

Anna Maria Świdwińska-Gajewska
Sławomir Czerczak

FULERENY – CHARAKTERYSTYKA SUBSTANCJI, DZIAŁANIE BIOLOGICZNE I DOPUSZCZALNE POZIOMY NARAŻENIA ZAWODOWEGO

FULLERENES: CHARACTERISTICS OF THE SUBSTANCE, BIOLOGICAL EFFECTS AND OCCUPATIONAL EXPOSURE LEVELS

Institut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera / Nofer Institute of Occupational Medicine, Łódź, Poland
Zakład Bezpieczeństwa Chemicznego / Department of Chemical Safety

STRESZCZENIE

Fulereny są cząsteczkami złożonymi z parzystej liczby atomów węgla o sferycznej, kulistej lub elipsoidalnej, zamkniętej strukturze przestrzennej. Najbardziej popularnym fulerem jest cząsteczka C_{60} o kulistej budowie – ściętego dwudziestościanu foremnego, przypominającego piłkę nożną. Fulereny znajdują szerokie zastosowanie przede wszystkim w diagnostyce i medycynie, ale również w przemyśle elektronicznym i energetycznym. Narażenie zawodowe na fuleren może wystąpić głównie przy jego produkcji. Stężenia w środowisku pracy fulerenów, opisane w literaturze, wynosiły 0,12–1,2 μm^3 dla frakcji nanocząstek (< 100 nm), co może świadczyć o niewielkim narażeniu. Fuleren jednak w dużej części aglomeruje do większych cząstek. Wchłanianie fulerenu drogą pokarmową i oddechową jest niewielkie oraz nie jest on absorbowany przez skórę. Po podaniu dożylnym fuleren może kumulować się w wątrobie oraz w mniejszym stopniu w śledzionie lub nerkach. Nie obserwowano działania fulerenu drażniącego ani uczulającego na skórę w badaniach na zwierzętach, jedynie słabe działanie drażniące na oczy. W badaniach inhalacyjnych na gryzoniach fuleren wywoływał przejściowe zmiany zapalne w płucach. Narażenie drogą pokarmową nie wywoływało większych negatywnych skutków. Fuleren nie wykazywał działania mutagennego ani genotoksycznego w badaniach eksperymentalnych. Nie ma opublikowanych danych dotyczących rakotwórczego działania nanocząstek fulerenu u ludzi i zwierząt. Istnieją natomiast doniesienia o możliwym szkodliwym wpływie fulerenu na płód u myszy po podaniu dootrzewnowym lub dożylnym. Fuleren w czystej postaci charakteryzuje się słabym wchłanianiem i niską toksycznością oraz nie stanowi zagrożenia w środowisku pracy. Autorzy niniejszej pracy stoją na stanowisku, że nie ma podstaw do wyznaczenia najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) fulerenu C_{60} w niezmodyfikowanej formie. Pochodne fulerenów, z uwagi na odmienne właściwości, wymagają osobnej analizy pod względem szacowania ryzyka zawodowego. Med. Pr. 2016;67(3):397–410

Słowa kluczowe: nanocząstki, narażenie zawodowe, najwyższe dopuszczalne stężenie, nanomateriały, wartości dopuszczalnych stężeń, fuleren

ABSTRACT

Fullerenes are molecules composed of an even number of carbon atoms of a spherical or an ellipsoidal, closed spatial structure. The most common fullerene is the C_{60} molecule with a spherical structure – a truncated icosahedron, compared to a football. Fullerenes are widely used in the diagnostics and medicine, but also in the electronics and energy industry. Occupational exposure to fullerene may occur during its production. The occupational concentrations of fullerenes reached 0.12–1.2 μm^3 for nanoparticles fraction (< 100 nm), which may evidence low exposure levels. However, fullerene mostly agglomerates into larger particles. Absorption of fullerene by oral and respiratory routes is low, and it is not absorbed by skin. After intravenous administration, fullerene accumulates mainly in the liver but also in the spleen and the kidneys. In animal experiments there was no irritation or skin sensitization caused by fullerene, and only mild irritation to the eyes. Fullerene induced transient inflammation in the lungs in inhalation studies in rodents. Oral exposure does not lead to major adverse effects. Fullerene was not mutagenic, genotoxic or carcinogenic in experimental research. However, fullerene may cause harmful effects on the mice fetus when administered intraperitoneally or intravenously. Pristine C_{60} fullerene is characterized by poor absorption and low toxicity, and it does not pose a risk in the occupational environment. The authors of this study are of the opinion that there is no ground for estimating the maximum allowable concentration (NDS) of pristine fullerene C_{60} . Fullerene derivatives, due to different characteristics, require separate analysis in terms of occupational risk assessment. Med Pr 2016;67(3):397–410

Key words: nanoparticles, occupational exposure, occupational exposure limit, nanomaterials, occupational exposure level, fullerene

Autorka do korespondencji / Corresponding author: Anna Maria Świdwińska-Gajewska,
Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera, Zakład Bezpieczeństwa Chemicznego, ul. św. Teresy 8, 91-348 Łódź,
e-mail: answid@imp.lodz.pl
Nadesłano: 12 sierpnia 2015, zatwierdzono: 25 listopada 2015

WSTĘP

Fulereny – historia, rodzaje, występowanie

Fulereny są cząsteczkami złożonymi z parzystej liczby atomów węgla o sferycznej, kulistej lub elipsoidalnej, zamkniętej strukturze przestrzennej. Ich nazwa pochodzi od nazwiska amerykańskiego architekta Richarda Buckminstera Fullera, konstruktora „kopuł geodezyjnych” – sklepień złożonych z wielościanów, odwzorowujących powierzchnię kuli [1]. Najbardziej popularnym fulerenem jest cząsteczka C_{60} o kulistej budowie – ściętego dwudziestościanu foremego, przypominającego piłkę nożną. Termin ‘fuleren’ bez określonej liczby atomów węgla w cząsteczce odnosi się do wyżej opisanej cząsteczki C_{60} . Inne fulereny mogą składać się z 28–1500 atomów węgla i być jednowarstwowe (fulereny właściwe) lub wielowarstwowe (nanocebulki). Specyficznym typem fulerenów są nanorurki węglowe.

Fulereny mogą być modyfikowane i pod tym względem można je podzielić na [1]:

- egzohedralne – modyfikowane powierzchniowo,
- endohedralne – zawierające wewnątrz inne atomy lub cząsteczki,
- heterofulereny – cząsteczki, w których 1 lub więcej atomów węgla zastąpiono innym atomem.

Do odkrycia fulerenów przyczynił się Harold Kroto w trakcie badań przemian związków węgla zachodzących w okolicach wygasłych gwiazd [2]. Wraz z zespołem badaczy z Uniwersytetu Rice, którzy opracowali metodę syntezy związków organicznych z użyciem naświetlania promieniami lasera tarczy grafitowej, w 1985 r. otrzymał i opisał strukturę fulerenu C_{60} , za co 11 lat później otrzymał nagrodę Nobla [2].

Fulereny naturalnie występują w niewielkich ilościach w sady węglowej, a także w minerałach takich jak szungit.

Właściwości fizykochemiczne i klasyfikacja fulerenu C_{60}

Właściwości fizykochemiczne i klasyfikacja fulerenu są następujące [3]:

- wzór sumaryczny – C_{60} ,
- nazwa – fuleren,
- numer w rejestrze CAS – 99685-96-8,
- postać, wygląd – kryształy barwy od ciemnoszarej do czarnej,
- masa cząsteczkowa – 720,64 g/mol,
- temperatura topnienia – $> 280^{\circ}\text{C}$,
- gęstość – $1,65 \text{ g/cm}^3$ w 20°C ,

- rozpuszczalność w wodzie – substancja nierozpuszczalna,
- rozpuszczalność – rozpuszcza się w benzenie, toluenie i tetrachlorku węgla,
- temperatura zapłonu – $> 94^{\circ}\text{C}$,
- rozmiar i kształt cząstek – kuliste ścięte dwudziestościany o średnicy ok. 0,7 nm,
- klasyfikacja – brak klasyfikacji urzędowej.

Fuleren C_{60} nie znajduje się w wykazach substancji stwarzających zagrożenie, zamieszczonych w załączniku VI do Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 127/2008 (CLP) [4]. Fuleren został jednak zaklasyfikowany przez rejestrujących (w ramach rozporządzenia REACH) ze względu na działanie na zdrowie człowieka jako substancja działająca drażniąco na oczy, a także mogąca powodować podrażnienie dróg oddechowych w następstwie jednorazowego narażenia [5].

METODY PRZEGLĄDU

Przeładow piśmiennictwa dokonano w bazach internetowych naukowych czasopism recenzowanych, m.in. EBSCO Discovery Service™ (EDS), stosując słowa kluczowe: fullerene, toxicity i occupational exposure. W przygotowaniu niniejszego opracowania wykorzystano prace dotyczące zastosowania fulerenów i ich pochodnych, narażenia zawodowego na fuleren C_{60} , a także jego działania biologicznego i dopuszczalnych poziomów narażenia.

WYNIKI PRZEGLĄDU

Zastosowanie fulerenów i ich pochodnych

Fulereny znajdują coraz szersze zastosowanie przede wszystkim w diagnostyce i medycynie, a także w przemyśle elektronicznym i energetycznym. Wykazują potencjalne działanie przeciwwirusowe, m.in. jako inhibitory asparaginowych proteaz wirusa niedoboru odporności (human immunodeficiency virus – HIV), wpasowując się w centrum aktywne enzymu i oddziałując z nim siłami van der Waalsa. Ponadto fulereny wykazują duży potencjał antyoksydacyjny. Już 1 cząsteczka może zneutralizować ponad 20 wolnych rodników. Właściwości przeciwutleniające są spowodowane dużą liczbą sprzężonych wiązań podwójnych i nisko leżącym niezapełnionym orbitalem molekularnym, mogącym przyjąć elektron. Daje to szanse przeciwdziałania stresowi oksydacyjnemu i oksydacyjnym uszkodzeniom komórek [6,7]. Fulereny i ich pochodne rozpuszczalne w wodzie mogą być stosowane jako czyn-

niki ochronne przeciw promieniowaniu w radioterapiach. Zapobiegają one uszkodzeniom DNA wywołanym przez promieniowanie jonizacyjne [8].

Badacze pracują nad możliwością wykorzystania fulerenów jako czynników chroniących komórki nerwowe przed nadmiarem wolnych rodników w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona czy stwardnienie zanikowe boczne. Fulereeny mogą też zapobiegać apoptozie komórek. Trwają badania nad ich potencjalnym zastosowaniem w innych schorzeniach, m.in. miażdżycy czy osteoporozie. Fulereeny mogą także chronić komórki przed szkodliwym działaniem promieniowania UVA. Stanowią również obiekt badań w fotochemioterapii, w szczególności w leczeniu raka skóry, dzięki możliwości rozcinania łańcucha oligonukleotydowego po wzbudzeniu fotonowym, które prowadzi do przekształcenia molekularnego tlenu we wzbudzony stan singletowy 1O_2 . Zdaniem niektórych badaczy fulereeny mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce jako środki kontrastowe. Istnieje także możliwość wykorzystania tych cząstek, interesujących pod względem budowy i funkcji, jako potencjalnych przekazywaczy leków czy nośników genów [6,7].

Fulereeny mogą pełnić rolę katalityczną poprzez przyjmowanie i przekazywanie atomów wodoru w reakcjach uwodorniania i hydrodealkilacji. Dzięki tym właściwościom potencjalnie umożliwiają przemianę metanu w wyższe węglowodory i hamują reakcje koksowania. Związki obecne w sadzy fulereneowej mogą także zwiększyć wydajność paliw. Reakcje fulerenu z udziałem tlenu singletowego mogłyby znaleźć zastosowanie w procesach uzdatniania wody i ochronie przed zagrożeniami biologicznymi [9].

Fulereeny charakteryzują się wyjątkowo niską energią transferu elektronów. Wpływa to na atrakcyjność tych cząstek jako akceptorów elektronów w elektronice organicznej. Mogą być one wykorzystywane w warstwach donorowo-akceptorowych w ogniwach fotowoltaicznych [3].

Fulereeny znajdują coraz szersze zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu, jednak autorzy niniejszego artykułu nie dotarli do danych dotyczących produkcji i stosowania fulerenów w Polsce. Informacje na temat narażenia zawodowego zostały opracowane na podstawie literatury światowej.

Narażenie zawodowe na fuleren

Narażenie zawodowe na fuleren może wystąpić przede wszystkim przy jego produkcji. W zakładzie, w którym wytwarzano fuleren, przeprowadzono pomiary nara-

żenia inhalacyjnego przy użyciu systemu analizy wymiarowej cząstek SMPS (scanning mobility particle sizer) i optycznego licznika cząstek określającego rozkład wielkości cząstek o średnicy 10–5000 nm [10]. Cząstki były obrazowane skaningowym mikroskopem elektronowym. Porównywano wyniki pomiarów wykonywanych w czasie pracy (w trakcie procesu mieszania, wewnątrz pomieszczeń) i podczas przerw (wewnątrz pomieszczeń, tło bliskie) oraz w powietrzu zewnętrznym, w niedużej odległości od źródła emisji (tło dalekie).

Na stanowiskach pracy w czasie przerw zmierzono cząstki o średnicy wynoszącej średnio 25 nm, które najprawdopodobniej były emitowane z zewnątrz. W trakcie procesów przenoszenia fulerenu z pojemników do miejsc ważenia i mieszania nie zaobserwowano wyraźnego wzrostu cząstek o średnicy mniejszej niż 50 nm, a jedynie wzrost stężenia większych cząstek. Badania przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego potwierdziły, że w czasie procesów związanych z transportem fulerenu zwiększa się liczba cząstek tej substancji w powietrzu środowiska pracy, jednak cząstki te tworzą aglomeraty [10].

Johnson i wsp. szacowali zawodowe narażenie na fuleren na stanowiskach laboratoryjnych podczas takich czynności jak ważenie, przenoszenie próbek i sonikacja [11]. Na pierwszym stanowisku (A) odważano 4–200 mg fulerenu i przenoszono go do zlewki z wodą, a następnie mieszano roztwór na mieszadle magnetycznym bez wentylacji miejscowej. Na drugim stanowisku (B) wykonywano sonikację próbek w niewentylowanym zamkniętym urządzeniu. Pracownicy byli zaopatrzeni w elementy ochrony osobistej, takie jak fartuch bawełniany, rękawice lateksowe i ochrona dróg oddechowych z filtrem N95.

Cząstki w powietrzu środowiska pracy mierzono za pomocą 2 aparatów – ręcznego licznika cząstek (hand-held particle counter) o symbolu HHPC-6 do mierzenia cząstek wielkości 300 nm – 10 μ m i kondensacyjnego licznika cząstek (condensation particle counter – CPC) mierzącego cząstki o wielkości 10–1000 nm [11]. Pomiary przeprowadzono przed wykonywaniem czynności w miejscu badania (tło bliskie) i w 2 miejscach oddalonych od badania (tło dalekie) oraz uśredniono wartości tła. Miejsce pomiaru wybrano w taki sposób, żeby uzyskać jak najwyższe stężenia, umieszczając aparat pomiarowy możliwie najbliżej źródła cząstek. Nanocząstki identyfikowano za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (transmission electron microscopy – TEM). Obrazowanie TEM przeprowadzono w celu zweryfikowania uwalnianych cząstek. Próbkę

pobierano podczas procesów w miejscach blisko źródła uwalniania cząstek, poza strefą oddychania pracowników. Próbkę tła zawierały amorficzne cząstki pochodzące z innych źródeł, niezwiązanych z badanymi procesami. Na obrazie mikroskopowym uwidoczniło aglomeraty cząstek fulerenu, większe w przypadku procesu A, mniejsze w procesie B [11].

Wszystkie wyniki pomniejszono o uśrednioną wartość tła. Wyniki pomiarów przeprowadzonych z użyciem HHCP dla cząstek wielkości 300 nm, 500 nm i 1000 nm wyniosły odpowiednio:

- na stanowisku laboratoryjnym A – 53 111 cząstek/l, 3884 cząstek/l i 162 cząstek/l,
- na stanowisku laboratoryjnym B – 23 856 cząstek/l, 6501 cząstek/l i 891 cząstek/l.

Z kolei wyniki pomiarów wykonanych z użyciem CPC dla cząstek z zakresu 10–1000 nm wyniosły 1476 cząstek/cm³ na stanowisku A i 2176 cząstek/cm³ na stanowisku B. Wyniki pomiarów, po uwzględnieniu wartości uzyskanych dla tła, wyraźnie wskazują na zwiększone stężenie cząstek w powietrzu środowiska pracy podczas wykonywania badanych czynności. Wielkość stężeń uwolnionych cząstek jest odwrotnie proporcjonalna do ich średnicy. Najwyższe wartości stężeń odnotowano dla cząstek 300 nm.

Johnson i wsp. zaobserwowali pewne różnice w uwalnianiu cząstek w obu badanych procesach [11]. Na skutek sonikacji do powietrza uwolniło się o połowę mniej cząstek w rozmiarze 300 nm niż w wyniku ważenia/przesypywania, podczas gdy w przypadku większych aglomeratów więcej obserwowano ich po procesie sonikacji. Stężenia cząstek fulerenu mierzonych CPC (w zakresie 10–1000 nm) osiągały wyższe wartości również w przypadku sonikacji w porównaniu z procesem ważenia/przesypywania [11].

Ogura i wsp. przeprowadzili badania pylistości nanomateriałów. Pomiar przeprowadzono podczas wstrząsania probówką zawierającą ok. 1 cm³ fulerenu. Przy przepływie powietrza 5 dm³/min emisja cząstek fulerenu na minutę wynosiła 73 µg/g. Dla poszczególnych frakcji cząstek wartości emisji kształtowały się następująco: 1,4×10⁻⁹ mg/g/min (10–100 nm); 2,9×10⁻⁴ mg/g/min (100–1000 nm); 6,3×10⁻² mg/g/min (1–10 µm) i 9,1×10⁻³ mg/g/min (> 10 µm) [12].

Na podstawie powyżej cytowanego badania pylistości [12] Shinohara i wsp. [13] oszacowali potencjalne narażenie na fuleren podczas pracy (wstrząsanie 1,5 g przez 1 min co 10 min). Średnia ważona w czasie 8-godzinnego dnia pracy wyniosła 9,4×10⁻⁸ µg/m³ dla nanocząstek (10–100 nm). Analogiczne wartości osza-

cowane dla większych cząstek to 0,02 µg/m³ (dla cząstek 100–1000 nm) i 4,2 µg/m³ (dla cząstek 1–10 µm). Narażenie na nanocząstki podczas stosowania fulerenu jest uważane za niskie [13].

W danych zebranych przez Shinohara i wsp. [13] najwyższe stężenia w środowisku pracy fulerenów sięgały 0,12–1,2 µg/m³ dla frakcji nanocząstek (< 100 nm), 1,2 µg/m³ dla cząstek o frakcji 100–2000 nm oraz 60 µg/m³ dla frakcji cząstek o średnicy większej niż 2000 nm. Autorzy cytowanej publikacji oszacowali narażenie zawodowe na fuleren w procesach jego produkcji jako niewielkie. Wzrost stężenia fulerenu obserwowano przy opróżnianiu substancji z reaktora, podczas pakowania substancji i czyszczenia reaktora. Fuleren jednak w dużej części aglomeruje do większych cząstek, a frakcja nanocząstek stanowi niewielką część uwolnionego fulerenu [13].

Toksykokinetyka fulerenu i jego pochodnych

Wchłanianie i rozmieszczenie fulerenu w dużym stopniu zależy od drogi narażenia. U zwierząt eksponowanych inhalacyjnie, fuleren był wykrywany głównie w różnych odcinkach układu oddechowego [14]. Z odcinka tchawiczo-oskrzelowego nanocząstki usuwane były wraz ze śluzem poprzez ruchy rzęsek nabłonka migawkowego. Cząstki, które dotarły do płuc, uległy fagocytozie przez makrofagi pęcherzykowe. Fuleren po podaniu dożołądkowym w niewielkim stopniu wchłaniał się z przewodu pokarmowego, większość podanej dawki była wydalana z kałem. Nie zaobserwowano wchłaniania przez skórę [14].

Naota i wsp. podawali myszom dotchawiczo zawierającą cząstki fulerenu (0,7 nm) w dawce 25 mg/kg m.c. lub 40 mg/kg m.c. i obserwowali zwierzęta w czasie do 7 dni od ustania narażenia [14]. Badacze opisali translokację fulerenu z płuc do krwiobiegu. Dzięki zastosowaniu mikroskopii świetlnej udało się zaobserwować agregaty cząstek fulerenu w świetle naczyń włosowatych i węzłach chłonnych płuc bezpośrednio po podaniu cząstek. Ponadto badanie z użyciem mikroskopu elektronowego ujawniło zwiększoną liczbę pęcherzyków pinocytotycznych i kaweoli w pneumocytach typu I. Wyniki badań sugerują, że cząstki fulerenu mogą pokonywać barierę powietrze–krew w wyniku dyfuzji i pinocytozy [15].

Gao i wsp. narażali szczury inhalacyjnie, dotchawiczo i dożylnie, oceniając rozmieszczenie fulerenów w tkankach [16]. Zwierzęta inhalowano przez 6 godz. cząstkami fulerenu o średnicy 20 nm, w stężeniu 1 mg/m³. W ciągu 7 dni po ekspozycji nie zaobser-

wowano obecności fulerenu w wątrobie ani śledzionie, a jego śladowe ilości stwierdzono jedynie w nerkach. Ponadto odnotowano słaby klirens płucny – okres półtrwania fulerenu wyniósł 22 dni. Podobne rezultaty uzyskano także po podaniu dotchawiczym fulerenu w ilości 1 mg/kg m.c. lub 5 mg/kg m.c. (obserwacja do 7 dni). Z kolei po podaniu dożylnym (10 mg/kg m.c.) dużą część dawki fulerenu wykryto w wątrobie oraz, w mniejszej ilości, w śledzionie i płucach. We krwi po 2 godz. od podania odnotowano jedynie śladowe ilości fulerenu [16].

Fujita i wsp. opisali eksperyment inhalacyjny na szczurach, w którym zwierzęta narażano przez 4 tygodnie, 6 godz./dzień, 5 dni/tydzień na cząstki fulerenu (96 nm) o stężeniu 0,12 mg/m³ (4,1×10⁴ cząstek/cm³) [17]. Po 3 dniach od ustania narażenia cząstki fulerenu wykryto w komórkach nabłonka wyściełającego pęcherzyki płucne. Po upływie kolejnych 3 dni do miesiąca obserwowano proces fagocytozy cząstek przez makrofagi pęcherzykowe [17]. Shinohara i wsp. przeprowadzili eksperyment na szczurach w celu oszacowania wskaźnika klirensu płucnego i depozycji cząstek C₆₀ w płucach, wątrobie i mózgu [18]. Zwierzęta w warunkach podobnych jak w wyżej opisanym eksperymencie [17] inhalowano aerozolem zawierającym cząstki fulerenu (96 nm). Szczury narażano także dotchawiczo na roztwór cząstek fulerenu (~30 nm) w stężeniu 0,33–3,3 mg/kg m.c. Zwierzęta badano 1 godz. i 6 miesięcy od ustania narażenia. Ilość cząstek fulerenu zdeponowanych w płucach zmniejszała się wraz z upływem czasu i była zależna od podanej dawki. Zawartość fulerenu w mózgu i wątrobie była poniżej oznaczalności metody, tzn. 8,9 ng/g tkanki. Okres półtrwania C₆₀ po podaniu dotchawiczym wyniósł 15–28 dni [18].

Fuleren słabo wchłania się z przewodu pokarmowego. W badaniu, w którym szczurom drogą pokarmową podano znakowaną trimetylenometanową pochodną fulerenu, rozpuszczalną w wodzie, zaobserwowano po 3 i 6 godz. w wątrobie i innych narządach jedynie śladowe ilości badanej substancji [19]. Po 48 godz. wraz z kałem zostało wydalone 97% podanej dawki pochodnej fulerenu. Niewielkie ilości wykryto również w moczach narażanych szczurów.

W innym badaniu szczurom rasy Wistar podano przez zgłębnik jednorazowo roztwór fulerenu w oliwie z oliwek w dawce 4 mg/kg m.c. [20]. Następnie pobierano krew w różnych odstępach czasowych – po upływie od 15 min do 48 godz. Mocz zbierano po 24 i 48 godz. Maksymalne stężenie fulerenu we krwi (0,52±0,16 µg/ml) odnotowano po 8 godz., a półokres wydalania wyniósł 12,6±0,9 godz. [20].

W dalszej części wyżej opisanego eksperymentu jego autorzy (Baati i wsp. [20]) podawali szczurom przez zgłębnik roztwór fulerenu w oliwie z oliwek w dawce 4 mg/kg m.c./dzień przez 7 dni. Narządy do badań (wątroba, śledziona i mózg) pobierano w 1. i 8. dniu trwania eksperymentu. W pierwszym dniu zawartość fulerenu w wątrobie wyniosła 0,14% podanej dawki, a w śledzionie – 0,18%. W ósmym dniu wartości te wzrosły w wątrobie i śledzionie, odpowiednio, do 0,39% i 0,51%. Zawartość fulerenu w mózgu w obu badanych dniach wynosiła poniżej 0,01% podanej dawki [20].

Nie ma opublikowanych dowodów na wchłanianie się fulerenu przez skórę. Xia i wsp. [21] przeprowadzili badania na świniach, którym aplikowano na skórę roztwory fulerenu w różnych rozpuszczalnikach – toluenie, cykloheksanie, chloroformie i oleju mineralnym. Aplikacja trwała 24 godz. i powtarzano ją przez 4 dni. Fuleren rozpuszczony w toluenie, cykloheksanie i chloroformie wnikał głęboko w warstwę rogową naskórka (najgłębiej w przypadku chloroformu). Po nakładaniu roztworu w oleju mineralnym fuleren nie był wykrywany w skórze. Badania prowadzono także *in vitro*, na izolowanej skórze świńskiej. Cząstki fulerenu nie przedostały się przez barierę skóry – nie wykryto ich w roztworze receptorowym po 24 godz. [21].

Brak wchłaniania przez skórę potwierdzają także badania z użyciem pochodnej fulerenu rozpuszczonej w skwalanie (lipofulerenu) [22]. W eksperymencie wykorzystano materiał pochodzący z biopsji skóry ludzkiej, z części brzusznej 2 badanych ochotników. Preparat przedostał się jedynie przez warstwę rogową naskórka, nie pokonując błony podstawnej. Lipofulerenu nie wykryto w warstwie skóry właściwej [22].

Fuleren w organizmie może kumulować się w wątrobie. Znakowany izotopowo fuleren C₆₀ podany dożylnie szczurom został wyeliminowany z układu krwionośnego w przeciągu 1 min [23]. Większość podanej dawki (90–95%) wykryto w wątrobie. Po upływie 5 dni obserwacji fuleren nadal był wykrywany w tym narządzie. Wyniki wskazują, że fuleren nie ulega metabolizmowi na szlaku oksydacyjnym, jak policykliczne węglowodory aromatyczne, ale może długo kumulować się w wątrobie [23].

Podobne wyniki uzyskano, stosując znakowaną pochodną fulerenu, rozpuszczalną w wodzie. Po 1 godz. od podania dożylnego szczurom we krwi pozostało jedynie 1,6% dawki, podczas gdy w wątrobie wykryto 73%. Po 30 godz. znakowaną pochodną fulerenu wykryto również w nerkach i płucach (3,2%), śledzio-

nie (2%), a także śladowe ilości substancji w sercu i mózgu (0,1%) [19].

W innym badaniu znakowany izotopowo fuleren wstrzykiwano dożylnie szczurom i myszom, a następnie prowadzono obserwację w czasie od 1 godz. do 30 dni po aplikacji [24]. Po pierwszej godzinie od podania w krwi obserwowano 4 razy wyższą zawartość fulerenu u szczurów niż u myszy. Radioaktywność we krwi u zwierząt obu gatunków utrzymywała się do 30 dni. W pierwszej dobie z moczem i kałem wydalone zostało < 2% podanej dawki. Najwyższe stężenie radioaktywności odnotowano w wątrobie, a także w płucach i śledzionie [24].

Wchłanianie i rozmieszczenie fulerenu oraz jego pochodnych w zależności od drogi podania, wielkości cząstek i rozpuszczalnika przedstawiono w tabeli 1. W eksperymentach inhalacyjnych na gryzoniach fuleren obecny był głównie w pęcherzykach płucnych [17,18]. Śladowe ilości fulerenu, o wielkości cząstek 20 nm, podawanego w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (phosphate-buffered saline – PBS) wykryto w nerkach [16]. Z kolei translokację do krwiobiegu u myszy zaobserwowano w przypadku podawania dotchawiczego fulerenu w PBS o jeszcze drobniejszych cząstkach (0,7 nm) [15].

Wchłanianie fulerenu można ocenić jako niewielkie – zarówno drogą oddechową, jak i pokarmową. W przypadku podawania dożołądkowego w cytowanych dalej badaniach wchłanianie było uzależnione od zastosowanego rozpuszczalnika fulerenu. Zaobserwowano, że C_{60} rozpuszczony w oliwie z oliwek dotarł do śledziony i wątroby [20], w przeciwieństwie do wodnej zawiesiny, która została wydalona z kałem, bez oznak wchłaniania [19].

Po podaniu dożylnym, niezależnie od rodzaju i nośnika fulerenu, obserwowano kumulację w wątrobie [16,19,23,24]. Mniejszą zawartość fulerenu wykrywano także w innych tkankach, takich jak śledziona, nerki czy płuca [16,19,23,24]. Aplikacja naskórna skutkowała wnikaniem w warstwę rogową naskórka w stopniu zależnym od zastosowanego rozpuszczalnika, jednak bez przenikania do głębszych warstw skóry [21,22]. Z uwagi na słabe wchłanianie substancji drogami narażenia spotykanymi w środowisku pracy fuleren można ocenić jako substancję bezpieczną.

Drażniące i uczulające działanie fulerenów

W eksperymentach na zwierzętach nie wykazano drażniącego ani uczulającego na skórę działania fulerenu [25,26]. Obserwowano jedynie przejściowe ob-

Tabela 1. Wchłanianie oraz rozmieszczenie fulerenu i jego pochodnych w zależności od drogi podania, wielkości cząstek i rozpuszczalnika [15–24]
Table 1. Absorption and distribution of fullerenes depending on the route of administration, particle size and solvent [15–24]

Gatunek / układ badawczy Species / test system	Fuleren Fullerene			Wyniki obserwacji Observation results	Piśmiennictwo Bibliography
	droga podania route of administration	wielkość cząstek particle size [nm]	rozpuszczalnik solvent		
Szczury / Rats	inhalacja / inhalation	20	zawiesina C_{60} w PBS / C_{60} suspension in PBS	słabe wchłanianie; śladowe ilości C_{60} w nerkach, brak w wątrobie i śledzionie / poor absorpton, trace amounts of C_{60} in kidneys, not detected in liver and spleen	16
Szczury / Rats	inhalacja / inhalation	96	zawiesina C_{60} w wodnym roztworze Tween 80 / C_{60} suspension in water solution of Tween 80	obecność C_{60} w płucach (nabłonek pęcherzykowy, makrofagi) / C_{60} found in lungs (alveoli epithelial cells, macrophages)	17
Szczury / Rats	inhalacja / inhalation	96	zawiesina C_{60} w wodnym roztworze Tween 80 / C_{60} suspension in water solution of Tween 80	C_{60} wykryto w płucach, brak w mózgu i wątrobie / C_{60} found in lungs, not detected in brain or liver	18
Myszy / Mice	dotchawiczo / intratracheal	0,7	zawiesina C_{60} w PBS / C_{60} suspension in PBS	translokacja C_{60} z płuc do krwiobiegu / traslocation of C_{60} from lungs to circulation	15
Szczury / Rats	dotchawiczo / intratracheal	20	zawiesina C_{60} w PBS / C_{60} suspension in PBS	śladowe ilości C_{60} w nerkach, brak w wątrobie i śledzionie / trace amounts of C_{60} in kidneys, not detected in liver or spleen	16

Szczury / Rats	dotchawiczo / intratracheal	30	zawiesina C_{60} w wodnym roztworze Tween 80 / C_{60} suspension in water solution of Tween 80	obecność C_{60} w płucach, brak w mózgu i wątrobie / C_{60} found in lungs, not detected in brain or liver	18
Szczury / Rats	dożołądkowo / oral	-	pochodna trimetylenometanowa C_{60} w wodzie / water solution of derivative of C_{60} with trimethylenemethane	brak wchłaniania, wydalanie z kałem / lack of absorption, excretion in feces	19
Szczury / Rats	dożołądkowo / oral	-	roztwór C_{60} w oliwie z oliwek / C_{60} -olive oil solution	C_{60} dotarł do krwiobiegu, wykryty w śledzionie (0,5% dawki) i wątrobie (0,4% dawki), nie wykryto w mózgu / C_{60} reached the circulation, found in spleen (0.5% of dose), in liver (0.4% of dose), not found in brain	20
Szczury / Rats	dożylnie / intravenous	20	zawiesina C_{60} w PBS / C_{60} suspension in PBS	kumulacja C_{60} w wątrobie, mniejsza zawartość w śledzionie i płucach / accumulation of C_{60} in liver, a smaller amount in spleen and lungs	16
Szczury / Rats	dożylnie / intravenous	-	pochodna trimetylenometanowa C_{60} w wodzie / water solution of derivative of C_{60} with trimethylenemethane	najwięcej C_{60} wykryto w wątrobie, mniej w płucach, nerkach i śledzionie / C_{60} found mainly in liver, a smaller amount in lungs, kidneys and spleen	19
Szczury / Rats	dożylnie / intravenous	-	wodna zawiesina $^{14}C_{60}$ / water suspension of $^{14}C_{60}$	kumulacja $^{14}C_{60}$ w wątrobie (90%), znacznie mniej wykryto w śledzionie, płucach i tkance mięśniowej (łącznie 7%) / accumulation of $^{14}C_{60}$ in liver (90%), a smaller amount found in spleen, lungs and muscle tissues (total content 7%)	23
Szczury / Rats	dożylnie / intravenous	-	pochodna C_{60} z jodkiem amoniowym N-dimetylopircydyny w etanolu / C_{60} -N-dimethylpyrrolidine ammonium iodide derivative	wolniejsza eliminacja z krwi pochodnej C_{60} w porównaniu z $^{14}C_{60}$, pochodną C_{60} wykryto głównie w wątrobie (> 50%), mniejszą ilość w płucach, skórze i mięśniach (łącznie 28%) / C_{60} derivative was more slowly eliminated from circulation than $^{14}C_{60}$; C_{60} derivative found mainly in liver (> 50%), a smaller amount in lungs, skin and muscles (total content 28%)	23
Szczury, myszy / Rats, mice	dożylnie / intravenous	-	zawiesina $^{14}C_{60}$ w 5% roztworze PVP w soli fizjologicznej / $^{14}C_{60}$ suspension in 5% PVP solution in saline	C_{60} wykryto głównie w wątrobie, mniejszą ilość w płucach i śledzionie, eliminacja z krwi wolniejsza u szczurów / C_{60} found mainly in liver, a smaller amount in lungs and spleen, slower elimination from circulation in rats	24
Świnia / Pig	na skórę / skin	-	fuleren rozpuszczony w: toluenie, cykloheksanie, chloroformie i oleju mineralnym / C_{60} solution in: toluene, cyclohexane, chloroform and mineral oil	brak wchłaniania przez skórę, stopień wnikiwania fulerenu w warstwę rogową zależy od rozpuszczalnika: najgłębiej wnikął roztwór C_{60} w chloroformie, nie wykryto C_{60} w oleju mineralnym / no skin absorption; the penetration of C_{60} into the stratum corneum depended on the solvent: C_{60} in chloroform permeated the most deeply, C_{60} in mineral oil was not detected	21
Biopsja skóry ludzkiej / Human skin biopsys	na skórę / skin	-	lipofuleren (pochodna fulerenu rozpuszczona w skwalanie) / lipofulere (C_{60} derivative solved in squalane)	lipofuleren przeniknął przez warstwę rogową naskórka, ale nie dotarł do skóry właściwej / lipofullerene permeated into the stratum corneum of the epidermis, not detected in the dermis	22

PBS – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej / phosphate-buffered saline, Tween 80 – monooleinian polioksyetylenosorbitolu / polyoxyethylene sorbitan monooleate, PVP – poliwinylpirolidon / polyvinylpyrrolidone.

jawy podrażnienia oczu [25,26]. Ema i wsp. przeprowadzili badania działania drażniącego fulerenu C_{60} na skórę i oczy na królikach zgodnie z testem OECD 404 i 405 (Organisation for Economic Co-operation and Development – Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju) oraz badanie działania uczulającego na skórę na świnkach morskich zgodnie z testem OECD 406 [25]. W teście skórnym na działanie drażniące substancję nakładano w ilości 50 mg, w teście na działanie uczulające – 40 mg, a w teście na działanie drażniące na oczy – 100 mg. Fuleren nie wykazywał działania drażniącego na skórę ani nie odnotowano objawów działania uczulającego na skórę. Zaobserwowano natomiast zaczerwienienie spojówek i przekrwienie tkanek po 1 godz. od zaaplikowania fulerenu do oczu. Zmiany te jednak ustępowały w przeciągu 24 godz. [25].

Podobne wyniki uzyskali Aoshima i wsp. [26] dla mieszaniny fulerenów C_{60} i C_{70} . Badania działania drażniącego na skórę i oczy prowadzono na królikach, a badania działania uczulającego i fotouczulającego na skórę – na świnkach morskich. Nie zaobserwowano objawów działania drażniącego ani uczulającego na skórę u zwierząt, także po napromienianiu światłem UV. Brak działania uczulającego na skórę został potwierdzony również w teście płatkowym przeprowadzonym na ochotnikach. Jedynie w teście na działanie drażniące na oczy fuleren wykazywał słabe działanie, objawiające się zaczerwienieniem spojówek i uszkodzeniami nabłonka rogówki, które ustępowały po 48 godz. [26].

Toksyczne działanie fulerenu na zwierzęta

W badaniach inhalacyjnych na gryzoniach (głównie szczurach) fuleren wywoływał przejściowe zmiany zapalne w płucach [27–31]. Stan zapalny objawiał się wzrostem stężenia białek prozapalnych w popłuczykach oskrzelowo-pęcherzykowych (broncho-alveolar lavage fluid – BALF). Badania histopatologiczne ujawniły także powstawanie nacieku komórek zapalnych w płucach, rozrost komórek czy zwłóknienia kolagenowe ścian pęcherzyków, jednak zmiany te ustępowały po miesiącu od ustania narażenia [27–31]. Narażenie drogą pokarmową nie wywoływało większych negatywnych skutków [32,33].

Droga inhalacyjna

Samce szczurów rasy Fisher 344 narażano inhalacyjnie (przez nos) na fuleren w 2 frakcjach: nanocząstki (55 nm) i mikrocząstki (0,93 μm) na aerozol w stężeniu, odpowiednio: 2,22 mg/m^3 lub 2,35 mg/m^3 [27].

Zwierzęta narażano 3 godz. dziennie przez 10 kolejnych dni. Nie zaobserwowano żadnych większych zmian mikroskopowych w narządach u narażanych szczurów. Badania biochemiczne i hematologiczne wykazywały niewielkie, choć istotne statystycznie, różnice między grupami narażonymi a kontrolnymi (obniżenie liczby czerwonych krwinek i poziomu hemoglobiny). Zmianie uległy parametry BALF – u szczurów narażanych na nanocząstki fulerenu znacznie zwiększyło się stężenie białek. Makrofagi pochodzące z BALF obu narażanych grup szczurów zawierały brązowy pigment zidentyfikowany jako fuleren, przy czym złogi C_{60} były większe u szczurów narażanych na nanocząstki w porównaniu ze szczurami eksponowanymi na mikrocząstki. Półokres trwania fulerenu w płucach wyniósł 26 dni w grupie narażanej na nanocząstki i 29 dni narażanej na mikrocząstki [27].

Grupa japońskich badaczy [28,29] narażała szczury rasy Wistar inhalacyjnie na aglomeraty fulerenu (96 nm) w stężeniu 0,12 mg/m^3 przez 4 tygodnie (6 godz./dzień, 5 dni/tydzień). Równoległe prowadzono eksperymenty na szczurach, którym podawano dotchawiczo dyspersję fulerenu (33 nm) w dawkach: 0,33 mg/kg m.c., 0,66 mg/kg m.c. lub 3,3 mg/kg m.c. Szczury z obu eksperymentów obserwowano do 3 miesięcy od ustania narażenia.

W pierwszej cytowanej pracy [28] badacze oceniali zwierzęta pod kątem odpowiedzi zapalnej – badając BALF i ekspresję genów chemoatraktantów neutrofilii indukowanych przez cytokiny (cytokine-induced neutrophil chemoattractants – CINC). W badaniach inhalacyjnych nie zaobserwowano objawów stanu zapalnego (zwiększenie stężenia białek w BALF ani CINC). Po podaniu dotchawiczym natomiast u szczurów, które otrzymały najwyższą dawkę, wystąpiło przejściowe, ale znaczące zwiększenie liczby neutrofilii w BALF oraz ekspresji CINC-1, CINC-2ab i CINC-3 w płucach. Wyniki wskazują na słabe potencjalne działanie prozapalne fulerenu na płuca [28].

W kolejnej pracy [29] oceniano zmiany u narażanych szczurów histopatologicznie metodą punktową (point counting method – PCM). Podczas prowadzonych badań nie odnotowano żadnego przypadku nowotworów ani ziarniaków. U szczurów narażanych inhalacyjnie zaobserwowano znaczące, ale przejściowe zmiany w płucach (naciek komórek zapalnych, rozrost komórek nabłonka płuc, zwłóknienia kolagenowe w ścianach pęcherzyków płucnych) obecne 3 dni po zakończeniu narażenia i niezauważalne po upływie miesiąca. Podobnie u szczurów, którym fuleren

podawano dotchawiczo – u zwierząt, które otrzymały najwyższą dawkę, wystąpił wzrost obszarów zapalnych, widoczny jedynie w przeciągu 1 tygodnia po narażeniu. Obserwacje te potwierdziły przejściowy charakter zmian zapalnych powstających w wyniku narażenia na fuleren [29].

W badaniu innych autorów nanocząstki podawano dotchawiczo szczurom samcom w dawce jednorazowej (0,5 mg/kg m.c. lub 2,5 mg/kg m.c.) albo powtarzanej (0,5 mg/kg m.c. raz w tygodniu przez 5 tygodni) [30]. Następnie badano płuca narażanych szczurów po 3 godz. lub 24 godz. od podania jednorazowego lub 3 godz. od podania wielokrotnego. Zaobserwowano odpowiedź zapalną w płucach pochodzących od zwierząt obserwowanych przez 24 godz. po jednokrotnym narażeniu na fuleren w dawce 2,5 mg/kg m.c. i po narażeniu powtarzanym. Na podstawie badań histopatologicznych stwierdzono niewielkie zmiany w postaci krwawień pęcherzykowych i nacieków zapalnych makrofagów oraz neutrofilii w pęcherzykach płucnych [30].

Fuleren wywoływał odpowiedź zapalną także u myszy. Park i wsp. [31] narażali myszy rasy ICR dotchawiczo na wodną zawiesinę fulerenu w dawkach 0,5 mg/kg m.c., 1 mg/kg m.c. i 2 mg/kg m.c. Odpowiedź zapalną u myszy badano w okresie 1–28 dni. Zaobserwowano utrzymujący się od pierwszego dnia wzrost cytokin prozapalnych w BALF (interleukin: IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, interferonu i czynnika wzrostu nowotworów (tumor growth factor – TNF- α)). Ponadto nastąpił wzrost poziomu immunoglobulin IgE zarówno w BALF, jak i we krwi obwodowej, który maksymalny poziom osiągnął w pierwszym dniu od narażenia, stopniowo się obniżając w kolejnych dniach. Wystąpiło zwiększenie liczebności limfocytów T. Zaobserwowano również zmiany histopatologiczne w postaci infiltracji komórek zapalnych w płucach [31].

Droga pokarmowa

Fuleren nie działa toksycznie na zwierzęta narażane drogą pokarmową w badaniach podprzewlekłych. Istnieją nawet doniesienia o pozytywnym działaniu fulerenu podawanego tą drogą. Szczurom rasy Crl:CD(SD) podawano przez zgłębnik fuleren w dawkach 0 mg/kg m.c., 1 mg/kg m.c., 10 mg/kg m.c., 100 mg/kg m.c. lub 1000 mg/kg m.c. przez 29 dni, a następnie zwierzęta obserwowano przez 14 dni [32]. Nie zaobserwowano zmian w przyroście masy ciała ani nie wykryto fulerenu w żadnym z badanych narządów (wątrobie, nerkach, śledzionie). Nie odnotowano również żadnych zmian histopatologicznych w badanych narządach. Po

okresie rekonwalescencji zaobserwowano jedynie niewielkie zwiększenie masy wątroby i śledziony w grupie samców otrzymujących najwyższą dawkę. U szczurów obu płci w tej grupie odnotowano czarne zabarwienie kału oraz obecność fulerenu w treści żołądkowej i jelitowej, co świadczy o niewielkim wchłanianiu fulerenu drogą pokarmową [32].

W badaniach 92-dniowych szczurom podawano dożołądkowo dyspersję nanocząstek fulerenu (31 nm) w dawkach 0,1–10 mg/kg m.c. [33]. Nie odnotowano zmian fizjologicznych, biochemicznych, hematologicznych ani immunologicznych wskazujących na działanie toksyczne fulerenu. Badania przy użyciu fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego nie wykazały nieprawidłowości morfologicznych w nabłonku jelitowym. Zaobserwowano jednak zmiany w rozmieszczeniu komórek Kupfera-Browicza, co wskazuje na możliwe wczesne objawy szkodliwego działania na wątrobę, choć bez oznak zmian zapalnych i martwiczych [33].

W innym badaniu fuleren rozpuszczony w oliwie z oliwek podawano szczurom w dawce 1,7 mg/kg m.c./dzień w ciągu 7 miesięcy – codziennie przez pierwszy tydzień, raz w tygodniu do końca 2. miesiąca i potem raz na 2 tygodnie do końca trwania eksperymentu [20]. W wynikach zaobserwowano wydłużenie średniego czasu przeżycia narażanych szczurów (mediana: 42 miesiące).

Odległe efekty działania toksycznego fulerenu

Działanie mutagenne i genotoksyczne

Fuleren nie wykazywał działania mutagennego ani genotoksycznego w badaniach eksperymentalnych [34,35]. Nie wywoływał mutacji powrotnych w teście Amesa prowadzonym w układach bakteryjnych *S. Typhimurium* TA98, TA100, TA1535 i TA1537 ani *E. coli*. Nie odnotowano także aberracji chromosomowych w komórkach CHL/IU chomika chińskiego (zarówno z aktywnością metaboliczną, jak i bez niej; w warunkach światła widzialnego i w ciemności). Negatywne wyniki uzyskano także w teście mikrojądrowym przeprowadzonym na komórkach szpiku kostnego myszy rasy ICR narażanych drogą dożołądkową [34].

W badaniach na szczurach, którym podawano dotchawiczo C₆₀, nie stwierdzono uszkodzeń DNA badanych testem kometowym w komórkach płuc [30]. Grupa badaczy pod kierunkiem Xu na podstawie symulacji molekularnych i analiz termodynamicznych jednak sugeruje możliwość bezpośredniej interakcji cząsteczek fulerenu z kwasami nukleinowymi [35]. Nanocząstki poprzez wiązanie z DNA, w miejscu mniejsze-

go rowka helisy, mogą hamować jego replikację, co potencjalnie może wywoływać negatywne skutki. Fuleren może także wiązać się z helisą RNA w miejscu większego rowka, stabilizując w ten sposób tę strukturę, co z kolei może leżeć u podstaw inhibicji odwrotnej transkrypcji wirusa HIV [35].

Działanie rakotwórcze

Autorzy niniejszego artykułu nie znaleźli opublikowanych danych dotyczących rakotwórczego działania nanocząstek fulerenu u ludzi i zwierząt.

Działanie embriotoksyczne, teratogenne i wpływ na rozrodczość

Istnieją doniesienia o możliwym szkodliwym wpływie fulerenu na płód u myszy [36–38]. Ciężarnym samicom w 10. dniu ciąży podano dootrzewnowo fuleren zawieszony w PVP (polywinylopyrrolidone – poliwinylpiperolidon) w dawkach 25–137 mg/kg m.c. i po 18 godz. od podania badano płody [36]. Fuleren wykryto zarówno w woreczku żółtkowym, jak i płodach myszy narażonych na fuleren w dawce 50 mg/kg m.c. U płodów zaobserwowano zaburzenia morfologiczne w okolicach głowy i ogona oraz odnotowano nieprawidłową budowę cewy nerwowej w części grzbietowej. Tsuchiya i wsp. przeprowadzili również badania *in vitro* na kulturach komórek śródmózgowia, po którym opisali zahamowanie wzrostu i różnicowania komórek po inkubacji z C₆₀ [36]. Autorzy cytowanego badania podsumowują, że fuleren C₆₀ może docierać wraz z krwią ciężarnych samic do woreczka żółtkowego płodów i wpływać na ich morfogenezę. Wyniki badań *in vitro* wskazują natomiast wpływ fulerenu na wzrost różnicowania się komórek śródmózgowia.

Ciężarnym i karmiącym samicom szczurów, na różnych etapach ciąży, dożylnie wstrzykiwano zawieszinę znakowanych izotopowo cząstek fulerenu ([¹⁴C]C₆₀ lub [¹⁴C](U)C₆₀) zawieszonych w PVP [37,38]. U narażonych samic obecność fulerenu wykryto głównie w wątrobie i płucach, natomiast we krwi znacznik utrzymywał się do 11 dni od zakończenia ekspozycji – największe stężenie odnotowano w dobie 1. (14–19%) i 2. (7%). Fuleren był obecny także w łożyskach ciężarnych samic i u ich płodów, wykryto go również w mleku karmiących samic, a także w organizmach młodych karmionych przez narażane samice [37,38].

Fuleren w badaniach na zwierzętach eksperymentalnych pokonywał barierę krew–łożysko i po podaniu dootrzewnowym lub dożylnym wpływał na rozwój płodu [36–38]. Biorąc jednak pod uwagę znikome

wchłanianie drogą inhalacyjną, którą fuleren mógłby dostać się do organizmu w środowisku pracy, można przypuszczać, że badania dotyczące szkodliwego działania tych cząstek na płód nie wpłyną na ocenę bezpieczeństwa fulerenu w narażeniu zawodowym.

Dopuszczalne poziomy narażenia zaproponowane dla fulerenu

W Polsce ani na świecie nie ma ustalonych wartości normatywów higienicznych dla fulerenu. Oszacowano natomiast pochodne poziomy niepowodujące zmian (derived no-effect levels – DNEL) dla działania ostrego i przewlekłego. Wartości DNEL dla fulerenu zaproponował zespół ekspertów pod kierunkiem prof. Vicki Stone w ramach projektu ENRHES (Engineered nanoparticles: Review health and environmental safety – Nanocząstki projektowane: przegląd dotyczący bezpieczeństwa i zdrowia środowiskowego) [39]. Na podstawie eksperymentów prowadzonych drogą inhalacyjną i pokarmową Stone i wsp. ustalili krytyczny efekt działania fulerenu jako pojawienie się stanu zapalnego i odpowiedź oksydacyjna o działaniu progowym [39]. Nie ma wystarczających opublikowanych danych na temat bezprogowego działania genotoksycznego fulerenu. Sugeruje się nawet, że podawany w niskich dawkach może mieć działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne [39].

Podstawą wyznaczenia poziomu DNEL dla fulerenu w narażeniu ostrym było badanie opisane przez Bakera i wsp., przeprowadzone na szczurach narażonych na cząstki fulerenu o średnicy 55 nm, w stężeniu 2,22 mg/m³ [27]. Zwierzęta były eksponowane inhalacyjnie (przez nos) przez 3 godz. dziennie, przez 10 kolejnych dni. Nie zaobserwowano zmian zapalnych u szczurów narażonych w powyższych warunkach, a stężenie 2,22 mg/m³ uznano za najwyższe niepowodujące negatywnych skutków (no observed adverse effect concentration – NOAEC). Po dokonaniu korekty związanej z różnicami między warunkami eksperymentalnymi a środowiskiem pracy uzyskano NOAEC dla pracownika (8 godz.), które wyniosło 0,55 mg/m³. W kolejnym etapie badania uwzględniono różnice międzygatunkowe i wrażliwości osobniczej wśród pracowników poprzez zastosowanie współczynnika ogólnego dla narażenia krótkotrwałego w środowisku pracy – 12,5 – uzyskując wartość DNEL wynoszącą 0,044 mg/m³ = 44,4 µg/m³.

Pochodne poziomy niepowodujące zmian (DNEL) dla narażenia przewlekłego oszacowano na podstawie eksperymentu inhalacyjnego, w którym szczu-

ry (całe ciało) narażano na fuleren (cząstki o średnicy 96 nm) w stężeniu $0,12 \text{ mg/m}^3$; $4,1 \times 10^4$ cząstek/ cm^3 przez 6 godz./dzień, 5 dni/tydzień, przez 4 tygodnie [17]. Cząstki fulerenu były obecne w komórkach nabłonkowo-pęcherzykowych lub zostały pochłonięte przez makrofagi. Badania ekspresji genów wykazały jedynie łagodny stan zapalny. Podane stężenie uznano za najniższe, przy którym obserwuje się negatywne skutki (lowest observed adverse effect concentration – LOAEC).

Po dokonaniu korekty związanej z różnicami między warunkami eksperymentalnymi a środowiskiem pracy uzyskano LOAEC dla pracownika (8 godz.) – $0,06 \text{ mg/m}^3$. Następnie uwzględniono współczynnik ekstrapolacji wartości LOAEC do NOAEC, uzyskując stężenie wynoszące $0,02 \text{ mg/m}^3$. W kolejnym etapie zastosowano współczynniki uwzględniające różnice międzygatunkowe, różnice wrażliwości osobniczej wśród pracowników i ekstrapolację z narażenia podprzewlekłego do przewlekłego, uzyskując współczynnik ogólny 75 i wartość DNEL równą $0,27 \mu\text{g/m}^3$.

W ramach tego samego projektu (ENRHES) Aschberger i wsp. zaproponowali dla fulerenu wskaźnikowe poziomy niewywołujące skutków u ludzi (indicative no-effect levels – INELs) [40]. Zostały one zaproponowane jako punkt odniesienia dla dalszych badań i nie stanowią podstawy normatywów obowiązujących w Unii Europejskiej. Dla narażonych pracowników zaproponowano 2 wartości – dla narażenia krótko- i długotrwałego. W obu przypadkach oparto się na badaniu Bakera i wsp. [27], biorąc za podstawę stężenie NOAEC równe $2,22 \text{ mg/m}^3$. Zastosowano analogiczne współczynniki modyfikacyjne jak przy szacowaniu poziomów DNEL [39] i uzyskano wartości INEL – wynoszące $44,4 \mu\text{g/m}^3$ dla narażenia krótkotrwałego i $7,4 \mu\text{g/m}^3$ dla narażenia przewlekłego.

Zgodnie z klasyfikacją nanomateriałów zaproponowanych przez Ekspertów Krajowego Instytutu Zdrowia Publicznego i Środowiska w Holandii (The Netherlands National Institute for Public Health and the Environment – Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milie – RIVM) fuleren C_{60} , jako nanomateriał ziarnisty, trwały w środowisku, o gęstości nieprzekraczającej 6000 kg/m^3 , spełnia kryteria klasy 2b [41]. Wartość referencyjna dla nanomateriałów (nano reference values – NRV) dla tej klasy zagrożenia to $40\,000$ cząstek/ cm^3 [41].

Shinohara i wsp. w 2011 r. oszacowali dla fulerenu ograniczony czasowo poziom dopuszczalny (period limited acceptable exposure level – AEL(PL)) [42]. Wartość ta jest ograniczona czasowo do 15 lat – przy za-

łożeniu, że w przeciągu 10 lat ukażą się nowsze dane dotyczące toksyczności nanocząstek i bardziej odpowiednie metody pomiarowe lub sposoby wyznaczania dawek. Podstawą szacowania było 4-tygodniowe badanie inhalacyjne na szczurach narażanych na cząstki fulerenu o średnicy (śr.) wynoszącej średnio 96 nm przy geometrycznym odchyleniu standardowym (geometric standard deviation – GSD) równym 2, o stężeniu $0,12 \text{ mg/m}^3$ [28]. Jako efekt krytyczny przyjęto objawy stanu zapalnego w płucach. Wobec braku wystąpienia negatywnych zmian zastosowane stężenie przyjęto jako NOAEL dla narażenia krótkotrwałego.

W celu ekstrapolacji tego poziomu do narażenia podprzewlekłego obliczono liczbę cząstek fulerenu pozostających w płucach po narażeniu trwającym 13 tygodni, a następnie podano dotchawiczo szczurom większą ich ilość [42]. Na podstawie przeprowadzonych badań zwierząt (BALF i badania histopatologiczne) nie stwierdzono szkodliwego działania substancji. Dawkę fulerenu podawaną dotchawiczo zwiększano aż do uzyskania skutków działania i jako poziom NOAEL dla działania przewlekłego oszacowano $3,1 \text{ mg/m}^3$. Po uwzględnieniu zróżnicowania międzygatunkowego (na podstawie długości dziennej ekspozycji, różnic w objętości oddechowej płuc, frakcji depozytywnej nanocząstek w płucach i powierzchni pęcherzyków płucnych) otrzymano NOAEL równe $3,5 \text{ mg/m}^3$. Po zastosowaniu współczynników niepewności wartość AEL(PL) w powietrzu środowiska pracy dla cząstek fulerenu (śr. = 96 nm, GSD = 2) wyniosła $0,39 \text{ mg/m}^3$ [42].

WNIOSKI

Fulereny mają wiele interesujących właściwości. Z uwagi na obecność zdelokalizowanych elektronów mogą przyjmować i oddawać elektrony oraz wykazywać właściwości zarówno prooksydacyjne, jak i antyoksydacyjne. Fuleren może indukować przemianę tlenu cząsteczkowego w aninorodnik ponadtlenkowy. Pod wpływem światła widzialnego w rozpuszczalnikach polarnych może powstawać rodnik hydroksylowy (OH) i anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-), a w niepolarnych – tlen singletowy ($^1\text{O}_2$). Kontrolowane uwalnianie tych reaktywnych form tlenu daje szeroki wachlarz zastosowań fulerenów, m.in. w terapii fotodynamicznej nowotworów. Z innej strony pochodne fulerenów rozpuszczalne w wodzie, w tym podstawiony grupami hydroksylowymi fulerol, wykazują właściwości antyoksydacyjne i mogą pełnić rolę zmiataczy wolnych rodników (nazwano je nawet „gąbkami rodnikowymi”). Działania

nie i właściwości tych cząsteczek w dużej mierze zależą od podstawników, a nawet od samego rozpuszczalnika [43]. Toksykokinetyka fulerenów, czyli ich wchłanianie, rozmieszczenie i wydalanie, również zależy od właściwości cząstek, podstawników, a nawet zastosowanych rozpuszczalników. Fulleren C_{60} charakteryzuje się słabym wchłanianiem i niską toksycznością. Nie stanowi zagrożenia w środowisku pracy. Autorzy niniejszej pracy stoją na stanowisku, że opublikowane dane nie dają wystarczających podstaw do wyznaczenia NDS fulerenu C_{60} w niezmodyfikowanej formie. Pochodne fulerenów, z uwagi na odmienne właściwości, wymagają osobnej analizy pod względem szacowania ryzyka zawodowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Nanonet [Internet]: Fundacja Nanonet 2016 [cytowany 11 sierpnia 2015]. Fulereny. Adres: <http://nanonet.pl/fulereny-fullereny>
2. Kroto H.W., Heath J.R., O'Brien C., Curl R.F., Smalley R.E.: C_{60} : Buckminsterfullerene. *Nature* 1985;318:162–163, <http://dx.doi.org/10.1038/318162a0>
3. Diener M.D.: Fullerenes for photovoltaic and bioscience applications sigma Aldrich [Internet] [cytowany 11 sierpnia 2015]. Adres: <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/fullerenes.html>
4. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006. DzU L 353 z 2008 r. z późn. zm.
5. European Chemicals Agency [Internet]: Agency, Helsinki 2015 [cytowany 11 sierpnia 2015]. Summary of classification and labelling. Adres: <http://echa.europa.eu/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/161572>
6. Grabowska J.: Fulereny – przyszłość zastosowań w medycynie i farmacji. *Gazeta Farmaceut.* 2008;6:38–40
7. Bakry R., Vallant R.M., Najam-ul-Haq M., Rainer M., Szabo Z., Huck C.W. i wsp.: Medicinal applications of fullerenes. *Int. J. Nanomedicine* 2007;2(4):639–649
8. Vávrová J., Řezáčová M., Pejchal J.: Fullerene nanoparticles and their anti-oxidative effects: A comparison to other radioprotective agents. *J. Appl. Biomed.* 2012;10(1):1–8, <http://dx.doi.org/10.2478/v10136-012-0002-2>
9. Yadav B.C., Kumar R.: Structure, properties and applications of fullerenes. *Int. J. Nanotechnol. Appl.* 2008;2(1):15–24
10. Fujitani Y., Kobayashi T., Arashidani K., Kunugita N., Suemura K.: Measurement of the physical properties of aerosols in a fullerene factory for inhalation exposure assessment. *J. Occup. Environ. Hyg.* 2008;5(6):380–389, <http://dx.doi.org/10.1080/15459620802050053>
11. Johnson D.R., Methner M.M., Kennedy A.J., Steevens J.A.: Potential for occupational exposure to engineered carbon-based nanomaterials in environmental laboratory studies. *Environ. Health Perspect.* 2010;118(1):49–54, <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.0901076>
12. Ogura I., Sakurai H., Gamo M.: Dustiness testing of engineered nanomaterials. *J. Phys. Conf. Ser.* 2009;170(012003):1–4
13. Shinohara N. [red.]: Risk assessment of manufactured nanomaterials – Fullerene (C_{60}). Final report issued on July 22, 2011, Executive Summary. NEDO Project (P06041) „Research and Development of Nanoparticle Characterization Methods” [Internet]. The Research Institute for Safety and Sustainability 2011 [cytowany 10 lipca 2015]. Adres: http://www.aist-riss.jp/main/?ml_lang=en
14. Hendrickson O.D., Zherdev A.V., Gmshinskii I.V., Dzantev B.B.: Fullerenes: *In vivo* studies of biodistribution, toxicity, and biological action. *Nanotechnol. Russia* 2014;9(11):601–617, <http://dx.doi.org/10.1134/S199507801406010X>
15. Naota M., Shimada A., Morita T., Inoue K., Takano H.: Translocation pathway of the intratracheally instilled C_{60} fullerene from the lung into the blood circulation in the mouse: Possible association of diffusion and caveolae-mediated pinocytosis. *Toxicol. Pathol.* 2009;37(4):456–462, <http://dx.doi.org/10.1177/0192623309335059>
16. Gao Z., Hedtke B.M., Marsters J.A., Lehman M.R., Holmes T., Lucak J.F. i wsp.: Disposition of C_{60} fullerene after inhalation (nano C_{60}), intratracheal instillation, or intravenous injection in male F344 rats. [Internet]: Lovelace Respiratory Research Institute, Albuquerque [cytowany 10 lipca 2015]. Adres: https://www.researchgate.net/publication/266449539_Disposition_of_C60_Fullerene_after_Inhalation_nanoC60_Intratracheal_Instillation_or_Intravenous_Injection_in_Male_F344_Rats
17. Fujita K., Morimoto Y., Ogami A., Myojyo T., Tanaka I., Shimada M. i wsp.: Gene expression profiles in rat lung after inhalation exposure to C_{60} fullerene particles. *Toxicology* 2009;258(1):47–55, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2009.01.005>
18. Shinohara N., Nakazato T., Tamura M., Endoh S., Fukui H., Morimoto Y. i wsp.: Clearance kinetics of fullerene C_{60} nanoparticles from rat lungs after intratracheal C_{60} instillation and inhalation C_{60} exposure. *Toxicol. Sci.* 2010;118(2):564–573, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfq288>

19. Yamago S., Tokuyama H., Nakamura E., Kikuchi K., Kananishi S., Sueki K. i wsp.: *In vivo* biological behavior of a water-miscible fullerene: ^{14}C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity. *Chem. Biol.* 1995;2(6):385–389, [http://dx.doi.org/10.1016/1074-5521\(95\)90219-8](http://dx.doi.org/10.1016/1074-5521(95)90219-8)
20. Baati T., Bourasset F., Gharbi N., Njim L., Abderrabba M., Kerkeni A. i wsp.: The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of [60]fullerene. *Biomaterials* 2012;33(19):4936–4946, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.036>
21. Xia X.R., Monteiro-Riviere N.A., Riviere J.E.: Skin penetration and kinetics of pristine fullerenes (C_{60}) topically exposed in industrial organic solvents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010;242(1):29–37, <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2009.09.011>
22. Kato S., Aoshima H., Saitoh Y., Miwa N.: Biological safety of lipofullerene composed of squalane and fullerene- C_{60} upon mutagenesis, photocytotoxicity, and permeability into the human skin tissue. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2009;104(6):483–487, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00396.x>
23. Bullard-Dillard Z.R., Creek K.E., Scrivens W.A., Tour J.M.: Tissue sites of uptake ^{14}C -labeled C_{60} . *Bioorg. Chem.* 1996;24(4):376–385, <http://dx.doi.org/10.1006/bioo.1996.0032>
24. Sumner S.C., Snyder R.W., Wingard C., Mortensen N.P., Holland N.A., Shannahan J.H. i wsp.: Distribution and biomarkers of carbon-14-labeled fullerene C_{60} ($^{14}\text{C}(\text{U})\text{C}_{60}$) in female rats and mice for up to 30 days after intravenous exposure. *J. Appl. Toxicol.* 2015;35(12):1452–1464, <http://dx.doi.org/10.1002/jat.3110>
25. Ema M., Matsuda A., Kobayashi N., Naya M., Nakaniishi J.: Dermal and ocular irritation and skin sensitization studies of fullerene C_{60} nanoparticles. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 2013;32(2):128–134, <http://dx.doi.org/10.3109/15569527.2012.727937>
26. Aoshima H., Saitoh Y., Ito S., Yamana S., Miwa N.: Safety evaluation of highly purified fullerenes (HPFs): Based on screening of eye and skin damage. *J. Toxicol. Sci.* 2009;34(5):555–562, <http://dx.doi.org/10.2131/jts.34.555>
27. Baker G.L., Gupta A., Clark M.L., Valenzuela B.R., Staska L.M., Harbo S.J. i wsp.: Inhalation toxicity and lung toxicokinetics of C_{60} fullerene nanoparticles and microparticles. *Toxicol. Sci.* 2008 Jan;101(1):122–131, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfm243>
28. Morimoto Y., Hirohashi M., Ogami A., Oyabu T., Myojo T., Nishi K. i wsp.: Inflammogenic effect of well-characterized fullerenes in inhalation and intratracheal instillation studies. Part. *Fibre. Toxicol.* 2010;7:4, <http://dx.doi.org/10.1186/1743-8977-7-4>
29. Ogami A., Yamamoto K., Morimoto Y., Fujita K., Hirohashi M., Oyabu T. i wsp.: Pathological features of rat lung following inhalation and intratracheal instillation of C_{60} fullerene. *Inhal. Toxicol.* 2011;23(7):407–416, <http://dx.doi.org/10.3109/08958378.2011.580386>
30. Ema M., Tanaka J., Kobayashi N., Naya M., Endoh S., Maru J. i wsp.: Genotoxicity evaluation of fullerene C_{60} nanoparticles in a comet assay using lung cells of intratracheally instilled rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2012;62(3):419–424, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.01.003>
31. Park E.J., Kim H., Kim Y., Yi J., Choi K., Park K.: Carbon fullerenes (C_{60} s) can induce inflammatory responses in the lung of mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010;244(2):226–233, <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2009.12.036>
32. Takahashi M., Kato H., Doi Y., Hagiwara A., Hirata-Koizumi M., Ono A. i wsp.: Sub-acute oral toxicity study with fullerene C_{60} in rats. *J. Toxicol. Sci.* 2012;37(2):353–361, <http://dx.doi.org/10.2131/jts.37.353>
33. Shipelin V.A., Smirnova T.A., Gmshinskii I.V., Tute-lyan V.A.: Analysis of toxicity biomarkers of fullerene C_{60} nanoparticles by confocal fluorescent microscopy. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015;158(4):443–449, <http://dx.doi.org/10.1007/s10517-015-2781-4>
34. Shinohara N., Matsumoto K., Endoh S., Maru J., Nakaniishi J.: *In vitro* and *in vivo* genotoxicity tests on fullerene C_{60} nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 2009;191(2–3):289–296, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.09.012>
35. Xu X., Wang X., Li Y., Wang Y., Yang L.: A large-scale association study for nanoparticle C_{60} uncovers mechanisms of nanotoxicity disrupting the native conformations of DNA/RNA. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(16):7622–7632, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks517>
36. Tsuchiya T., Oguri I., Yamakoshi Y.N., Miyata N.: Novel harmful effects of [60]fullerene on mouse embryos *in vitro* and *in vivo*. *FEBS Lett.* 1996;393(1):139–145, [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00812-5](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(96)00812-5)
37. Sumner S.C., Fennell T.R., Snyder R.W., Taylor G.F., Lewin A.H.: Distribution of carbon-14 labeled C_{60} ($^{14}\text{C}\text{C}_{60}$) in the pregnant and in the lactating dam and the effect of C_{60} exposure on the biochemical profile of urine. *J. Appl. Toxicol.* 2010;30(4):354–360, <http://dx.doi.org/10.1002/jat.1503>
38. Snyder R.W., Fennell T.R., Wingard C., Mortensen N.P., Holland N.A., Shannahan J.H. i wsp.: Distribution of carbon-14 labeled C_{60} ($^{14}\text{C}\text{C}_{60}$) in pregnant and lactating rats and their offspring after maternal intravenous

- exposure. *J. Appl. Toxicol* 2015;35(12):1438–1451, <http://dx.doi.org/10.1002/jat.3177>
39. Stone V. [red.]: Engineered nanoparticles: Review health and environmental safety (ENRHES) [Internet] [cytowany 19 maja 2016]. Adres: [http://www.temas.ch/IMPART/IMPARTProj.nsf/7903C02E1083D0C3C12576CC003DD7DE/\\$FILE/ENRHES+Review.pdf?OpenElement&enetarea=03](http://www.temas.ch/IMPART/IMPARTProj.nsf/7903C02E1083D0C3C12576CC003DD7DE/$FILE/ENRHES+Review.pdf?OpenElement&enetarea=03)
40. Aschberger K., Johnston H.J., Stone V., Aitken R.J., Tran C.L., Hankin S.M. i wsp.: Review of fullerene toxicity and exposure – Appraisal of a human health risk assessment, based on open literature. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2010;58(3):455–473, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.08.017>
41. Van Broekhuizen P., van Broekhuizen F., Cornelissen R., Reijnder L.: Workplace exposure to nanoparticles and the application of provisional nanoreference values in times of uncertain risks. *J. Nanopart. Res.* 2012;14:770, <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-012-0770-3>
42. Shinohara N., Gamo M., Nakanishi J.: Fullerene C60: Inhalation hazard assessment and derivation of a period-limited acceptable exposure level. *Toxicol. Sci.* 2011;123(2):576–589, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfr192>
43. Krokosz A.: Fulereny w biologii. *Postępy Biochem.* 2007;53(1):91–96