

Zdravotní aspekty užití nanočástic včetně nástržiků s TiO_2

***MUDr. Michael Vít, PhD , RNDr. Bohumil Kotlík, PhD
SZU Praha***

- Nanotechnologie a nanomateriály v současnosti představují nové, převratné možnosti rozvoje v mnoha oborech lidské činnosti. (např. v potravinářství, zejména v obalových materiálech, dále v technologiích informačního průmyslu včetně průmyslu výroby počítačových technologií). Očekává se, že tyto nové technologie a materiály přinesou revoluci v medicíně, kde díky své velikosti vykazují nanomateriály schopnost vstupovat do jednotlivých buněk, a tak působit například jako nosiče léčiv nebo kontrastní látky v lékařské diagnostice.
- **Definice (2011/696/EU) je nanomateriál přírodním materiálem, materiálem vzniklým jako vedlejší produkt nebo cíleně vyrobeným materiálem obsahujícím částice. Tyto částice jsou ve formě izolovaných částic nebo jejich agregátů/ aglomerátů a 50 % nebo více částic materiálu má jeden nebo více vnějších rozměrů ve velikostním rozmezí 1–100 nm. Definice zahrnuje také fullereny, grafenové vločky a jednostěnné uhlíkové nanotrubic, které často existují v rozměrech pod 1 nm minimálně v 1D.**
- Celkové množství nanomateriálů, které jsou každý rok dodány na světové trhy, se odhaduje na přibližně 11 milionů tun a jejich tržní hodnota dosahuje zhruba 20 miliard EUR.

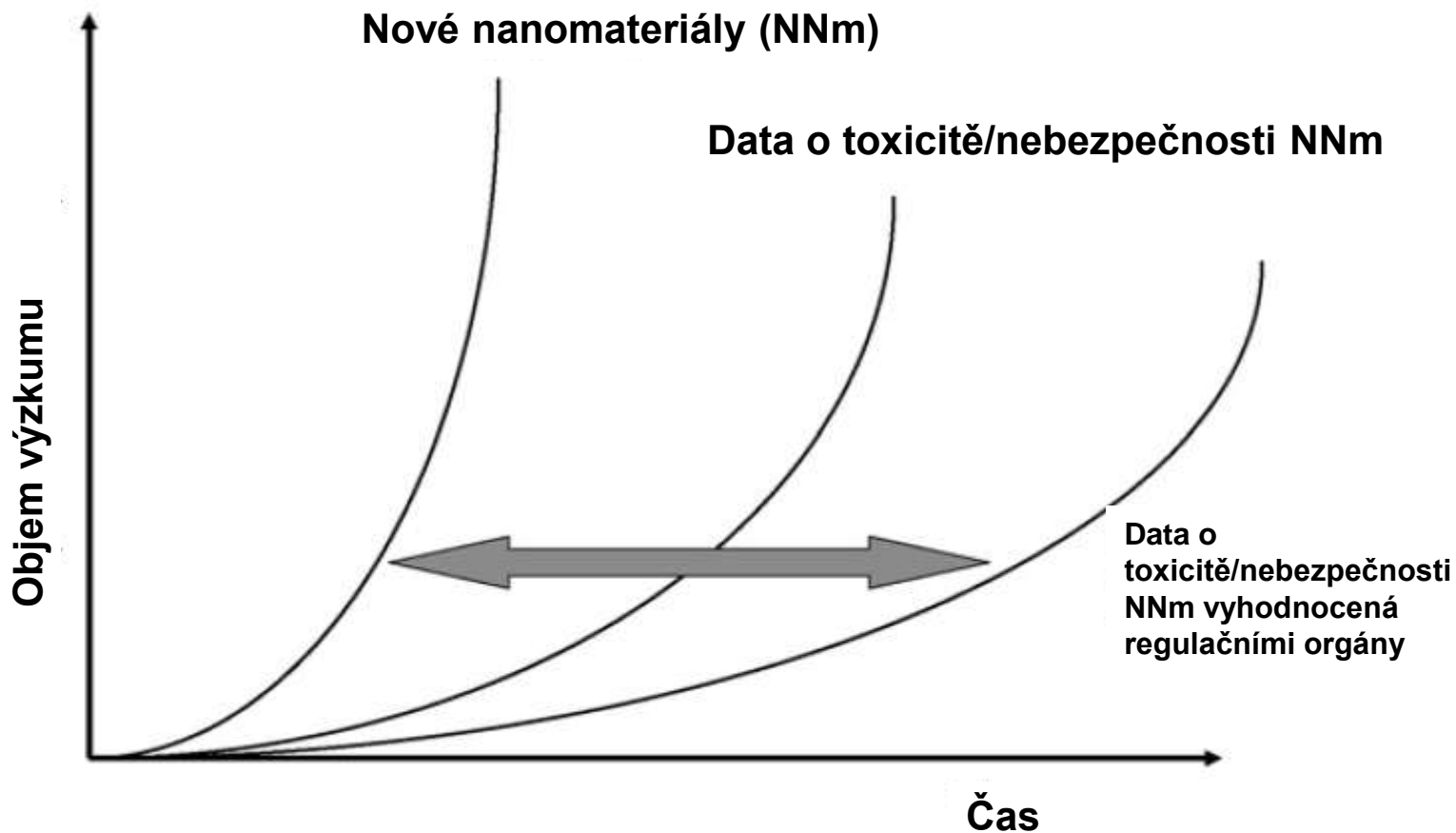
Nanotechnologie a jejich postavení v rámci hospodářské politiky EU

- Mezi nanomateriály, které jsou v současné době na trhu, je zdaleka nejvíce zastoupena **uhlíková čern** a **amorfní oxid křemičitý**
- Mezi materiály, které v současné době přitahují nejvíce pozornosti, patří **nanokrystalický oxid titaničitý, nanokrystalický oxid zinečnatý, fullereny, uhlíkové nanotrubičky a nanostříbro**. Tyto materiály jsou uváděny na trh ve zjevně menším množství než tradiční nanomateriály, ale význam a využití některých z nich rychle roste.
- Podle předpovědí má objem obchodu s výrobky využívajícími nanotechnologie vzrůst z 200 miliard EUR v roce 2009 na 2 biliony EUR do roku 2015.

Nanotechnologie a jejich postavení v rámci hospodářské politiky EU

- Tyto aplikace budou mít zásadní význam pro konkurenceschopnost široké škály výrobků pocházejících z EU na světovém trhu. Nanotechnologie byla označena za klíčovou technologii (KET), která představuje základnu pro další inovace a nové výrobky
- Tento rychlý technologický pokrok vede jednak **k možné profesionální expozici osob při výrobních procesech používajících nanomateriály**, jednak **k ne vždy kontrolovanému uvádění nanotechnologií do životního prostředí, které může vést k nežádoucí expozici běžné populace.**
- Dalším problémem je, že dosud platné bezpečnostní standardy vycházejí z limitních hodnot pro látky z nichž se nanomateriály skládají, avšak **neberou v úvahu experimentálně ověřený fakt, že na rozdíl od větších částic mohou nanočástice v lidském těle pronikat do řady orgánů a tkání a vyvolávat tam nežádoucí toxické účinky**

Nanotechnologie a jejich postavení v rámci hospodářské politiky EU

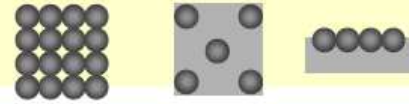


Současná úroveň poznání o toxicitě nanomateriálů

Nanomaterials in the Body

Nanomaterial

Powder
Embedded in matrix
or on surfaces



Dispersion

Aerosol
Suspension



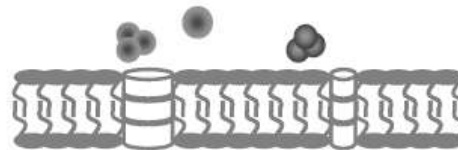
Uptake in the body

Deposition in the lung,
Alveolar, intestinal, dermal
penetration



Modification in the body

Surface coating changes
Agglomeration, desagglomeration

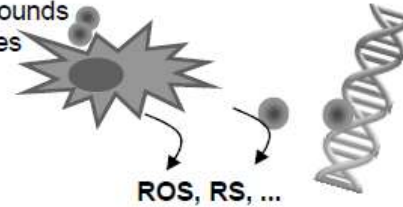


Distribution in the body

Penetration of biological barriers
Tissue distribution,
Intracellular distribution

Primary Effect

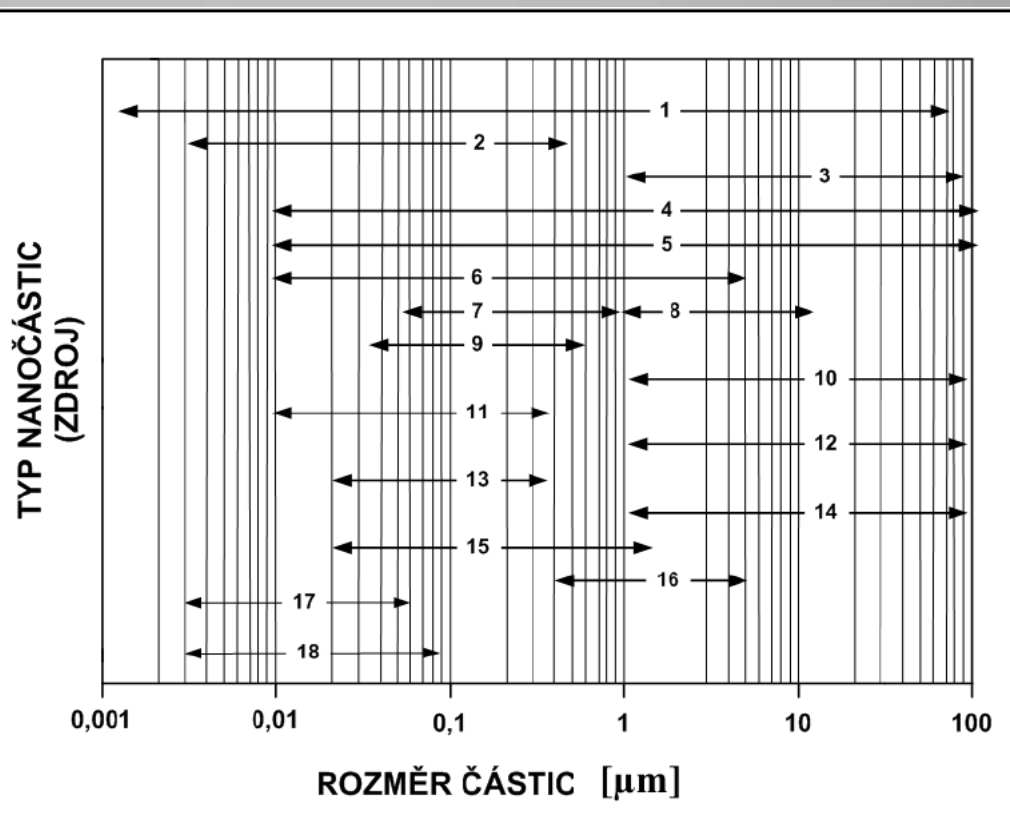
Inflammation
Catalysing formation of reactive compounds
Direct interaction with cellular structures



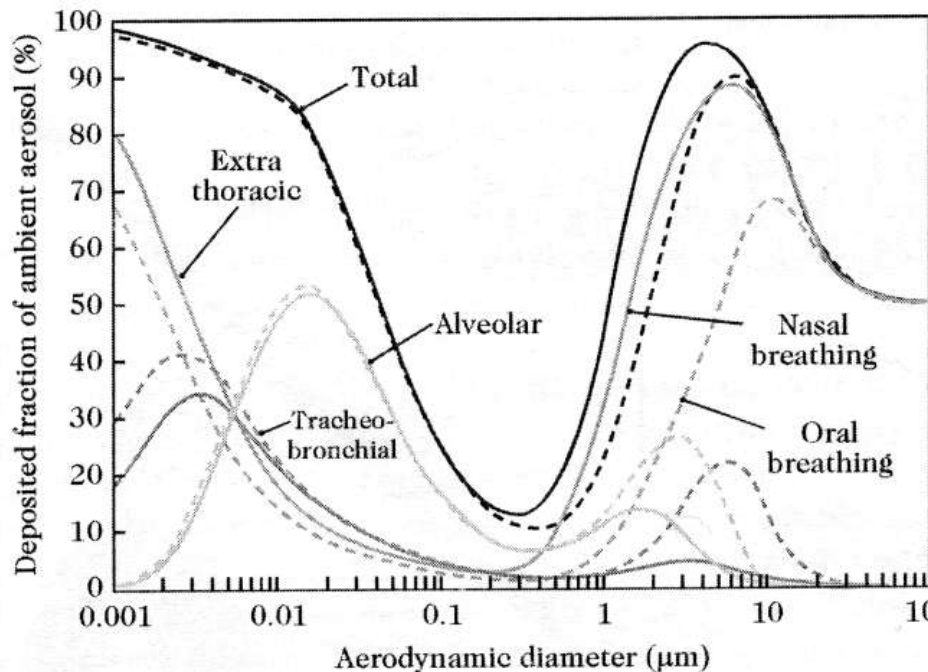
Toxic Effect

Organ toxicity,
Genotoxicity

1	Dýmy ze svařování
2	Saze z dieselových motorů
3	Resuspendované částice prachu
4	Popílek
5	Sopečné emise
6	Mořské aerosoly
7	Dým z požáru ropy
8	Pylová zrna
9	Mořská sůl
10	Částice prachu po vysávání
11	Uhelné saze
12	Částice ze stavební činnosti
13	Saze
14	Důlní prach
15	Částice v tabákovém kouři
16	Bakteriální buňky
17	Virové částice
18	Nukleární jádra v atmosféře



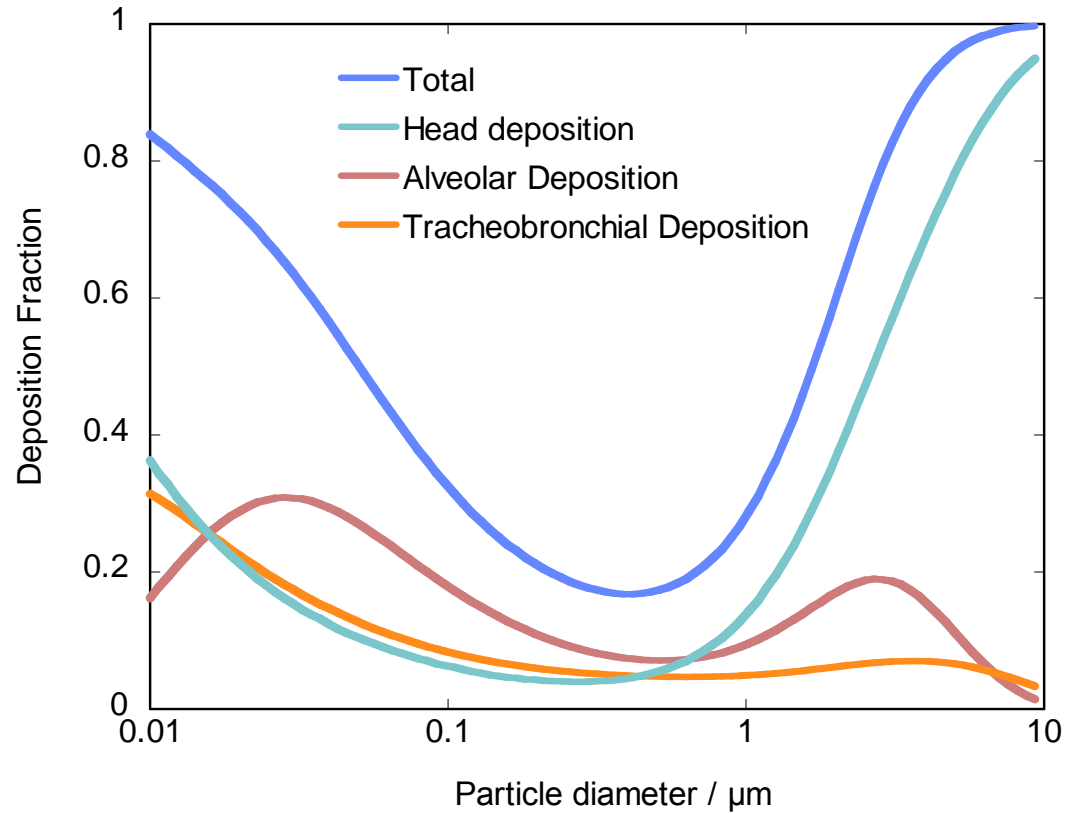
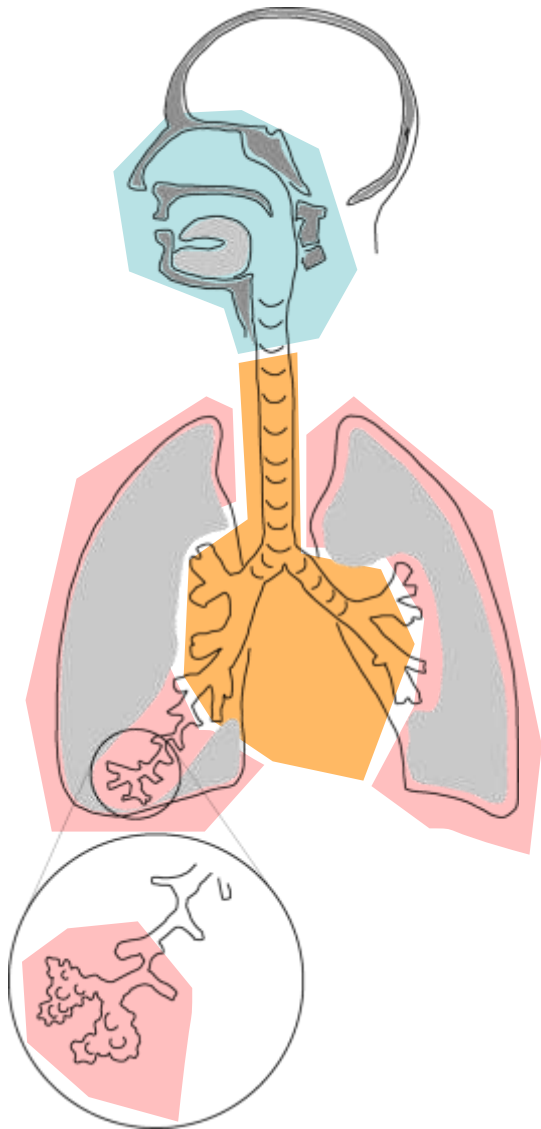
Dominantní expoziční cesta - inhalační expozice

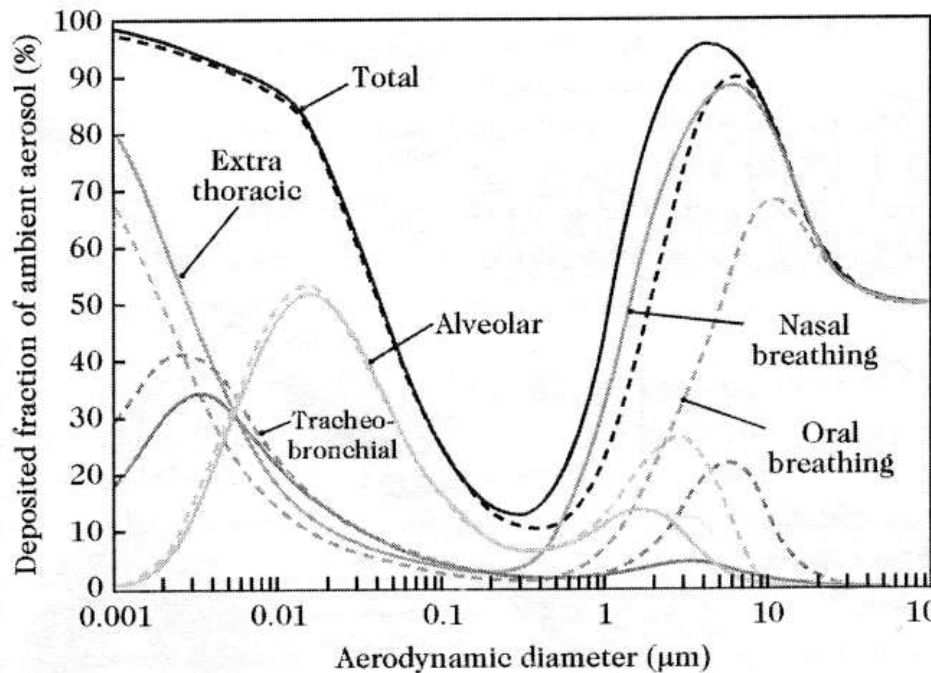


- Nanočástice jsou ukládány se specifickou distribucí v každé části respiračního traktu v závislosti na velikosti deponovaných částic.
- Nanočástice o rozměrech kolem 5 nm se ukládají ve srovnatelné míře ve všech oblastech.
- Depozice v horních cestách dýchacích dominuje u nanočástic menších než 5 nm, naopak částice větší než 5 nm jsou preferenčně ukládány v alveolární části plic. Maximální alveolární depozice (50–60 %) je predikována pro částice o velikosti 20 nm a celková pravděpodobnost depozice pro tyto nanočástice je 80 %.

Depozice v plicích – dominantní expoziční cesta

Depozice částic v plicích

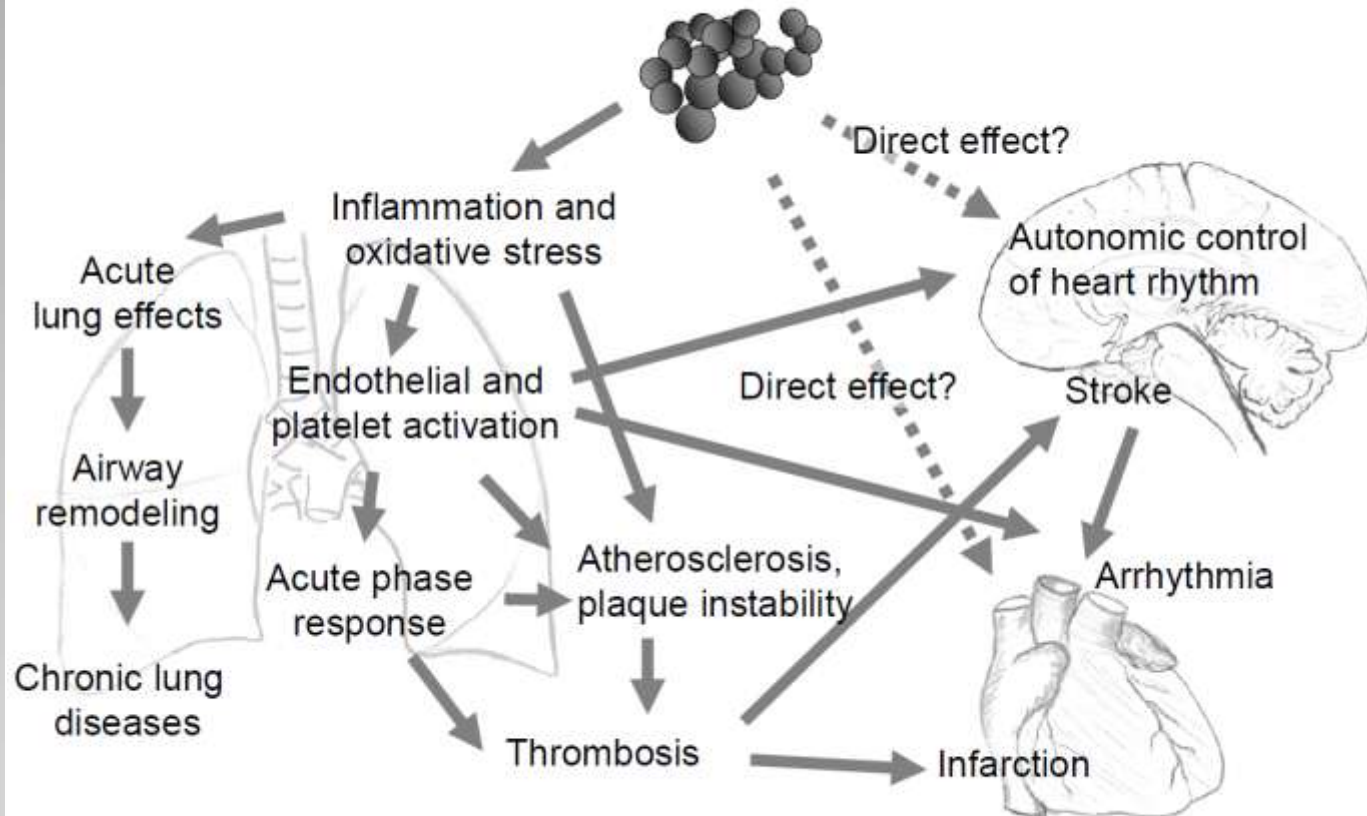




- Při změně fyziologických podmínek se mohou změnit i depoziční parametry, tj. při přechodu z klidového režimu do fyzické zátěže
- Obecně platí, že v alveolární oblasti plic se deponuje až třetina všech částic menších než 100 nm.
- Nanočástice se deponují také v horních cestách dýchacích (až se 75% účinností), zejména pak při dýchání nosem

Depozice v plicích

Complex model to explain CV-effects of particles

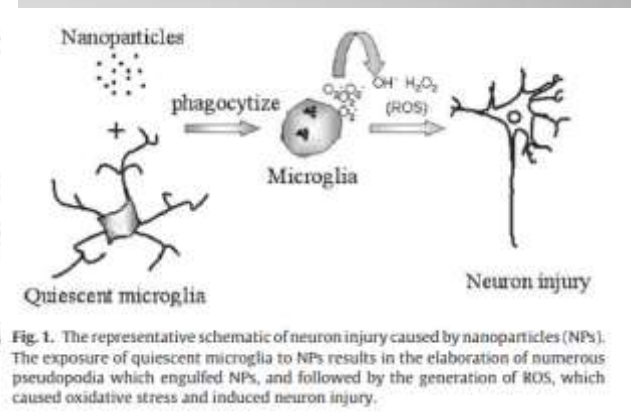
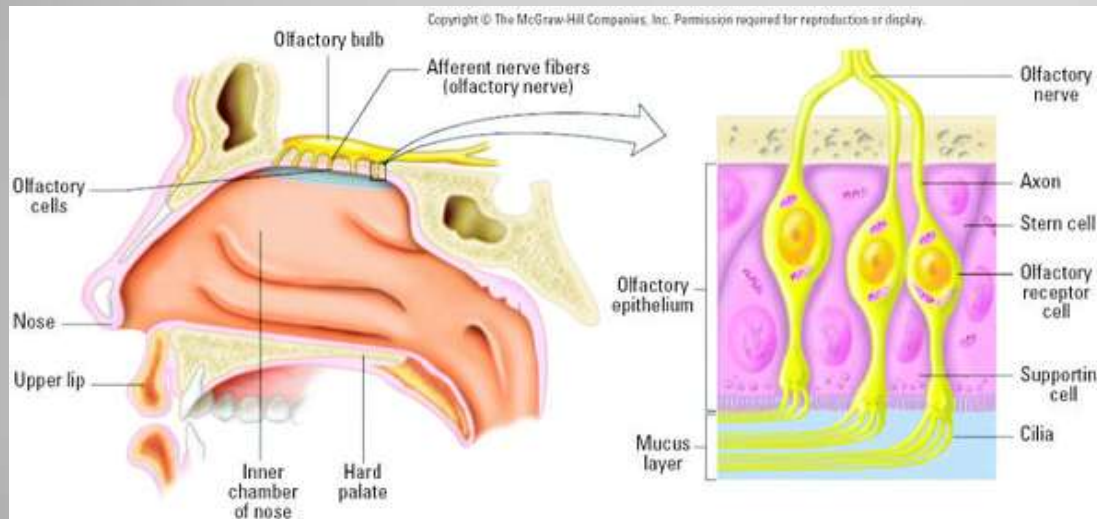


Modified from Riediker, Harrisons' Online, 2006

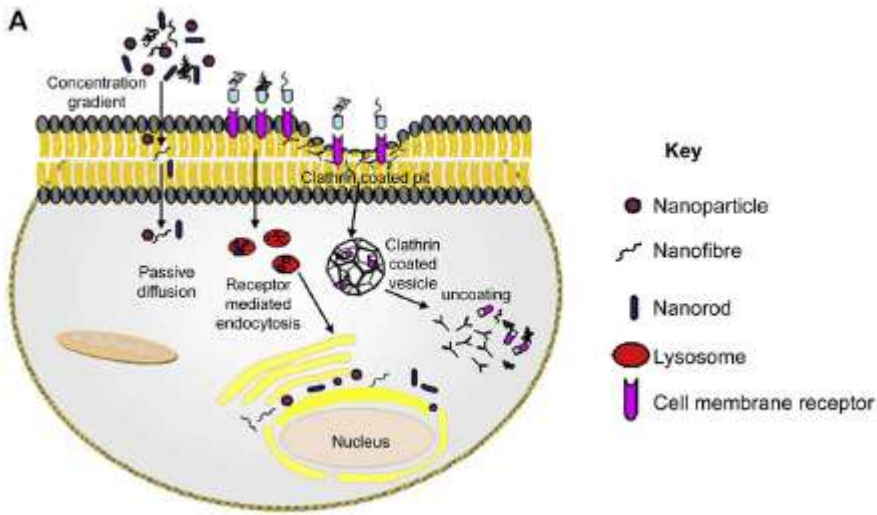
Pour que santé et travail soient compatibles 

Nanočástice a kardiiovaskulární systém

- Studie na myších s nanočásticemi TiO_2 také prokázaly transport nanočástic do mozku přes čichový epitel.
- Translokace 20nm nanočástic je u lidí 2–10× vyšší přes čichový nerv než u myši, nanočástice translokované u člověka mohou vstoupit hlouběji do mozkových struktur během kratšího expozičního času než je tomu u hlodavců.
- K omezenému množství dostupných experimentů, je obtížné posoudit, zda rozsáhlá akumulace nanočástic v mozku deponovaných po olfaktoriálním transportu je opravdu reálná



Možná cesta vstupu cestou čichového nervu



- Nanočásticemohou pronikat přímo do jádra,
- Nanočástice v buňce mohou rovněž pronikat z cytosolu nebo fagozómů do lysozómů a mitochondrií.

- Již v časně fázi vstupu do buňky dochází ke zvýšení produkce různých přenašečů (ROS, ATP a vápník) a aktivaci různých signálních drah, které vedou k buněčným odezvám, jako je např. vznik oxidativního stresu nebo zánětu, jež rovněž v závislosti na stupni jejich intenzity mohou způsobit poškození DNA.
- V pozdní fázi vstupu nanočástic do buňky mohou být aktivovány reakce (např. fragmentace DNA) vedoucí postupně k apoptóze (programovaná smrt buňky), autofagocytóze nebo nekróze

Mechanismus toxického účinku NPs

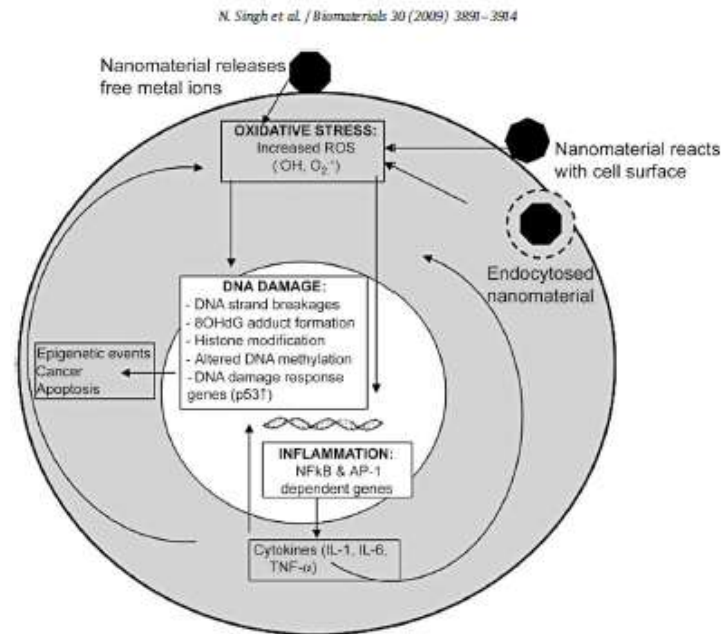
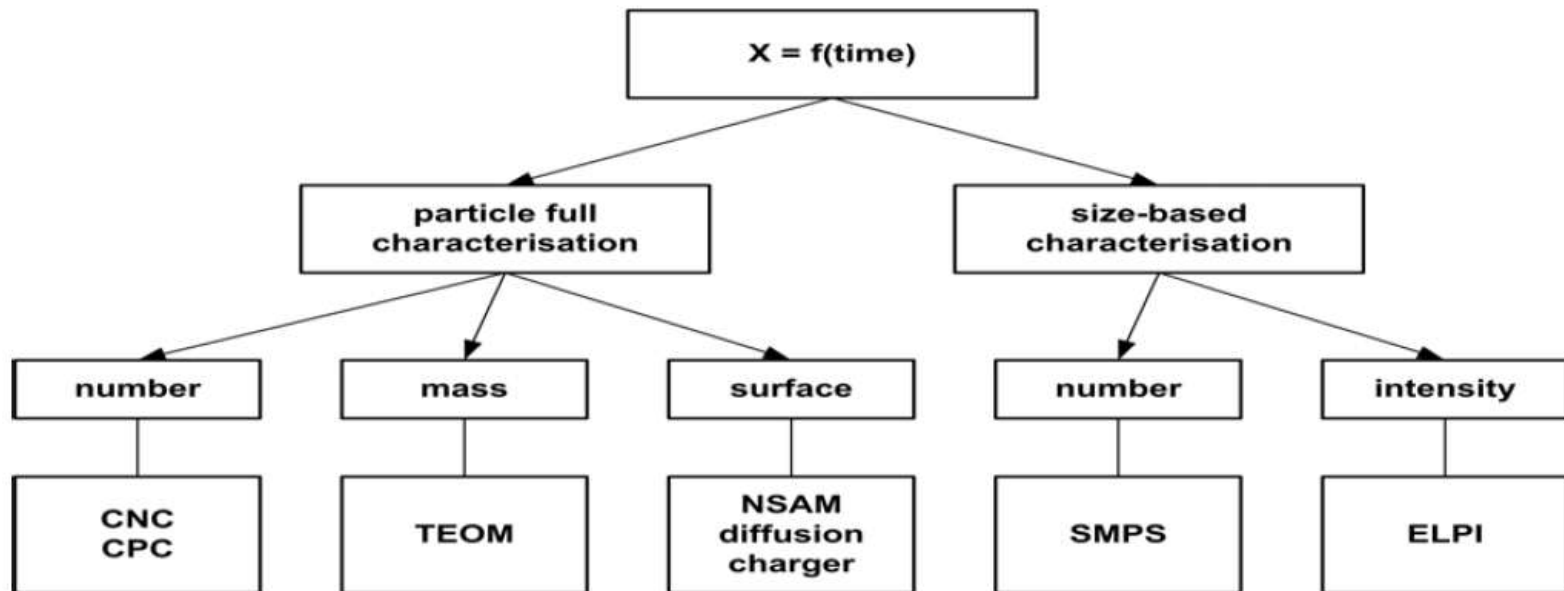


Fig. 3. Indirect mechanisms that can lead to genotoxicity. Nanomaterials may result in oxidative stress or inflammatory responses that in turn have the potential to damage DNA and alter transcriptional patterns.

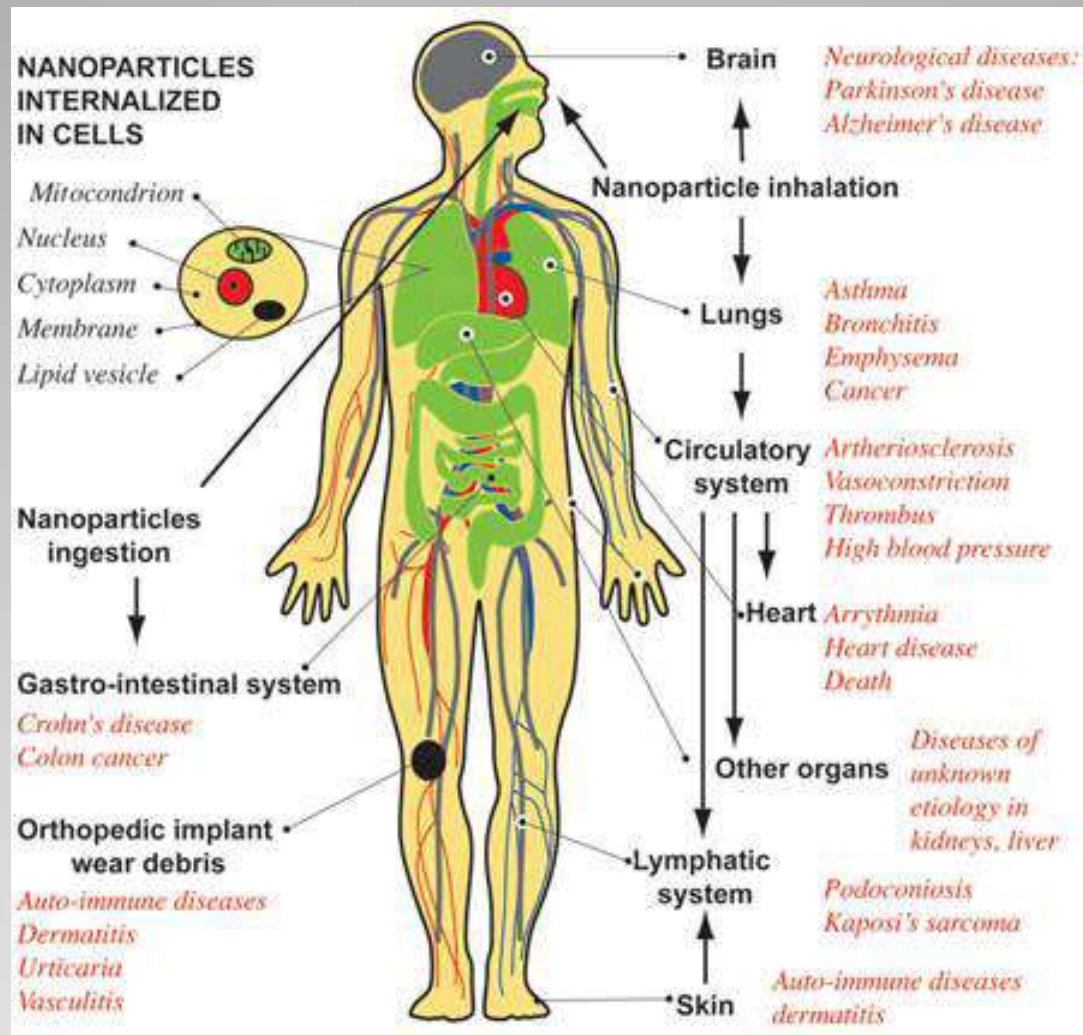
- Pro určení toxického účinku chemických látek (stanovení vztahu dávka–odezva) bývá standardně určována koncentrace dané látky a doba trvání expozice.
- Oproti tomu u nanočástic je, kromě stanovení dávky a doby expozice, nutné charakterizovat fyzikálně-chemické vlastnosti hodnocených nanočástic
- Pro hodnocení expozice bylo navrženo několik měrných jednotek a doporučuje se, že pro popis dávky by mělo být použito více z nich .
- Jedná se o **hmotnostní koncentraci** (je jediným parametrem používaným ve většině toxikologických studií, ale samotný tento parametr není vhodným měřítkem, neboť nezahrnuje specifické charakteristiky ENM).
- Dále je možné dávku definovat na základě **počtu částic na jednotku objemu nebo plochy či specifickou plochou povrchu (poměr hmotnosti k velikosti plochy nanočástic)**

Dávka / expozice



(CNC= Condensation Nuclei Counter, CPC = Condensation Particle Counter, TEOM = Tapered Element Oscillating Microbalance, NSAM = Nanoparticle Surface Aerosol Monitor, SMPS = Scanning Mobility Particle Sizer, ELPI = Electrical Low Pressure Impactor)

Hodnocení expozice



Možné cesty expozice nanočásticemi a přidružená onemocnění navržené na základě *in vivo* a *in vitro* epidemiologických studií (převzato Filipová Z., a kol., 2012)

TiO₂

- TiO₂ se používá hlavně při výrobě barev, laků, papíru, plastů, keramiky, pryže a pod.
- TiO₂ je také použit při svařování, nátěry konstrukcí, výrobě podlahových krytin, katalyzátorů, potažených tkanin a textilií, kosmetiky, potravinových barviv, skla, farmaceutických výrobků, při výrobě pneumatiky výrob a ve výrobě elektronických součástek – jedna z nejvíce používaných látek v nanoformě.

Užití TiO₂

- Aplikace nanomateriálů oxidů kovů v oblasti povrchových úprav prokázala, že má antibakteriální efekt. Z oxidů kovů, oxid titaničitý je velmi požívaný vzhledem ke svým fotokatalytickým vlastnostem i za použití UVA záření.
- Antibakteriální aktivita TiO₂ nanomateriálů závisí na velikosti částic, morfologii, krystalické struktuře, koncentraci a použití „dopingu“ kovových iontů (např. Zn, Ag)
- Obecně platí, že na antibakteriálním mechanismu TiO₂ se podílí interakce hydroxylového volného radikálu s aminoskupinou v molekule proteinu v mikroorganismu, což vede k poškození buněčné membrány a k následné buněčné smrti (viz. následující slide)
- Antibakteriální účinnost TiO₂ nanočástic byla zaznamenán v mnoha studiích (na *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus faecalis*), v poslední době jsou publikovány i experimenty ověřující i protiplísňový efekt.

Antimikrobiální efekt TiO₂

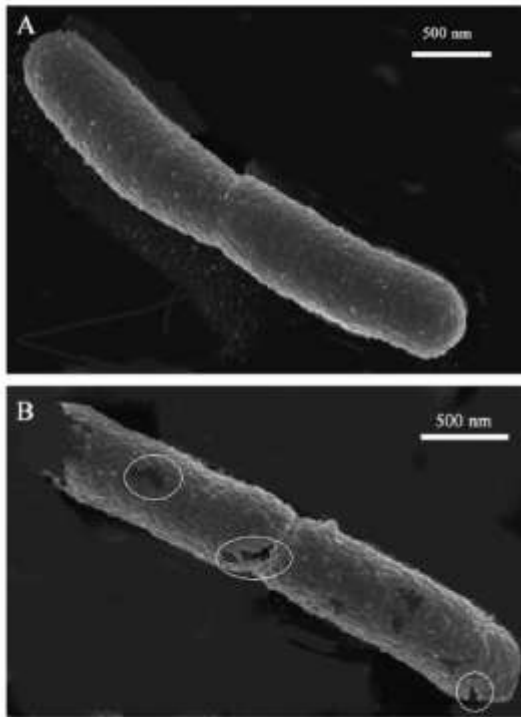


Fig. 7. The FE-SEM of *E. coli* before (A) and after (B) being damaged on the mesoporous TiO₂ film.

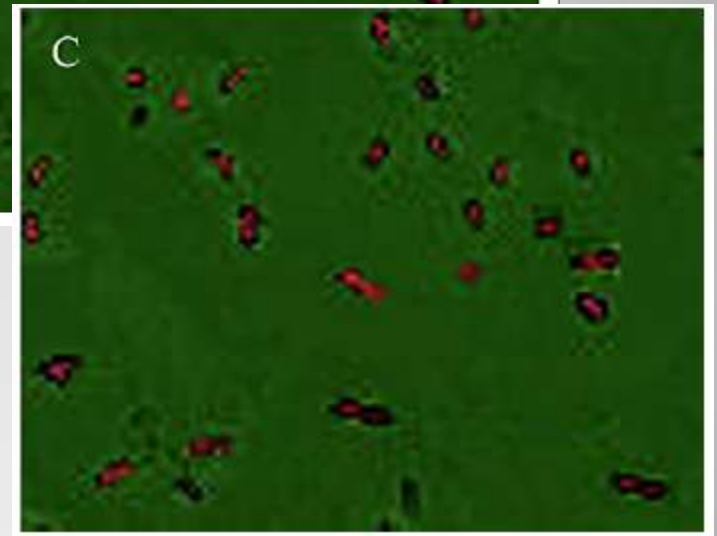
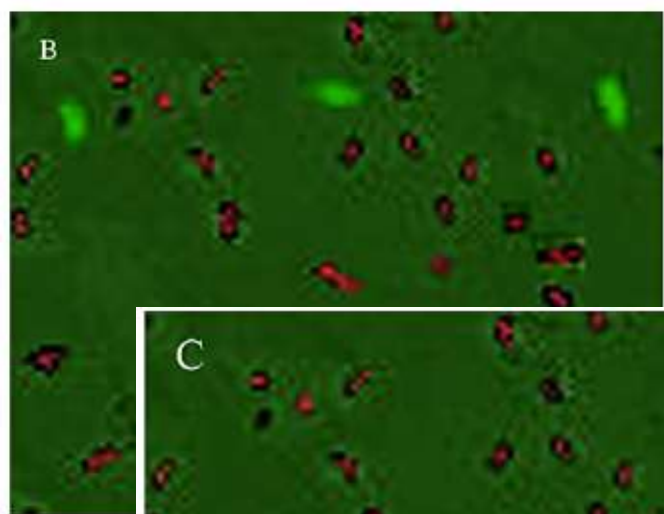
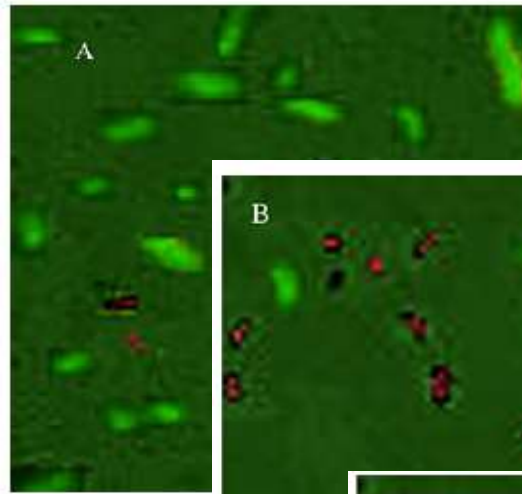


Fig. 8. The fluorescence microscopy pictures of *E. coli* on glass (A), as-prepared mesoporous TiO₂ (B) and Ag/TiO₂ composite (C) under UV light for 5 min.

Fotokatalytický „antimikrobiální efekt“ TiO₂

- Z epidemiologických studií vyplývá, že expozici TiO₂ je vystavena široká škála pracovníků v průmyslu a data se zdají dle hodnocení NIOSH být dostatečně reprezentativní pro hodnocení expozice pracovníků v průběhu několika desetiletí.
- Jedním z hlavních nedostatků studií je absence studií kohort pracovníků, kteří manipulují nebo používají při své činnosti TiO₂ (nikoli výrobních dělníků).
- Celkově tyto studie neposkytují žádný jasný důkaz o zvýšeném riziku úmrtnosti na rakovinu plic nebo zvýšenou nemocnost u těchto zaměstnanců vystavených působení TiO₂ prachu.

Výsledky z humánních epidemiologických studií (NIOSH, 2011)

- Studie in vivo i in vitro potvrzují fakt, že e TiO₂ vykazuje genotoxický efekt (poškození DNA) za určitých podmínek, ale ne mutagenní změny (genetické změny).
- Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) klasifikovány dříve TiO₂ ve skupině 3, s omezenými důkazy karcinogenity na zvířatech a nedostatečné důkazy pro karcinogenitu u člověka [IARC 1989].
- **V roce 2006 IARC klasifikovány TiO₂ ve skupině 2B dostatečné důkazy karcinogenity u pokusných zvířat a nedostatečné důkazy pro karcinogenitu u člověka a celkové hodnocení "pravděpodobně karcinogenní pro člověka (skupina 2B)" [IARC 2010].**

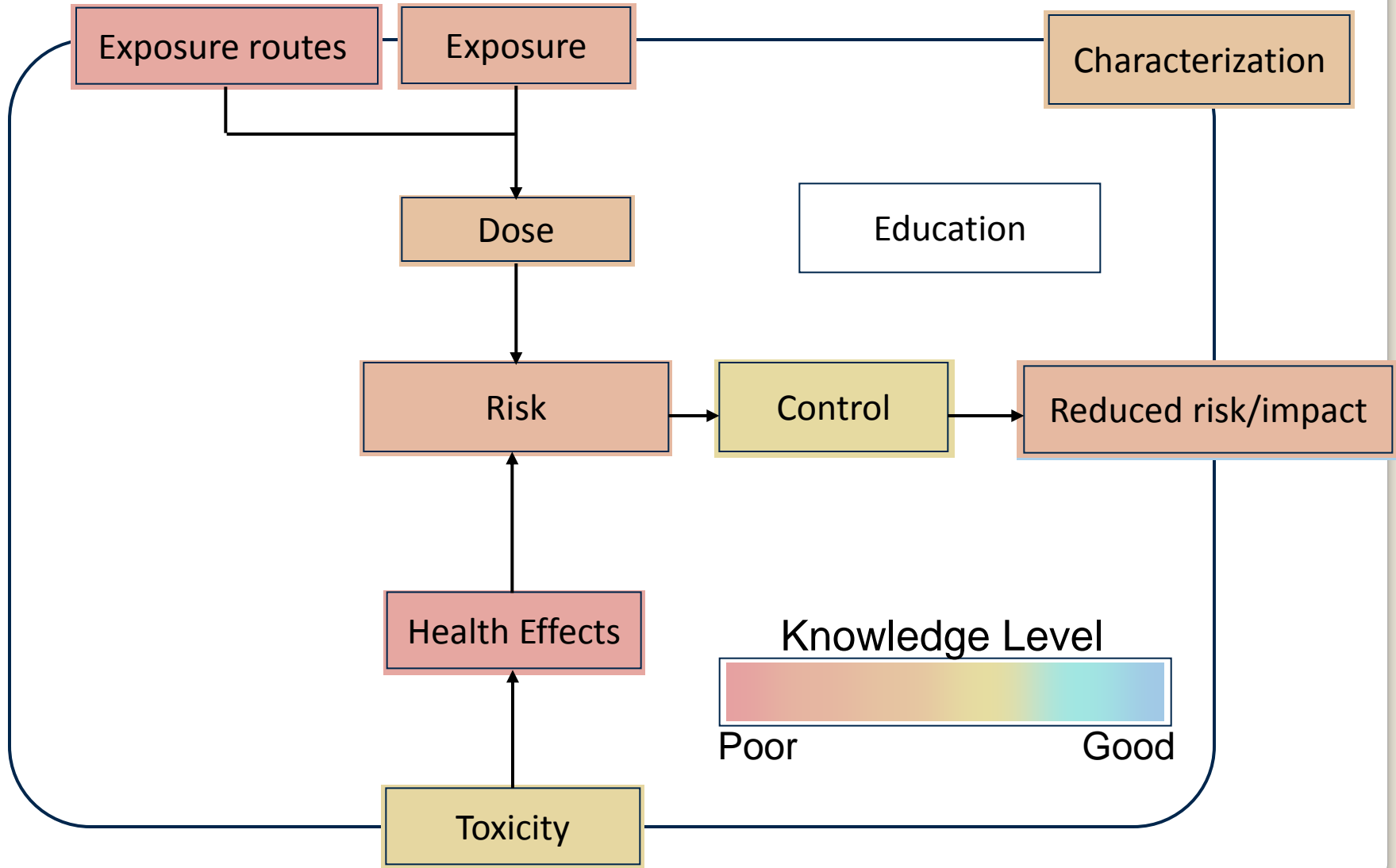
Genotoxicita a mutagenita

- Souhrnně lze říci, že chronické inhalační studie na pokusných zvířatech ukazují závislost reakce plicní tkáně na dávce ultrajemných (nano) částic TiO₂.
- Ultrajemné (nano) částice TiO₂ zhoršují funkci alveolárních makrofágů ve větší míře, než jemné částice TiO₂. Mohou vyvolávat větší zánětlivé reakce při dané hmotnosti dávky než jemné částice TiO₂.
- Dostatečně vysoká dávka (hmotnostní dávka nebo dávka definovaná plochou) vyvolává následující projevy: snížení plicní clearance plic a zvýšenou retenci částic ("přetížení"), plicní zánět, oxidační stres, poškození tkáně, fibróza, a rakovinu plic.
- Chronický plicní zánět se zdá být nutný pro vývoji plicních nádorů u krys po inhalační expozici TiO₂, tj. působí prostřednictvím sekundárního genotoxického mechanismus, který zahrnuje zahrnující oxidační poškození DNA.
- Je možno usuzovat, že při udržení expozice nižší, než té, která vyvolává zánětlivé změny, by se dalo zabránit rozvoji nádoru, nicméně rozložení zánětlivých reakcí v lidské populaci není znám a přímý genotoxický mechanismus nelze vyloučit pro nano TiO₂

Chronické inhalační studie

Ochrana zdraví

Algoritmus možného „pracovního rizika“

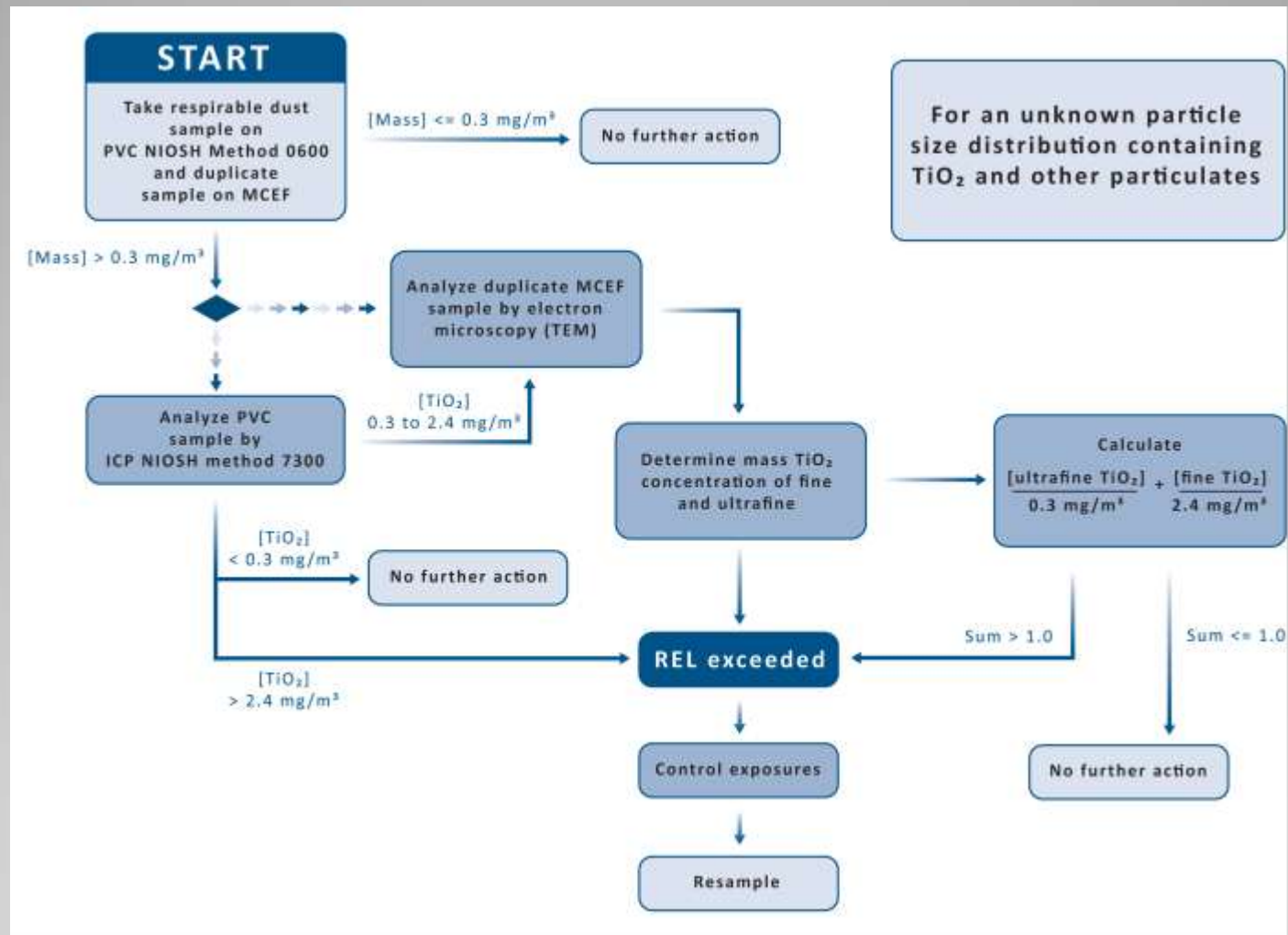


- NIOSH (2011) doporučuje RELs pro jemné („fine“) částice TiO₂ 2,4 mg/m³ a pro „ultrafine“, tj. nanočástice TiO₂ 0,3 mg/m³ (odvození REL z extrapolace vztahu dávky a účinku u plicních nádorů u kryš)
- REL odráží obavu NIOSH z hlediska potenciální karcinogenity nanočástic částic TiO₂ (s novými poznatky se daná doporučení mohou měnit).
- Doporučení dle SRN pro biopersistentní nanomateriály se specifickými toxikologickými vlastnostmi tj. méně než 0,1 g/m³, (*BekGS 527, Announcement 527, May 2013*)
- Doporučení dle SRN pro biopersistent nanomateriály bez specifických toxikologických vlastností) tj. méně než 0,5 mg/m³
- Doporučené expoziční limity (*Australie*) pro TiO₂ (0.1% excess risk of lung cancer) od 0.07 do 0.3 mg/m³ pro nanoformu TiO₂ a 0.7 až 1.3 mg/m³ pro částice nad 100 nm TiO₂.
- V ČR není specifický limit pro TiO₂, aplikace PEL pro nefibrogenní prach 10 mg/m³, individuálně stanoveno v jednom případě 6 mg/m³

Limity pro pracovní prostředí

- Technická opatření na zdroji – opatření pro normální provoz, pro havarijní úniky, zneškodňování úniku a úklid na pracovištích.
- Organizační opatření
- Osobní ochranné pomůcky respirátor FFP2 , FFP 3 (polomasky ev. celoobličejové masky), rukavice, brýle, oděv, hygienická smyčka
- Informovanost zaměstnanců !
- Kontrola expozice - prašnosti na pracovišti
- Sledování a kontrola zdravotního stavu
- Dlouhodobé sledování - registr

Doporučené postupy



Algoritmus hodnocení expozice dle NIOSH

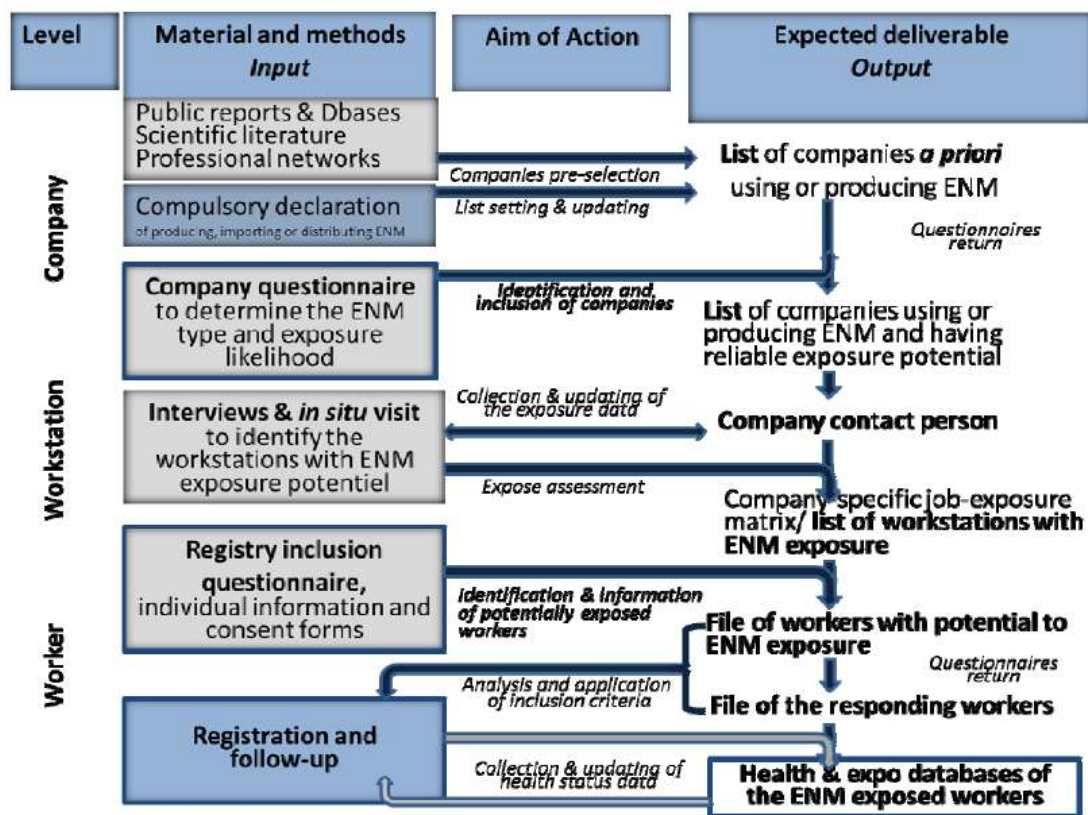
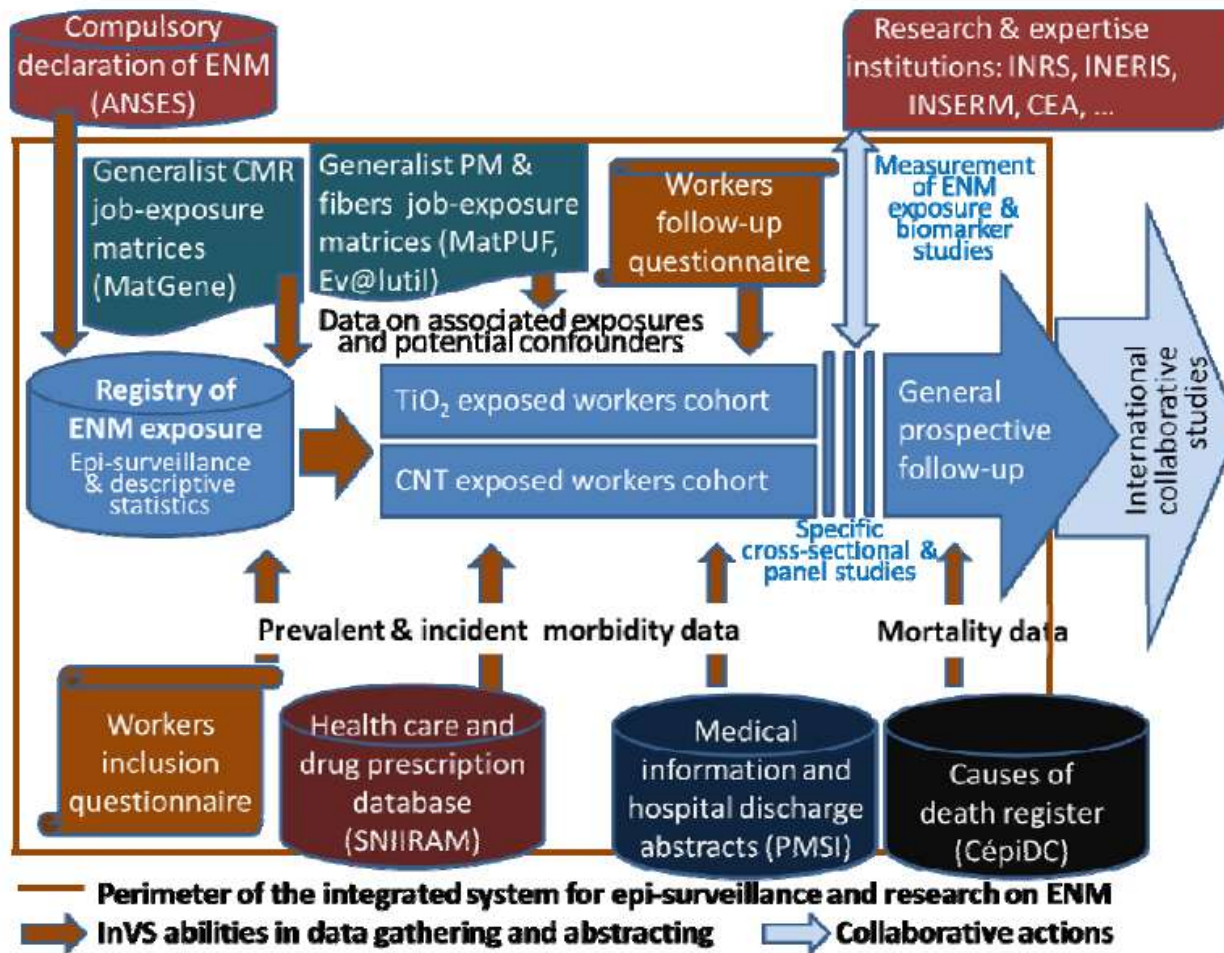


Figure 1. Multi-step development of the French ENM exposure registry.

Expoziční francouzský registr (carbon black, TIO₂, amorfní oxid křemičitý, nanotubes)



. Figure 2. Pattern of the French integrated ENM surveillance system.

Expoziční francouzský registr (carbon black, TiO₂, amorfni oxid křemičitý, nanotubes)

I Table 4 I

Surveillance methods for potential health effects on the respiratory system

Pathologies and health events to be monitored	Type of surveillance	Location of data collection	Indicators and methods	Comments	
<ul style="list-style-type: none"> - Lung and systemic inflammation/oxidant stress - Occurrence or aggravation of chronic respiratory pathologies (asthma, COPD) and exacerbation of symptoms - Increase in the frequency of lung infections - Pulmonary fibrosis - Lung cancer - Pleural plaques and pleural mesothelioma (effects specific to CNTs) 	Passive surveillance	InVS	Causes of death		
			PMSI diagnosis		
				Long term conditions diagnosis	
				Drug consumption	
		InVS		Reported respiratory symptoms (ECRHS questionnaire)	Indicators that are not very sensitive nor very specific
				Self-reported diagnosis	
		Active surveillance	Occupational health services or health care centers	Blood level of systemic inflammation markers and oxidant stress	Very sensitive but not very specific indicators C Reactive Protein : Acute marker of inflammation Data could be collected among occupational health services that include them in the health follow-up of workers
				Spirometry	Necessity of trained personnel and standardization of methods Allows differentiation between obstructive problems (COPD, asthma) and restrictive problems (fibrosis)
				Spirometry after ventoline bronchodilatation	Differentiation between asthma and COPD (asthma characterized by reversibility of respiratory problems after bronchodilatation)
			Specialized hospital or ambulatory medical service	Carbon monoxide diffusion capacity test	Indicator of diseases affecting pulmonary interstitium (emphysema, fibrosis)
	In-depth pulmonary function test, including measurement of total lung capacity				
	Chest X-ray			Exposes to ionizing radiation Data could be collected among occupational health services that include chest X-rays them in the health follow-up of workers	
			Chest Computed Tomography	Exposes to ionizing radiation, expensive Data could be collected among occupational health services that include chest CT in the health follow-up of workers	
			Research team	Markers of lung inflammation in exhaled breath condensates	Minimally invasive method, problem of reproducibility (very small quantities collected) Has never been done in the workplace

PMSI: Programme des médicalisation des systèmes d'information (French Hospital Information System); ECRHS: European Community Respiratory Health Survey; COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease

Objektivní metody pro sledování zdravotního stavu (dle francouzského registru)

Použití dnes není ani v pracovním, ani v životním prostředí regulováno. TiO₂ není regulován z hlediska biocidní legislativy a je používán ve shodě s legislativou REACH – otázka efektivity použití?

MINULOST



SOUČASNOST

**Použití nanonástříků TiO₂
v potravinářském průmyslu**



Použití nanonástříků TiO_2 v nemocnici



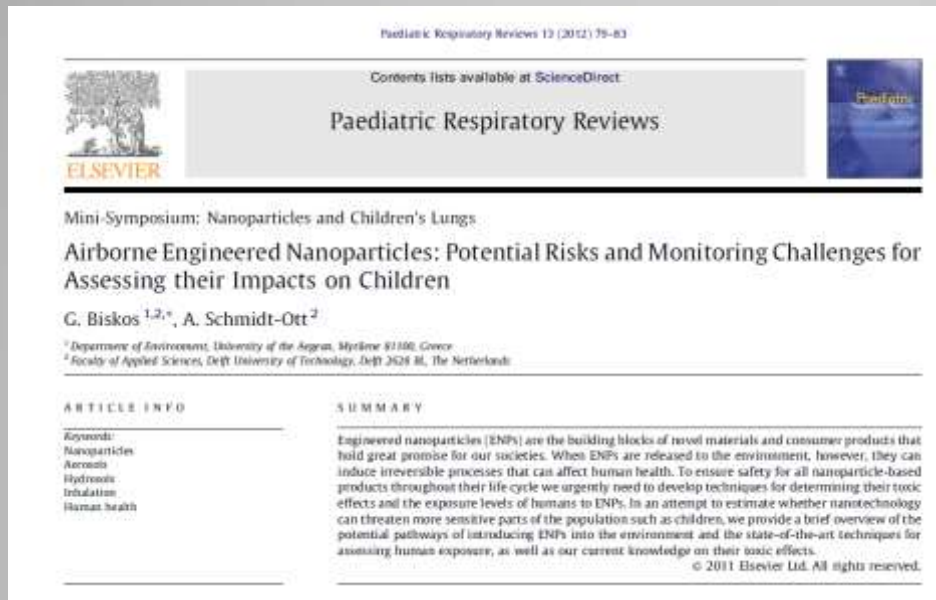
Použití nanonástříků TiO₂ v automobilu



Použití nanoTiO₂ nástřiků ve školce

- Děti jsou zranitelnější v případě vzniku chronických onemocnění. V důsledku toho mohou být náchylnější, pokud jsou vystaveny ENPs.
- Toxické účinky nanočástic se mohou projevit až po dlouhé době, stejně jako v případě azbestu, proto je zvláště důležité chránit mladou část populace
- Skutečnost, že všechny nanočástice (biopersistentní částice) mají tendenci se hromadit, retenční mechanismy zatím nejsou dokonale objasněny, je nutno chránit mladou část populace před nimi.

Názor pediatriů



- Podle definice Evropské komise z 2. února 2000 je třeba užít principu předběžné opatrnosti vždy, „**když existuje alespoň předběžný vědecký názor, že je opodstatněný důvod k obavám před riziky poškození životního prostředí či zdraví lidí, živočichů a rostlin, která by mohla narušit základní princip vysoké úrovně ochrany životního prostředí**“.
- Tento princip je potřeba vnímat jako přechodné opatření pouze po dobu, dokud nebudou získány všechny klíčové poznatky, které umožní přijmout ekonomicky, technicky i společensky nejlepší opatření pro zajištění bezpečnosti a ochrany zdraví (potenciálně) exponovaných osob

Princip předběžné opatrnosti

- Návrh odborného stanoviska „ o posuzování a řízení rizik nanomateriálů na pracovišti „ má být v EU předložen tak, aby příslušné odborné závěry byly vypracovány do roku 2014.

Postup v rámci EU

1. Revize úkolu HH (projednání s průmyslem)
2. Stanovení postupu pro hodnocení s nanomateriály v pracovním prostředí event. v životním prostředí (viz. reklamní nabídky)
3. Doporučení jak zacházet s nanočásticemi a jak se před nimi chránit
4. Diskuze o „prioritních nanočásticích“ pro hodnocení pracovního prostředí (viz. ad 1)
5. Doporučení náplně preventivních prohlídek
6. Doporučení pro hodnocení expozice (objektivizace nanočástic v pracovním prostředí)
7. Diskuze o zavedení registru expozic jako ve Francii, Holandsku, Dánsku, Finsku a pod.
8. Ve spolupráci s vysokými školami podílet se na výzkumu vlivu nanočástic na zdravotní stav
9. Doporučení, kdy použít „ princip předběžné opatrnosti“
10. Doporučení PEL pro nejvíce se vyskytující nebo zdravotně nejvíce závažné nanočástice

Závěry

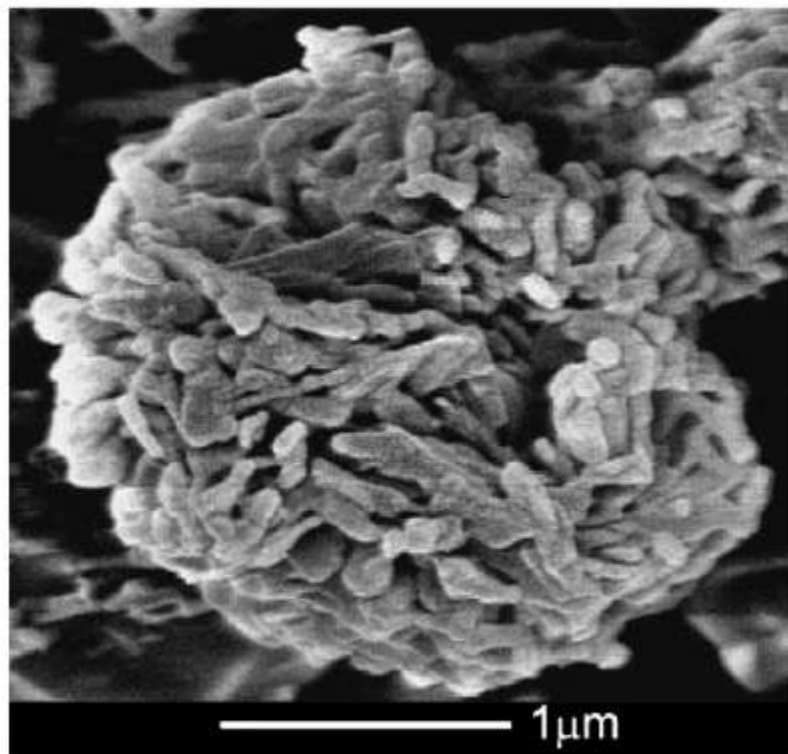


Fig. 2. Nanoparticle agglomerates of salbutamol sulfate. Reprint from Ref. [110] with permission from John Wiley and Sons.

Děkuji za pozornost