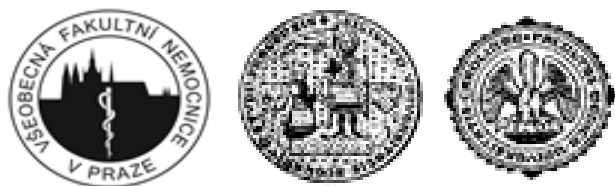


NANOČÁSTICE JAKO HROZBA?



DANIELA PELCLOVÁ

Klinika pracovního lékařství VFN a 1. LF UK

NANOČÁSTICE

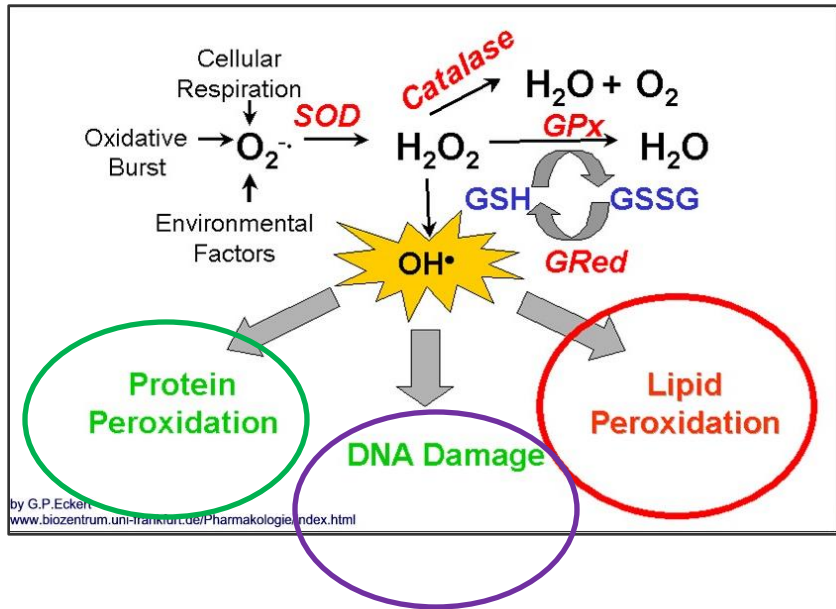
- Metody vyšetřování exponovaných osob
- 1- Dělníci z výroby titanové běloby
- 2- Úředníci ze stejného podniku
- 3- Dělníci na výrobu pigmentů s **Fe oxidy**
- 4- Výzkumníci s **nanokompozitními materiály**
- 5- Dobrovolníci s opalovacími (nano)TiO₂ krémy
- Myši a potkani
- Jsme ohroženi?

NANOČÁSTICE

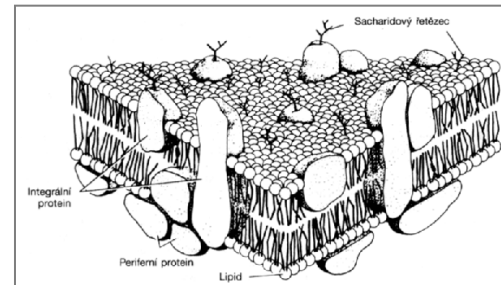
- Unikátní fyzikálně-chemické vlastnosti
- **Velký poměr povrchu k hmotnosti**
- **Vyšší reaktivitu**
- **Mohou procházet skrze biologické membrány a bariéry mezi tkáněmi**
- **Působí zánět a smrt buněk**
- **Poškozují jaderné kyseliny**
- **„Oxidační stres“**
- Experimentální studie –
- **zánět, fibróza plic,**
- **rozedma, rakovina**

OXIDACE

bílkovin, jaderných kyselin a tuků



Oxidace tuků buněčných membrán
(lipidová dvojvrstva)



Souhrn experimentálních údajů ukazuje, že některé nanočástice působí **oxidativní poškození** lipidů buněčných membrán, proteinů, a nukleových kyselin

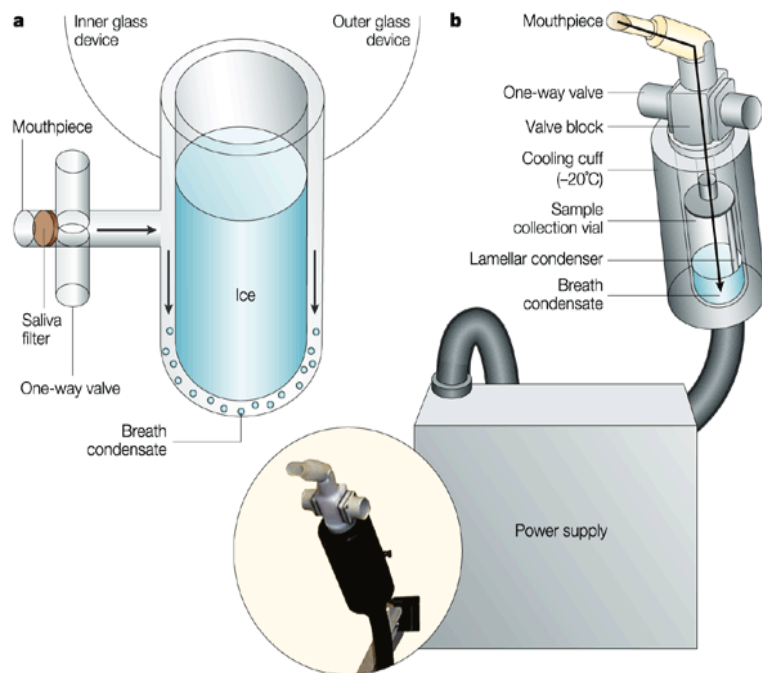
BAKAND, S., HAYES, A., DECHSAKULTHORN, F. Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure. *Inhalation Toxicology*, 2012

SHI H, MAGAYE R, CASTRANOVA V, ZHAO J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology*, 2013

Odběr kondenzátu vydech. vzduchu (KVV)



System pro neinvazivní sběr látek z dýchacího systému po zkapalnění zchlazením na -10°C (Jaeger).

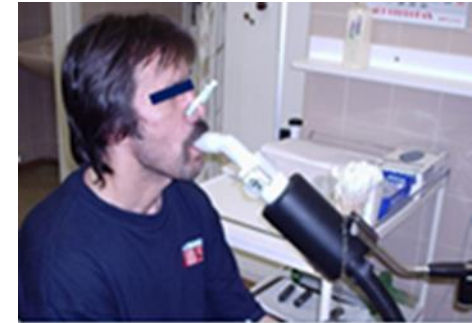
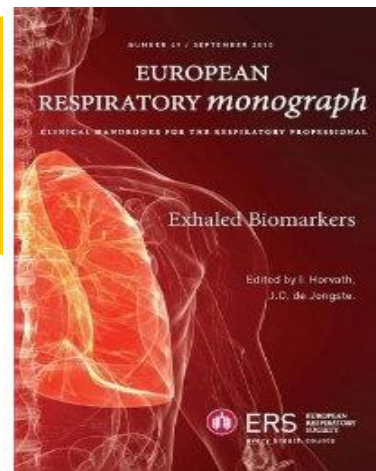


KVV obsahuje:

- 1) 99 % zkapalněnou vodní páru
 - 2) **částice aerosolu tekutiny z dýchacích cest** uvolněné vířením vzduchu při stažení průdušinek
- 1) ve vodě rozpustné látky.

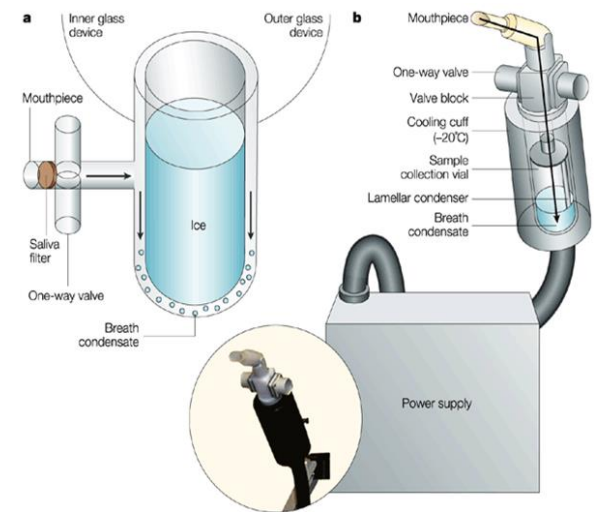
Metodika KVV

Horváth et al. 2010



VÝHODY

- + nebolí
- + obtěžuje jen málo
- + lze opakovat
- + děti, pacienti
- + nesnižuje se kouřením
- + přenosná



NEVÝHODY

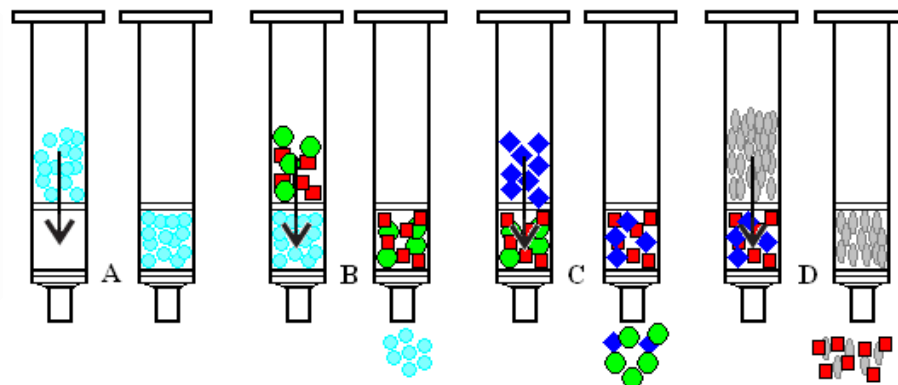
- cena LC-ESI-MS/MS

Analýza vzorků biologického materiálu

- Identifikace biomolekul



Odsolení a zakoncentrování vzorků Extrakce na pevné fázi



Analýza kapalinovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií TSQ Vantage, LTQ Orbitrab



ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ

LC-MS ANALÝZA
VZORKŮ

KVANTITATIVNÍ
A KVALITATIVNÍ
VYHODNOCENÍ DAT

Měřené látky v kondenzátu vydechovaného vzduchu a moči



- malondialdehyd (MDA)
- 4-hydroxy-trans-nonenal (HNE)
- 4-hydroxy-trans-hexenal (HHE)
- 8-isoProstaglandin F_{2α} (8-isoprostan)

TUKY

- 8-hydroxy-2-deoxyguanosin (8-OHdG)
- 8-hydroxyguanosin (8-OHG)
- hydroxymethyl uracil (5-OHMeU)

JADERNÉ KYSELINY

- o-tyrosin (o-Tyr)
- 3-chloro-tyrosin (3-ClTyr)
- nitrotyrosin (3-NO₂Tyr)

BÍLKOVINY

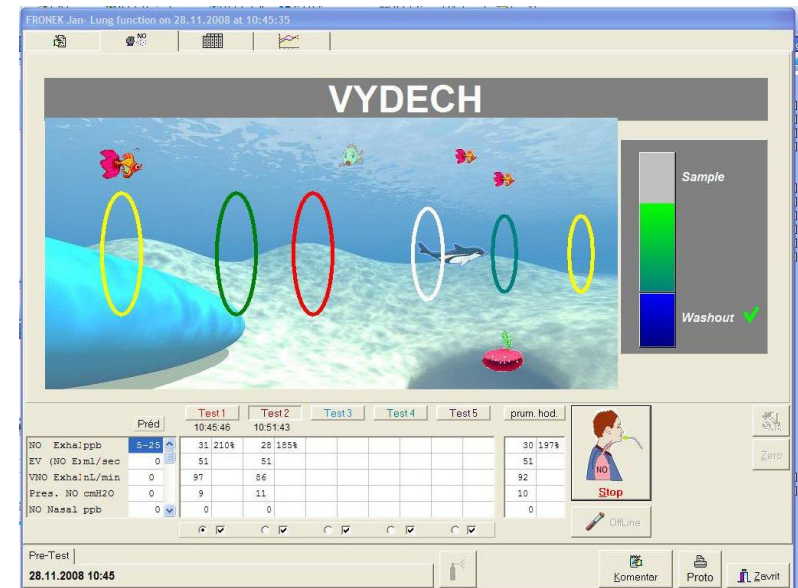
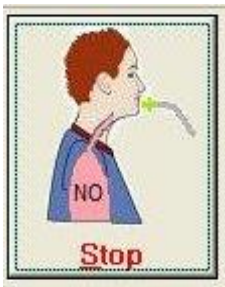
- leukotrieny
- arachidonová kys. → nestabilní LTA₄ → LTB₄ (exacerbace CHOPN, kouření)
- → LTC₄, LTD₄, LTE₄ (bronchospasmus)

ZÁNĚT, ASTMA

- FeNO

Měření vydechovaného oxidu dusnatého FeNO (fraction of exhaled NO)

- Metoda: zavedená v klinické praxi
- Jednoduché, rychlé vyšetření
- nevýhoda: NO je nižší u **kuřáků** vzhledem k poškození epitelu, kde se NO tvoří z L-argininu



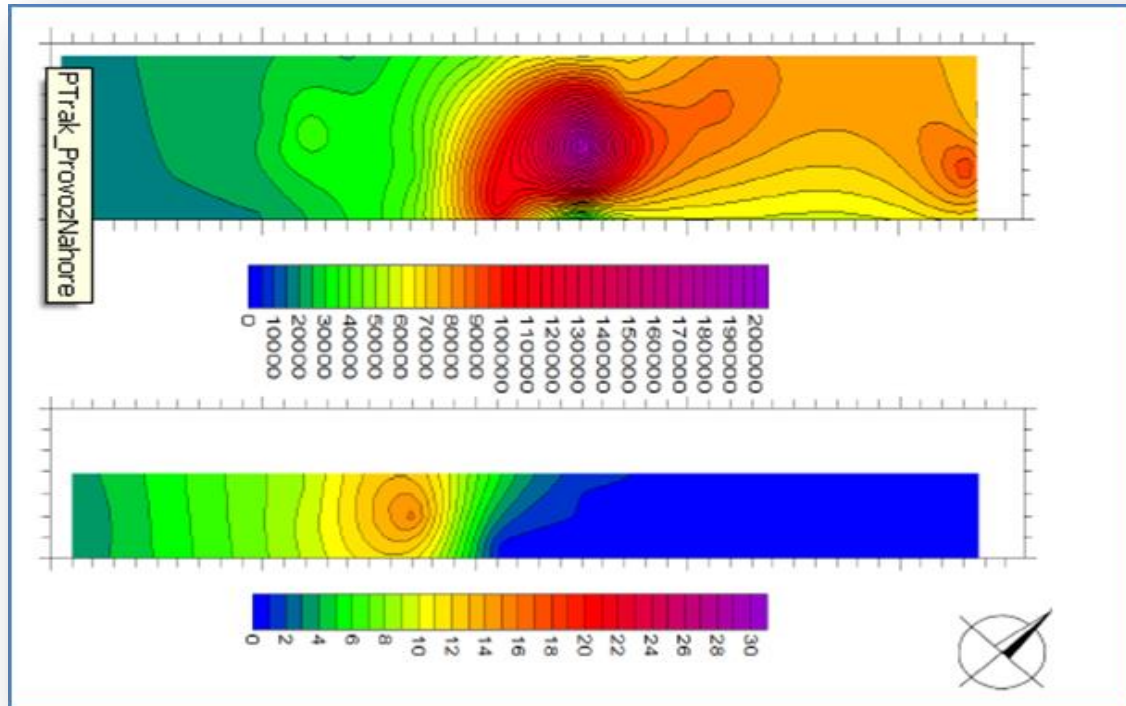
1 VÝROBA PIGMENTU TiO_2

TiO_2

Početní koncentrace (P-TRACK)

Hmotnostní koncentrace (Dust-TRACK)

80 % ČÁSTIC v oblasti nano



VÝROBA PIGMENTU TiO_2

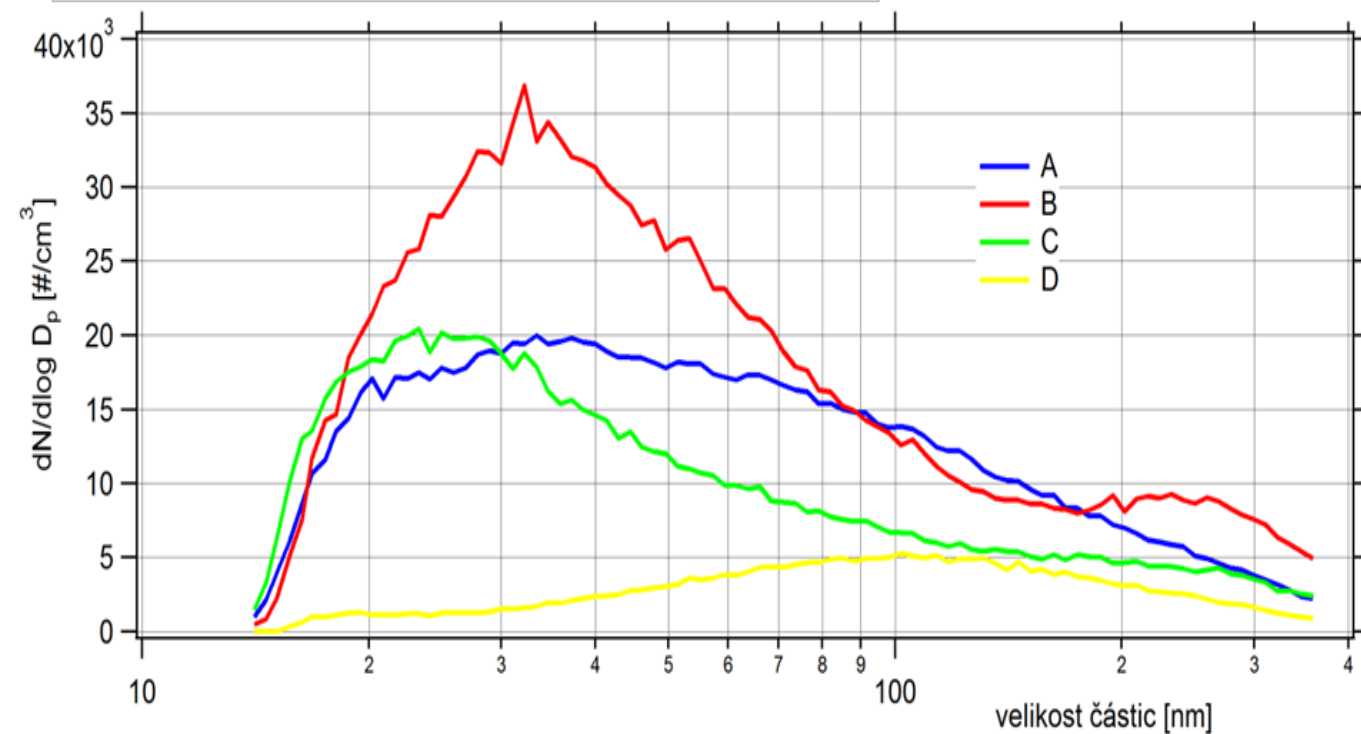
Měření aerosolu pomocí SMPS a APS
po dobu celé směny na 4 místech

Mikronizace = mletí

Kalcinace = zahřívání na 900°C

Transport



Velíny (žlutá)



SMPS - scanning mobility particle sizer - VĚTŠINA ČÁSTIC do 100 nm



Vyšetření 2012 a 2013

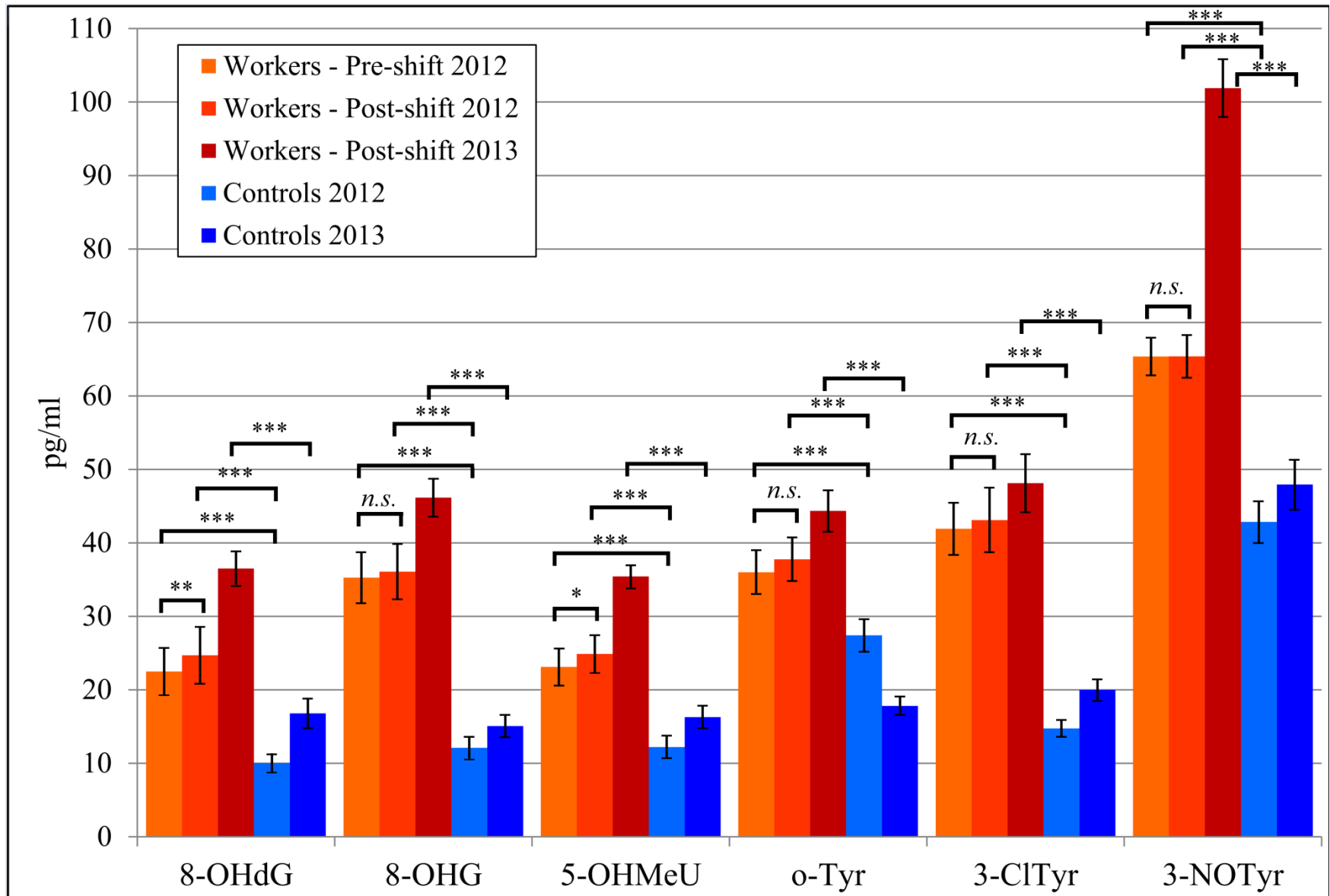
	Expozice	Počet osob	Věk	Kuřáci	Koncentrace mg/m ³	Počet částic/cm ³
TiO₂ 2012 Před-směnou Po směně		20	34±8	55 %	1.90	38 000
TiO₂ 2013 Po směně		14	34±5	50 %	0.90	23 200
Kontrolní osoby 2012+2013		20+35	38±8	50 %	n.m.	nebylo měřeno

Titan v biologických vzorcích

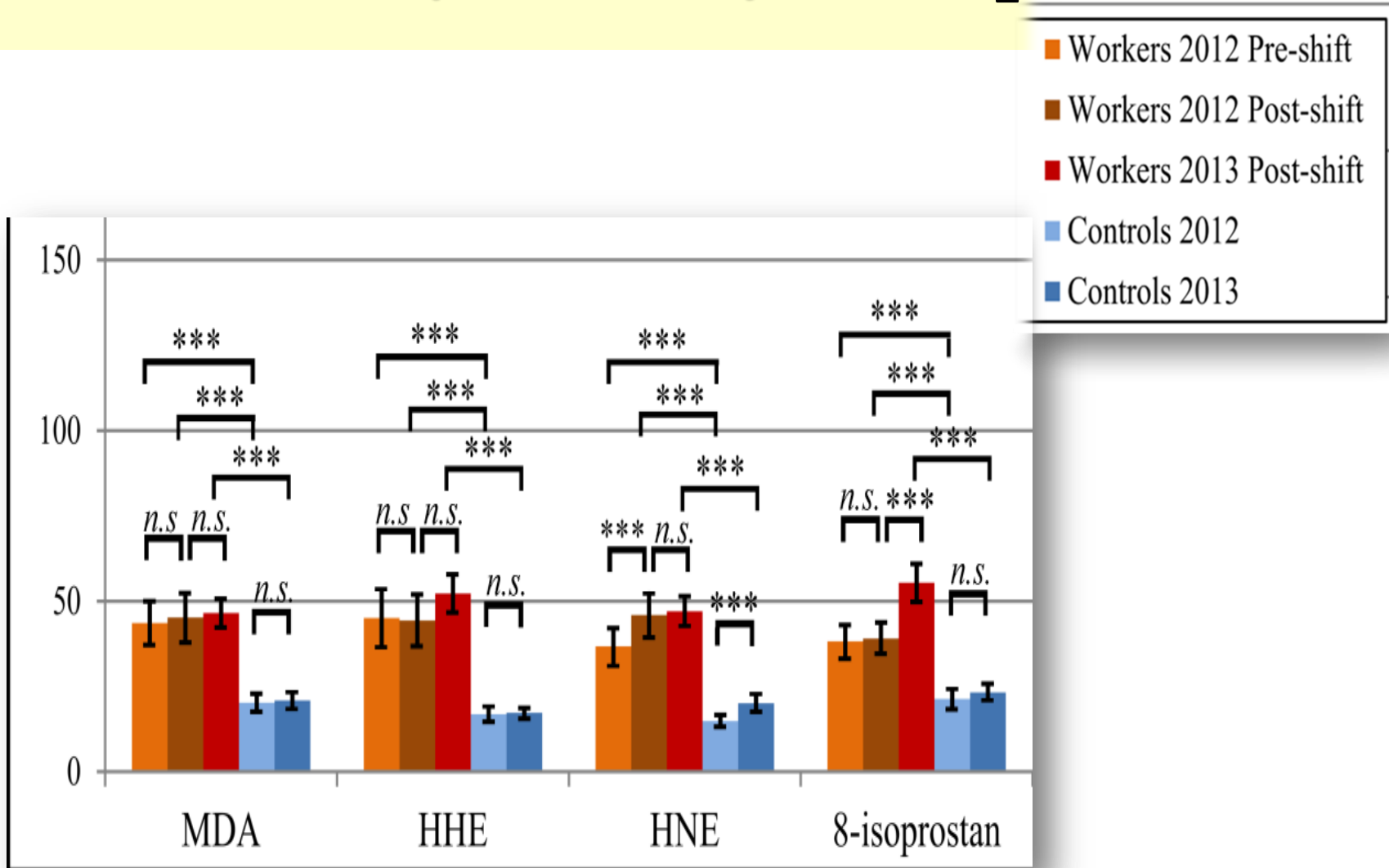
ICP-MS (LOD 1.1 µg/l)

Skupina	Počet osob	Kondenzát µg/l	Moč µg/l
TiO ₂ výroba 2012 Před směnou Po směně	16	24.1±1.8 24.1±1.9	<LOD
TiO ₂ výroba 2013 Po směně	14	20.0±2.2	<LOD
Kanceláře 2013	22	1.14±0.1	<LOD
Kontroly 2012+2013	45	1.12±0.0	<LOD

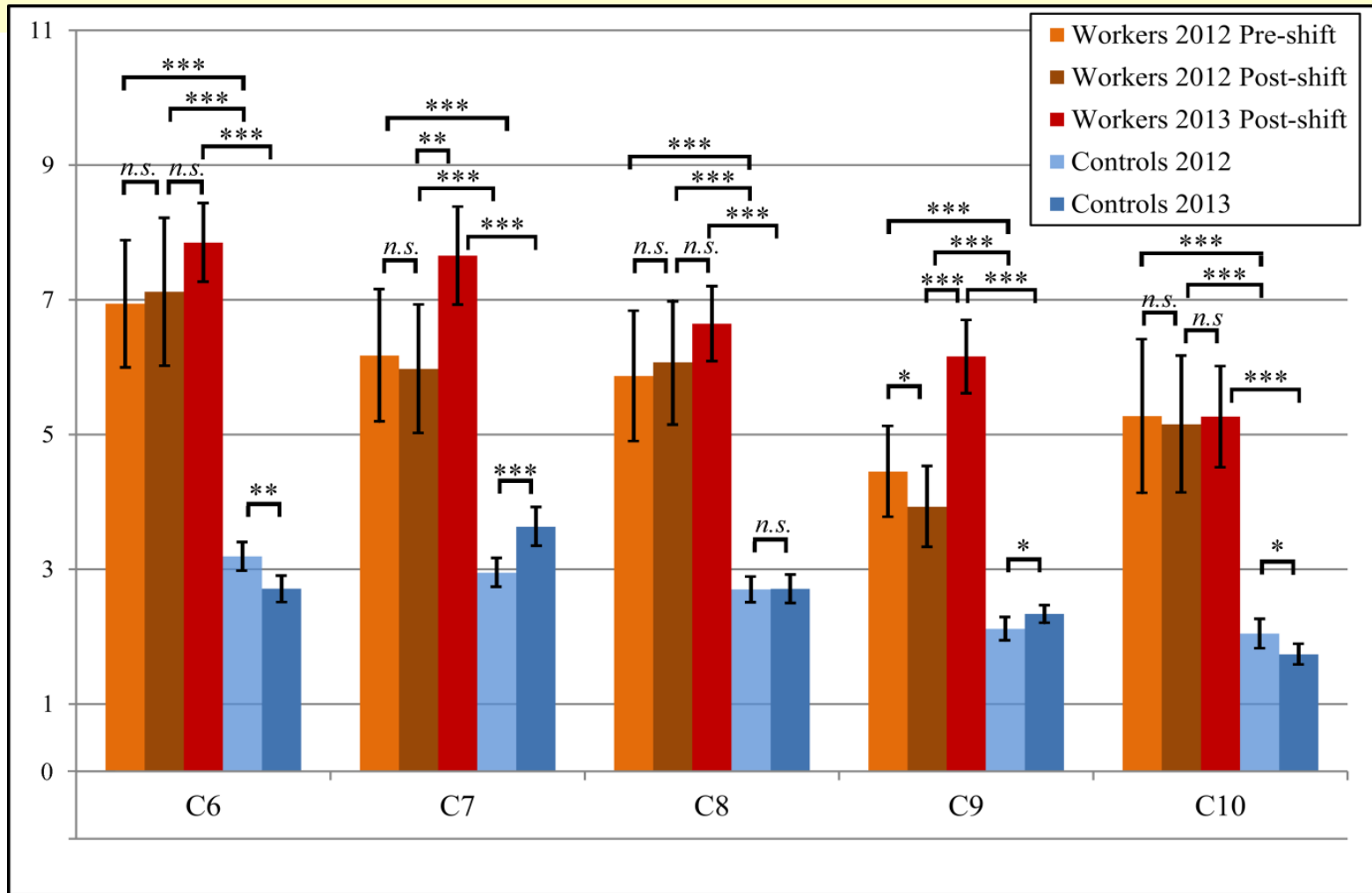
Rozdíly u **exponovaných** TiO₂ x **kontroly**



Rozdíly u **exponovaných** TiO₂ x **kontroly**



Rozdíly u **exponovaných** TiO₂ x **kontroly**

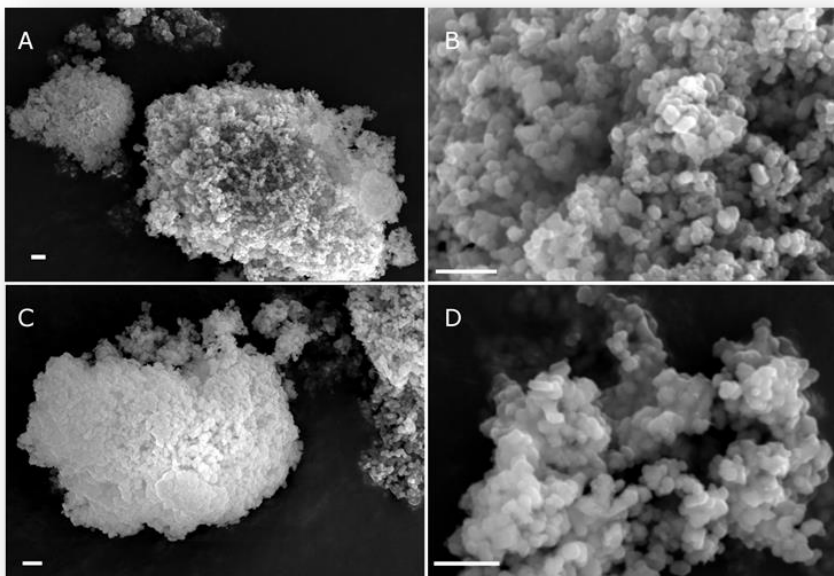


Analýza sedimentovaného prachu chemicky, mikroskopicky



Scanning electron microscopy (SEM)
aglomerované/agregované částice

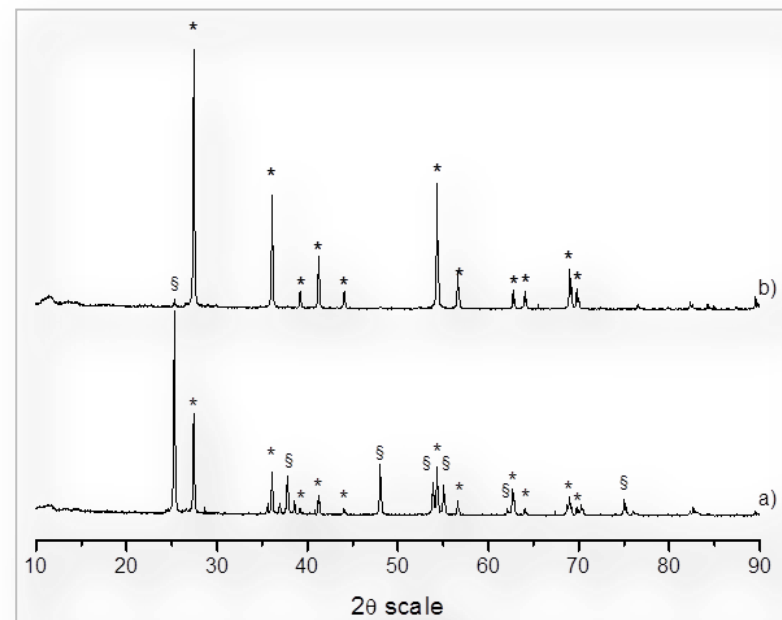
Kalcinace (A, B)
Mikronizace (C, D)



___ 1 μ m

RTG difrakce

Mikronizace (rutil) § anatas *rutil



Kalcinace (anatas:rutil 2:1)

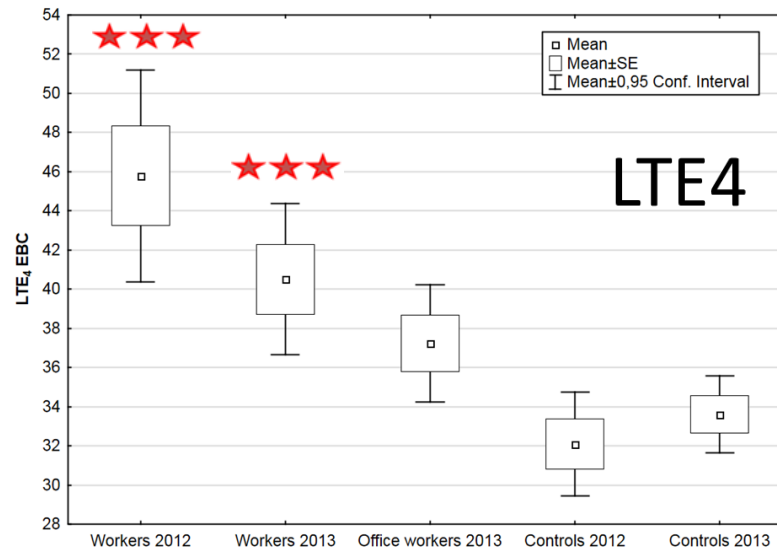
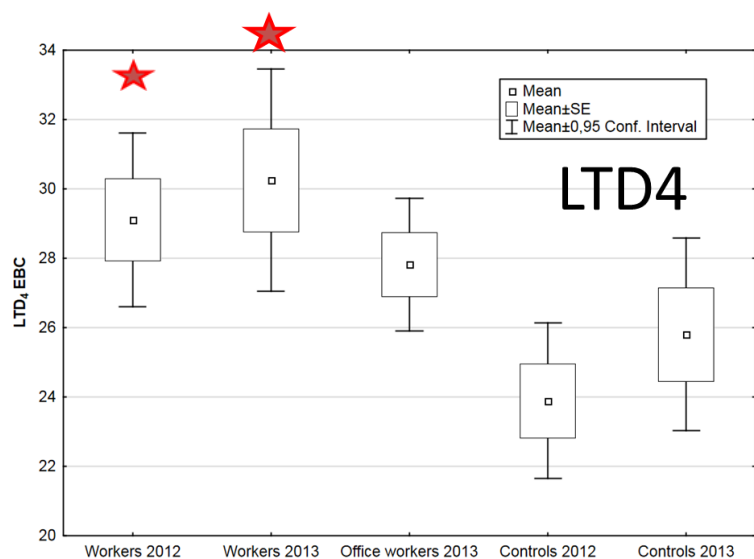
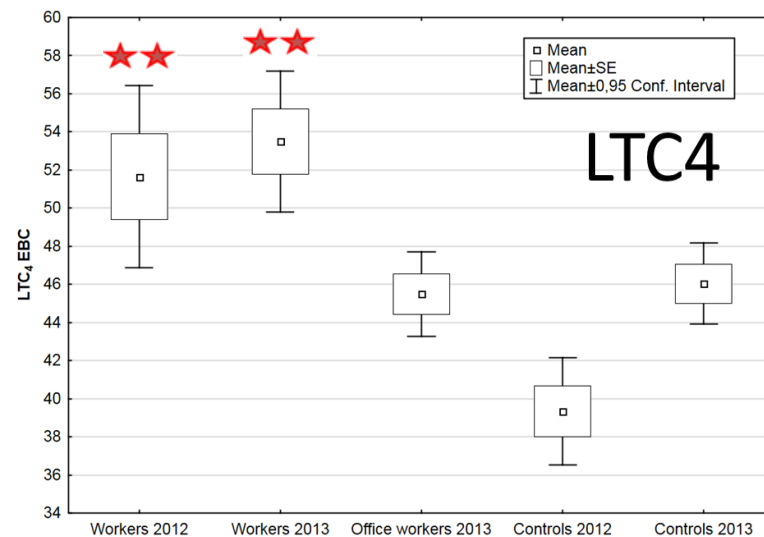
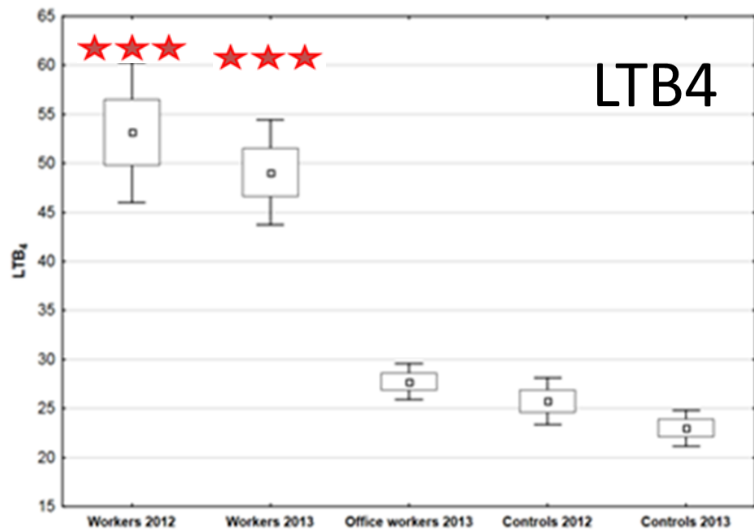
Multiple regression analysis – primární je expozice v práci (TiO₂)

	8-OHdG (pg/ml)	8-OHG (pg/ml)	5-OHMeU (pg/ml)	o-Tyr (pg/ml)	3-CITyr (pg/ml)	3-NOTyr (pg/ml)
TiO₂ výroba	19.20*** (14.75, 23.66)	30.37*** (26.75, 34.00)	19.35*** (16.30, 22.40)	28.95*** (25.51, 32.38)	28.43*** (23.71, 33.14)	51.68*** (44.31, 59.04)
Věk (roky)	0.02 (-0.17, 0.21)	-0.02 (-0.17, 0.13)	0.06 (-0.06, 0.19)	-0.02 (-0.16, 0.13)	0.13 (-0.07, 0.32)	-0.06 (-0.36, 0.25)
Kouření	-0.29 (-3.65, 3.07)	0.70 (-2.04, 3.43)	0.38 (-1.92, 2.69)	-0.46 (-3.05, 2.14)	-1.41 (-4.97, 2.14)	1.62 (-3.94, 7.17)
SO ₂ (µg/m ³) (CO, NO _x) v ovzduší	0.02 (-0.13, 0.17)	-0.02 (-0.14, 0.10)	-0.04 (-0.15, 0.06)	-0.13* (-0.24, -0.01)	-0.06 (-0.22, 0.10)	0.16 (-0.09, 0.41)

Pelclova et al. Occupational and Environmental Medicine 2016: Markers of oxidative damage of nucleic acids and proteins among workers exposed to TiO₂ (nano) particles.

Leukotrieny v kondenzátu

(Pelclova et al. *J. Breath Research* 2016)



Multiple regression analysis – primární je TiO₂ expozice v práci

(Pelclova et al. J. Breath Research 2016)

	LTB4	LTC4	LTD4	LTE4	FeNO
TiO ₂ expozice	17.93*** (13.86, 22.00)	6.80*** (3.86, 9.75)	3.39** (1.07, 5.71)	8.01*** (4.89, 11.14)	9.06* (1.75, 16.38)
Věk (roky)	-0.42*** (-0.61, -0.23)	-0.13 (-0.27, -0.01)	-0.00 (-0.10, 0.11)	-0.02 (-0.16, 0.13)	0.22 (-0.11, 0.56)
Kouření	8.21*** (4.17, 12.26)	2.66 (-0.26, 5.58)	-0.16 (-2.46, 2.15)	-0.87 (-3.97, 2.24)	-10.92** (-18.18, -3.65)
Alkohol	-9.24 (-22.85, 4.37)	5.31 (-4.52, 15.14)	0.88 (-6.87, 8.46)	-5.97 (-16.41, 4.48)	-39.35** (-63.80, -14.90)

Ramanova mikrospektroskopie potvrdila krystaly TiO_2

v kondenzátu

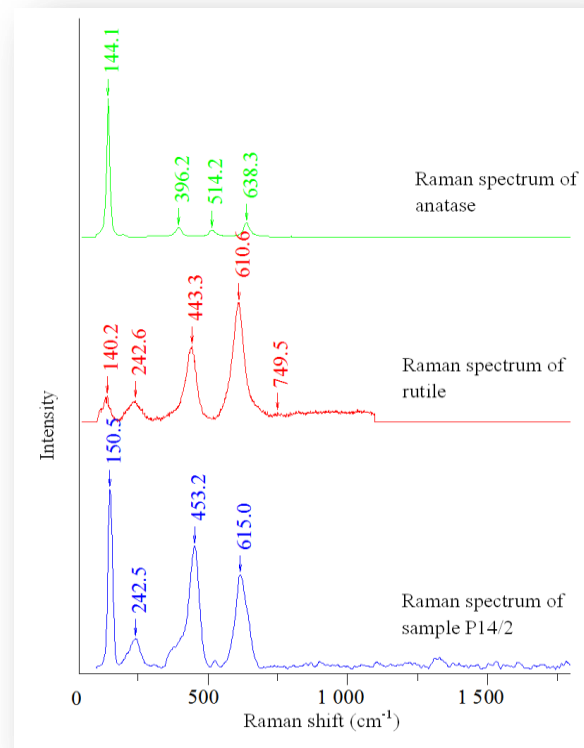
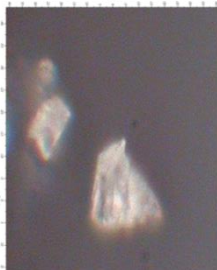
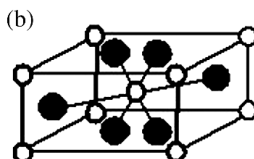
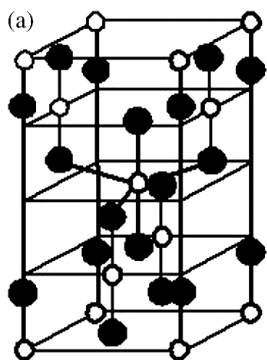
u 40 % dělníků před směnou!

u 70 % po směně



a) anatas

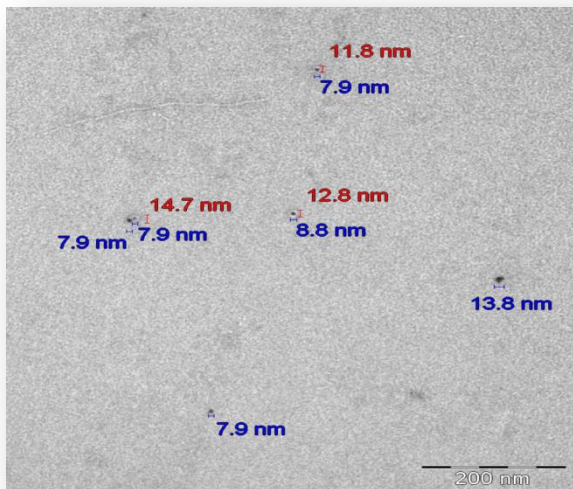
b) rutil



Pelclova D et al. J Breath Res 2015: Raman microspectroscopy of exhaled breath condensate and urine in workers exposed to fine and nano TiO_2 particles: a cross-sectional study.

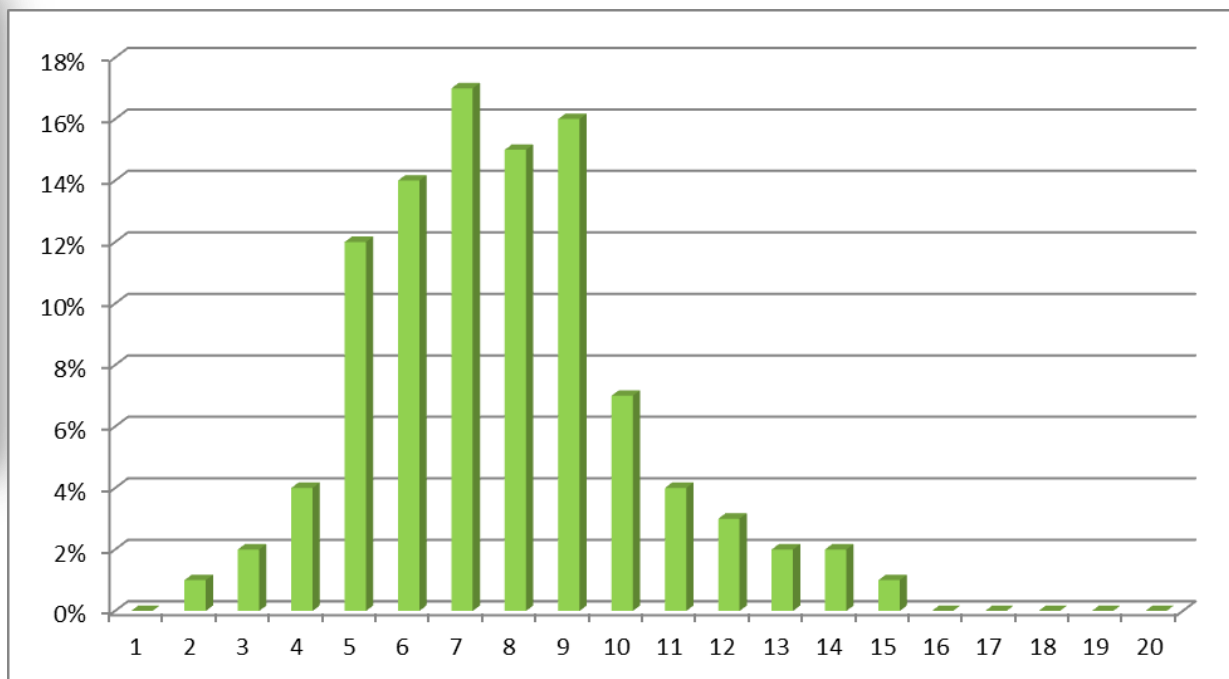
Transmisní elektronová microskopie (TEM)

nanočástice v moči dělníků TiO_2
4 osoby nález před + zvýšení po směně
3 osoby nález jen po směně



chemicky: Secondary ion
mass spectrometry (SIM)
titan

Velikost částic – medián 7 nm



2 - ÚŘEDNÍCI

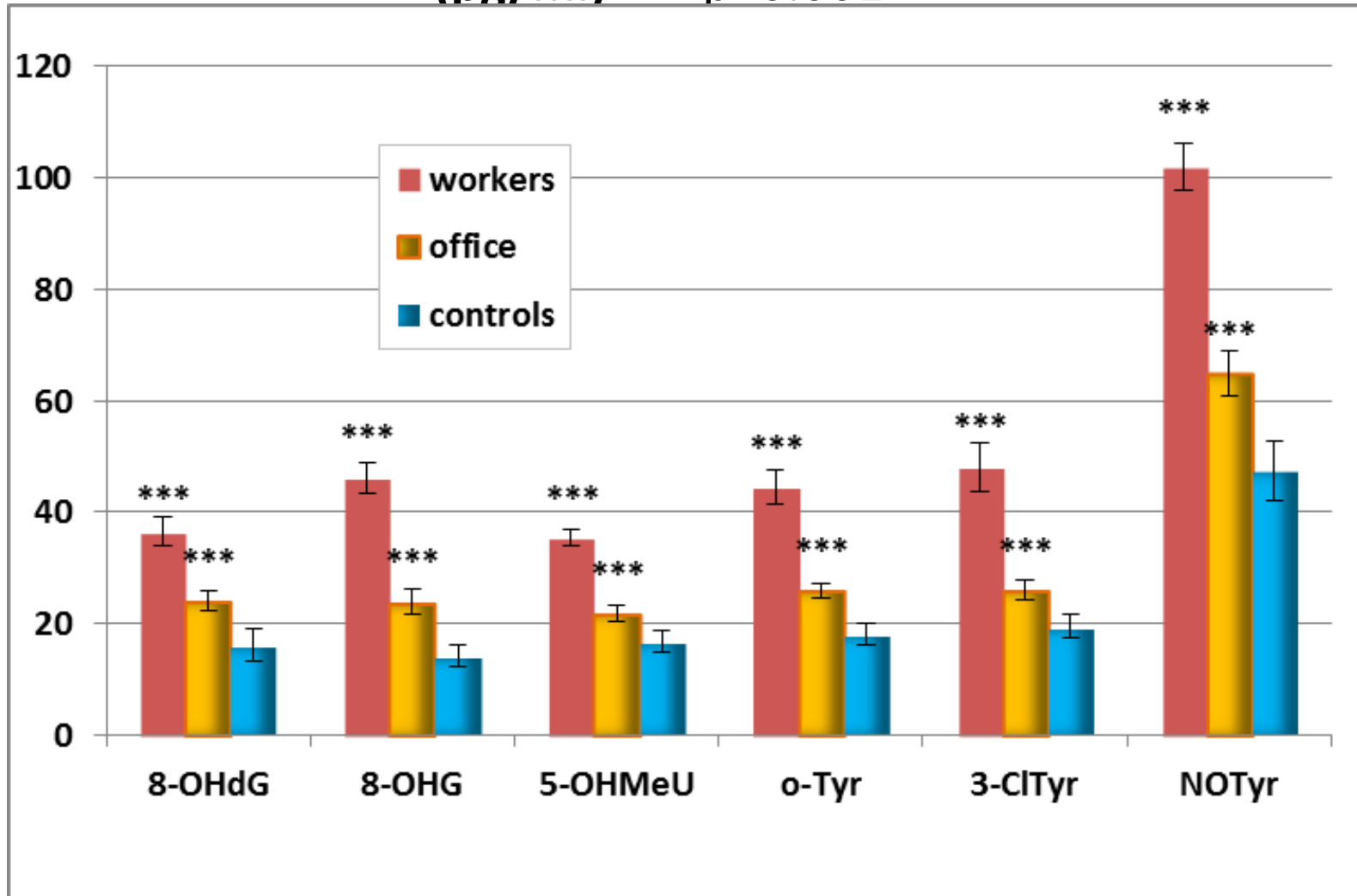
Skupina	Počet	Věk	Kuřáci		
Úředníci 2013	22	44±4	5%	15 min v provozu/den	
Kontroly 2013	14	39±5	50%	mimo expozici	

Pelclova et al. *Markers of lipid oxidative damage among office workers exposed intermittently to air pollutants including nanoTiO₂ particles. Reviews of Environmental Health 2016*



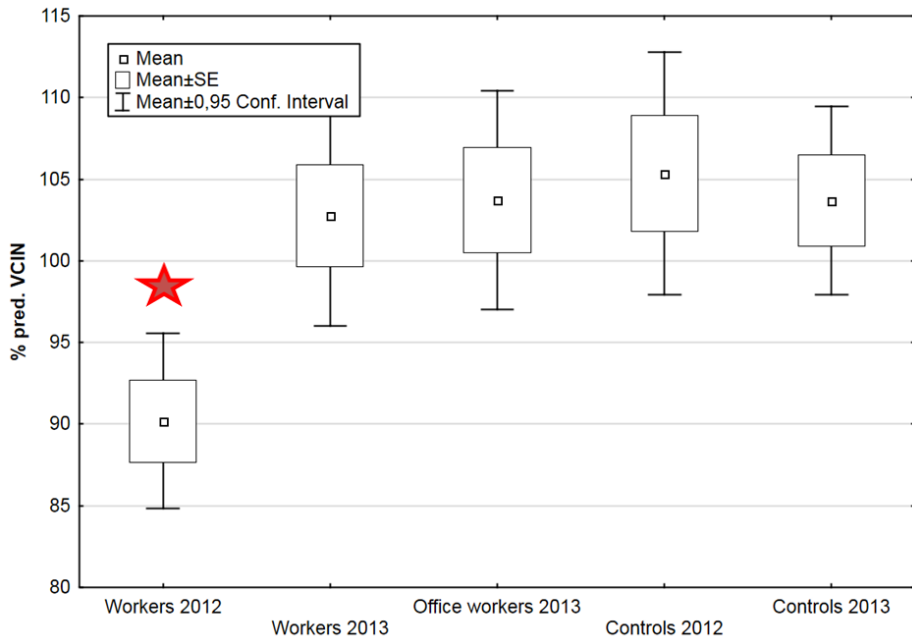
Dělníci TiO₂, úředníci a kontrolní osoby

(pg/ml) ***p<0.001

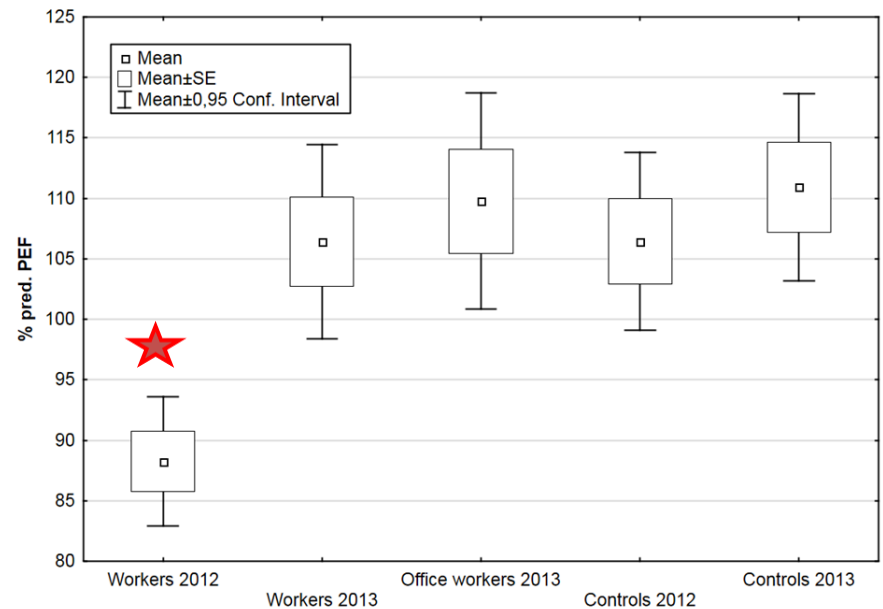


Plicní funkce – většina parametrů v normě

%VCIN



% PEF



★ dělníci 2012

dělníci 2013

úředníci

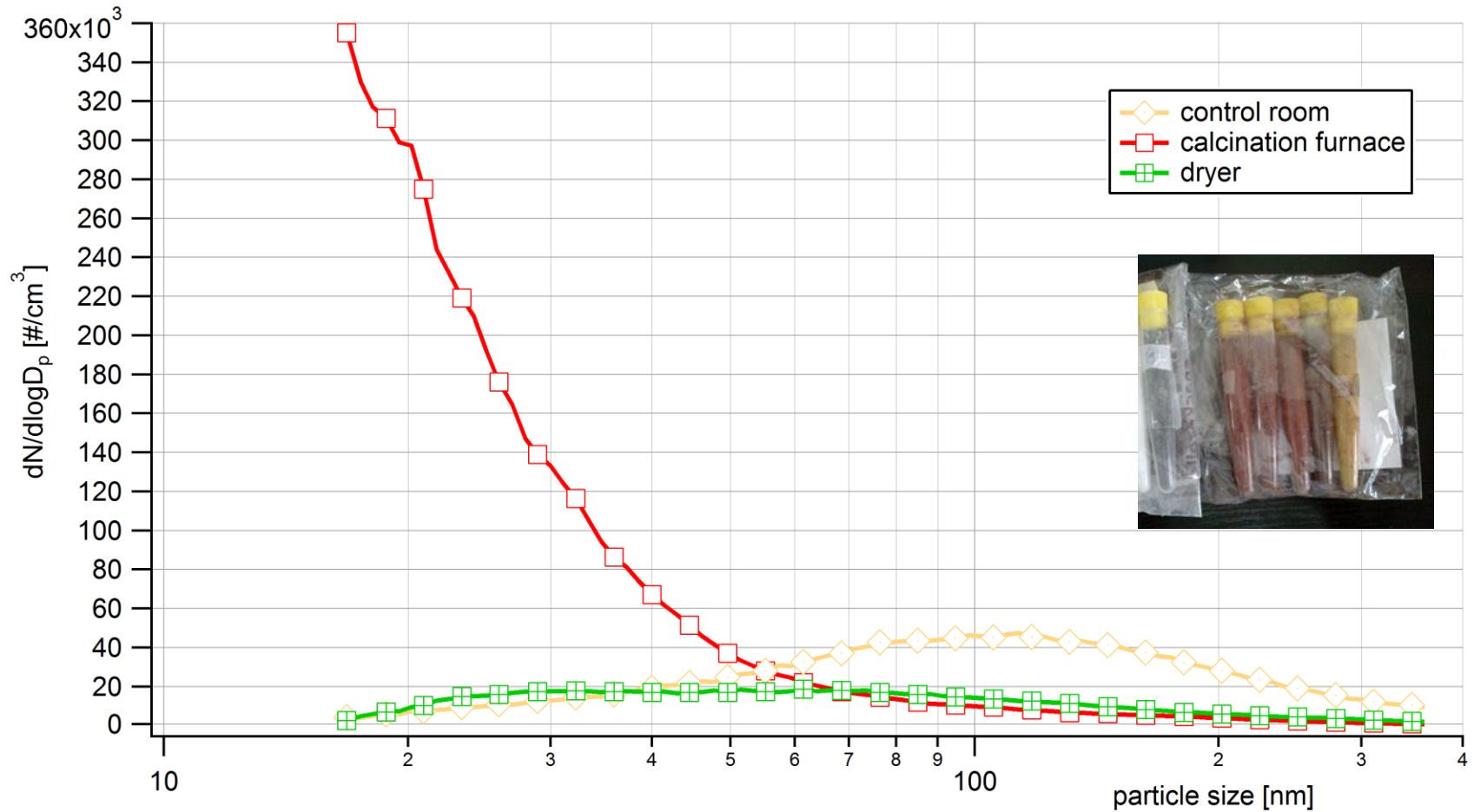
kontroly 2012

kontroly 2013

p<0.05

★ 2012 - včetně 4 dělníků s nejdelší expozicí, kuřáků




Výroba Fe-oxidů - většina částic má do 100 nm





Vyšetření 2012 a 2013- koncentrace oxidů Fe byla nižší

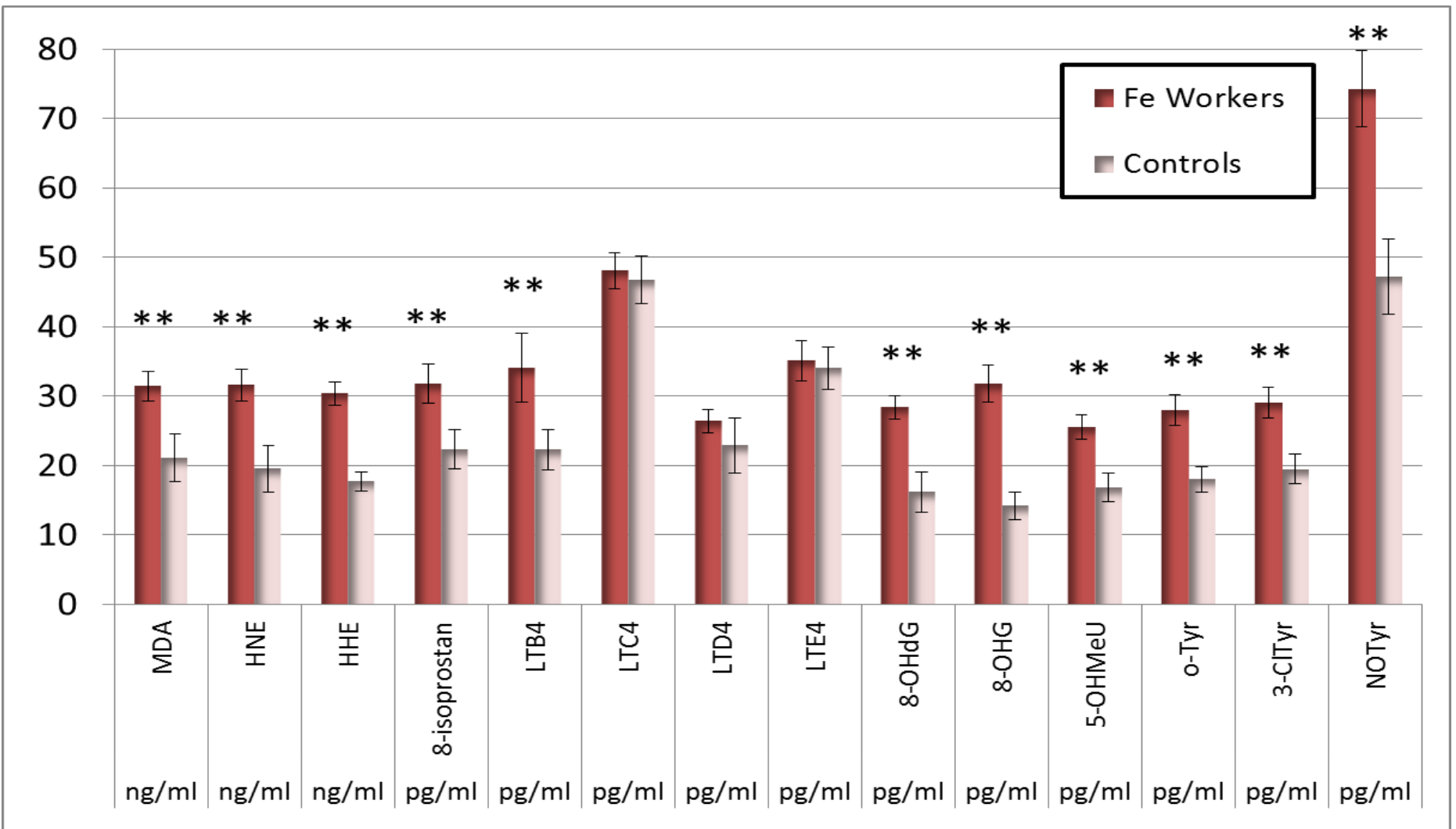


	Expozice	Počet osob	Věk	Kuřáci	Koncentrace mg/m ³	Počet částic/cm ³
TiO₂ 2012 Před-směnou Po směně		20	34±8	55 %	1.90	38 000
TiO₂ 2013 Po směně		14	34±5	50 %	0.90	23 200
Fe-oxidy 2013 Po směně		14	43±8	43 %	0.13	11 800

Pelclova et al J Breath Research 2016: Oxidative stress markers are elevated in exhaled breath condensate of workers exposed to nanoparticles during iron oxide pigment production.

Fe oxidy - markery v koncentráte vydechovaného vzduchu vs. kontroly

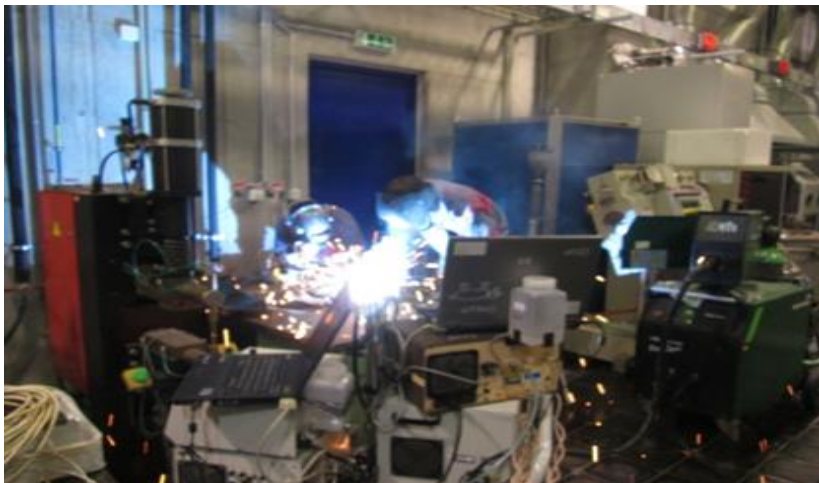
(markery nižší než u dělníků s TiO₂)



4 - Výzkumné pracoviště nanokompozitních materiálů - 2015 a 2016

- DÍLNY
- Svařování
- Slévání
- Obrábění

Svařování nanomateriálů - svařování nízkouhlíkové oceli:
Mn 1,70 %; Si 0,6 %; P 0,035 %; S 0,035 %



Obrábění nanomateriálů - geopolymerů s cementovou matricí a 40 % plniva - popílku, čediče nebo lupku, a nanoSiO₂



4 - Výzkumné pracoviště nanokompozitních materiálů -2016

Měření částic v ovzduší pomocí **Bernerova kaskádního nízkotlakého impaktoru (BLPI)** - dělí zachycené částice do 10 velikostních frakcí od 25 nm do 10 μm

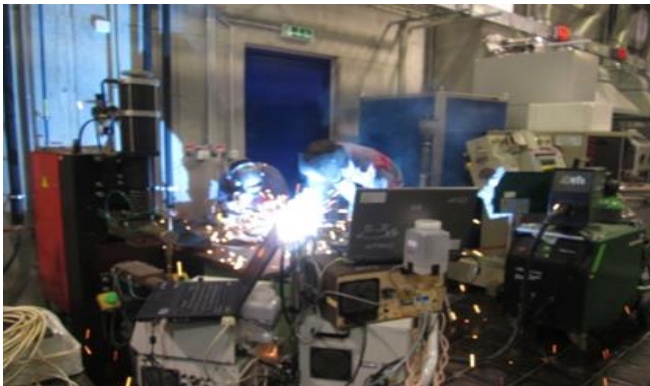
Celkové dosažené koncentrace

svařování - 1840 $\mu\text{g}/\text{m}^3$,

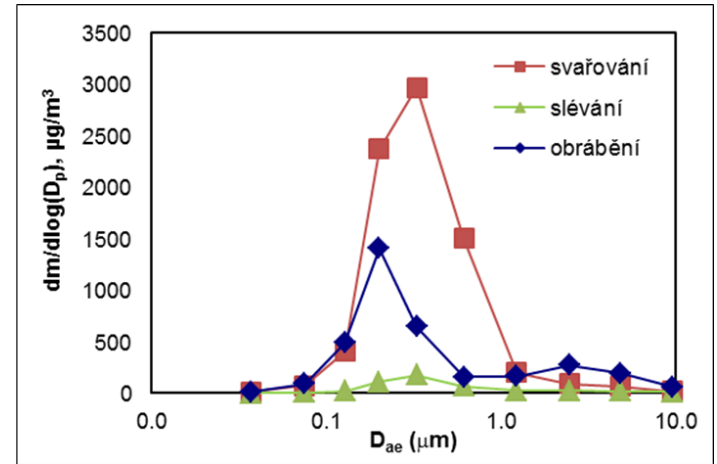
obrábění - 804 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

slévání – 120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

Svařování nanomateriálů



Schwarz a kol.: Chem. Listy, odesláno 2017



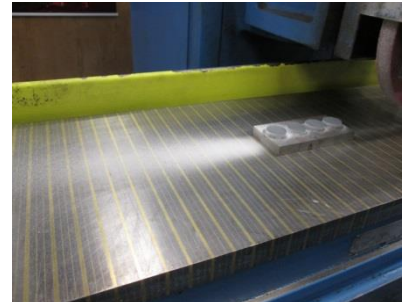
Obrábění nanomateriálů

Metody rozšířeny

20 pracovníků strojní fakulty před začátkem práce
a po skončení 3 hodin práce

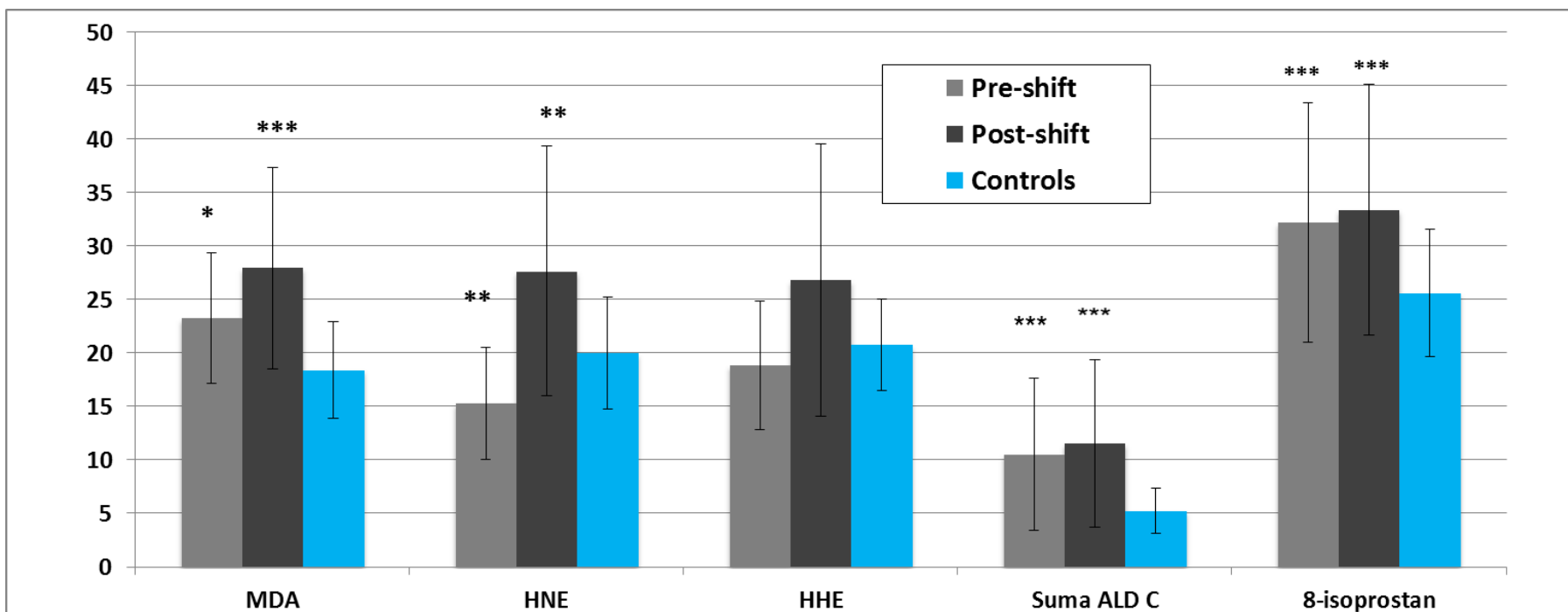
21 kontrolních osob
ze stejného kraje.

- vyšetření 3x – před směnou,
po směně,
za 12 hodin po směně
- odběr krve na stejné markery
- odběr moče na stejné markery
- odběr buněk ze stěru v ústní dutině
na genetické vyšetření
- vyšetření mikrojadern v periferních
lymfocytech

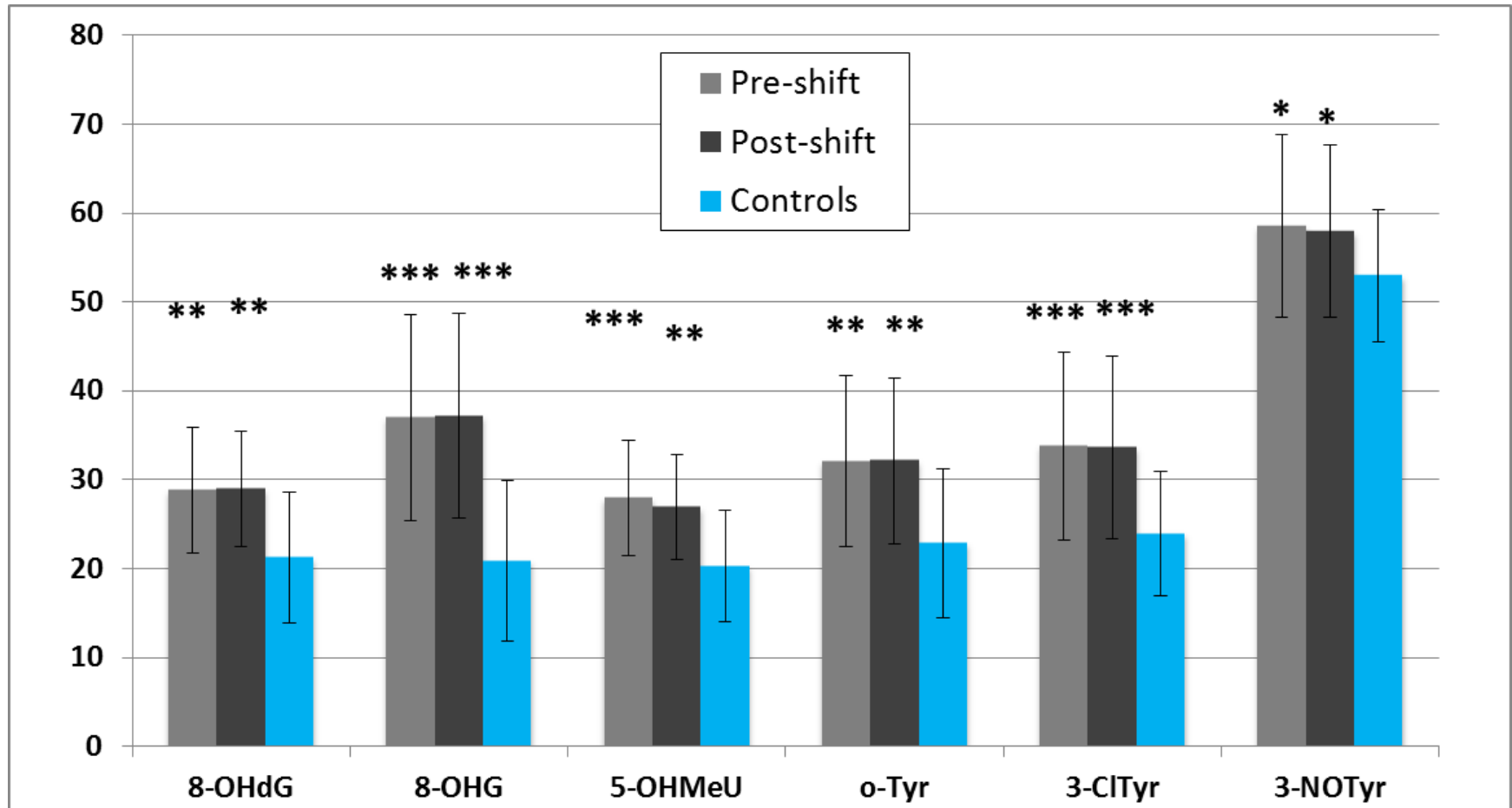


Markery oxidace lipidů

*** (p<0,001) ** (p<0,01) * (p<0,05)

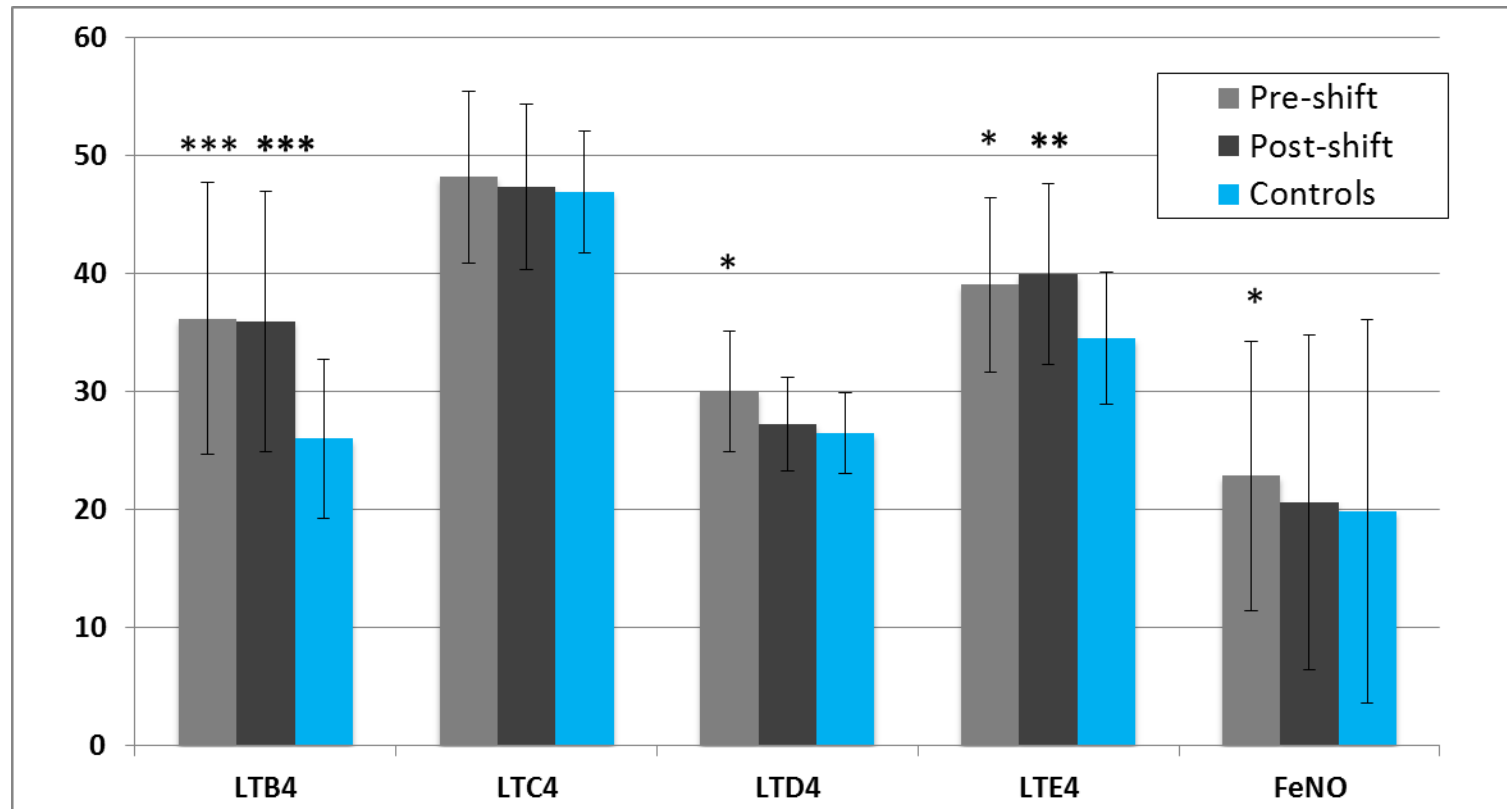


Markery oxidace nukleových kyselin a proteinů *** (p<0,001) ** (p<0,01) * (p<0,05)



Markery zánětu

*** (p<0,001) ** (p<0,01) * (p<0,05)



Assessing the first wave of epidemiological studies of nanomaterial workers.

Liou SH¹, Tsai CS², Pelclova D³, Schubauer-Berigan MK⁴, Schulte PA⁴.

Author information

¹National Institute of Environmental Health Sciences, National Health Research Institutes, 35 Keyan Road, Zhunan, Miaoli County 35053, Taiwan, ROC.

²Department of Environmental and Radiological Health Science, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA.

³Department of Occupational Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic.

⁴National Institute for Occupational Safety and Health, Cincinnati, OH, USA.

- **Nanočástice obsahuje 1 682 spotřebních výrobků**
- Jejich cena na trhu na trhu dosáhne 10^{12} (trillionů) USD
- 6 PUBLIKOVANÝCH STUDIÍ do r. 2015
- JEDNOTLIVÉ LÁTKY: TiO_2 (ČR, Čína), uhlíkové nanotrubičky (Rusko, Korea, Holandsko), oxidy železa (ČR), CaCO_3 (Čína), nano-saze v tonerech, (Japonsko), nanoAg (Korea)
- ***International Agency for Research on Cancer (IARC) klasifikoval TiO_2***
- ***jako „possibly carcinogenic to humans“ (skupina 2B)***

Nejsou nebezpečné krémy s nanoTiO₂?



- 20 min před opalováním
- 2 mg/1 cm² kůže
- TiO₂ částice 60-100 nm



**Nebyl překročen limit EU UV
pro solária 0,3 W/m²**
odpovídá půl dni pobytu na
slunci u Středozemního moře





Expozice



- 6 osob 48 ± 8 let, 3 muži, 3 ženy
- Krém Sebamed ochr. **faktor 50** nanoTiO_2
- na 80 % tělesného povrchu
- 3,5 dne (7-10 aplikací)
- spotřeba krému průměrně 130 g/osobu= tuba
- solárium 2 x 8 min



3 VARIANTY TESTU *s odstupem 6 měsíců*

Den 0 - pátek

1 před

2 po

Den 4 pondělí

před odstraněním

krému *a/nebo*

po 2 UV ozářeních

Den 11 - pondělí

bez krému a UV

- Test 1



- Test 2



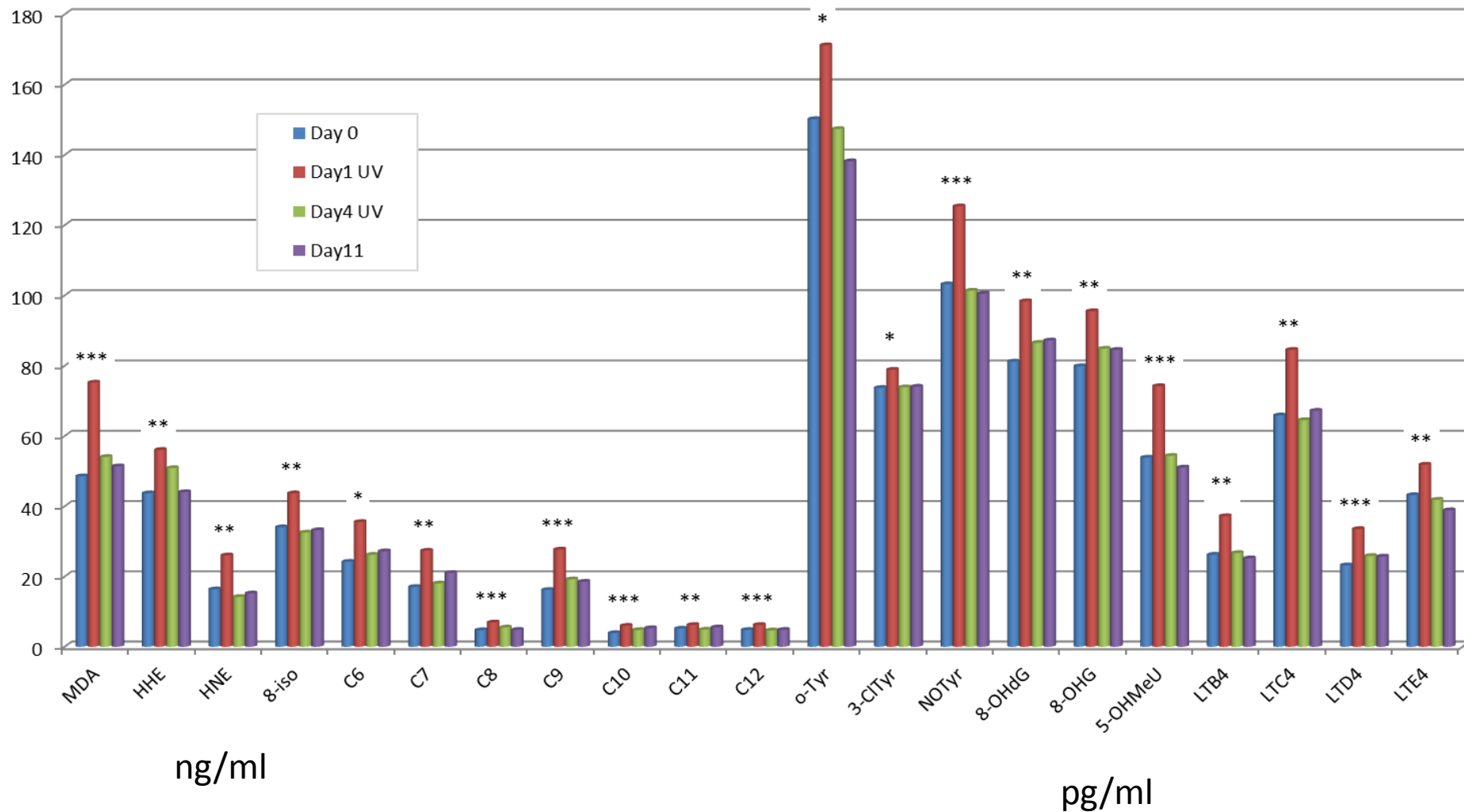
- Test 3





TEST 2: Jen UV – krev

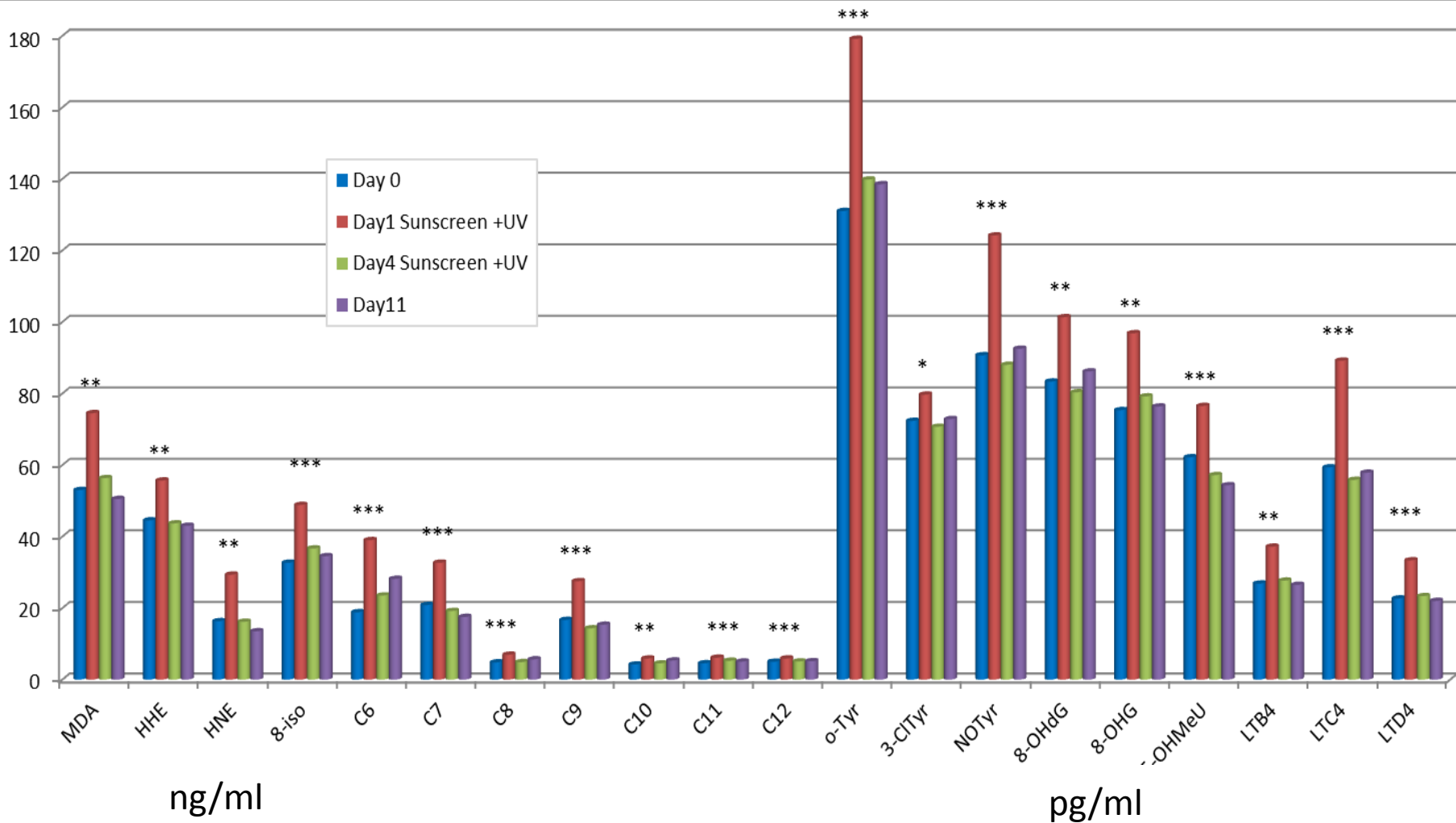
zvýšení ve všech vzorcích
NEPŘÍZNIVÝ ÚČINEK UV ZÁŘENÍ





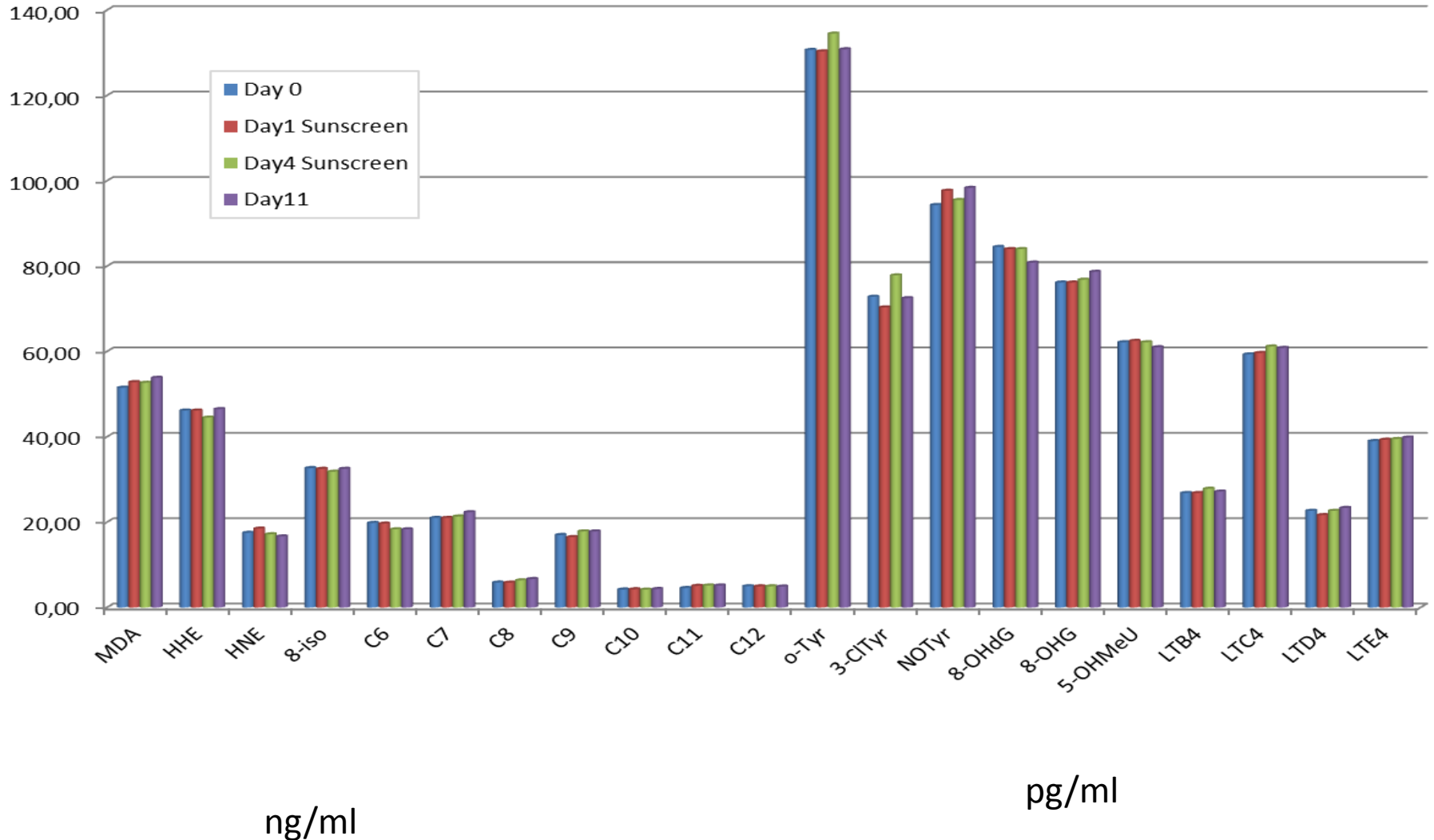
TEST 3: Krémy + UV krev

zvýšení OPĚT ve všech vzorcích
PROTI UV ÚČINKU CHRÁNÍ JEN KŮŽI



TEST 1: Jen krémy – krev

KRÉMŮ SE BÁT NEMUSÍME



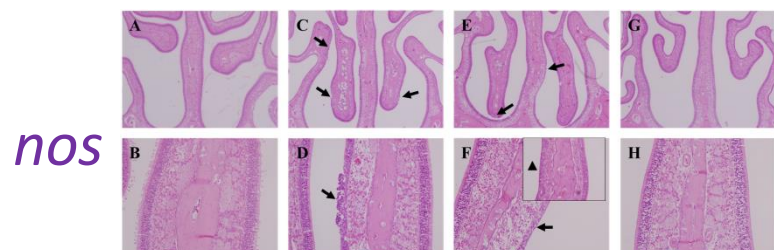
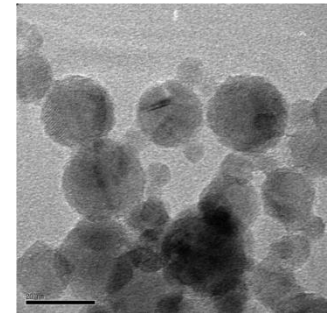
Co to vlastně znamená?

- Markery odrážejí expozici – biologický efekt na úrovni nukleových kyselin, bílkovin, tuků
- Něco se v těle děje – HORŠÍ NEŽ
ZNEČIŠTĚNÍ VENKOVNÍHO OVZDUŠÍ
SO₂, NO₂, CO, včetně polétavého prachu (PM10 μm) – **závažnější jsou částice menších rozměrů**
- Plicní funkce poškození většinou neodhalí

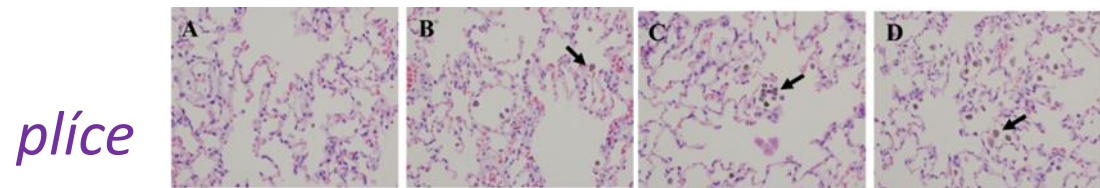
Nasal and Pulmonary Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles in Rats

Soonjin Kwon^{1,2}, Young-Su Yang¹, Hyo-Seon Yang¹, Jinsoo Lee^{1,2}, Min-Sung Kang¹,
Byoung-seok Lee³, Kyuhong Lee¹ and Chang-Woo Song¹

- TiO₂ nanočástice (80 nm) inhalované 2 týdny
- 6 hod 5 dní /týden
- koncentrace 11,4 mg/m³
- zánětlivé změny v dutině nosní
- a v plicích -
- malé částice do 20 nm – emfyzém, porušení sept, nádory plic při inhalaci TiO₂ (IARC 2010)



kontrola *den 1* *den 7* *den 15*

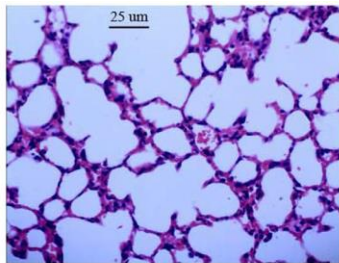


kontrola *den 1* *den 7* *den 15*

Molecular Mechanisms of Nanosized Titanium Dioxide-Induced Pulmonary Injury in Mice

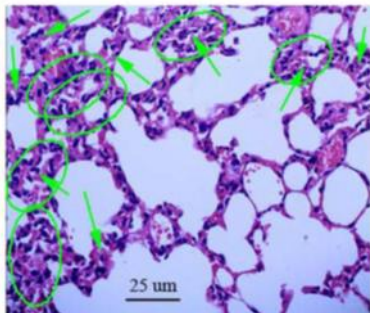
Bing Li^{1,3}, Yuguan Ze^{1,3}, Qingqing Sun^{1,3}, Ting Zhang^{2,3,3}, Xuezi Sang¹, Yaling Cui¹, Xiaochun Wang¹, Suxin Gui¹, Danlin Tan¹, Min Zhu¹, Xiaoyang Zhao¹, Lei Sheng¹, Ling Wang¹, Fashui Hong^{1*}, Meng Tang^{2,3*}

nano-TiO₂ denně 90 dní

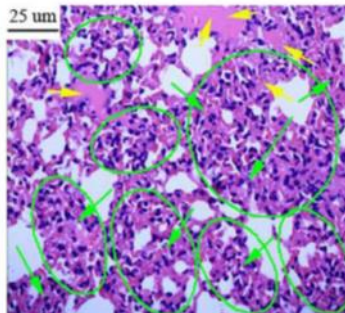


kontrola

- zánět
- edém



2,5 mg/kg



5 mg/kg

Table 3. Oxidative stress in the mouse lung after nasal administration with nano-TiO₂ for 90 consecutive days.

Oxidative stress	TiO ₂ NPs (mg/kg BW)			
	0	2.5	5	10
O ₂ ⁻ (nmol/mg prot. min)	23±1.15a	30.27±1.51b	39.18±1.96c	50±2.50d
H ₂ O ₂ (nmol/mg prot. min)	43±2.15a	61.22±3.06b	78.96±3.95c	110±5.50d
MDA (μmol/mg prot)	1.08±0.05a	1.59±0.08b	2.89±0.15c	5.15±0.26d
Carbonyl (μmol/mg prot)	0.54±0.03a	0.98±0.05b	1.85±0.09c	3.04±0.15d
8-OHdG (mg/g tissue)	0.42±0.02a	2.26±0.11b	4.25±0.21c	7.12±0.36d

Letters indicate significant differences between groups (p<0.05). Values represent means ± SE (N=5).

MDA -malondialdehyd, PC- protein karbonyl, 8-OHdG 8-hydroxy-2-deoxyguanosin

Závěr

- **Existují účinky na člověka?**
- **ANO**
- **ZVÝŠENÍ BĚHEM PRACOVNÍ SMĚNY**
- **ALE VÝZNAMNÉ ZVÝŠENÍ I PŘED SMĚNOU – SVĚDČÍ PRO DÉLETRVAJÍCÍ ÚČINEK - může trvat měsíce i roky**
- **Zvýšení i u jiných nemocí –**
- **Alzheimerovy nemoci, aterosklerózy, hypertenze, diabetu II. typu, s vyšším věkem, karcinomu plic (Fuchs 2010, Yang et al. 2013)**
- **Jsou trvalé?** Do určité doby jsou nejspíše vratné, ale nevíme, jak dlouho přetrvávají

Co dál?

- Podobné nálezy u nano aerosolu laserových tiskáren a kopírek u zdravých dobrovolníků (Khatri 2012, Martin 2015, Pirella 2015)
- Obdoba s karcinogenními prachy azbestu a SiO_2
 - (Lehtonen et al. 2007, Pelclova et al. 2007, Pelclova et al. 2008)
- **Většinu spolupracovníků odradíme svými výsledky**
- Další plán: výzkumníci s nanoCuO
- květen 2017

Děkuji spolupracovníkům

*Klinika pracovního lékařství VFN a 1. LF UK
Ústav chemických procesů AV ČR, v. v. i.,
Vysoká škola chemicko-technologická
Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i. ,
Technická Univerzita v Liberci
Nanotechnology Centre, Vysoká škola báňská, Ostrava,
University of Torino, Italy
University of Massachusetts in Lowell, USA
Všem myším a potkanům*

