



Toksykokinetyka i toksyczność nanocząstek w przebiegu narażenia inhalacyjnego

Toxicokinetics and toxicity of nanoparticles in the course of inhalation exposure

Berta Fal^{1,A-D,F}, Magdalena Czajka^{1,B-C}, Magdalena Matysiak-Kucharek^{1,B,D},
Krzysztof Sawicki^{1,B-C}, Lucyna Kapka-Skrzypczak^{1,A,E-F}

¹ Zakład Biologii Molekularnej i Badań Translacyjnych, Instytut Medycyny Wsi w Lublinie

A – Koncepcja i projekt badania, B – Gromadzenie i/lub zestawianie danych, C – Analiza i interpretacja danych, D – Napisanie artykułu, E – Krytyczne zrecenzowanie artykułu, F – Zatwierdzenie ostatecznej wersji artykułu

Fal B, Czajka M, Matysiak-Kucharek M, Sawicki K, Kapka-Skrzypczak L: Toksykokinetyka i toksyczność nanocząstek w przebiegu narażenia inhalacyjnego. Med Og Nauk Zdr. doi: 10.26444/monz/124761

■ Streszczenie

Wprowadzenie i cel pracy. Współczesny dynamiczny rozwój nanotechnologii zapewnia społeczeństwu wiele korzyści. Za sprawą niemal nieograniczonych manipulacji materią w nanoskali powstają nanomateriały (NMs), wykazujące odmienne właściwości fizykochemiczne w porównaniu do swoich odpowiedników o większych rozmiarach. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie czynników determinujących zachowanie toksykokinetyczne nanocząstek (NPs) wskutek narażenia inhalacyjnego oraz potencjalnych losów NPs w układzie oddechowym i toksycznych efektów ich oddziaływań ze strukturami biologicznymi. Omówiono w niej najnowsze postępy i ograniczenia związane z oceną i zarządzaniem ryzykiem narażenia na NPs.

Skrócony opis stanu wiedzy. Możliwość nadawania NMs pożądanych cech przekłada się na szeroki wachlarz ich zastosowań niemal w każdej dziedzinie życia. Pociąga to za sobą rosnące ryzyko narażenia ludzi na NMs, w tym NPs, których nie należy traktować analogicznie do innych zanieczyszczeń chemicznych. NPs przekraczają bariery ochronne organizmu zarówno drogą dermalną, pokarmową, jak i inhalacyjną, jednak ta ostatnia ma największe znaczenie w odniesieniu do toksycznych efektów ekspozycji. Wiele projektowanych NPs wykazuje zdolność pokonywania barier fizycznych, biochemicznych oraz komórkowych układu oddechowego i przejścia przez powierzchnię oddechową do krwiobiegu.

Podsumowanie. Toksykologiczna ocena ryzyka narażenia na NMs powinna zachodzić równocześnie z opracowywaniem nowych NMs, w celu zapewnienia zdrowia i bezpieczeństwa ludzi oraz ochrony środowiska. Dokładne zbadanie toksykokinetyki wdychanych NPs ma zatem ogromne znaczenie dla wiarygodnego oszacowania ryzyka ekspozycji.

Słowa kluczowe

nanomateriały, nanocząstki, narażenie inhalacyjne

■ Abstract

Introduction. The modern dynamic development of nanotechnology provides many benefits to society. Due to almost unlimited manipulations of the matter at the nanoscale, nanomaterials (NMs) are created, which show different physicochemical properties compared to their counterparts of larger sizes.

Objective. The aim of this study is presentation of the factors determining the toxicokinetic behaviour of NPs due to inhalation exposure, and the potential fate of NPs in the respiratory system, as well as the toxic effects of their interaction with biological structures. The latest progress and limitations related to the assessment and management of risk of exposure to NPs are discussed.

Brief description of the state of knowledge. The ability to give NMs the desired characteristics translates into a wide range of applications of these materials in almost every area of life. This entails an increasing risk of human exposure to NMs, including NPs, which should not be treated analogously to other chemical pollutants. NPs exceed the protective barriers of the body by the dermal, ingestion and inhalation routes; however, the latter is of the greatest importance in relation to the toxic effects of exposure. Many engineered NPs have the ability to overcome the physical, biochemical and cellular barriers of the respiratory system and pass through the respiratory surface into the bloodstream.

Conclusions. Toxicological risk assessment of exposure to NMs should occur simultaneously with the development of new NMs to ensure human health and safety, and environmental protection. A thorough study of the toxicokinetics of inhaled NPs, therefore, is of great importance for a reliable exposure risk assessment.

Key words

nanomaterials, nanoparticles, inhalation exposure

Adres do korespondencji: Berta Fal, Zakład Biologii Molekularnej i Badań Translacyjnych, Instytut Medycyny Wsi w Lublinie
e-mail: berta.fal@gmail.com

Nadesłano: 25.05.2020; zaakceptowano do publikacji: 29.06.2020 publikacja online: 22.07.2020.

WPROWADZENIE I CEL PRACY

W ostatnich latach nanotechnologia stała się jedną z najbardziej obiecujących dziedzin nowych technologii na świecie,

umożliwiają podejmowanie różnorodnych manipulacji materią na poziomie nanoskali, wynoszącym od 1 do 100 nm. W tym zakresie zachodzą wyjątkowe zjawiska, umożliwiające projektowanie i opracowywanie nowych produktów niemalże w każdym obszarze działalności człowieka [1]. Szereg nanoobjektów, w tym nanocząstek (NPs), nanopłytek oraz nanowłókien, należących do obszernej grupy projektowanych nanomateriałów (NMs) z powodzeniem znajduje zastosowanie we współczesnej medycynie, farmacji, biotechnologii, wytwarzaniu energii, naukach o środowisku, ochronie upraw, transporcie i elektronice [2]. Ze względu na duży stosunek powierzchni do objętości i prawdopodobne występowanie efektów kwantowych, NMs wykazują zupełnie odmienne cechy w porównaniu do swoich odpowiedników masowych, co przekłada się na coraz powszechniejsze ich użycie [3]. Ogromne zainteresowanie nanotechnologią pociąga za sobą nieuniknioną i wciąż narastającą ekspozycję ludzi na NMs. Z tego względu nowo powstały obszar toksykologii – nanotoksykologia koncentruje się na opracowywaniu skutecznych narzędzi do oceny bezpieczeństwa i właściwości toksycznych NMs. Jedno z podstawowych pytań, na które stara się odpowiedzieć ta subdyscyplina, brzmi: „dlaczego NMs mogą być z natury bardziej toksyczne niż substancje, z których są zbudowane?”. Wnioski z dotychczasowych obserwacji wskazują, że NMs nie mogą być traktowane w taki sam sposób jak związki chemiczne, z których powstają w odniesieniu do oceny ich bezpieczeństwa, z uwagi na unikalne właściwości fizykochemiczne tych molekuł, będące przyczyną nieoczekiwanych interakcji ze składowymi modelami eksperymentalnymi. Ponadto prowadzenie badań nad efektami oddziaływań NMs ze strukturami biologicznymi wiąże się z innymi wyzwaniami. Zasadniczą trudność stanowi utrzymanie spójności w serii ważnych cech NMs wykorzystywanych w badaniach, takich jak rozmiar, kształt, skład, właściwości powierzchni. Problemem jest ustalenie właściwej dawki, będącej odpowiednim stosunkiem masy, pola powierzchni i koncentracji NMs, jak również opracowanie skutecznych metod detekcji i oceny ilościowej NMs w tkankach. Wyzwaniem w badaniach nanotoksykologii jest także zmiana właściwości fizycznych i chemicznych NMs wraz z upływem czasu lub wskutek oddziaływań środowiska biologicznego [1].

Wraz z wykładniczym wzrostem produkcji i komercjalizacji produktów opartych na nanotechnologii stopień narażenia ludzi na NMs, a w szczególności NPs, zmienił się znacząco. NPs mogą dostać się do organizmu człowieka drogą inhalacyjną, pokarmową, dermalną i wskutek iniekcji, w sposób niezamierzony lub celowy. Pomimo ewolucji ludzkich dróg oddechowych w kierunku szczelnych barier zarówno strukturalnych, jak i funkcjonalnych, nie zawsze zapewniają one wystarczającą ochronę przed szkodliwymi cząsteczkami zawieszonymi we wdychanym powietrzu, szczególnie w przypadku cząstek o małych rozmiarach. Dlatego droga inhalacyjna stanowi główny portal niezamierzonego przedostania się cząstek nanometrycznych do organizmu, a więc najistotniejszą drogę narażenia środowiskowego, w tym zawodowego na NPs [4]. Powierzchnia wymiany gazowej składa się w przeważającej części z komórek nabłonkowych, stale narażonych na działanie środowiska zewnętrznego, a zatem potencjalnych substancji szkodliwych. Pomimo obecności systemów zabezpieczających w postaci dużej powierzchni oddechowej (ponad 100 m² w płucach osób dorosłych), nabłonka urzęsionego, wydzielania substancji ochronnych

(śluz i surfaktant płucny) oraz obecności komórek odpornościowych (makrofagi pęcherzykowe i śródmiąższowe), nadal możliwe jest przejście bariery powietrze–krew, szczególnie przez struktury o wyjątkowo małych wymiarach. Pokonanie tych przeszkód przez zawieszane w powietrzu NPs może wywołać serię niepożądanych reakcji w postaci stresu oksydacyjnego, stanu zapalnego, genotoksyczności, zwłóknienia śródmiąższowego, rozedmy płuc [5–7].

Dynamiczny rozwój nanotechnologii, potęgujący emisję NMs do środowiska, stwarza potrzebę dalszego zgłębiania wiedzy na temat ich potencjalnego negatywnego wpływu na ludzki organizm. Dlatego toksykologicznej oceny ryzyka narażenia na NMs powinno się dokonywać jednocześnie z opracowywaniem i produkcją coraz to nowych nanoobjektów, w celu zapewnienia zdrowia i bezpieczeństwa pracowników oraz konsumentów, a także ochrony środowiska [8]. Toksykokinetyka wdychanych NPs, w tym ich całkowite wchłanianie, biodystrybucja i dawka, mają zatem ogromne znaczenie dla wiarygodnej oceny ryzyka [9]. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie czynników determinujących zachowanie toksykokinetyczne NPs wskutek narażenia inhalacyjnego oraz potencjalnych losów NPs w układzie oddechowym i toksycznych efektów ich oddziaływania ze strukturami biologicznymi. Ponadto omówiono najnowsze postępy i ograniczenia związane z oceną i zarządzaniem ryzykiem narażenia na NPs obecne w powietrzu.

OPIS STANU WIEDZY

Źródła narażenia inhalacyjnego

Przez lata pracownicy różnych branż przemysłowych byli narażeni na przypadkowe ultradrobne cząstki, a badania epidemiologiczne wykazały związek między narażeniem na ten typ zanieczyszczeń powietrza w wyższych stężeniach i niekorzystnymi skutkami zdrowotnymi, prowadzającymi do chorób płuc. Współczesny ciągły wzrost produkcji i zastosowań NPs budzi obawy dotyczące narażenia zawodowego i będących jego efektem skutków zdrowotnych [10]. Szczególnie niepokojący jest fakt, że ekspozycja na projektowane NPs zawieszane w powietrzu ma największe znaczenie właśnie w aspekcie bezpieczeństwa i zdrowia w miejscu pracy. Do kontaktu z NPs może dochodzić podczas ich produkcji, przy obsłudze poszczególnych procesów technologicznych, na różnych etapach ścieżki dostaw, podczas przetwarzania i nadawania nowych właściwości [11]. Ryzyko zawodowe może wiązać się z wielokrotną i długotrwałą ekspozycją na wysokie dawki NPs, których zachowanie toksykokinetyczne pozostaje wciąż nie w pełni poznane. Znajomość procesów prowadzących do niepożądanego emisji NPs ma więc fundamentalne znaczenie dla właściwego opracowania charakterystyki narażenia na NPs w miejscu pracy [12].

Z roku na rok odnotowuje się stały wzrost liczby produktów opartych na nanotechnologii, swobodnie wprowadzanych na rynek, przy braku szczegółowych regulacji w zakresie rodzaju i zawartości cząstek nanometrycznych. Narażenie inhalacyjne na NPs rozpylone we wdychanym powietrzu może występować podczas zamierzonego stosowania takich produktów konsumenckich w postaci aerozoli, jak i w efekcie emisji NPs podczas eksploatacji różnych urządzeń udoskonalonych nanotechnologią [13]. Wśród produktów medycznych i konsumenckich zawierających NPs na rynku dominują te oparte na srebrze (AgNPs), złocie (AuNPs), dwutlenku tytanu (TiO₂NPs),

krzemionce (SiO_2 NPs) i tlenkach żelaza (IONPs) w nanoskali. AgNPs wykorzystuje się przy wytwarzaniu preparatów przeciwdrobnoustrojowych, opatrunków, kosmetyków, przyborów kuchennych, sprzętów gospodarstwa domowego. AuNPs są obecne w urządzeniach elektronicznych, filtrach oczyszczających wodę, farbach o zwiększonej trwałości. Znajdują również zastosowanie w medycynie podobne do SiO_2 NPs, jako doskonale nośniki farmaceutyków i cząstki wykorzystywane w diagnostyce *in vitro* oraz *in vivo*. TiO_2 NPs są powszechnie spotykane w filtrach przeciwsłonecznych i produktach kosmetycznych, ze względu na ich zdolności do ochrony przed promieniowaniem ultrafioletowym. Natomiast kluczowe zastosowania IONPs obejmują produkty medyczne do znakowania i magnetycznej separacji materiałów biologicznych, diagnostyki obrazowej oraz terapii przeciwnowotworowej, opartej na hipertermii [14]. Niemal nieograniczone możliwości manipulacji w zakresie właściwości projektowanych NPs napędzają produkcję opartą na nanotechnologii, a powstające produkty konsumenckie są coraz powszechniej stosowane w życiu codziennym. Skutki biologiczne bezpośredniej ekspozycji na NPs pochodzących z tak zróżnicowanych źródeł emisji wciąż nie zostały w pełni poznane i pozostają przedmiotem wielu aktualnych badań [15].

Źródła projektowanych NPs w środowisku naturalnym są wszechobecne i trudne do zidentyfikowania, jednak ich emisja może zachodzić na drodze podobnych procesów jak w scenariuszach narażenia zawodowego lub codziennego. Dotyczy zatem uwalniania NPs na poszczególnych etapach produkcji, dystrybucji, eksploatacji i utylizacji nanoproduktów [16, 17]. Oszacowano, że do powietrza atmosferycznego dostaje się mniej niż 1,5% globalnej produkcji projektowanych NPs, co stanowi najmniejszy udział w całkowitej emisji tych cząstek do środowiska naturalnego w porównaniu z zanieczyszczeniem gleb i wody [18]. Niemniej jednak, ze względu na szczególne ryzyko działań niepożądanych związanych z wdychaniem NPs, nie należy lekceważyć znaczenia tego procesu. Niestety cząstki o wymiarach zbliżonych do nanoskali, powstające i uwalniane w przebiegu emisji przemysłowych, ogrzewania gospodarstw domowych, aktywności wulkanicznej i innych procesów, komplikują dokonanie pełnej charakterystyki projektowanych NPs w powietrzu. Nakładające się zakresy rozmiarów, porównywalnie niska koncentracja cząstek i ograniczenia metody analitycznej sprawiają wiele trudności w interpretacji wyników pomiarów i ocenie narażenia. Wyodrębnienie NPs z frakcji cząstek tła, niezbędne dla oceny ryzyka i badań toksyczności, nadal stanowi nierozwiązany problem [19].

Toksykokinetyka wdychanych nanocząstek

Wejście zawieszonych w powietrzu projektowanych NPs do dróg oddechowych wiąże się z napotkaniem licznych przeszkód w postaci barier fizycznych, biochemicznych i komórkowych, które utrudniają przedostanie się ciał obcych do głębszych obszarów płuc. Ich skuteczność jest jednak ściśle zależna od charakterystyki danego rodzaju NPs, która może wpłynąć na osadzanie, pobieranie i dalsze losy wdychanego materiału w organizmie. Tym samym wyjaśnienie toksykokinetyki NPs po inhalacji jest kluczowe dla zrozumienia ich toksyczności [20, 21].

Właściwości NPs a skuteczność mechanizmów obronnych

Właściwości fizyczne wdychanych NPs mają nadrzędne znaczenie podczas przejścia przez jamę nosowo-gardłową,

krtań, tchawicę, drzewo oskrzelowe aż po pęcherzyki płucne. Większość cząstek o średnicy aerodynamicznej od 5 do 10 μm wskutek swojej bezwładności nie jest w stanie podążać za turbulentnym przepływem strumienia powietrza w drogach oddechowych, co sprawia, iż uderzają i osadzają się na ścianach obszaru nosowo-gardłowego. Cząstki o średnicy od 1 do 5 μm zwykle docierają do dalszych odcinków dróg oddechowych, gdzie w efekcie sedymentacji zachodzącej przy mniejszej prędkości przepływu powietrza w tym miejscu i dzięki przyciąganiu grawitacyjnemu osadzają się na ścianach oskrzelików [22–24]. NPs wraz z wdychanym powietrzem mogą być przenoszone jeszcze dalej, aż do przestrzeni pęcherzykowej, gdzie najczęściej docierają cząstki o średnicy poniżej 20 nm. Tam minimalna prędkość przepływu gazu, ruchy Browna, zderzenia z większymi cząstkami oraz oddziaływania elektrostatyczne mogą skutkować zatrzymaniem NPs na powierzchni wymiany gazowej. Osadzanie się cząstek w układzie oddechowym zależy również od ich kształtu. Nieferyczne NPs z co najmniej jednym większym wymiarem, a więc z wysokim współczynnikiem kształtu, częściej zderzają się ze ścianami górnych dróg oddechowych. Nie docierają zatem do dalszych odcinków, pomimo teoretycznie wystarczająco małych wymiarów [25, 26].

W zależności od miejsca osadzenia się NPs w układzie oddechowym ich dalsze losy w dużym stopniu zależą od odnawialnych barier biochemicznych w postaci śluzu w drogach oddechowych oraz surfaktantu płucnego, pokrywającego powierzchnię pęcherzyków. Większość zatrzymanych w śluzie NPs jest sprawnie usuwana poprzez transport śluzowo-rzęskowy z układu oddechowego, najczęściej do przewodu pokarmowego. Niekiedy jednak, w zależności od typu NPs, może wystąpić ich reakcja ze składnikami śluzu, prowadząca do utworzenia na powierzchni cząstek korony białkowej, ułatwiającej ich interakcję i internalizację z komórkami nabłonka [27]. Niezależnie od rodzaju i funkcjonalizacji NPs docierające do pęcherzyków oddziałują z komponentami płucnego środka powierzchniowo czynnego. Składniki surfaktantu, zaabsorbowane na powierzchni NPs, modyfikują ich właściwości, co może ułatwiać pokonywanie bariery powietrze–krew [26].

W przypadku pokonania barier fizycznych i biochemicznych przejściu projektowanych NPs do krwiobiegu może zapobiec ostatnia linia obrony w postaci komórek nabłonka oraz makrofagów, współtworzących cienką powierzchnię wymiany gazowej. Brak transportu śluzowo-rzęskowego w okolicy pęcherzykowej sprowadza procesy neutralizacji zdeponowanych NPs w tej strefie do zjawiska solubilizacji oraz fagocytozy makrofagów. Komórki tworzące jednowarstwową wyściółkę nabłonkową ściany pęcherzyków – pneumocyty I i II typu są słabiej zaangażowane w wychwytywanie NPs, który w ich przypadku zachodzi wskutek endocytozy klatryno-zależnej oraz klatryno-niezależnej, za pośrednictwem kaweoli. Mają jednak liczebną przewagę w pęcherzykach, co skutkuje częstszym kontaktem z NPs docierającymi do nabłonka oddechowego, a tym samym endocytarna internalizacja cząstek odgrywa istotną rolę w sprawnym funkcjonowaniu bariery komórkowej [28]. Rozpoznanie i fagocytarne wychwytywanie NPs przez makrofagi pęcherzykowe i śródmiąższowe zależą od wielkości, kształtu oraz stanu aglomeracji cząstek. Ponadto istotne znaczenie dla efektywności poboru komórkowego ma rodzaj związku opłaszczającego NPs oraz powstawanie korony białkowej, wskutek kontaktu ze składnikami surfaktantu płucnego [29, 30].

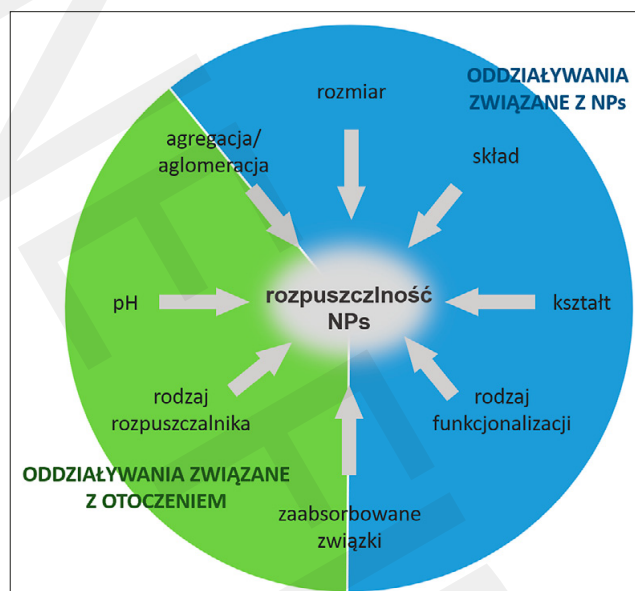
Skuteczność mechanizmów obronnych przy inhalacyjnym narażeniu na projektowane NPs może się znacznie zmniejszyć w efekcie dużego obciążenia cząstkami. Długotrwała ekspozycja w warunkach przeciążenia zakłóca transport śluzowo-rzęskowy i aktywność fagocytarną makrofagów, co ma odbicie w osłabieniu klirensu innych zanieczyszczeń powietrza, w tym drobnoustrojów oraz cząstek mikronowych [31]. Dodatkowo utrudnione pochłanianie NPs przez komórki występuje w przypadku cząstek z wysokim współczynnikiem kształtu, znacznie wydłużając ich okres półtrwania [26].

Różnice w rozpuszczalności NPs

Po aspiracji i osadzeniu się NPs w układzie oddechowym na przebieg ich dalszych losów w organizmie istotny wpływ ma ich rozpuszczalność [32]. Pokonanie bariery powietrze-krew zachodzi znacznie sprawniej w przypadku NPs łatwo rozpuszczalnych. Dotarcie do krwiobiegu usprawnia tym samym ich dystrybucję oraz przejście do tkanek i narządów wtórnych. Poza skuteczniejszą penetracją struktur biologicznych, większa rozpuszczalność NPs może skutkować wyższą toksycznością, wywołowaną uwalnianiem potencjalnie szkodliwych składowych w postaci jonowej. To zjawisko zaobserwowano w badaniach skutków narażenia zawodowego pracowników branży elektronicznej na projektowane NPs tlenku indu i cyny (ITO-NPs), wykazując związek ekspozycji ze zwiększonym poziomem płynów ustrojowych oraz rozwojem śródmiąższowych chorób płuc. Podłożem patomechanizmu takich efektów zdrowotnych jest zakłócenie funkcji fagocytarnej makrofagów poprzez zahamowanie internalizacji i zakwaszania fagolizosomów wskutek rozpuszczenia cząstek i uwolnienia indu w postaci jonowej [33]. Zwykle słabo rozpuszczalne NPs tlenku kobaltu (Co_3O_4 NPs) w przypadku pochłonięcia przez makrofagi i zmiany pH środowiska ulegają wewnątrzkomórkowej solubilizacji, czemu towarzyszy wzrost ich toksyczności. Podobnie niektóre NPs z wysokim współczynnikiem kształtu w przypadku fagocytozy mogą ulec rozpuszczeniu wewnątrz komórki, wykazując działanie cytotoksyczne niezwiązane z ich strukturą przestrzenną [34].

Pomimo istnienia teoretycznej zależności pomiędzy wielkością a rozpuszczalnością NPs proces ten w rzeczywistości jest bardziej złożony. Pomędzy poszczególnymi NPs występują znaczne różnice w rozpuszczalności, w związku z dużą liczbą czynników wpływających na tę właściwość. Należą do nich parametry charakterystyki cząstki: rozmiar, skład chemiczny, funkcjonalizacja powierzchni oraz cechy ośrodka, w tym rodzaj rozpuszczalnika i pH środowiska [35]. Wpływ wielkości cząstki na rozpuszczalność w komórkach nabłonkowych i makrofagach została zbadana m.in. dla AgNPs. Największą skłonność do uwalniania składowych w postaci jonowej oraz następcze silne efekty toksyczne wykazały najmniejsze NPs. Różnice w rozpuszczalności warunkował również rodzaj substancji opłaszczającej [36]. Znaczenie mają również inne właściwości fizyczne i chemiczne NPs, w tym morfologia, krzywizna, stan aglomeracji oraz modyfikacje powierzchni, a ich różnokierunkowość oddziaływania w aspekcie zjawiska rozpuszczania cząstki czyni je jeszcze trudniejszym do przewidzenia. W rozważaniach jednoczynnikowych można jednak wyodrębnić utrzymujące się trendy: 1) rozpuszczanie mniejszych NPs jest szybsze; 2) cząstki wypukłe są łatwiej rozpuszczane w porównaniu ze strukturami wklęsłymi; 3) wyższy stopień aglomeracji powoduje obniżenie rozpuszczalności. Wnioski

te opierają się analizie właściwości warstwy dyfuzyjnej, pola powierzchni oraz parametrów termodynamicznych NPs. Cząsteczki wtórnie do ekspozycji zaadsorbowane z otoczenia przez NPs mogą dodatkowo zwiększyć lub zmniejszyć ich rozpuszczalność. Powstanie korony białkowej poza wpływem ładunku powierzchniowego, krzywizny i chemicznej modyfikacji powierzchni cząstek zależy również od środowiskowych oddziaływań miejsca osadzenia się NPs w układzie oddechowym [37]. Ponadto rozpuszczalność cząstek jest modyfikowana oddziaływaniami ośrodka, w którym się znajdują. Różnice osobnicze pomiędzy populacjami makrofagów wystarczają, aby zaobserwować odmienne schematy procesu solubilizacji tych samych NPs [38]. W przypadku cząstek zawierających ind podobne zjawisko stwierdzono w wyniku porównania rozpuszczalności wewnątrzkomórkowej pomiędzy makrofagami a komórkami nabłonka [33]. Istnienie rozbudowanej sieci powiązań różnych właściwości z rozpuszczalnością NPs utrudnia dokładne poznanie i zrozumienie tego procesu, mocno determinującego dalsze losy oraz toksyczność cząstek, w efekcie narażenia inhalacyjnego [35]. Złożoność oddziaływań poszczególnych charakterystyk cząstek i warunków środowiska na rozpuszczalność NPs przedstawiono schematycznie na ryc. 1.



Rycina 1. Parametry wpływające na rozpuszczalność NPs, związane z ich charakterystyką oraz warunkami otoczenia [35].

Mechanizmy toksycznych oddziaływań nanocząstek

Istnieje wiele mechanizmów, dzięki którym NPs mogą wywierać wpływ na komórki ludzkiego organizmu. W efekcie ich aspiracji i przejścia bariery powietrze-krew wraz z przepływającą krwią mogą docierać do odległych tkanek i narządów. Zarówno w obszarze miejsc docelowych, jak i w układzie oddechowym, w wyniku zatrzymania wdychanych NPs przez systemy ochronne, wśród mechanizmów prawdopodobnie odpowiedzialnych za skutki biologiczne tych cząstek stwierdza się: wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT), stres oksydacyjny, pobudzenie mitochondriów, stan zapalny, pobór siateczkowo-śródbłonkowy, modyfikacje białek, upośledzenie fagocytozy, zakłócenie funkcji śródbłonka, generowanie neoantygenów, zmiany w regulacji cyklu komórkowego i uszkodzenia DNA [39]. Toksyczność cząstek jest związana z kilkoma parametrami, głównie z ich

rodzajem, rozkładem koncentracji i wielkości, częstotliwością i czasem trwania ekspozycji oraz wentylacją płucną. Jednak w porównaniu właściwości projektowanych NPs obserwuje się znaczące różnice, przede wszystkim wyraźnie większą wartość pola powierzchni na jednostkę objętości, wyższą reaktywność oraz dużą skłonność do absorpcji białka na powierzchni NPs [40]. Biologiczny wpływ NPs związany z ich unikalnymi właściwościami fizykochemicznymi podsumowano w tab. 1.

Tabela 1. Właściwości NPs i ich potencjalne skutki biologiczne

WŁAŚCIWOŚCI NPs	POTENCJALNE SKUTKI BIOLOGICZNE
Rozmiar i rozkład wielkości	upośledzenie fagocytozy
	zakłócenie mechanizmów obronnych
	migracja do innych narządów
	transport innych zanieczyszczeń środowiska
Stosunek powierzchni do masy	zwiększona reaktywność i toksyczność
	generowanie RFT
	stres oksydacyjny
Skład i charakterystyka powierzchni	stan zapalny
	produkcja cytokin
	wyczerpanie glutationu
	zaburzenie funkcji mitochondriów
	uszkodzenia białek i DNA
Agregacja/ aglomeracja	zaburzenie procesów komórkowych
	bioakumulacja

Źródło: [40]

Właściwości w nanoskali, które formułują odmienne zachowania NPs, wpływają również na ich oddziaływania w układach biologicznych. Rozkład wielkości stanowi parametr determinujący, jednak inne czynniki, w tym morfologia cząstek, gęstość, pole powierzchni, rozpuszczalność i reaktywność, są również niezbędne do oceny ich interakcji biologicznych. Im mniejszy rozmiar cząstek, tym większe pole powierzchni właściwej, a więc większa część atomów prezentowanych na powierzchni [39]. Co więcej, struktura nanometryczna danej substancji chemicznej może zmieniać właściwości optyczne, mechaniczne i elektryczne, a także reaktywność chemiczną, prowadząc do różnego wychwytu komórkowego i interakcji z tkankami biologicznymi oraz nieprzewidywalnych efektów [41].

Właściwości w nanoskali ulegają zmianom wraz z metodą produkcji, funkcjonalizacji, przechowywania, jak również po wprowadzeniu do układu biologicznego. W zależności od profilu ekspozycji i komórek docelowych odpowiedzi komórkowe mogą być minimalne i odwracalne, osiągnięte za sprawą aktywacji mechanizmów adaptacyjnych, bądź ciężkie i nieodwracalne, prowadzące do znacznych zmian struktury i funkcji komórkowych, w tym również do zmiany całkowitej liczby komórek w efekcie apoptozy lub nekrozy [42]. Cytotoksyczność kilku NPs, w tym nanorurek węglowych (CNTs), kropek kwantowych (QDs), TiO_2 NPs, AuNPs i AgNPs, została poddana przeglądowi w celu wskazania podłoża ich toksycznych oddziaływań. Oprócz właściwości fizykochemicznych wyróżniono wytwarzanie toksycznych jonów, wysoki ładunek powierzchniowy i powstawanie rodników tlenowych jako potencjalnie kluczowych czynników wywołujących efekty cytotoksyczne [43]. Nanoskalowy

rozkład wielkości NPs odgrywa znaczącą rolę w ich toksyczności i zdolności do przekraczania barier tkankowych oraz błon komórkowych, a zinternalizowane cząstki mogą oddziaływać z różnymi przedziałami subkomórkowymi. W badaniach nad AuNPs wykazano, że cząstki mniejsze niż 50 nm mają zdolność swobodnego wejścia nie tylko do wnętrza komórek, gdyż z powodzeniem przekraczają bariery organelli komórkowych, takich jak mitochondria i jądro, poprzez dyfuzję pasywną [44]. Ponadto bardzo mały rozmiar cząstek umożliwia bezpośrednie uszkodzenia komórek, spowodowane interakcjami NPs z funkcyjnymi cząsteczkami przestrzeni wewnątrzkomórkowej [39].

NPs mogą wywoływać większą toksyczność w związku z dużym stosunkiem ich powierzchni do masy. Na przykład pole powierzchni unoszących się w powietrzu NPs o średnicy 5 nm jest 1000 razy większe niż pole powierzchni cząstek wielkości 5 μm o tym samym składzie chemicznym i stężeniu masowym. Zwiększona powierzchnia identycznej substancji chemicznej może spotęgować jej reaktywność, właściwości adsorpcyjne i potencjalną toksyczność. Ze względu na wysokie właściwości energetyczne powierzchni i siły adhezyjne NPs mogą, podobnie jak węgiel aktywowany, wykazywać tendencje do adsorpcji innych małych cząsteczek, w tym różnych cząsteczek biologicznych w postaci białek, lipidów i kwasów nukleinowych [45]. Narażenie inhalacyjne na NPs jest związane z ryzykiem ostrzejszych reakcji zapalnych w porównaniu z większymi cząsteczkami o podobnym składzie i masie, głównie ze względu na właściwości powierzchniowe [21]. Mały rozmiar cząstek oraz wysoka reaktywność i fizykochemia powierzchni znacząco przyczyniają się do interakcji NPs ze strukturami biologicznymi. Analiza toksyczności IONPs wykazała, że zarówno rozmiar, jak i powłoka powierzchniowa są kluczowymi determinantami odpowiedzi komórkowej i potencjalnym mechanizmem cytotoksyczności tych NPs [46]. Wysoka reaktywność i charakterystyczne właściwości NPs w postaci dużej liczby atomów na powierzchni cząstek oraz geometrii fraktalnej również zwiększają prawdopodobieństwo efektów toksycznych. Wiąże się to ze wzrostem wspomnianej rozpuszczalności NPs w stosunku do ich odpowiedników w skali mikronowej i uwalnianiem jonów metali lub tlenków metali, które mogą hamować bądź zakłócać aktywność enzymów i białek transportowych komórki. Mechanizmy te zostały wskazane m.in. w badaniach nad toksycznością AgNPs [47].

Jednym z najczęściej obserwowanych i opisywanych w literaturze toksycznych oddziaływań NPs jest wewnątrzkomórkowa indukcja wytwarzania RFT oraz wolnych rodników z następczym rozwojem stresu oksydacyjnego, zapalenia tkanek, uszkodzenia błon komórkowych, białek i DNA [43]. W badaniach nad cytotoksycznością AgNPs zaobserwowano wyczerpanie glutationu w przebiegu stresu oksydacyjnego oraz redukcję potencjału błon mitochondrialnych [48]. Ekspozycja ludzkich komórek nabłonka płucnego na NPs tlenku miedzi (CuONPs) oraz SiO_2 NPs doprowadziła do zbliżonych efektów toksycznych, a jej wydłużenie spowodowało istotne zmiany integralności błon, indukowane wychwytem komórkowym [49, 50]. Indukcja stresu oksydacyjnego przez NPs jest powiązana z prozapalnymi odpowiedziami sygnalizacyjnymi i produkcją cytokin oraz cytoprotekcyjnych cząsteczek wewnątrzkomórkowych, jak białko szoku cieplnego (HSP70) i jądrowy czynnik transkrypcyjny (Nrf2). Komórki zapalne mają kluczowe znaczenie dla mechanizmów neutralizujących oddziaływanie NPs, jednak nadmierna odpowiedź zapalna

może prowadzić do zaostrzenia wcześniej istniejących chorób (np. astmy, chorób sercowo-naczyniowych) lub do zwiększenia częstości występowania chorób autoimmunologicznych, alergicznych i innych związanych z odpornością. Ponadto istnieją dowody na zdolność NPs obecnych w środowisku do wchodzenia w reakcje z alergenami i wywoływania uczulenia alergicznego za sprawą działania jako adiuwant [51].

Dystrybucja NPs w organizmie przebiega znacznie efektywniej w porównaniu z większymi cząstkami, tym samym znajdują one zastosowanie m.in. w medycynie jako skuteczne nośniki leków. Niestety za sprawą tej właściwości projektowane NPs zawarte we wdychanym powietrzu mogą również wiązać i ułatwiać transport toksycznych chemikaliów i innych zanieczyszczeń środowiskowych [52]. Co więcej, wszechobecność NPs przyczynia się do wzajemnych oddziaływań pomiędzy ich różnymi rodzajami, potęgując złożoność i nieprzewidywalny charakter wywoływanych reakcji komórkowych [53]. Stały rozwój nanotechnologii zwiększa potencjał interakcji NPs z elementami środowiskowymi, dlatego konieczne są starannie zaprojektowane badania toksyczności, umożliwiające zrozumienie potencjalnych oddziaływań tych cząstek z innymi substancjami toksycznymi obecnymi w powietrzu. Biologiczne interakcje różnych NPs nie są w pełni poznane, ale wspólna ścieżka stresu oksydacyjnego sugeruje istnienie znacznego potencjału oddziaływań chemicznych, takich jak efekty addytywne lub synergistyczne, które należy wziąć pod uwagę w przyszłych badaniach [52].

Bioakumulacja NPs związana z ich rozpuszczalnością jest ważnym czynnikiem wpływającym na toksyczność środowiskową i biologiczną. Niektóre NPs, w szczególności te oparte na węglu, są wyjątkowo trudno rozpuszczalnymi cząstkami, a ich potencjał do akumulacji w żywych układach jest znacznie wyższy niż w przypadku innych rodzajów cząstek nanometrycznych. Podczas gdy rozpuszczalne NPs mogą wywoływać ostre odpowiedzi toksyczne, nierozpuszczalne lub bardzo słabo rozpuszczalne powodują różnorodne chroniczne działania, w tym interakcje o charakterze rakotwórczym. Nierozpuszczalne NPs mogą przez lata pozostawać w obszarze dróg oddechowych oraz pęcherzyków płucnych. Jak wspomniano wcześniej, funkcja fagocytarna makrofagów pęcherzykowych nie zawsze zapewnia skuteczną eliminację tego typu zanieczyszczeń powietrza wdychanego. Po długotrwałym narażeniu, powtarzającym się na niskim poziomie ta właściwość zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia niekorzystnych skutków zdrowotnych. Na przykład drobniejsze od włókien azbestowych jednościenne CNTs (SWCNTs) i wielościenne CNTs (MWCNTs) cechuje wyjątkowo silna skłonność do bioakumulacji w płucach, czego następstwem mogą być zachwiania czynności komórek układu immunologicznego tego regionu [54]. NPs mają silną tendencję do tworzenia agregatów i aglomeratów, zwłaszcza w płynnych zawiesinach, więc powstają także wskutek zdeponowania wdychanych NPs w śluzie dróg oddechowych i surfaktancie płucnym. W takich układach przestrzennych NPs stają się mniej rozpuszczalne, jednak wskutek ich komórkowej internalizacji mogą ulec wieloletniej kumulacji w miejscowych tkankach i narządach [55].

Koncentracja cząstek, ich rozmiar i rozkład wielkości, geometria, cechy i pole powierzchni, droga narażenia, czas trwania ekspozycji, rozpuszczalność i rodzaj uwalnianych jonów, tworzenie korony białkowej oraz charakterystyka fizykochemiczna stanowią potencjalnie krytyczne czynniki

związane z toksycznością NPs. W celu uzyskania pełniejszego obrazu toksyczności NPs niezwykle ważne jest opracowanie zintegrowanej strategii badań, w tym zarówno spójnego projektowania testów przesiewowych *in vitro*, jak i ustalania priorytetów w zakresie długoterminowych badań na zwierzętach [56].

Zarządzanie ryzykiem narażenia na nanocząstki

Ogromna różnorodność projektowanych NPs i ich duży potencjał do zastosowań komercyjnych wprowadziły znaczne wyzwania w zakresie oceny ryzyka i zarządzania nim. Ramy zarządzania ryzykiem zapewniają systematyczne i naukowe podejście do jego charakteryzowania, jednak ich wykorzystanie wobec NPs często wiąże się ze znacznie większymi czynnikami niepewności w porównaniu z innymi chemikaliami lub farmaceutykami. Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (ISO) opracowała szereg raportów technicznych w celu przedstawienia ram oceny ryzyka nanotechnologii, w tym identyfikacji zagrożeń, opcji decyzyjnych oraz informowania o zagrożeniach w celu ochrony zdrowia i bezpieczeństwa narażonych populacji, a więc ogółu społeczeństwa, konsumentów i pracowników oraz środowiska [57]. Zalecany proces przedstawiono w tab. 2.

Tabela 2. Ramy zarządzania ryzykiem dotyczącym NPs

ZARZĄDZANIE RYZYKIEM	ETAPY POSTĘPOWANIA
Zidentyfikowanie zagrożenia	opisanie NPs i ich zastosowania
	określenie profilu fizykochemicznych
	scharakteryzowanie zagrożenia
Ocena ryzyka	opracowanie wzorców narażenia, w tym jego prawdopodobieństwa i dotkliwości
	poziom 1: eliminacja zagrożenia
	poziom 2: wprowadzanie bezpieczniejszych rozwiązań zastępczych
Kontrola ryzyka	poziom 3: opracowanie kart charakterystyki, procedur bezpieczeństwa pracy oraz wprowadzenie środków ochrony indywidualnej
	stała aktualizacja procesu oceny ryzyka
Regularny przegląd i dostosowania	wyciąganie wniosków ze zdarzeń niepożądanych

Źródło: [57]

W procesie oceny ryzyka wymagana jest kompleksowa charakterystyka NPs, obejmująca opracowane profile fizykochemiczne, profile zagrożeń i narażenia. Unikalne właściwości materiałów stałych na poziomie nanoskali przyczyniają się do głównych ograniczeń technicznych, które generują wprowadzające w błąd wyniki konwencjonalnych testów toksyczności. Na przykład NPs mogą adsorbować niezbędne barwniki, mikroelementy z hodowli komórkowej lub uwalniane cytokiny, ze względu na ich duże pole powierzchni i reaktywność. Aby zapobiec błędnej interpretacji w badaniach *in vitro*, należy włączać odpowiednie kontrole, dokonywać oceny zdolności cząstek do zakłócania testów oraz ich dyspersji [58].

Biorąc pod uwagę badania toksykologiczne i środowiskowe, w odniesieniu do NPs mogą być wymagane różne dane, w tym dotyczące charakterystyki cząstek, potencjalnych działań niepożądanych, ich wykrywania i kwantyfikacji. Podczas gdy rozkład wielkości cząstek jest główną cechą fizykochemiczną badań toksykologicznych NPs, inne ważne parametry obejmują reaktywność powierzchni,

rozpuszczalność w wodzie, aglomerację, skład chemiczny, morfologię, a także liczbę cząstek i stężenia masowe. Obecnie techniki obrazowania w wysokiej rozdzielczości, takie jak transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) i skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM), służą jako skuteczne narzędzia do charakteryzowania NPs pod względem ich rozkładu wielkości, morfologii i struktury [59, 60]. Jednak skuteczna charakterystyka i kwantyfikacja NPs może wymagać zastosowania kilku technik analitycznych, co komplikuje analizę i ocenę wyników. Dostępne metody pobierania próbek i techniki analityczne mogą być niewystarczające do precyzyjnego oszacowania koncentracji NPs. Wymaga to ściślejszej współpracy interdyscyplinarnych zespołów badawczych, złożonych z nanotoksykologów, chemików, inżynierów i materiałoznawców [58].

Podczas gdy możliwe jest konstruowanie NPs o pożądanych właściwościach powierzchni do zastosowań komercyjnych i biomedycznych, ich toksyczne działanie można zminimalizować za pomocą bezpiecznych metod projektowania, takich jak nakładanie lub powlekanie NPs [61]. Zjawisko to zaobserwowano m.in. dla AgNPs, których zależna od dawki toksyczność komórkowa w ludzkim nabłonku płucnym uległa znacznemu zmniejszeniu po wstępnym traktowaniu przeciwutleniaczem – N-acetylo-cysteiną [62]. W celu bezpiecznego wytworzenia i wprowadzania AgNPs o różnych kształtach do hydrożeli kolagenowych niedawno opracowano metodę zakotwiczenia NPs w zmodyfikowanym peptydzie LL37. Po podaniu podskórnym nie zaobserwowano toksycznego działania na ludzkie komórki rogówki oraz znaczącej aktywacji interleukiny-6 [63]. W przypadku nieorganicznych NPs, z trudem usuwanych z organizmu, możliwym rozwiązaniem jest skierowanie ich na hepatocyty w celu zwiększenia klirensu wątrobowego. Jednak aby zmniejszyć sekwestrację NPs przez wątrobę, zaproponowano kilka strategii modyfikacji kształtu i powierzchni cząstek. Wśród priorytetów nanotoksykologii jest opracowanie zależności między strukturą NPs a ich aktywnością, co może pomóc w optymalnym projektowaniu bezpiecznych NPs dla określonych zastosowań [64].

Obecnie wciąż bardzo ograniczone dane utrudniają ustalenie wytycznych dotyczących narażenia na NPs. Biorąc pod uwagę brak solidnych profili toksykologicznych, należy wdrożyć hierarchię środków kontroli w celu maksymalnej ochrony zdrowia ludzkiego i środowiska. ISO dostarczyła dwie specyfikacje techniczne: ISO/TS 12901–1 oraz ISO/TS 12901–2, dotyczące środków bezpieczeństwa i higieny pracy w odniesieniu do zarządzania ryzykiem zawodowym podczas stosowania projektowanych NPs [65, 66]. Specyfikacje obejmują kategorie i zakresy zagrożeń dla zdrowia, które należy łączyć z potencjałem narażenia lub jego scenariuszami w celu przewidywania poziomu ryzyka. Przedstawiono praktyczny przewodnik zarządzania ryzykiem zawodowym związanym z NPs, zawierający wskazówki dotyczące przeprowadzania oceny narażenia w miejscu pracy i metod księgowania [67].

PODSUMOWANIE

Pomimo wielu potencjalnych korzyści wynikających z rozwoju nanotechnologii i komercjalizacji NMs na całym świecie ryzyko narażenia na NPs z powodu braku wystarczających informacji o ich toksyczności może być często ignorowane.

Ostre i przewlekłe działania niepożądane, wywołane ekspozycją na NMs wiążą się z trudnymi do przewidzenia konsekwencjami zdrowotnymi wśród narażonych populacji. Obecnie szczególne zagrożenie dotyczy osób zaangażowanych w badania i produkcję NMs, jednak stały wzrost komercyjnego zastosowania takich materiałów zwiększa potencjał narażenia ogółu społeczeństwa. Kontakt z wszechobecnymi w codziennym życiu NPs wiąże się z ich nieuniknionym wejściem do organizmu drogą dermalną, pokarmową, a przede wszystkim inhalacyjną. Układ oddechowy stanowi szczególnie obciążony obszar zabezpieczający przed wnikaniem NPs do organizmu, jednak pomimo wielu wyspecjalizowanych systemów ochronnych różnorodność właściwości oraz powszechna obecność NPs uniemożliwiają zapewnienie całkowicie szczelnej bariery. Oddziaływania biologiczne NPs są istotnie związane z ich unikalnymi właściwościami fizykochemicznymi. Szczególnie ich mały rozmiar stanowi czynnik decydujący o rozbieżnych zachowaniach kinetycznych w odniesieniu do swoich większych odpowiedników. Toksykokinetyka oraz toksyczność NPs zależą nie tylko od rozmiaru cząstek, a ta ostatnia jest wypadkową wzajemnych korelacji również innych właściwości tych unikalnych molekuł, w tym morfologii, gęstości, pola powierzchni, rozpuszczalności i reaktywności. Różnorodność cech NPs prowadzi do odmiennej skuteczności ich wychwytu komórkowego i interakcji ze strukturami biologicznymi. Istnieje wiele niepewności dotyczących oceny ryzyka narażenia na NMs. Wprowadzono jednak strategię oceny i zarządzania niezamierzoną ekspozycją, zwłaszcza zawodową. Wobec braku odpowiednich profili toksykologicznych należy wdrożyć hierarchię środków kontroli w celu zapewnienia ochrony zdrowia ludzi i uniknięcia niedoszacowania potencjalnego ryzyka narażenia na NMs.

Źródło finansowania

Umowa nr POWR.03.02.00-00-I002/17-00

PIŚMIENICTWO

1. Hobson DW, Roberts SM, Shvedova AA, Warheit DB, Hinkley GK, Guy RC. Applied nanotoxicology. *Int J Toxicol*. 2016; 35(1): 5–16. <https://doi.org/10.1177/1091581816628484>
2. Hougaard KS, Campagnolo L, Chavatte-Palmer P, Tarrade A, Rousseau-Ralliard D, Valentino S, et al. A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles. *Reprod Toxicol*. 2015; 56: 118–140. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.05.015>
3. Ding Y, Kuhlbusch TAJ, Van Tongeren M, Jiménez AS, Tuinman I, Chen R, et al. Airborne engineered nanomaterials in the workplace – a review of release and worker exposure during nanomaterial production and handling processes. *J Hazard Mater*. 2017; 322(Pt A): 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.075>
4. Donaldson K, Seaton A. A short history of the toxicology of inhaled particles. *Part Fibre Toxicol*. 2012; 9: 13. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-13>
5. Song Y, Tang S. Nanoexposure, unusual diseases, and new health and safety concerns. *Sci World J*. 2011; 11: 1821–1828. <https://doi.org/10.1100/2011/794801>
6. Iyer R, Hsia CCW, Nguyen KT. Nano-therapeutics for the lung: state-of-the-art and future perspectives. *Curr Pharm Des*. 2015; 21(36): 5233–5244. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150923095742>
7. Hidalgo A, Cruz A, Pérez-Gil J. Pulmonary surfactant and nanocarriers: Toxicity versus combined nanomedical applications. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2017; 1859(9): 1740–1748. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2017.04.019>
8. Hayes AJ, Bakand S. Toxicological perspectives of inhaled therapeutics and nanoparticles. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014; 10(7): 933–947. <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.916276>

9. DeLoid GM, Cohen JM, Pyrgiotakis G, Demokritou P. Preparation, characterization, and in vitro dosimetry of dispersed, engineered nanomaterials. *Nat Protoc.* 2017; 12(2): 355–371. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.172>
10. Graczyk H, Riediker M. Occupational exposure to inhaled nanoparticles: Are young workers being left in the dust? *J Occup Health.* 2019; 61(5): 333–338. <https://doi.org/10.1002/1348-9585.12056>
11. Kuhlbusch TAJ, Asbach C, Fissan H, Göhler D, Stintz M. Nanoparticle exposure at nanotechnology workplaces: A review. *Part Fibre Toxicol.* 2011; 8: 22. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-22>.
12. Schulte PA, Kuempel ED, Drew NM. Characterizing risk assessments for the development of occupational exposure limits for engineered nanomaterials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2018; 95: 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.03.018>
13. Calderón L, Han TT, McGilvery CM, Yang L, Subramaniam P, Lee KB, et al. Release of airborne particles and Ag and Zn compounds from nanotechnology-enabled consumer sprays: Implications for inhalation exposure. *Atmos Environ.* 2017; 155: 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2017.02.016>
14. Kendall M, Holgate S. Health impact and toxicological effects of nanomaterials in the lung. *Respirology.* 2012; 17(5): 743–758. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2012.02171.x>
15. De Matteis V, Rinaldi R. Toxicity assessment in the nanoparticle era. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1048: 1–19. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72041-8_1
16. John AC, Küpper M, Manders-Groot AMM, Debray B, Lacombe JM, Kuhlbusch TAJ. Emissions and possible environmental implication of engineered nanomaterials (ENMs) in the atmosphere. *Atmosphere-Basel.* 2017; 8(5): 84. <https://doi.org/10.3390/atmos8050084>
17. Bressot C, Manier N, Pagnoux C, Aguerre-Chariol O, Morgener M. Environmental release of engineered nanomaterials from commercial tiles under standardized abrasion conditions. *J Hazard Mater.* 2017; 322(Pt A): 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.039>
18. Keller AA, McFerran S, Lazareva A, Suh S. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *J Nanopart Res.* 2013; 15(6): 1–17. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1692-4>
19. Kumar S, Verma MK, Srivastava AK. Ultrafine particles in urban ambient air and their health perspectives. *Rev Environ Health.* 2013; 28(2–3): 117–128. <https://doi.org/10.1515/revheh-2013-0008>
20. Becker H, Herzberg F, Schulte A, Kolossa-Gehring M. The carcinogenic potential of nanomaterials, their release from products and options for regulating them. *Int J Hyg Environ Health.* 2011; 214(3): 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.11.004>
21. Stone V, Miller MR, Clift MJD, Elder A, Mills NL, Möller P, et al. Nanomaterials versus ambient ultrafine particles: an opportunity to exchange toxicology knowledge. *Environ Health Perspect.* 2017; 125(10): 106002. <https://doi.org/10.1289/EHP424>
22. Carvalho TC, Peters JI, Williams RO 3rd. Influence of particle size on regional lung deposition – what evidence is there? *Int J Pharm.* 2011; 406(1–2): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.12.040>
23. Smith JR, Birchall A, Etherington G, Ishigure N, Bailey MR. A revised model for the deposition and clearance of inhaled particles in human extra-thoracic airways. *Radiat Prot Dosimetry.* 2014; 158(2): 135–147. <https://doi.org/10.1093/rpd/nct218>
24. Hidalgo A, Cruz A, Pérez-Gil J. Barrier or carrier? Pulmonary surfactant and drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015; 95(Pt A): 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.02.014>
25. Fröhlich E, Salar-Behzadi S. Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: role of in vivo, ex vivo, in vitro, and in silico studies. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(3): 4795–4822. <https://doi.org/10.3390/ijms15034795>
26. Garcia-Mouton C, Hidalgo A, Cruz A, Pérez-Gil J. The Lord of the Lungs: The essential role of pulmonary surfactant upon inhalation of nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2019; 144: 230–243. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.09.020>
27. Pearson JP, Chater PI, Wilcox MD. The properties of the mucus barrier, a unique gel – how can nanoparticles cross it? *Ther Deliv.* 2016; 7(4): 229–244. <https://doi.org/10.4155/tde-2015-0002>
28. Kuhn DA, Vanhecke D, Michen B, Blank F, Gehr P, Petri-Fink A, et al. Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages. *Beilstein J Nanotechnol.* 2014; 5: 1625–1636. <https://doi.org/10.3762/bjnano.5.174>
29. Shaw CA, Mortimer GM, Deng ZJ, Carter ES, Connell SP, Miller MR, et al. Protein corona formation in bronchoalveolar fluid enhances diesel exhaust nanoparticle uptake and pro-inflammatory responses in macrophages. *Nanotoxicology.* 2016; 10(7): 981–991. <https://doi.org/10.3109/17435390.2016.1155672>
30. Nakayama M. Macrophage recognition of crystals and nanoparticles. *Front Immunol.* 2018; 9: 103. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00103>
31. Liegeois M, Legrand C, Desmet CJ, Marichal T, Bureau F. The interstitial macrophage: A long-neglected piece in the puzzle of lung immunity. *Cell Immunol.* 2018; 330: 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.02.001>.
32. Donaldson K, Schinwald A, Murphy F, Cho WS, Duffin R, Tran L, et al. The biologically effective dose in inhalation nanotoxicology. *Acc Chem Res.* 2013; 46(3): 723–732. <https://doi.org/10.1021/ar300092y>
33. Gwinn WM, Qu W, Bousquet RW, Price H, Shines CJ, Taylor GJ, et al. Macrophage solubilization and cytotoxicity of indium-containing particles as in vitro correlates to pulmonary toxicity in vivo. *Toxicol Sci.* 2015; 144(1): 17–26. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu273>
34. Ortega R, Bresson C, Darolles C, Gautier C, Roudeau S, Perrin L, et al. Low-solubility particles and a Trojan-horse type mechanism of toxicity: the case of cobalt oxide on human lung cells. *Part Fibre Toxicol.* 2014; 11: 14. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-14>
35. Misra SK, Dybowska A, Berhanu D, Luoma SN, Valsami-Jones E. The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. *Sci Total Environ.* 2012; 438: 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.066>
36. Wang X, Ji Z, Chang CH, Zhang H, Wang M, Liao YP, et al. Use of coated silver nanoparticles to understand the relationship of particle dissolution and bioavailability to cell and lung toxicological potential. *Small.* 2014; 10(2): 385–398. <https://doi.org/10.1002/smll.201301597>
37. Gunawan C, Lim M, Marquis CP, Amal R. Nanoparticle-protein corona complexes govern the biological fates and functions of nanoparticles. *J Mater Chem B.* 2014; 2(15): 2060–2083. <https://doi.org/10.1039/c3tb21526a>
38. Hamilton RF, Buckingham S, Holian A. The effect of size on Ag nanoparticle toxicity in macrophage cell models and lung epithelial cell lines is dependent on particle dissolution. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(4): 6815–6830. <https://doi.org/10.3390/ijms15046815>
39. Accomasso L, Gallina C, Turinetto V, Giachino C. Stem cell tracking with nanoparticles for regenerative medicine purposes: An overview. *Stem Cells Int.* 2016; 2016: 7920358. <https://doi.org/10.1155/2016/7920358>
40. Bakand S, Hayes A, Dechsakulthorn F. Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure. *Inhal Toxicol.* 2012; 24(2): 125–135. <https://doi.org/10.3109/08958378.2010.642021>
41. Puri A. Nanoparticles: crossing barriers and membrane interactions. *Mol Membr Biol.* 2010; 27(7): 213–214. <https://doi.org/10.3109/09687688.2010.509115>
42. Adjei IM, Sharma B, Labhasetwar V. Nanoparticles: cellular uptake and cytotoxicity. *Adv Exp Med Biol.* 2014; 811: 73–91. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8739-0_5
43. Khalili Fard J, Jafari S, Eghbal MA. A review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles. *Adv Pharm Bull.* 2015; 5(4): 447–454. <https://doi.org/10.15171/apb.2015.061>
44. Chithrani DB. Intracellular uptake, transport, and processing of gold nanostructures. *Mol Membr Biol.* 2010; 27(7): 299–311. <https://doi.org/10.3109/09687688.2010.507787>
45. Fenoglio I, Fubini B, Ghibaudi EM, Turci F. Multiple aspects of the interaction of biomacromolecules with inorganic surfaces. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011; 63(13): 1186–1209. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.08.001>
46. Sanganerla P, Sachar S, Chandra S, Bahadur D, Ray P, Khanna A. Cellular internalization and detailed toxicity analysis of protein-immobilized iron oxide nanoparticles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2015; 103(1): 125–134. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33178>
47. McShan D, Ray PC, Yu H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *J Food Drug Anal.* 2014; 22(1): 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.010>
48. Dubey P, Matai I, Kumar SU, Sachdev A, Bhushan B, Gopinath P. Perturbation of cellular mechanistic system by silver nanoparticle toxicity: Cytotoxic, genotoxic and epigenetic potentials. *Adv Colloid Interface Sci.* 2015; 221: 4–21. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.02.007>
49. Kim IY, Joachim E, Choi H, Kim K. Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type. *Nanomedicine.* 2015; 11(6): 1407–1416. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.03.004>
50. Thit A, Selck H, Bjerregaard HF. Toxic mechanisms of copper oxide nanoparticles in epithelial kidney cells. *Toxicol in Vitro.* 2015; 29(5): 1053–1059. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.03.020>
51. Hussain S, Vanoirbeek JA, Hoet PH. Interactions of nanomaterials with the immune system. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2012; 4(2): 169–183. <https://doi.org/10.1002/wnan.166>. Epub 2011 Dec 5.

52. Kabir E, Kumar V, Kim KH, Yip ACK, Sohn JR. Environmental impacts of nanomaterials. *J Environ Manage*. 2018; 225: 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.07.087>
53. Męczyńska-Wielgosz S, Wojewódzka M, Matysiak-Kucharek M, Czajka M, Jodłowska-Jędrych B, Kruszewski M, Kapka-Skrzypczak L. Susceptibility of HepG2 cells to silver nanoparticles in combination with other metal/metal oxide nanoparticles. *Materials (Basel)*. 2020; 13(10): 2221. <https://doi.org/10.3390/ma13102221>
54. Morimoto Y, Horie M, Kobayashi N, Shinohara N, Shimada M. Inhalation toxicity assessment of carbon-based nanoparticles. *Acc Chem Res*. 2013; 46(3): 770–781. <https://doi.org/10.1021/ar200311b>
55. Puisney C, Baeza-Squiban A, Boland S. Mechanisms of uptake and translocation of nanomaterials in the lung. *Adv Exp Med Biol*. 2018; 1048: 21–36. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72041-8_2
56. Sajid M, Ilyas M, Basheer C, Tariq M, Daud M, Baig N, et al. Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2015; 22(6): 4122–4143. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3994-1>
57. ISO. ISO/TR 13121. Nanotechnologies – Nanomaterial Risk Evaluation. Genewa: Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna; 2011.
58. Geiser M, Jeannot N, Fierz M, Burtscher H. Evaluating adverse effects of inhaled nanoparticles by realistic in vitro technology. *Nanomaterials (Basel)*. 2017; 7(2): 49. <https://doi.org/10.3390/nano7020049>
59. Anderson SR, Parmiter D, Baxa U, Nagashima K. Immunoelectron microscopy for visualization of nanoparticles. *Methods Mol Biol*. 2018; 1682: 65–71. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7352-1_7
60. Savage DT, Hilt JZ, Dziubla TD. In vitro methods for assessing nanoparticle toxicity. *Methods Mol Biol*. 2019; 1894: 1–29. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8916-4_1
61. Wysokińska E, Cichos J, Ziolo E, Bednarkiewicz A, Strządała L, Karbowski M, et al. Cytotoxic interactions of bare and coated NaGdF₄:Yb(3+);Er(3+) nanoparticles with macrophage and fibroblast cells. *Toxicol In Vitro*. 2016; 32: 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.11.021>
62. Foldbjerg R, Dang DA, Autrup H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Arch Toxicol*. 2011; 85(7): 743–750. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0545-5>
63. Alarcon EI, Vulesevic B, Argawal A, Ross A, Bejjani P, Podrebarac J, et al. Coloured cornea replacements with anti-infective properties: expanding the safe use of silver nanoparticles in regenerative medicine. *Nanoscale*. 2016; 8(12): 6484–6489. <https://doi.org/10.1039/c6nr01339b>
64. Zhang YN, Poon W, Tavares AJ, McGilvray ID, Chan WCW. Nanoparticle-liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. *J Control Release*. 2016; 240: 332–348. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.020>
65. ISO. ISO/TS 12901-1. Nanotechnologies – Occupational Risk Management Applied to Engineered Nanomaterial – Part 1: Principles and Approaches. Genewa: Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna; 2012.
66. ISO. ISO/TS 12901-2. Nanotechnologies – Occupational Risk Management Applied to Engineered Nanomaterial – Part 2: Use of the Control Banding Approach. Genewa: Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna; 2014.
67. Ramachandran G, Ostraat M, Evans DE, Methner MM, O’Shaughnessy P, D’Arcy J, et al. A strategy for assessing workplace exposures to nanomaterials. *J Occup Environ Hyg*. 2011; 8(11): 673–685. <https://doi.org/10.1080/15459624.2011.623223>