

Anna Maria Świdwińska-Gajewska

NANOCZĄSTKI (CZĘŚĆ 2) — KORZYŚCI I RYZYKO DLA ZDROWIA

NANOPARTICLES (PART 2) — ADVANTAGES AND HEALTH RISK

Zakład Informacji Naukowej, Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera, Łódź

STRESZCZENIE

W ostatnich latach dużym zainteresowaniem naukowców cieszą się nanotechnologie i ich produkty — nanocząstki. Znajdują one zastosowanie w wielu dziedzinach, począwszy od nauk biomedycznych, poprzez optykę, włókiennictwo, budownictwo, motoryzację, a na elektryce i elektronice skończywszy. Niemalże z każdym dniem przybywa nowych możliwości wykorzystania nanostruktur. Nanocząstki to niestety nie tylko korzyści, ale również pewne ryzyko. Małe rozmiary pozwalają na wręcz niezauważalne przez człowieka pokonywanie barier ustrojowych. Narażenie na nanocząstki staje się zatem poważnym zagrożeniem. Może ono następować wszystkimi drogami, ale największe zagrożenie stanowi ekspozycja inhalacyjna. Działanie toksyczne nanocząstek objawia się przede wszystkim powstawaniem stanu zapalnego, będącego skutkiem najprawdopodobniej stresu oksydacyjnego. Niektórzy znajdują pewne podobieństwo między jednymi z bardziej popularnych nanocząstek — nanorurkami węglowymi — a włóknami azbestu. Wobec gwałtownego rozwoju nanotechnologii należy zadbać o wypracowanie właściwych kryteriów szacowania ryzyka, które zabezpieczą przed potencjalnym szkodliwym działaniem wynikającym ze specyficznych właściwości substancji w postaci nanocząstek. Med. Pr. 2007;58(3):253–263

Słowa kluczowe: nanocząstki, zastosowanie, toksyczność

ABSTRACT

Over the recent years, nanotechnologies and their products — nanoparticles — have become extremely popular among scientists. Nanoparticles find numerous applications in many fields, starting with biomedical sciences, through optics, textile, construction, motorization industries, and ending with electricity and electronics. New possibilities of nanoproducts application emerge almost every day. However, it should be remembered that nanoparticles carry both advantages and risks. Small-size-particles enable overcoming the systemic barriers unnoticeably to humans. Exposure to nanoparticles is a serious threat; it may take all possible routes, of which inhalation is the most important one. Toxicity of nanoparticles is manifested by inflammation resulting probably from oxidative stress. Nanosceptics even find certain similarities between nanoparticles and carbon nanotubes, one of the most popular nanoparticles, and asbestos fibers. In view of a rapid development of nanotechnologies it is essential to establish adequate criteria for risk assessment that could protect against potential harmful effects arising from specific properties of substances occurring in the form of nanoparticles. Med Pr 2007;58(3):253–263

Key words: nanoparticles, application, toxicity

Adres autorki: ul. św. Teresy 8, 91-348 Łódź, e-mail: answid@imp.lodz.pl

Nadesłano: 20.10.2006

Zatwierdzono: 20.04.2007

WSTĘP

Przedmiotem licznych badań ostatnich lat są niewielkie struktury, o wielkości do 100 nm, nazwane nanocząstkami. Obserwuje się gwałtowny rozwój technik związanych z projektowaniem i syntezą tego typu cząstek, określanych powszechnie nanotechnologiami. Nanocząstki wieńczą swój sukces dzięki szerokiemu spektrum możliwości zastosowania, między innymi w kosmetyce, farmacji, włókiennictwie, elektronice, optyce czy motoryzacji. Struktury te niosą ze sobą również i pewne zagrożenia. Nanocząstki posiadają pewne właściwości, które pozwalają na wykorzystanie ich w wielu dziedzinach, ale z drugiej strony przyczyniają się do większej szkodliwości substancji, w porównaniu z jej wielkocząsteczkową formą. Szerokie zainteresowanie możliwościami, jakie niesie nanotechnologia wśród specjalistów różnych dziedzin po-

zwala przypuszczać, że nanocząstki mogą w najbliższej przyszłości być stałym elementem naszego otoczenia. Już w tej chwili opisanie wszystkich możliwości zastosowania nanocząstek nie jest łatwym zadaniem. Warto jednak choć w krótkim zarysie zapoznać się z ich różnorodnością.

TECHNICZNE NANOCZĄSTKI

Najszerzej rozpowszechnionym typem nanocząstek projektowanych przez człowieka są nanorurki węglowe. Ze względu na budowę wyróżnia się nanorurki węglowe jedno- i wielościenne. W zależności od konstrukcji, nanorurki węglowe mogą być przewodnikami, półprzewodnikami lub izolatorami (1). W związku z szerokim spektrum możliwości konstrukcyjnych nanorurki węglowe znalazły szerokie zastosowanie

w nanoelektronice. Nanocząstki tworzą ultracienkie powłoki półprzewodnikowe, zwane studzienkami kwantowymi, stosowane w laserowych czytnikach CD. Polimery organiczne syntetyzowane na bazie nanocząstek mają zdolność emisji światła pod wpływem energii elektrycznej, a także generowania energii przy udziale światła słonecznego. Tego typu baterie słoneczne i akumulatory mogą być ekologicznym źródłem energii (2).

Substancje posiadają naturalne skłonności do tworzenia monomolekularnych warstw, co wykorzystuje się przy syntezie nanomateriałów. W zależności od zastosowania materiał można pokryć warstwą aktywną albo odporną chemicznie lub mechanicznie. W ten sposób można zabezpieczać powierzchnie metalowe przed korozją, a powierzchnie gładkie (szkło, tworzywo) przed zarysowaniem. Nanocząstki są obecnie używane do produkcji szkieł optycznych, farb wytrzymałych na pęknięcia oraz pokryć ścian odpornych na pokrywanie ich napisami (antygraffiti) (3). Tlenki metali, używane w postaci nanocząstek tworzących warstwy odporne na zarysowanie, działają również jako bezbarwny filtr przeciw promieniowaniu UV lub IR, a co ciekawe właściwości takich nie obserwuje się w materiałach tworzonych na bazie większych cząstek (4). Metody wytrącania substancji w fazie zol-żel stosowane są do produkcji nanocienkich warstw o właściwościach antyrefleksyjnych do monitorów i szkieł (5–7).

Nanopowłoki, które pokrywają szyby okienne, dzięki efektowi kwiatu lotosu, tworzą samoczyszczące się powierzchnie. Efekt ten związany jest z fakturą powierzchni, która sprawia, że przemieszczająca się po niej kropla absorbuje zanieczyszczenia. Zjawisko to zaobserwowano na płatkach kwiatu lotosu — rośliny, która zadziwia swoją nieskazitelną czystością po wynurzeniu się nawet z zamulonego zbiornika wodnego. Nanocząstki mogą mieć również zastosowanie w włókiennictwie: osadzone w materiałach tekstylnych zwiększają ich trwałość, sprawiają, że są one lżejsze, wpływają na ich właściwości fizyczne, hydrofobowość, zwiększają także odporność na zabrudzenia (8).

Nanotechnologia znalazła również zastosowanie w motoryzacji. Nanocząstki jako wypełniacze w oponach mogą poprawiać przyczepność kół, zmniejszając drogę hamowania na mokrej nawierzchni. Sztywność karoserii samochodu można poprawić dzięki zastosowaniu stali wzmocnionej nanocząstkami. Ultracienkie, przezroczyste powłoki na bazie srebra, dzięki

ogrzewaniu się mogą być stosowane jako powłoki przeciw osadzaniu się mgły (rosy) czy lodu na szybach. Ponadto przezroczyste i lekkie materiały mogą zastąpić części samochodowe, które ograniczają widoczność (9,10).

NANOCZĄSTKI W MEDYCYNIE I KOSMETOLOGII

Nanomateriały mają również szerokie zastosowanie w biologii i medycynie, w izolowaniu i oczyszczaniu struktur biologicznych i komórek oraz fluorescencyjnym znakowaniu preparatów biologicznych (11). Kropki kwantowe tworzone są przez fluorescencyjne nanocząstki wzbudzone światłem UV. Emitują one światło o różnej długości fali, w zależności od składu, dzięki czemu wykorzystywane są coraz częściej w technikach znakowania preparatów biologicznych (12–15). Z uwagi na dużą powierzchnię substancje w formie nanocząstek mogą być sprawnymi, niemal idealnie dopasowanymi katalizatorami (16). Nanocząstki znajdują również szerokie zastosowanie w medycynie: w bezpośrednim dostarczaniu leków, także do mózgu (17,18), terapii genowej, inżynierii tkankowej czy mikrochirurgii (19), a nawet przy konstrukcji materiałów do endoprotez czy rusztowania wykorzystwanego przy odbudowywaniu kości, konstruowanego m.in. z nanorurek węglowych lub nanorurek TiO_2 (20,21). Mogą również służyć jako narzędzie w genomice i proteomice (22). Mały rozmiar nanocząstek umożliwia sprawne przemieszczanie się w obrębie organizmu i sprawia, że leki są trudniej wychwytywane przez układ immunologiczny (23). Duża powierzchnia natomiast ułatwia wiązanie ligandów rozpoznających receptory komórek docelowych, co umożliwia dostarczenie leków do konkretnych komórek. Dzięki nanotechnologii możliwe jest stworzenie „laboratorium w chipie”, które precyzyjnie reagowałoby na potrzebę dostarczenia odpowiedniej dawki leku u osób przewlekle chorych (19,24–27).

Nanocząstki znalazły zainteresowanie wśród producentów kosmetyków. Powstają liczne produkty do pielęgnacji skóry zawierające nanoliposomy. Na szczególną uwagę zasługuje to, że materiały w skali nano zmieniają znacznie właściwości. Mało aktywne metale szlachetne w formie nanocząstek charakteryzują się wysoką aktywnością. Przykładem mogą być antyseptyczne właściwości srebra, choć wykorzystywane są one również w produktach medycznych i tekstyliach (28). Nanocząstki tlenku tytanu stosowane w filtrach przeciwsłonecznych, w przeciwieństwie

do materiałów złożonych z większych cząstek tej substancji, są przezroczyste, dzięki czemu z powodzeniem mogą być stosowane w preparatach kosmetycznych (29). Specjaliści z organizacji ATGA (Australian Therapeutic Goods Administration) oszacowali, że w 2006 r. w Australii było około 400 komercyjnie dostępnych kosmetyków z filtrem przeciwsłonecznym zawierającym TiO_2 lub ZnO w postaci nanocząstek (30).

NANOTECHNOLOGIE W PRZEMYSŁE SPOŻYWCZYM

Specyficzne właściwości nanocząstek mogą znaleźć zastosowanie przy produkcji, przetwarzaniu i pakowaniu żywności (31). Możliwe, że nanotechnologia pozwoli na manipulowanie molekularnymi formami żywności w kierunku zwiększenia trwałości i obniżenia kosztów produkcji. Nanotechnologia może wpływać na właściwości samej żywności. Napoje, takie jak woda czy mleko, mogą zostać wzbogacone w witaminy, minerały i inne potrzebne składniki dzięki technologii nanoemulsji, która w sposób kontrolowany wprowadza i uwalnia określone substancje. Technika ta pozwala również nadawać określone cechy, takie jak zapach, kolor, które w specyficznych warunkach (pod wpływem ciepła, ultradźwięków, zmian pH czy innych czynników) pojawiają się, zależnie od woli konsumenta. Nanoemulsje z obecnością substancji bakterioobójczych mogą również mieć zastosowanie przy oczyszczaniu wody. Stosowanie selektywnych nanofiltrów może pozwolić na wychwycenie toksyn na podstawie wielkości i kształtu ich cząsteczek (32).

Opakowania żywności można udoskonalać poprzez pokrywanie ich nanomateriałami, nadając im właściwości antybakteryjne. Nanotechnologia może pomóc w wykrywaniu substancji chemicznych i czynników biologicznych wskazujących na biochemiczne zmiany w żywności, gdzie nanocząstki służą jako wskaźnik obecności zanieczyszczeń i patogenów. Nanocząstki mogą wpływać na właściwości mechaniczne i odporność na ciepło. Nanopowłoki mogą także tworzyć odpowiednie membrany nieprzepuszczalne lub o określonej przepuszczalności, w zależności od rodzaju opakowania (9).

Odkrywczy fulerenów, pierwszych nanocząstek, prawdopodobnie nie zdawali sobie sprawy, że tego typu struktury znajdą zastosowanie w tak wielu dziedzinach. Nanocząstki to niestety nie tylko korzyści, ale również pewne ryzyko. Małe rozmiary pozwalają na niezauważalne wręcz przez człowieka pokonywa-

nie barier ustrojowych. Poważnym zagrożeniem staje się narażenie na nanocząstki.

NARAŻENIE NA NANOCZĄSTKI

Narażenie na nanocząstki może zachodzić drogą oddechową, pokarmową oraz przez skórę (33). Największe zagrożenie stanowi jednak ekspozycja inhalacyjna. Nanocząstki mają zdolność przenikania przez komórki nabłonkowe dróg oddechowych, istnieją także doniesienia o możliwym transporcie cząstek przez nerw węchowy (34). Niestety, nadal mało jest danych na temat rozmieszczenia nanocząstek w organizmie i ich metabolizmu.

Narażenie dermalne

Mimo szerokiego zastosowania nanocząstek w kosmetykach i farmaceutykach, stosowanych na skórę, niewiele jest dostępnych informacji na temat narażenia dermalnego. Doniesienia ekspertów HSE uspokajają brakiem dowodów wskazujących na występowanie szkodliwych następstw penetracji nanocząstek przez skórę (35). Szkodliwe efekty wywołane narażeniem dermalnym prawdopodobnie mają charakter lokalny, jedynie w obrębie skóry. Przepuszczalność dopiero przedostanie się nanocząstek do krwiobiegu i do innych organów może powodować poważniejsze skutki. Wiele prowadzonych badań na temat wnikania cząstek przez skórę dotyczy głównie zastosowania ich jako gotowych leków lub ich nośników (36). Najczęściej wykorzystywane do tego celu nanocząstki to liposomy, słabo rozpuszczalne stałe cząstki TiO_2 i ZnO , jak również cząstki polimerów. Badania z zastosowaniem mikroskopii optycznej i elektronicznej dowiodły, że nanocząstki TiO_2 stosowane w filtrach ochronnych przeciw promieniowaniu UV w kosmetykach odkładają się wyłącznie na zewnętrznej powierzchni warstwy rogowej naskórka. Nie wykryto bowiem nanocząstek w głębszych częściach naskórka ani w skórze właściwej (37). Badania dotyczące narażenia na nanocząstki wykazały jednak, że kropki kwantowe, w zależności od kształtu i pokrycia powierzchni, mogą przedostawać się przez nieuszkodzoną skórę w warunkach 8-godzinnej ekspozycji (38). Kontakt nanocząstek ze skórą powinien być zatem rozpatrywany jako potencjalne narażenie zawodowe.

Narażenie pokarmowe

Wiadomo, że cząstki mogą przemieszczać się ze światła przewodu jelitowego poprzez grudki tkanki limfaticznej jelitowej — kępki Peyera zawierające komórki M, przez komórki nabłonkowe jelit — enterocyty,

w mniejszym zaś stopniu przez przestrzenie międzykomórkowe (39,40). Dane na temat potencjalnego narażenia na nanocząstki drogą pokarmową są jednak znikome. Na podstawie doświadczeń z zastosowaniem cząstek wiadomo, że ich wnikanie zależy zarówno od wielkości, jak i ładunku elektrycznego. Zaobserwowano, że mniejsze cząstki szybciej przechodzą przez warstwę śluzu: cząstki o średnicy 14 nm przenikały w przeciągu 2 min, cząstki o średnicy 415 nm — w 30 min, a cząstki o średnicy 1000 nm nie pokonywały bariery warstwy śluzowej. Wiadomo również, że nanocząstki naładowane dodatnio są wychwytywane przez ujemnie naładowaną warstwę śluzu i nie docierają do enterocytów (41).

Narażenie inhalacyjne

Narażenie na nanocząstki występuje najczęściej drogą inhalacyjną. Przewód oddechowy spełnia rolę systemu filtrów, a każdy z jego elementów charakteryzuje odmienny mechanizm, co różnicuje stopień zalegania cząstek w każdym z odcinków. Wiadomo, że nanocząstki (frakcja ultrafine) ulegają przemieszczaniu dzięki ruchom Browna i podlegają zjawisku dyfuzji (42). Wchłonięte drogą inhalacyjną cząstki, w zależności od wielkości, mogą odkładać się w przewodzie oddechowym: w odcinku gardłowym, nosowym, tchawiczo-oskrzelowym i w płucach. Oddychanie przez nos, w porównaniu z oddychaniem przez usta, zwiększa wychwytywanie cząstek w górnym odcinku układu oddechowego, chroniąc przed odkładaniem się ich w oskrzelach czy płucach. W miarę jednak zmniejszania się wielkości cząstek dochodzi do odkładania się ich nie tylko w górnym odcinku układu oddechowego, ale również w oskrzelach i płucach. Co ciekawe, cząstki o średnicy poniżej 5 nm są wychwytywane efektywniej w górnej części przewodu oddechowego, dzięki czemu w mniejszym stopniu docierają do płuc. Z całej puli wdychanych nanocząstek w płucach odkłada się 30–70%. W rezultacie do płuc docierają głównie cząstki o wielkości 10–50 nm (42). Efektywność oczyszczania płuc zależy od masy, rozmiaru, trwałości i wielkości powierzchni wchłoniętych cząstek, co w efekcie powoduje trudności w usuwaniu nanocząstek z pęcherzyków.

PRZEMIESZCZANIE SIĘ NANOCZĄSTEK

Nanocząstki mogą z płuc przenikać do krwi i tą drogą do różnych organów wewnętrznych. Mogą wpływać na przepuszczalność mikronaczyń płucnych, a także

penetrować przez błony komórkowe i przedostawać się do wnętrza krwinek (43–47). Nanocząstki mogą być transportowane również drogą neuronalną. Zaobserwowano wzrost interleukiny 1 α (IL1 α) i czynnika martwicy nowotworów (TNF α) — biomarkerów stanu zapalnego — w tkance mózgowej myszy narażonych na nanocząstki (frakcję ultrafine) oraz cząstki frakcji fine (48). Translokację nanocząstek przez nerw węchowy potwierdzają również badania Elder i współpracowników. Szczurom podano tlenek manganu w postaci cząstek o średnicy 30 nm do nozdrzy. Po 12 dniach narażenia mangan zidentyfikowano w płucach, w wątrobie, a także w opuszce węchowej i innych rejonach mózgu: w prążkowie, korze płata czołowego i mózdzku. W opuszcce węchowej zaobserwowano wzrost czynnika martwicy nowotworu α oraz jego mRNA, jak również innych markerów stanu zapalnego. Co ciekawe, po podaniu zwierzętom cząstek tlenku manganu tylko do prawych nozdrzy metal kumulowany był jedynie w lewej opuszce węchowej. Autorzy wnioskuje, że stałe nanocząstki tlenku manganu podane drogą inhalacyjną są transportowane poprzez nerw węchowy do ośrodkowego układu nerwowego, powodując zmiany zapalne u szczurów. Mimo wielu różnic w układzie oddechowym tego typu translokacja cząstek może również występować u ludzi (34).

TOKSYCZNOŚĆ NANOCZĄSTEK

Wiadomo, że toksyczność substancji zależy w głównej mierze od budowy chemicznej. Cząstki sadzy technicznej wykazują bardziej szkodliwe działanie na organizmy żywe niż cząstki TiO₂ (49). Z badań eksperymentalnych wynika jednak, że obie te substancje są bardziej toksyczne, jeśli podawane są w postaci nanocząstek (frakcji ultrafine), porównując z większymi cząstkami (frakcji fine). Z kolei badania toksyczności substancji o podobnych właściwościach TiO₂ i BaSO₄, ale podanych w różnych postaciach, wykazały znaczną rozbieżność. Dytlenek tytanu TiO₂ podany w zbliżonej dawce, z zakresu 25–75 mg/m³, w eksperymencie inhalacyjnym na szczurach wykazywał większą toksyczność, niż BaSO₄, działając niekorzystnie na płuca i węzły chłonne. Porównywane dawki różniły się natomiast liczbą cząstek (50). Porównano więc efekty wywołane przez obie substancje w dawkach o podobnej wielkości całkowitej powierzchni cząstek i, co ciekawe, stopień toksyczności okazał się zbliżony. Obserwacje wskazują zatem, że wielkość powierzchni może być czynnikiem o istotnym znaczeniu dla właściwości

toksycznych substancji. Dzięki małej średnicy nanocząstki charakteryzują się dużą powierzchnią przy małej objętości. Większa jest także zdolność substancji do absorbowania innych cząstek na powierzchni (51,52). Można zatem przypuszczać, że toksyczność nanocząstek związana jest z ich niewielkim rozmiarem, a przede wszystkim z wielkością powierzchni i jej aktywnością.

Zobserwowano, że wiele substancji w postaci nanocząstek wyraźnie różni się pod względem toksyczności od formy o większej średnicy cząstek. Porównano efekty wywołane przez TiO_2 w postaci nanocząstek frakcji ultrafine z frakcją fine — cząstkami o wielkości 0,1–2,5 μm o podobnej strukturze krystalicznej. Po narażeniu trwającym 12 tygodni zaobserwowano poważniejsze zmiany zapalne w płucach narażanych zwierząt na frakcję ultrafine w porównaniu ze skutkiem narażenia na większe cząstki. Ponadto w okresie 1 roku od ustania narażenia nadal utrzymywały się różnice między zwierzętami narażonymi na cząstki TiO_2 o różnej wielkości, co objawiało się, między innymi, ogniskami zwłóknienia śródmiąższowego płuc oraz długotrwałym upośledzeniem czynności makrofagów płucnych u zwierząt eksponowanych na nanocząstki. Warto podkreślić, że zaobserwowano zależność między występowaniem zmian w płucach zwierząt a wielkością narażenia wyrażoną w postaci całkowitej powierzchni cząstek (52,53).

Badania toksyczności najmniejszych produkowanych nanocząstek (2–5 nm) przeprowadzono na modelu zwierzęcym. Myszy narażano inhalacyjnie (całe ciało) na cząstki TiO_2 przez 4 godziny w narażeniu ostrym lub przedłużonym (4 godz./dzień/10 dni). Skutki narażenia szacowano przy pomocy pomiarów całkowitej ilości białka, aktywności dehydrogenazy mleczanowej oraz ilości cytokin zapalnych w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALF). Przeprowadzono ponadto badanie histopatologiczne płuc. Wyniki wskazują, że u myszy po narażeniu ostrym na nanocząstki TiO_2 w stężeniu 0,77–7,22 mg/m^3 zaobserwowano jedynie nieznaczne efekty toksyczne w płucach oraz stan zapalny. Narażenie przedłużone na nanocząstki (10 dni w stężeniu 8,88 mg/m^3) wywołało natomiast znaczące objawy stanu zapalnego (większa ilość makrofagów pęcherzykowych), bezpośrednio po ekspozycji, a także po upływie 1 i 2 tygodni. Symptomy te jednak ustępowały po 3 tygodniach od ustania narażenia (54).

Oprócz tlenku tytanu pod kątem szkodliwości nanocząstek badano także sadzę techniczną, kobalt i ni-

kiel. Po narażeniu na mniejsze cząstki (frakcji ultrafine) zaobserwowano wzrost markerów zapalnych w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALF), a także zwiększenie ilości wolnych rodników, co może świadczyć o udziale stresu oksydacyjnego w mechanizmie toksyczności nanocząstek (55,56). Szczury rasy Wistar eksponowano na frakcję ultrafine i fine sadzy technicznej o podobnym stężeniu (odpowiednio 1,66 mg/m^3 i 1,40 mg/m^3) przez 7 godzin. Narażenie na frakcję ultrafine w przeliczeniu na liczbę cząstek było ponad 10-krotnie wyższe od frakcji fine. W efekcie narażenia na mniejsze cząstki sadzy technicznej zaobserwowano wzrost liczby leukocytów w BALF, przy czym wzrost liczby neutrofilów w płynie w obu grupach zwierząt eksponowanych na frakcje był podobny. Narażenie na nanocząstki spowodowało ponadto zwiększenie liczby leukocytów we krwi obwodowej (57). U szczurów narażanych na nanocząstki sadzy technicznej o wielkości 38 nm oprócz wzrostu markerów stanu zapalnego w BALF zauważono trwałą, łagodną wzrost częstości akcji serca. Badania histopatologiczne wykazały ponadto obecność skupisk makrofagów przeładowanych cząstkami (58).

Na szkodliwość nanocząstek w porównaniu z większymi cząstkami wskazują także badania z zastosowaniem lateksu, teflonu (politetrafluoroetyleny) i polistyrenu (59–61,49,62). U zwierząt narażanych na cząstki polistyrenowe o wielkości 64 nm wystąpił znacznie większy napływ neutrofilów do płuc, a także wzrost innych parametrów świadczących o stanie zapalnym, w porównaniu ze zwierzętami narażonymi na cząstki o wielkości 202–535 nm. Badania *in vitro* wykazały ponadto wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} . Autorzy sugerują, że zmiany te mogą wpływać na ekspresję genów białek prozapalnych. Zaobserwowano zwiększenie ekspresji genu interleukiny Il-8 oraz obniżenie poziomu glutationu w komórkach nabłonkowych A549 po narażeniu na cząstki frakcji ultrafine polistyrenu, a także ditlenku tytanu (63,64). W innym eksperymencie, przeprowadzonym na zwierzętach narażanych na cząstki polistyrenu, po podaniu dotchawicznym cząstek o wielkości 60 nm pojawiły się zmiany naczyniowe w kierunku zakrzepicy na skutek aktywacji płytek krwi i ich agregacji, czego nie zaobserwowano z kolei po narażeniu na cząstki o wielkości 400 nm, choć w obu grupach wystąpił stan zapalny płuc (65).

Z powyższych obserwacji wynika, że ta sama substancja podana w porównywalnej dawce, ale w postaci nanocząstek jest bardziej toksyczna w porównaniu

z większymi cząstkami. Związek o stosunkowo niskiej toksyczności w wielkocząstkowej postaci, może okazać się zatem znacznie bardziej szkodliwy w postaci nanostruktur. Wydaje się więc, że toksyczność nanocząstek jest w głównej mierze związana z powierzchnią.

Większa powierzchnia, a zatem większa możliwość absorbowania innych związków chemicznych, może wpływać na reaktywność nanocząstek. Zaobserwowano niekorzystny wpływ frakcji nanocząstek pochodzących ze spalin silnika Diesla na komórki mysiej linii makrofagów RAW 264.7 *in vitro* (66). Zdaniem autorów niektóre obserwowane efekty mogą być wywoływane nie przez same cząstki, lecz substancje zaabsorbowane na ich powierzchni. Nanocząstki zawieszona w powietrzu mogą tworzyć dość skomplikowane w budowie kompleksy, zawierające różne składniki organiczne, a także metale, np. żelazo metaliczne. Metal ten związany z nanocząstkami sadzy technicznej może powodować większą reaktywność, a w efekcie stres oksydacyjny (61). Cząstki mogą absorbować na swojej powierzchni nie tylko reaktywne związki chemiczne, ale również czynniki biologiczne, takie jak endotoksyny bakteryjne (67). Z drugiej strony takie właściwości absorpcyjne mogą zmniejszać cytotoksyczność. Wykorzystywane jest to między innymi w nanocząstkach o zastosowaniu biomedycznym, na których powierzchni absorbowane są cukry, takie jak: pullulan, dekstran, bądź białka: albumina, żelatyna, laktoferyna czy ceruloplazmina (68–72).

Nie bez wpływu na toksyczność pozostaje rodzaj substancji i budowa chemiczna. Szereg toksyczności nanocząstek po podaniu dotchawiczym ze względu na właściwości prozapalne przedstawia się następująco: $\text{Ni} > \text{Co} > \text{TiO}_2$. Na podstawie badań nad indukowaniem wolnorodnikowych uszkodzeń plazmidowego DNA oszacowano, że najmniej szkodliwe są nanocząstki ditlenku tytanu, zaś nanocząstki niklu i kobaltu posiadają podobne właściwości toksyczne (73).

STRES OKSYDACYJNY — ODPOWIEDŹ ORGANIZMU NA NANOCZĄSTKI

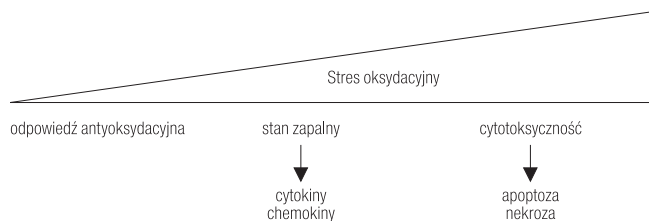
Działanie toksyczne nanocząstek objawia się przede wszystkim stanem zapalnym i powstaniem stresu oksydacyjnego (60,74). Istnieją również doniesienia o występowaniu reakcji alergicznej (60,75). Na udział reaktywnych form tlenu w mechanizmie działania nanocząstek wskazują wyniki licznych badań *in vivo* i *in vitro*. Przeprowadzono badania *in vitro* z użyciem ludzkich keratynocytów (HaCaT) i po 18-godzinnej

ekspozycji na nanorurki węglowe zaobserwowano obniżenie żywotności komórek na skutek tworzenia się wolnych rodników i gromadzenia nadtlenków, powodujących stres oksydacyjny, jak również zmniejszenie ilości glutationu (GSH), utlenienie grup SH białek oraz obniżenie poziomu witaminy E. Zauważono ponadto ultrastrukturalne i morfologiczne zmiany badanych komórek. Zdaniem autorów zwiększony stres oksydacyjny w komórkach skóry narażonych pracowników może być przyczyną dermalnej toksyczności nanorurek węglowych (76).

Efekty stresu oksydacyjnego pojawiły się również w makrofagach i monocytach krwi w badaniach *in vitro* po narażeniu na nanocząstki. Zaobserwowano wysokie stężenie jonów wapniowych wewnątrz monocytów, co może mieć wpływ na uwalnianie cytokin przez makrofagi w odpowiedzi na nanocząstki (63). Również badania ekspresji genów potwierdzają udział stresu oksydacyjnego w prozapalnym działaniu nanocząstek (77). Wolne rodniki na powierzchni indukowane dzięki wysokiej reaktywności nanocząstek oraz stres oksydacyjny mogą przyczyniać się także do stanu zapalnego przy przewlekłej zaporowej chorobie płuc (78).

Pojawienie się stresu oksydacyjnego w pęcherzykowych makrofagach zaobserwowano również w badaniach *in vivo*. U narażanych na nanocząstki TiO_2 szczurów wzrosła aktywność enzymów antyoksydacyjnych (peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej), jednak nie wystarczająco, aby skutecznie przeciwdziałać peroksydacji lipidów i zapobiec wywołaniu stresu oksydacyjnego (79). Udział wolnych rodników potwierdzają również badania *in vitro* z udziałem antyoksydantów (N-acetylocysteiny i estru metylo-glutationowego), które hamowały uwalnianie się czynnika TNF α z makrofagów pęcherzykowych po narażeniu na nanocząstki sadzy technicznej, kobaltu, niklu i ditlenku tytanu (55). Narażenie na nanostrukturalne związki: TiO_2 i ZnO wywoływało również pojawienie się oksydacyjnych uszkodzeń DNA, a także tworzenie się mikrojądełek i apoptozę (80–82).

Z licznych badań wynika, że narażenie na nanocząstki wywołuje szereg skutków, w których powstawaniu prawdopodobnie bierze udział stres oksydacyjny. Badania cytotoksyczności nanocząstek w postaci kropek kwantowych wykazały, że mogą one przekazywać energię optyczną na pobliskie atomy tlenu, w efekcie czego generowane są reaktywne formy tlenu, takie jak wolne rodniki: rodnik hydroksylowy ($\cdot\text{OH}$), nadtlenek ($\cdot\text{O}_2^-$) oraz tlen singletowy ($^1\text{O}_2$) (83). Badania narażenia



Ryc. 1. Model odpowiedzi na stres oksydacyjny powstały w wyniku narażenia na cząstki.

Fig. 1. Model of the response to stress induced by exposure to nanoparticles.

na cząstki, w szczególności obecne w spalinach silnika Diesla, wykazały, że stres oksydacyjny może odgrywać istotną rolę w procesach prozapalnych, prowadzących do astmy (84). Autorzy dowodzą, że reaktywne formy tlenu nie tyle pojawiają się w konsekwencji stanu zapalnego, ale odgrywają istotną rolę w jego powstawaniu w płucach. W zależności od ilości reaktywnych form tlenu, a więc wielkości powstałego stresu oksydacyjnego, skutkiem narażenia na nanocząstki może być jedynie odpowiedź antyoksydacyjna bądź objawy stanu zapalnego, a nawet efekty cytotoksyczne (ryc. 1.), uszkodzenia DNA i zmiany nowotworowe (84,77,85).

CZY GROZI NAM NANORURKOZA?

Na toksyczność cząstek, zwłaszcza przy narażeniu drogą inhalacyjną, wpływ ma również kształt. Specyficznym rodzajem nanocząstek projektowanych są nanorurki, które znajdują coraz większe zastosowanie w technologii. Są to cząstki włókniste o średnicy kilku nanometrów i o długości kilku-, a nawet kilkunastu mikrometrów. Ze względu na podobieństwo do włókien azbestu o potwierdzonych właściwościach rakotwórczych nanorurki stały się obiektem badań i obserwacji pod kątem działania toksycznego.

U myszy przez 7 dni narażanych na nanorurki węglowe podawane dotchawczo zaobserwowano, zależnie od podanej dawki, zmiany nowotworowe w płucach (ziarniniaki), a w niektórych przypadkach śródmiąższowe zapalenie płuc. W następstwie narażenia 90-dniowego pojawiła się ponadto martwica (86). Powstawanie ziarniniaków w płucach zaobserwowano również u szczurów narażanych dotchawczo na nanorurki węglowe (87). Autorzy wnioskujeją zatem, że nanorurki węglowe, docierając do płuc, mogą być bardziej toksyczne od sadzy technicznej i kwarcu, które stwarzają poważne ryzyko w narażeniu zawodowym. Aczkolwiek narażenie na aerozol nanorurek węglowych na stanowiskach pracy oszacowano na niewielkie.

NANOCZĄSTKI — „ZŁOTY ŚRODEK” CZY „AZBEST XXI WIEKU”?

Na fenomen sukcesu nanocząstek składa się wiele czynników. Nowoczesne trendy technologiczne dążą do miniaturyzacji. Poszukiwanie metod syntezy i wykorzystania coraz mniejszych struktur odkrywa wiele możliwości, ale wiąże się z tym również pewne ryzyko. Mały rozmiar, możliwość łatwego przemieszczania się, a także trudna wychwytywalność przez układ immunologiczny to cechy korzystne z punktu widzenia nośników leków. Jeśli jednak cząstki takie dostaną się do organizmu w sposób niepożądany, na skutek narażenia, mogą wpływać negatywnie na ustrój (88,89).

Słabe wychwytywanie przez makrofagi, łatwe przemieszczenie się w obrębie organizmu drogami oddechowymi do płuc, a dalej poprzez naczynia włosowate do krwiobiegu, przyczyniają się do rozwoju stanu zapalnego, a także zaburzeń ze strony układu oddechowego i krwionośnego (49). Łatwy transport nanocząstek do mózgu otwiera nowe możliwości dostarczania leków, ale przemieszczanie się przypadkowych struktur za pośrednictwem nerwów węchowych, w wyniku narażenia inhalacyjnego, może okazać się niebezpieczne (48). Nanocząstki są ponadto łatwo transportowane przez błony komórkowe i mogą zakłócać przekazanie sygnałów komórkowych. Z drugiej zaś strony warstwy zbudowane z nanorurek węglowych, które w zależności od budowy mają zdolność przewodzenia prądu (16), można wykorzystać w inżynierii tkankowej, między innymi jako podłoże dla wzrostu komórek nerwowych stymulowanych elektrycznie.

Duża powierzchnia ułatwia wiązanie się ligandów do receptorów komórek docelowych w nanokapsułkach o zastosowaniu biomedycznym (19), lecz stwarza tym samym większą szansę przypadkowym nanocząstkom na kontakt i interakcję z komórkami, jeśli wskutek narażenia dostaną się one do organizmu. Specyficzny kształt także wpływa na zachowanie nanocząstek, umożliwiając tworzenie kompleksów z biomolekułami. Odkryto, że nanorurki węglowe, ze względu na podobne rozmiary, mają zdolność oddziaływania z DNA, mogą być zatem dobrym narzędziem dla inżynierii genetycznej, działając między innymi jako wektory dla genów (22). Dobrze, jeśli dzieje się to zgodnie z planowanym eksperymentem, gorzej, jeżeli nanocząstki w sposób niekontrolowany dostaną się do organizmu. Wówczas mogą wchodzić w interakcję z nośnikiem genów, tworząc addukty DNA. Stwarza to niebezpieczeństwo zaburzeń replikacji, cyklu

komórkowego i może przyczynić się do powstawania nowotworów.

Wysoka aktywność powierzchniowa nanocząstek zwiększa możliwość wiązania metali i związków chemicznych, które mogą zakłócać równowagę oksydacyjną, wywołując stres i szereg związanych z nim następstw. Właściwości te są jednak wykorzystywane do tworzenia określonych materiałów, np. aktywnych lub odpornych chemicznie (16).

Rozmiar w skali nano ujawnia wiele interesujących cech substancji, których nie obserwuje się w większych formach, na przykład właściwości antyseptyczne srebra (28). Niestety nie zawsze nowo odkryte własności substancji są korzystne. W wielu przypadkach substancje niewykazujące właściwości toksycznych są szkodliwe w postaci nanocząstek (56). Liczne badania wskazują, że nanocząstki przyczyniają się do tworzenia wolnych rodników, zwiększając stres oksydacyjny, który w efekcie może prowadzić do peroksydacji fosfolipidów oraz uszkodzeń komórkowego DNA (55).

Wobec wzrastającego zainteresowania nanotechnologiami zwiększa się gwałtownie liczba produktów w postaci nanocząstek. Wydatki na ich produkcję osiągnęły już sumę kilku miliardów dolarów i szacuje się, że w 2015 r. kwota ta wyniesie 1 bilion dolarów (90). Wszechobecność nanocząstek powinna jednak iść w parze ze świadomością zagrożeń, jakie mogą one wywoływać. Nanosceptycy nazwali nanocząstki „azbestem XXI wieku” ze względu na podobną karierę obu materiałów (91). Szkodliwość azbestu, jak się okazało, znacznie przeważała korzyści związane z jego stosowaniem. Czy nanocząstki czeka podobny los? Wszystko zależy od tego, czy rozwój nanotechnologii będzie szedł w parze z wypracowaniem właściwych kryteriów szacowania ryzyka, które zabezpieczą przed potencjalnym szkodliwym działaniem wynikającym ze specyficznych właściwości substancji w postaci nanocząstek.

PIŚMIENNICTWO

- Petit P., Loiseau A.: Carbon nanotubes: from science to applications. *C. R. Physique* 2003;4:967–974
- Carbon nanotube applications. *Adv. Semicond. Mag.* 2003;16(5):22
- Allan J.: NanoMaterials Background Paper. NanoIreland 2005 [cytowany 17 kwietnia 2007]. Adres: http://www.forfas.ie/events/consultation/nanoireland0510/NanoIreland_NanoMaterials_consultation_0510_forfas.pdf
- Nanomaterial coating technology for transparent applications, *Addit. Polymers* 2001;9:7
- Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR) Opinion on The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies; wrzesień 2005 [cytowany 17 kwietnia 2007]. Adres: <http://files.nanobio-raise.org/Downloads/scenihr.pdf>
- Nanotechnology: Opportunities and Risks for Humans and the Environment, Background Paper, sierpień 2006, Umwelt Bundes Amt Für Mensch und Umwelt [cytowany 17 kwietnia 2007]. Adres: <http://www.umweltbundesamt.de/uba-info-presse-e/hintergrund/nanotechnology.pdf>
- Duan X.L., Yuan D.R., Cheng X.F., Yu F.P., Liu Z.Q., Zhang X.Q.: Synthesis and optical properties of transparent ZnO–Ga₂O₃–SiO₂ glass-ceramics embedded with cobalt-doped nanocrystals. *Nanotechnology* 2007;18:175609(5pp)
- Liu Y., Tang J., Wang R., Lu H., Li L., Kong Y. i wsp.: Artificial lotus leaf structures from assembling carbon nanotubes and their applications in hydrophobic textiles. *J Mater. Chem.* 2007;17:1071–1078
- Nanoforum Report: Benefits, Risks, Ethical, Legal and Social Aspects; 4th Report, June 2004 [cytowany 17 kwietnia 2007]. Adres: <http://www.nanoforum.org/dateien/temp/ELSIcomplete.pdf?01072004201014>
- Trends in Nanotechnology. Perspectives from Bayern Innovativ, Corporation for Innovation and Knowledge Transfer [cytowany 17 kwietnia 2007]. Adres: http://www.bayern-innovativ.de/ib/site/documents/media/714b4844-fd35-950d-0402-d8a5c6cc535a.pdf/Special_Nanotech_15011.pdf
- Panyam J., Sahoo S.K., Prabha S., Bargar T., Labhastwar V.: Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2003;262:1–11
- Sutherland A.J.: Quantum dots as luminescent probes in biological systems. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 2002;6:365–370
- Bruchez M.P.: Turning all the lights on: quantum dots in cellular assays. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2005;9:533–537
- Arya H., Kaul Z., Wadhwa R., Taira K., Hirano T., Kaul S.C.: Quantum dots in bio-imaging: Revolution by the small. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005;329:1173–1177
- Pinaud F., Michalet X., Bentolila L.A., Tsay J.M., Doose S., Li J.J. i wsp.: Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes. *Biomaterials* 2006;27:1679–1687
- Liu W.-T.: Nanoparticles and Their Biological and Environmental Applications. *J. Biosci. Bioeng.* 2006;102(1):1–7
- Mühlen A., Schwarz C., Mehnert W.: Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery — Drug re-

- lease and release mechanism. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1998;45:149–155
18. Kreuter J.: Application of nanoparticles for the delivery of drugs to the brain. *Int. Congr. Ser.* 2005;1277:85–94
19. Salata O.V.: Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J. Nanobiotechnology* 2004;2:3 [cytowany 17 kwietnia 2007]. Adres: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/2/1/3>
20. Win K.Y., Feng S.-S.: Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 2005; 26:2713–2722
21. Kubota S., Johkura K., Asanama K., Okouchi Y., Ogiwara N., Sasaki K.: Titanium oxide nanotubes for bone regeneration. *J. Materials Sci.: Materials Med.* 2004;15:1031–1035
22. Chow D.C., Johannes M.S., Lee W.-K., Clark R.L., Zauscher S., Chilkoti A.: Nanofabrication with Biomolecules. *NanoToday* 2005;8(12):30–39
23. Akerman M.E., Chan W.C.W., Laakkonen P., Bhatia S.N., Ruoslahti E.: Nanocrystal targeting in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002;99(20):12617–12621
24. Baran E.T., Özer N., Hasirci V.: *In vivo* half life of nano-encapsulated L-asparaginase. *J. Materials Sci.: Materials Med.* 2002;13:1113–1121
25. Kipp J.E.: The role of solid nanoparticle technology in the parental delivery of poorly water-soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 2004;284:109–122
26. Kohli A.K., Alpar H.O.: Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery: effect of particle size and charge. *Int. J. Pharm.* 2004;275:13–17
27. Nobs L., Buchegger F., Gurny R., Allémann E.: Poly(lactic acid) nanoparticles labeled with biologically active Neutravidin™ for active targeting. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004;58:483–490
28. Hurst K.M.: Characteristics and Applications of Antibacterial Nano-Silver. Department of Chemical Engineering Auburn University December 6, 2006 [cytowany 17 kwietnia 2007]. Adres: <http://www.eng.auburn.edu/users/hurstkm/nanosilver.pdf>
29. Jaroenworarluck A., Sunsaneeyametha W., Kosachan N., Stevens R.: Characteristics of silica-coated TiO₂ and its UV absorption for sunscreen cosmetic applications. *Surface Interface Anal.* 2006;38(4):473–477
30. Nanomaterials, sunscreens and cosmetics: Small Ingredients Big Risks, A report prepared for Friends of the Earth Australia and Friends of the Earth United States, May 2006 [cytowany 17 kwietnia 2007]. Adres: <http://nano.foe.org.au>
31. Study: Nanotechnology in Food and Food Processing Industry Worldwide [cytowany 17 kwietnia 2007]. Adres: <http://www.hkc22.com/Nanofood.html>
32. Sanguansri P., Augustin M.A.: Nanoscale materials development — a food industry perspective. *Trends Food Sci. Technol.* 2006;17:547–556
33. Maynard A.: Nanotechnology: assessing the risks. *Nano-today* 2006;1(2):22–33
34. Elder A., Gelein R., Silva V., Feikert T., Opanashuk L., Carter J. i wsp.: Translocation of Inhaled Ultrafine Manganese Oxide Particles to the Central Nervous System. *Environ. Health Perspect.* 2006;114(8):1172–1178
35. Aitken R.J., Creely K.S., Tran C.L.: Nanoparticles: An occupational hygiene review. Institute of Occupational Medicine for the Health and Safety Executive, 2004, RESEARCH REPORT 274 [cytowany 17 kwietnia 2007]. Adres: <http://www.hse.gov.uk/research/rrpdf/rr274.pdf>
36. Jenning V., Gysler A., Schäfer-Korting M., Gohla S.H.: Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000;49:211–218
37. Schulz J., Hohenberg H., Pflucker F., Gartner E., Will T., Pfeiffer S., i wsp.: Distribution of sunscreens on skin. *Adv. Drug Deliv. Rev. Suppl.* 2002;54(1):S157–S163
38. Ryman-Rasmussen J.P., Riviere J.E., Monteiro-Riviere N.A.: Penetration of Intact Skin by Quantum Dots with Diverse Physicochemical Properties. *Toxicol. Sci.* 2006;91(1):159–165
39. Hussain N., Jaitley V., Florence A.T.: Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001;50:107–142
40. Aprahamian M., Michel C., Humbert W., Devissaguet J.P., Damge C.: Transmucosal passage of polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as a new drug carried in the small intestine. *Biol. Cell* 1987;61:69–76
41. Szentkuti L.: Light microscopic observations on luminally administered dyes, dextrans, nanospheres and microspheres in the pre-epithelial mucus gel layer of the rat distal colon. *J. Controlled Release* 1997;46:233–242
42. Kreyling W.G., Semmler M., Möller W.: Dosimetry and toxicology of ultrafine particles. *J. Aerosol Med.* 2004;17(2):140–152
43. Oberdörster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A.C.P., Gelein R., Lunts A. i wsp.: Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 2002;65A:1531–1543
44. MacNee W., Li X.Y., Gilmour P., Donaldson K.: Systemic effect of particulate air pollution. *Inhal. Toxicol. Suppl.* 2000;12(3):233–244
45. Kreyling W.G., Semmler M., Erbe F., Mayer P., Takenaka S., Schulz H. i wsp.: Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J. Toxicol. Environ. Health* 2002;65A:1513–1530
46. Hamoir J., Nemmar A., Halloy D., Wirth D., Vincke G., Vanderplasschen A. i wsp.: Effect of polystyrene particles on lung microvascular permeability in isolated perfused rabbit lungs: role of size and surface properties. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003;190:278–285

47. Geys J., Coenegrachts L., Vercammen J., Engelborghs Y., Nemmar A., Nemery B. i wsp.: In vitro study of the pulmonary translocation of nanoparticles A preliminary study. *Toxicol. Lett.* 2006;160:218–226
48. Campbell A., Oldham M., Beceria A., Bondy S.C., Meacher D., Sioutas C. i wsp.: Particulate matter in polluted air may increase biomarkers of inflammation in mouse brain. *NeuroToxicology* 2005;26:133–140
49. Renwick L.C., Brown D., Clouter A., Donaldson K.: Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup. Environ. Med.* 2004;61:442–446
50. Tran C.L., Buchanan R.T., Cullen R.T., Searl A, Jones A.D., Donaldson K.: Inhalation of poorly soluble particles II influence of particle surface area on inflammation and clearance. *Inhal. Toxicol.* 2000;12:1113–1126
51. Donaldson K., Stone V., Tran C.L., Kreyling W., Borm P.J.A.: Nanotoxicology. *Occup. Environ. Med.* 2004;61:727–728
52. Oberdörster G., Finkelstein J.N., Johnston C., Gelein R., Cox C., Baggs R. i wsp.: Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. HEI Research Report 96, August 2000. Health Effects Institute [cytowany 17 kwietnia 2007]. Adres: <http://pubs.healtheffects.org/get-file.php?u=203>
53. Oberdörster G., Ferin J., Lehnert B.E.: Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ. Health Perspect.* 1994;102(S5):173–179
54. Grassian V.H., O’Shaughnessy P.T., Adamcakova-Dodd A., Pettibone J.M., Thorne P.S.: Inhalation Exposure Study of Titanium Dioxide Nanoparticles with a Primary Particle Size of 2 to 5 nm. *Environ. Health Persp.* 2007;115(3):397–402
55. Collin A.J., Dick C.A., Brown D.M., Donaldson K., Stone V.: The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal. Toxicol.* 2003;15:39–52
56. Zhang Q., Kusaka Y., Zhu X., Sato K., Mo Y., Kluz T. i wsp.: Comparative toxicity of standard nickel and ultrafine nickel in lung after intratracheal instillation. *J. Occup. Health* 2003;45:23–30
57. Gilmour P.S., Ziesenis A., Morrison E.R., Vickers M.A., Drost E.M., Ford I. i wsp.: Pulmonary and systemic effects of short-term inhalation exposure to ultrafine carbon black particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004;195:35–44
58. Harder V., Gilmour P.S., Lentner B., Karg E., Takanaka S., Ziesenis A. i wsp.: Cardiovascular responses in unstrained WKY rats to inhaled ultrafine carbon particles. *Inhal. Toxicol.* 2005;17:29–42
59. Li X.Y., Brown D., Smith S., MacNee W., Donaldson K.: Short-term inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats. *Inhal. Toxicol.* 1999;11:709–731
60. Donaldson K., Stone V., Clouter A., Renwick L., MacNee W.: Ultrafine particles. *Occup. Environ. Med.* 2001;58:211–216
61. Wilson M.R., Lightbody J.H., Donaldson K., Sales J., Stone V.: Interactions between ultrafine particles and transition metals *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2002;184:172–179
62. Johnston C.J., Finkelstein J.N., Mercer P., Corson N., Gelein R., Oberdörster G.: Pulmonary Effects Induced by Ultrafine PTFE Particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2000;168:208–215
63. Brown D.M., Wilson M.R., MacNee W., Stone V., Donaldson K.: Size dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001;175:191–199
64. Singh S.: Toxicological effects of Nanoparticles: In vitro studies with Titanium Dioxide, Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, angefertigt am Institut für Umweltmedizinische Forschung (IUF) an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf 2005 [cytowany 17 kwietnia 2007]. Adres: http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=976000458&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=976000458.pdf
65. Nemmar A., Hoylaerts M.F., Hoet P.H., Vermeylen J., Nemery B.: Size effect of intratracheally instilled particles on pulmonary inflammation and vascular thrombosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003;186:38–45
66. Xia T., Korge P., Weiss J.N., Li N., Venkatesen M.I., Sioutas C. i wsp.: Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction implications for ultrafine particle toxicity. *Environ. Health. Perspect.* 2004;112(14):1347–1358
67. Schins R.P.F., Lightbody J.H., Borm P.J.A., Shi T., Donaldson K., Stone V.: Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004;195:1–11
68. Gupta M., Gupta A.K.: In vitro cytotoxicity studies of hydrogel pullulan nanoparticles prepared by AOT/N-hexane micellar system. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2004;7(1):38–46
69. Gupta A.K., Gupta M.: Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. *Biomaterials* 2005;26:1565–1573
70. Berry C.C., Wells S., Charles S., Curtis A.S.G.: Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 2003;24:4551–4557
71. Gupta A.K., Gupta M., Yarwood S.J., Curtis A.S.G.: Effect of cellular uptake of gelatin nanoparticles on adhesion, morphology and cytoskeleton organisation of human fibroblasts. *J. Controlled Release* 2004;95:197–207

72. Gupta M., Curtis A.S.G.: Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. *Biomaterials* 2004;25:3029–3040
73. Zhang Q., Kusaka Y., Sato K., Nakakuki K., Kohyama N., Donaldson K.: Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine metals: role of free radicals. *J. Toxicol. Environ. Health* 1998;53A:423–438
74. Donaldson K., Stone V.: Current hypotheses on the mechanism of toxicity of ultrafine particles. *Ann. Ist. Super. Sanità* 2003;39(3):405–410
75. Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J.: Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 2005;113(7):823–839
76. Shvedova A.A., Castranova V., Kisin E.R., Schwegler-Berry D., Murray A.R., Gandelsman V.Z. i wsp.: Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J. Toxicol. Environ. Health* 2003;66A:1909–1926
77. Kooter I.M., Pennings J.L.A., Opperhuizen A., Cassee F.R.: Gene expression pattern in spontaneously hypertensive rats exposed to urban particulate matter (EHC-93). *Inhal. Toxicol.* 2005;17:53–65
78. MacNee W., Donaldson K.: Mechanism of lung injury caused by PM10 and ultrafine particles with special reference to COPD. *Eur. Respir. J. Suppl.* 2003;40(21):47s–51s
79. Afaq F., Abidi P., Matin R., Rahman Q.: Cytotoxicity, pro-oxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultrafine titanium dioxide. *J. Appl. Toxicol.* 1998;18:307–312
80. Donaldson K., Beswick P.H., Gilmour P.S.: Free radical activity associated with the surface of particles: a unifying factor in determining biological activity? *Toxicol. Lett.* 1996;88:293–298
81. Dunford R., Salinaro A., Cai L., Serpone N., Horikoshi S., Hidaka H. i wsp.: Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. *FEBS Lett.* 1997;418:87–90
82. Rahman Q., Lohani M., Dopp E., Pemsel H., Jonas L., Weiss D.G. i wsp.: Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environ. Health Perspect.* 2002;110(8):797–800
83. Yu W.W., Chang E., Drezek R., Colvin V.L.: Water-soluble quantum dots for biomedical applications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;348:781–786
84. Li N., Hao M., Phalen R.F., Hinds W.C., Nel A.E.: Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clin. Immunol.* 2003;109:250–265
85. Donaldson K., Tran L., Jimenez L.A., Duffin R., Newby D.E., Mills N. i wsp.: Combustion-derived nanoparticles: A review of their toxicology following inhalation exposure. *Particle Fibre Toxicol.* 2005;2:10 [cytowany 17 kwietnia 2007]. Adres: <http://www.particleandfibretoxicology.com/content/2/1/10>
86. Lam C.W., James J.T., McCluskey R., Hunter R.L.: Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci.* 2004;77(1):126–134
87. Warheit D.B., Laurence B.R., Reed K.L., Roach D.H., Reynolds G.A.M., Webb T.R.: Comparative Pulmonary Toxicity Assessment of Single-wall Carbon Nanotubes in Rats. *Toxicol. Sci.* 2004;77(1):117–125
88. Albrecht M.A., Evans C.W., Raston C.L.: Green chemistry and the health implications of nanoparticles. *Green Chem.* 2006;8:417–432
89. Hardman R.: A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors. *Environ. Health Persp.* 2006;114(2):165–172
90. Aitken R.J., Chaudhry M.Q., Boxall A.B.A., Hull M.: Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. *Occup. Med.* 2006;56:300–306
91. Workplace exposure to nanomaterials: Will nano be the next asbestos? Background paper Written by Georgia Miller, prepared for Friends of the Earth Australia and Friends of the Earth United States, maj 2006 [cytowany 17 kwietnia 2007]. Adres: <http://nano.foe.org.au/filestore2/download/116/Workplace%20exposure%20to%20nano%20-%20Background%20Paper%20May%202006.pdf>