergy & Rhinology*. 2017 Aug;7(8):777–85.
79. Tharakan A, Halderman AA, Lane AP, Biswal S, Ramanathan M. Reversal of cigarette smoke extract-induced sinonasal epithelial cell barrier dysfunction through Nrf2 Activation. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2016;6(11):1145–50.
80. Guan WJ, Zheng XY, Chung KF, Zhong NS. Impact of air pollution on the burden of chronic respiratory diseases in China: time for urgent action. *The Lancet*. 2016 Oct;388(10054):1939–51.

81. Currie GP, Ayres JG. Assessment of Bronchial Responsiveness Following Exposure to Inhaled Occupational and Environmental Agents. *Toxicological Reviews*. 2004;23(2):75–81.
82. Sadhra SS, Mohammed N, Kurmi OP, Fishwick D, de Matteis S, Hutchings S, et al. Occupational exposure to inhaled pollutants and risk of airflow obstruction: a large UK population-based UK Biobank cohort. *Thorax*. 2020 Jun;75(6):468–75.
83. Schwarzbach HL, Mady LJ, Lee SE. What is the Role of Air Pollution in Chronic Rhinosinusitis? *Immunol Allergy Clin North Am*. 2020;40(2):215–22.
84. Leland EM, Zhang Z, Kelly KM, Ramanathan M. Role of Environmental Air Pollution in Chronic Rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2021;21(8):42.
85. Chrobok V, Komínek P, Plzák J, Čelakovský P, Zeleník K. *Otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku*. 1. vydání. Praha: Tobiáš; 2022. 570.
86. Rimmer J, Hellings P, Lund VJ, Alobid I, Beale T, Dassi C, et al. European position paper on diagnostic tools in rhinology. *Rhinology*. 2019 Jul 25;57(Suppl S28):1–41.
87. Grymer LF, Hilberg O, Pedersen OF. Prediction of nasal obstruction based on clinical examination and acoustic rhinometry. *Rhinology*. 1997 Jun;35(2):53–7.
88. Jones NS. The prevalence of facial pain and purulent sinusitis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009 Feb;17(1):38–42.
89. Lund VJ, Kennedy DW. Quantification for staging sinusitis. The Staging and Therapy Group. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl*. 1995 Oct;167:17–21.
90. Psaltis AJ, Li G, Vaezeafshar R, Cho KS, Hwang PH. Modification of the Lund-Kennedy endoscopic scoring system improves its reliability and correlation with patient-reported outcome measures. *Laryngoscope* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2022 Apr 10];124(10):2216–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24615873/>
91. Brook I. Chronic Sinusitis Treatment & Management: Approach Considerations, Control of Predisposing Factors, Symptomatic Treatment [Internet]. 2022 [cited 2022 Apr 10]. Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/232791-treatment#d7>
92. Casale M, Moffa A, Cassano M, Carinci F, Lopez MA, Trecca EMC, et al. Saline nasal irrigations for chronic rhinosinusitis: From everyday practice to evidence-based medicine. An update. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2018 Jan 23;32:205873841880267.

93. Chong LY, Piromchai P, Sharp S, Snidvongs K, Webster KE, Philpott C, et al. Biologics for chronic rhinosinusitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2021 Mar 12;2021(10).
94. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, et al. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology journal*. 2012 Mar 1;50(1):1–12.
95. Čábalová L, Čabanová K, Bielníková H, Kukutschová J, Dvořáčková J, Dědková K, et al. Micro- and nanosized particles in nasal mucosa: A Pilot Study. *BioMed Research International*. 2015;2015.
96. Čabanová K, Motyka O, Čábalová L, Hrabovská K, Bielníková H, Kuzníková L, et al. Metal particles in mucus and hypertrophic tissue of the inferior nasal turbinates from the human upper respiratory tract. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020 Aug 1;27(22):28146–54.
97. Čabanová K, Motyka O, Bielníková H, Čábalová L, Handlos P, Zabiegaj D, et al. Identification of the phase composition of solid microparticles in the nasal mucosa of patients with chronic hypertrophic rhinitis using Raman microspectroscopy. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Apr 12];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34556770/>
98. Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W, Borm PJA. *Nanotoxicology. Occupational and Environmental Medicine*. 2004 Sep;61(9):727–8.
99. Singh S, Nalwa HS. Nanotechnology and health safety - Toxicity and risk assessments of nanostructured materials on human health. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2007 Sep;7(9):3048–70.
100. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*. 2005 Jul;113(7):823–39.
101. Richman JD, Livi KJT, Geyh AS. A scanning transmission electron microscopy method for determination of manganese composition in welding fume as a function of primary particle size. *Journal of Aerosol Science*. 2011;42(6):408–18.
102. Oprya M, Kiro S, Worobiec A, Horemans B, Darchuk L, Novakovic V, et al. Size distribution and chemical properties of welding fumes of inhalable particles. *Journal of Aerosol Science*. 2012;45:50–7.

103. Morimoto Y, Horie M, Kobayashi N, Shinohara N, Shimada M. Inhalation toxicity assessment of carbon-based nanoparticles. *Acc Chem Res.* 2013 Mar 19;46(3):770–81.
104. Wang J, Xu Y, Yang Z, Huang R, Chen J, Wang R, et al. Toxicity of Carbon Nanotubes. *Current Drug Metabolism.* 2013 Aug 31;14(8):891–9.
105. Madannejad R, Shoaie N, Jahanpeyma F, Darvishi MH, Azimzadeh M, Javadi H. Toxicity of carbon-based nanomaterials: Reviewing recent reports in medical and biological systems. *Chemico-Biological Interactions.* 2019 Jul;307:206–22.
106. Hou J, Wang L, Wang C, Zhang S, Liu H, Li S, et al. Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. *J Environ Sci (China).* 2019 Jan;75:40–53.
107. Shakeel M, Jabeen F, Shabbir S, Asghar MS, Khan MS, Chaudhry AS. Toxicity of Nano-Titanium Dioxide (TiO₂-NP) Through Various Routes of Exposure: a Review. *Biol Trace Elem Res.* 2016 Jul;172(1):1–36.
108. Khalid I, Khalid TJ, Jennings JH. A welder with pneumosiderosis: a case report. *Cases J* [Internet]. 2009 Apr [cited 2022 Apr 16];2(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20181169/>
109. Kukutschová J, Roubíček V, Mašláň M, Jančík D, Slovák V, Malachová K, et al. Wear performance and wear debris of semimetallic automotive brake materials. *Wear.* 2010 Jan;268(1–2):86–93.
110. Schleimer RP. Immunopathogenesis of Chronic Rhinosinusitis and Nasal Polyposis. *Annu Rev Pathol.* 2017 Jan 24;12:331–57.
111. Alekseenko SI, Skalny A v, Ajsuvakova OP, Skalnaya MG, Notova S v, Tinkov AA. Mucociliary transport as a link between chronic rhinosinusitis and trace element dysbalance. *Med Hypotheses.* 2019 Jun;127:5–10.
112. Geboes K, Riddell R, Ost A, Jensfelt B, Persson T, Löfberg R. A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut.* 2000 Sep;47(3):404–9.
113. Katainen A. Smoking and workers' autonomy: a qualitative study on smoking practices in manual work. *Health (London).* 2012 Mar;16(2):134–50.
114. Geraets L, Oomen AG, Krystek P, Jacobsen NR, Wallin H, Laurentie M, et al. Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different

- titanium dioxide nanoparticles in rats. *Particle and Fibre Toxicology*. 2014 Dec 3;11(1):30.
115. Barbero F, Russo L, Vitali M, Piella J, Salvo I, Borrajo ML, et al. Formation of the Protein Corona: The Interface between Nanoparticles and the Immune System. *Seminars in Immunology*. 2017 Dec;34:52–60.
 116. Kirschvink JL, Kobayashi-Kirschvink A, Woodford BJ. Magnetite biomineralization in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1992 [cited 2022 Apr 16];89(16):7683–7. Available from: <https://www.pnas.org>
 117. Maher BA, Ahmed IAM, Karloukovski V, MacLaren DA, Foulds PG, Allsop D, et al. Magnetite pollution nanoparticles in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2016 Sep 27 [cited 2022 Apr 16];113(39):10797–801. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27601646/>
 118. Schultheiss-Grassi P, Wessiken R, Dobson J. TEM investigations of biogenic magnetite extracted from the human hippocampus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1999 Jan 4;1426(1):212–6.
 119. Chen Y, Shah N, Huggins FE, Huffman GP. Microanalysis of ambient particles from Lexington, KY, by electron microscopy. *Atmospheric Environment*. 2006 Feb;40(4):651–63.
 120. Liati A, Pandurangi SS, Boulouchos K, Schreiber D, Arroyo Rojas Dasilva Y. Metal nanoparticles in diesel exhaust derived by in-cylinder melting of detached engine fragments. *Atmospheric Environment*. 2015 Jan;101:34–40.
 121. Mitchell R, Maher BA. Evaluation and application of biomagnetic monitoring of traffic-derived particulate pollution. *Atmospheric Environment*. 2009;43(13):2095–103.
 122. López-Heras I, Madrid Y, Cámara C. Prospects and difficulties in TiO₂ nanoparticles analysis in cosmetic and food products using asymmetrical flow field-flow fractionation hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*. 2014 Jun;124:71–8.
 123. Souza VGL, Fernando AL. Nanoparticles in food packaging: Biodegradability and potential migration to food—A review. *Food Packaging and Shelf Life*. 2016 Jun 1;8:63–70.
 124. Velzeboer I, Hendriks AJ, Ragas AMJ, van de Meent D. Aquatic ecotoxicity tests of some nanomaterials. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2008;27(9):1942.

125. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for barium and barium compounds. [Internet]. 2007 [cited 2022 Apr 16]. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp24.pdf>
126. Ali A, Phull AR, Zia M. Elemental zinc to zinc nanoparticles: Is ZnO NPs crucial for life? Synthesis, toxicological, and environmental concerns. *Nanotechnology Reviews* [Internet]. 2018 Oct 25 [cited 2022 Apr 16];7(5):413–41. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/ntrev-2018-0067/html?lang=en>

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AC	amorfní uhlík (z angl. amorphous carbon)
ASA	kyselina acetylsalicylová (z angl. acetylsalicylic acid)
BaSO ₄	barit
BSE	zpětně rozptýlené elektrony (z angl. back scattered electrons)
CaCO ₃	kalcit
CaFe(CO ₃) ₂	ankerit
CaSO ₄	síran vápenatý
CRS	chronická rinosinusitida (z angl. chronic rhinosinusitis)
CT	výpočetní tomografie (z angl. computed tomography)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
EDS	energiově disperzní spektrometrie
EM	elektronová mikroskopie
EPOS	European Position Paper on Rhinosinusitis and Polyps
Fe ₂ O ₃	hematit
Fe ₃ O ₄	magnetit
FESS	funkční endoskopická chirurgie dutin (z angl. functional endoscopic sinus surgery)
FNO	Fakultní nemocnice Ostrava
GR	grafit
hpf	pole viditelné v optickém mikroskopu při maximálním zvětšení 400x (z angl. high powered field)
IL	interleukin
MCA	mnohorozměrná korespondenční analýza (z angličtiny: multiple correspondence analysis)
MgCO ₃	uhličitan hořečnatý
MR	magnetická rezonance
NMČ	nano- a mikročástice
PM	pevné částice (z angl. particulate mater)
RMS	Ramanova mikrospektroskopie
RS	Ramanova spektroskopie
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SEM-EDS	skenování elektronová mikroskopie s energiově disperzní spektrometrií

TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TiO ₂ -A	oxid titaničitý - anatas
TiO ₂ -R	oxid titaničitý - rutil
VDN	vedlejší dutiny nosní
VŠB-TUO	Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava
ZnO	oxid zinečnatý

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 2.1 Srovnání rozměru nanočástic a mikročástic s jinými objekty: jak „velké“ je „nano-“ a „mikro-“?
- Obr. 2.2 Skenovací elektronový mikroskop SEM (Quanta FEG 450, FEI) s rentgenovou mikroanalýzou APOLLO X (EDAX).
- Obr. 2.3 Srovnání optického mikroskopu, TEM a SEM. Zdroj: Soubusta J. Optoelektronické systémy: Elektronová mikroskopie transmisní a rastrovací. (48).
- Obr. 2.4 Rayleighův a Ramanův rozptyl.
- Obr. 2.5 Ramanův mikrospektrometr: Smart Raman Microscopy System XploRATM (HORIBA Jobin Yvon, France).
- Obr. 2.6 Kostěná laterální stěna dutiny nosní. Modifikováno podle (55).
- Obr. 2.7 Vedlejší dutiny nosní a jejich postnatální vývoj.
- Obr. 2.8 Schéma mukociliární clearance.
- Obr. 3.1 Schéma odběru nosní sliznice z dolní skořepky nosní při endoskopické mukotomii: a) sagitální řez (pohled na laterální stěnu dutiny nosní), b) koronární řez. S – horní nosní skořepka, M – střední nosní skořepka, IN – dolní nosní skořepka, Un – processus uncinatus, Se – nosní septum.
- Obr. 3.2 Schéma vzorku nosní sliznice odebraného při mukotomii; vertikální linie ukazují rozdělení vzorku na části podle vzdálenosti od nostril.
- Obr. 3.3 Řez sliznicí s vyznačenými 9 body, které byly analyzovány pomocí RMS.
- Obr. 3.4 Normální histologie (bez známek zánětu, závažnost zánětu - stupeň 0). Optická mikroskopie, zvětšení 200x.
- Obr. 3.5 Hyperplázie epitelu (závažnost zánětu - stupeň 1). Šipka ukazuje na hyperplastický epitel. Optická mikroskopie, zvětšení 200x.
- Obr. 3.6 Hyperplázie epitelu s mírnými známkami zánětu v podslizničním vazivu (závažnost zánětu - stupeň 2). Modrá šipka ukazuje hyperplastický epitel a červená fokální zánětlivou celulizaci. Optická mikroskopie, zvětšení 200x.

- Obr. 3.7 Chronický zánět v podslizničním vazivu (závažnost zánětu - stupeň 3). Šipka ukazuje velký cluster zánětlivé celulizace. Optická mikroskopie, zvětšení 400x.
- Obr. 3.8 Kulovitá částice železa ve vzorku M1 v obrazu SEM (zvětšení 3500x).
- Obr. 3.9 Agregát obsahující barium ve vzorku M3 v obrazu SEM (zvětšení 20 000x).
- Obr. 3.10 Vybraná Ramanova spektra částic detekovaných ve sliznici v CRS skupině, získaná Ramanovou mikrospektroskopií. $\text{TiO}_2\text{-A}$ – anatas, $\text{TiO}_2\text{-R}$ – rutil, AC – amorfni uhlík, CaCO_3 – kalcit, $\text{CaFe}(\text{CO}_3)_2$ – ankerit, Fe_3O_4 – magnetit, Fe_2O_3 – hematit, MgCO_3 – uhličitan hořečnatý, GR – grafit, BaSO_4 – barit. Upraveno podle Čabanové a kol. (98).
- Obr. 3.11 Ramanova spektra a EM zobrazení anatasu ve vzorku M1.
- Obr. 3.12 Ramanova spektra a EM zobrazení kalcitu ve vzorku M2.
- Obr. 3.13 Ramanova spektra a EM zobrazení CaSO_4 ve vzorku M3.
- Obr. 3.16 MCA biplot. Upraveno podle Čabanové a kol. (98).
- Obr. 3.17 Asociace C, Ti a CO s diagnózou (rhinitic = CRS skupina, non-rhinitic = kontrolní skupina; červená – málo zastoupená kategorie, modrá – významně zastoupená kategorie). Upraveno podle Čabanové a kol. (98).
- Obr. 3.18 Příklady částic kovu/jejich aglomerátů detekovaných SEM v hlenu (1a-4a) a ve sliznici (1b-4b). Upraveno podle Čabanové a kol. (97).

SEZNAM TABULEK

- Tab. 2.1 Srovnání vlastností nanočástic a mikročástic.
- Tab. 2.2 Příklady nálezů mikro- a nanočástic v lidských orgánových systémech.
- Tab. 2.3 Definice rinosinuitidy dle EPOS 2020 (63).
- Tab. 3.1 Demografická data pacientů M1 – M2.
- Tab. 3.2 Prvky detekované ve sliznici pomocí SEM. 1 – část nejbliže nostril, 2 a 3 – střední části, 4 – část nejbliže choan.
- Tab. 3.3 Částice detekované v různých částech vzorků sliznice pomocí RMS. P – povrchová vrstva sliznice, H – hluboké vrstvy sliznice.
- Tab. 3.4 Skupina pacientů s CRS: demografické údaje, kuřácká anamnéza, detekované částice a míra zánětlivých změn; upraveno podle Čabanové a kol. (98).
- Tab. 3.5 Kontrolní skupina: demografické údaje, kuřácká anamnéza a detekované částice.
- Tab. 3.6 Nejčastěji detekované částice v CRS skupině (celkem 40 vzorků).
- Tab. 3.7 Závažnost zánětu v CRS skupině (celkem 40 vzorků).
- Tab. 3.8 Detekované částice ve vztahu k histologickému nálezu. Skupina A: míra zánětu 0 – 2 – 55 % (22/40) vzorků / skupina B: míra zánětu 3 – 45 % (18/40) vzorků.
- Tab. 3.9 Detekované částice ve vztahu k anamnéze kouření u CRS skupiny.
- Tab. 3.10 Detekované částice ve vztahu k pracovní anamnéze v CRS skupině. Skupina M – „manuální“ práce, skupina K – „kancelářská“ práce.
- Tab. 3.11 Přehled prvků/sloučenin detekovaných v hlenu, resp. nosní sliznici pomocí SEM a RMS. Upraveno podle Čabanové a kol. (97).
- Tab. 3.12 Velikost částic kovu měřená pomocí SEM v hlenu a nosní sliznici.

SEZNAM ODBORNÝCH PUBLIKACÍ AUTORA

Práce související s disertační prací:

a) původní vědecké práce v časopise s IF

1. Čábalová L, Čabanová K, Bielniková H, Kukutschová J, Dvořáčková J, Dědková K, Zeleník K, Komínek P. Micro-and nanosized particles in nasal mucosa: A Pilot Study. *Biomed Res Int*. 2015. Epub 2015 Jun 1 (IF 2015 = 2,492)
2. Čabanová K, Peikertová P, Bielniková H, Barošová H, Motyka O, Čábalová L, Dvořáčková J, Komínek P, Kukutschová J. Raman Microspectroscopy as a useful tool for nanopathology. *J Raman Spectrosc* 2016. Epub 2016 Oct 13. (IF 2016 = 3,090)
3. Čabanová K, Motyka O, Čábalová L, Hrabovská K, Bielniková H, Kuzníková L, Dvořáčková J, Zeleník K, Komínek P, Kukutschová J. Metal particles in mucus and hypertrophic tissue of the inferior nasal turbinates from the human upper respiratory tract. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2020 Aug;27(22):28146-28154. (IF 2020 = 4,223)
4. Čabanová K, Motyka O, Bielniková H, Čábalová L, Handlos P, Zabiegaj D, Zeleník K, Dvořáčková J, Komínek P, Heviánková S, Havlíček M, Kukutschová J. Identification of the phase composition of solid microparticles in the nasal mucosa of patients with chronic hypertrophic rhinitis using Raman microspectroscopy. *Sci Rep*. 2021 Sep 23;11(1):18989. (IF 2021 = 4,380)
5. Čábalová L, Čabanová K, Bielniková H, Kukutschová J, Dvořáčková J, Zeleník K, Komínek P. Solid anorganic particles and chronic rhinosinusitis: A histopathology Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Jun 14;19(12):7269. (IF 2021 = 3,364)

b) přehledné/souborné práce v ostatních recenzovaných časopisech

1. Čábalová L, Komínek P, Zeleník K, Kukutschová J, Čabanová K.: Nanočástice, nanotoxikologie, nanomedicína: definice pojmů, perspektivy v otorinolaryngologii. *Otorinolaryng a Foniatr /Prague/*, 65, 2016, No. 3, s. 179-183.

c) původní vědecké práce v ostatních recenzovaných časopisech

d) přehledné/souborné práce v časopisech s IF

e) monografie

f) kapitoly v monografiích

g) publikovaná abstrakta

1. **Čábalová L**, Komínek P, Zeleník K, Kukutschová J. Nanočástice, nanotoxikologie, nanomedicína: perspektivy v otorinolaryngologii. Sborník abstrakt. XIV. Kongres mladých otorinolaryngologů, Svatka, 13. – 15. 9.2012. ISBN978-80-7311-134-2
2. **Čábalová L**, Komínek P, Zeleník K, Kukutschová J. Role nanočástic v etiopatogenezi onemocnění v ORL oblasti u dětí. Zborník prednášok. II. Popradské lekárske dni, 7.-8.2.2014, Poprad, Slovensko. Vydala Nemocnica Poprad, a.s.
3. **Čábalová L**, Čabanová K, Bielniková H, Komínek P, Kukutschová J, Dvořáčková J. Nanočástice a mikročástice v lidské sliznici dutiny nosní – první výsledky. Otorinolaryng. a Foaniatr. (Prague), 63, 2014, č. 2, s. 127. 76. kongres České společnosti otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku ČLS JEP, 4. – 6. 6. 2014, Ostrava. ISSN 1210-7867
4. **Čábalová L**, Čabanová K, Bielniková H, Kukutschová J, Dvořáčková J, Komínek P. Nanočástice a mikročástice ve sliznici dutiny nosní – pilotní studie. Sborník abstrakt. XVI. Česko-Slovenský kongres mladých otorinolaryngologů ČSORLCHHK ČLS JEP, 12. - 14. 10. 2016, Rožnov pod Radhoštěm. Dostupné z <https://docplayer.cz/40978532-Sbornik-abstrakt-xvi-cesko-slovensky-kongres-mladych-otorinolaryngologu-csorlchhk-cls-jep-hotel-eroplan-roznov-pod-radhostem.html>

h) seznam ostatních přednášek

1. **Čábalová L**, Komínek P, Zeleník K, Kukutschová J: Nanočástice, nanomedicína, nanotoxikologie: perspektivy v otorinolaryngologii. XIV. kongres mladých otorinolaryngologů, 13. - 15. 9. 2012, Svatka
2. **Čábalová L**, Čabanová K, Bielniková H, Komínek P, Kukutschová J, Dvořáčková J: Nanočástice a mikročástice v lidské sliznici dutiny nosní – první výsledky. Slezské dny preventivní medicíny, 5. – 7. 3. 2014, Karviná – Darkov

3. **Čábalová L:** Nanotoxikologie – role nanočástic v zánětlivých změnách nosní sliznice. Regionální ORL seminář, 11. 6. 2014, Ostrava
4. **Čábalová L:** Nanočástice, nanotechnologie, nanotoxikologie: Možný vliv nanočástic na lidský organismus. Přednáška pro Akademii 3. věku, Zdravotně sociální fakulta Ostravské univerzity, Ostrava, 26. 11. 2014
5. **Čábalová L, Čabanová K, Bielniková H, Kukutschová J, Dvořáčková J, Zeleník K, Komínek P:** Micro- and Nano-sized Particles in Nasal Mucosa – A Pilot Study. RhinoForum 2014, Varšava, Polsko 5.-6.12.2014
6. **Čábalová L, Čabanová K, Bielniková H, Kukutschová J, Dvořáčková J, Zeleník K, Komínek P:** Nanočástice a mikročástice v lidské sliznici dutiny nosní. Workshop Biomedicínské technologie, VŠB-TU Ostrava, 17.3.2015
7. **Čábalová, L, Čabanová K, Bielniková H, Kukutschová J, Dvořáčková J, Zeleník K, Komínek P:** Nanočástice a mikročástice ve sliznici dutiny nosní – pilotní studie. Česká ORL akademie, Olomouc 2.-3.10.2015
8. **Čábalová, L.** Nanoparticles and nasal mucosa. International Workshop on Nasal and Sinus Surgery, Lacrimal System Surgery, Ostrava, 13.10.2015

Publikace nesouvisející s disertační prací:

a) původní vědecké práce v časopise s IF

1. Zeleník K, Kukutschová J, Dvořáčková J, Bielníková H, Peikertová P, **Čábalová L**, Komínek P: Possible role of nano-sized particles in chronic tonsillitis and tonsillar carcinoma: a pilot study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2013, 270(2): 705-9. Epub 2012. **(IF 2012 = 1,774)**
2. Matoušek P, Zeleník K, Šafarčík K, **Čábalová L**, Komínek P. Squamous cell carcinoma antigen as a marker of sinonasal inverted papilloma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2014 Mar;271(3):535-8. **(IF 2014 = 1,684)**
3. Matoušek P, **Čábalová L**, Masárová M, Komínek P. Endoscopic Transcaruncular Medial Orbitotomy as an Alternative Approach to Anterior Ethmoidal Artery Coagulation. *J Craniofac Surg*. 2019 May/Jun;30(3):911-913. **(IF 2019 = 0,938)**
4. **Čábalová L**, Komínek P, Matoušek P, Ličev L, Kunčický R, Gulčík A. Paranasal sinus volumetry with system Fotom08 Plus. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences* 2020; 73(5):722-728. **(IF 2020 = 0,410)**
5. Formánek M, Hrbáč T, Procházka V, **Čábalová L**, Komínek P. Carotid body paraganglioma, a very rare pediatric tumor. *Cesk Slov Neurol N* 2020; 83/ 116(4): 436–437. **(IF 2020 = 0,300)**
6. Matoušek P, **Čábalová L**, Formánková D, Staníková L, Čelakovský P, Mejzlík J, Chrobok V, Komínek P. Tonsillar origin of deep neck infection as a negative prognostic factor for developing complications. *Otolaryngol Pol*. 2021 Oct 28;76(2):42-45. **(IF 2021 = 0,690)**
7. Matoušek P, Cvek J, **Čábalová L**, Misiorzová E, Krejčí O, Lipina R, Krejčí T. Does Endoscopic Transnasal Optic Nerve Decompression Followed by Radiosurgery Improve Outcomes in the Treatment of Parasellar Meningiomas? *Medicina* 2022, 58(8):1137. **(IF 2021 = 2,948)**

b) původní vědecké práce v ostatních recenzovaných časopisech

1. **Čábalová L**, Komínek P, Zeleník K, Syrovátka J, Matoušek P: Endoskopická transkarunkulární mediální orbitotomie jako přístup k ošetření posttraumatického krvácení z a. ethmoidalis anterior. *Otorinolaryng. a Foniát. /Prague/*, 62, 2013, č. 1, s. 35-37.

2. **Čábalová L**, Zeleník K, Komínek P: Stevensův-Johnsonův syndrom – kazuistika. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 2013, 19, s. 115-119.

c) přehledné/souborné práce v časopisech s IF

d) přehledné/souborné práce v ostatních recenzovaných časopisech

1. **Čábalová L**, Zeleník K, Komínek P, Matoušek P: Krvácení z a. ethmoidalis anterior – možnosti chirurgického řešení. *Otorinolaryng. a Foniat. /Prague/*, 62, 2013, č. 3, s. 140-144.
2. **Čábalová L**, Komínek P, Zeleník K: Obstrukce horních cest dýchacích u dětí z pohledu otorinolaryngologa. *Pediatric pro praxi*, 15, 2014, 2, s. 70-73.

e) monografie

1. Komínek P, Zeleník K, **Čábalová L**: Kazuistiky v otorinolaryngologii. Ostravská univerzita v Ostravě, 2013.

f) kapitoly v monografiích

1. **Čábalová L**, Černý M, Zeleník K: Anatomie a fyziologie jícnu. In *Mimójícnové projevy refluxní choroby*, Tobiáš, Havlíčkův Brod 2013. ISBN: 978-80-7311-138-0
2. Černý M, **Čábalová L**: Anatomie a fyziologie dutiny ústní a hltanu. In *Mimójícnové projevy refluxní choroby*, Tobiáš, Havlíčkův Brod 2013. ISBN: 978-80-7311-138-0
3. Chovanec M, Česák T, **Čábalová L**, Matoušek P, Potičný S, Lipina R: Chirurgická anatomie spodiny lební, sinonazální oblasti a nosohltanu. In *Endoskopická chirurgie spodiny lební*, Tobiáš, Havlíčkův Brod 2014. ISBN: 978-80-7311-139-7
4. Smílek P, Veselý M, **Čábalová L**: Slovníček základních pojmů. In *Karcinomy dutiny ústní a hltanu*, Tobiáš, Havlíčkův Brod 2015. ISBN: 978-80-7311-153-3
5. **Čábalová L**, Matoušek P, Kopecký A, Krejčí T, Kántor P, Lubojacký J: Chirurgická anatomie očníce. In *Chirurgie očníce*, Tobiáš, Havlíčkův Brod 2020. ISBN: 978-80-7311-198-4

6. Matoušek P, Čábalová L: Chirurgie spodiny lební (rinobaze). In Otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Tobiáš, Havlíčkův Brod 2021. ISBN: 978-80-7311-206-6

g) publikovaná abstrakta

1. Čábalová L, Komínek P: Dušnost u dětí z pohledu otorinolaryngologa. Sborník abstrakt. Pediatrický den, Ostrava 2. 9. 2012, ISBN 978-80-260-3019-5
2. Čábalová L, Komínek P: A. lusoria a n. laryngeus non-recurrens dx. u retrosternální struny. Sborník abstrakt. XIV. Kongres mladých otorinolaryngologů, Svratka, 13. – 15. 9.2012. ISBN 978-80-7311-134-2
3. Čábalová L, Matoušek P, Zeleník K, Komínek, P: Endoskopická transkarunkulární koagulace a. ethmoidalis anterior. Otorinolaryng. a Foniatr. (Prague). Supplementum – abstrakta, květen 2013, s. 20. 5. česko-slovenský kongres otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Hradec Králové, 23.-25.5.2013.
4. Zeleník K, Formánek M, Čábalová L, Komínek K: Vliv znečištění ovzduší na středoušní záněty. Kongres pediatriů a dětských sester, 5.-6.2.2014, Ostrava. Pediatrie pro praxi, Suppl. A, 2014, ISBN 978-80-7471-057-5
5. Čábalová L, Zeleník K, Komínek P: Dušnost u dětí z pohledu ORL lékaře. Zborník prednášok. II. Popradské lekárske dni, 7.-8.2.2014, Poprad, Slovensko. Vydala Nemocnica Poprad, a.s.
6. Čábalová L, Matoušek P, Komínek P: Rozsáhlý karcinom dutiny nosní a paranazálních dutin s propagací do tvrdého a měkkého patra a nosohltanu – kazuistika. Sborník abstrakt. XVII. Olomoucké onkologické dny, Olomouc, 20.-21.2.2014. ISBN 978-80-87562-14-7
7. Čábalová L, Matoušek P, Lipina R, Krejčí T, Komínek P: Méně obvyklé rozšířené transnazální endoskopické přístupy. 18. pracovní dny chirurgie baze lební, 8. - 10. 5. 2022, Rožnov pod Radhoštěm. Dostupné z www.baze-lebni2022.cz/sbornik_18._pracovni_dny_baze_lebni_2022.pdf

h) seznam ostatních přednášek

1. Čábalová L: Clinical anatomy of major salivary glands. Workshop Velké slinné žlázy 16. - 17. 4. 2012, Ostrava

2. **Čábalová L**, Komínek P, Zeleník K: Stevens-Johnsonův syndrom - kazuistika. ORL konference pardubického a královéhradeckého kraje. 18. – 19. 5. 2012, Hotel Mánes, Svratka
3. **Čábalová L**, Komínek P, Zeleník K: Stevensův-Johnsonův syndrom - kazuistika. XVI. česko-slovenský kongres o infekčních nemocech, 6. - 8. 6. 2012, Ostrava
4. **Čábalová L**, Matoušek P, Kopřivová H: Etiologie a diferenciální diagnostika poruch polykání. Regionální ORL seminář, 20. 6. 2012, Ostrava
5. **Čábalová L**: Kazuistika pacienta s karcinomem piriformního sinu. ORL seminář Moravskoslezského kraje, 12. 12. 2012, Ostrava
6. **Čábalová L**, Matoušek P: Pagetova choroba – kazuistika. ORL seminář Moravskoslezského kraje, 13. 2. 2013, Ostrava
7. **Čábalová L**, Matoušek P: Flexibilní endoskopie – využití v praxi. Regionální ORL seminář, 13. 2. 2013, Ostrava
8. **Čábalová L**, Matoušek P, Komínek K: Transkarunkulární endoskopická koagulace a. ethmoidalis anterior. 8. rinologické dny, 28. 2. - 2. 3. 2013, Zuberec, Slovensko
9. **Čábalová L**, Komínek P, Zeleník K, Kopřivová H: Clinical anatomy of larynx. Workshop Mikrochirurgie hrtanu a fonochirurgie (indikace, diferenciální diagnostika, live surgery), 8. – 9. 4. 2013, Ostrava
10. **Čábalová L**: Anatomy of larynx – cadaver demonstration. Workshop Mikrochirurgie hrtanu a fonochirurgie (indikace, diferenciální diagnostika, live surgery), 8. – 9. 4. 2013, Ostrava
11. **Čábalová L**, Komínek P: Aspirační punkce v léčbě peritonzilárního abscesu. IX. Ningerovy dny, 11. - 12. 10. 2013, Luhačovice
12. **Čábalová L**, Matoušek P, Komínek P: Transkarunkulární endoskopická koagulace a. ethmoidalis anterior. ORL seminář Moravskoslezského kraje, 11. 12. 2013, Ostrava
13. **Čábalová L**, Matoušek P, Komínek P: Rozsáhlý karcinom dutiny nosní a paranazálních dutin s propagací do tvrdého a měkkého patra a nosohltanu – kazuistika. XVII. Olomoucké onkologické dny 20. - 21. 2. 2014, Olomouc
14. **Čábalová L**, Zeleník K, Komínek P: Patofyziologie kašle. 76. kongres České společnosti otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku ČLS JEP, 4. – 6. 6. 2014, Ostrava

15. **Čábalová L**, Matoušek P: Endoscopic transnasal approach for spontaneous/traumatic CSF leak. Comprehensive hands-on course of endoscopic pituitary surgery 2014, 11. – 13. 6. 2014, Ostrava
16. **Čábalová L**, Zeleník K: Rinogenní bolesti hlavy. Regionální ORL seminář, 10. 12. 2014, Ostrava
17. **Čábalová L**, Matoušek P, Komínek P: Transnazální chirurgie hypofýzy – výhody spolupráce s ORL z pohledu pacienta. Zimní seminář Kliniky ORL a chirurgie hlavy a krku FNO pro endokrinology a ORL lékaře. 20. 1. 2016, Ostrava
18. **Čábalová L**, Matoušek P: Chirurgická léčba epistaxe. 3. česká ORL akademie. 14.-15.10.2016, Rožnov pod Radhoštěm. *Cena za nejlepší přednášku ORL akademie.*
19. **Čábalová L**, Matoušek P, Lipina R, Komínek P: Pooperační péče a komplikace po transnazálních endoskopických operacích baze lební z pohledu otorinolaryngologa. 16. pracovní dny chirurgie baze lební s mezinárodní účastí, 24.-26.11.2016, Špindlerův Mlýn
20. **Čábalová L**, Matoušek P: Skull base reconstruction and CSF leak repair technique in transnasal surgery. Comprehensive Hands-on Course of Transnasal Skull Base Surgery, 5.-7.12.2017, Ostrava
21. **Čábalová L**, Matoušek P: Complications of the transnasal approaches. How to avoid them? Comprehensive Hands-on Course of Transnasal Skull Base Surgery, 5.-7.12.2017, Ostrava
22. **Čábalová L**: Larynx anatomy (cadaver demonstration). International Workshop on Advanced Laryngeal and Tracheal Surgery, 9.-10. dubna 2018, Ostrava
23. **Čábalová L**, Matoušek P, Lipina R, Krejčí T, Komínek P: Méně obvyklé rozšířené transnazální endoskopické přístupy. 18. pracovní dny chirurgie baze lební, 8. - 10. 5. 2022, Rožnov pod Radhoštěm