

Anna Maria Świdwińska-Gajewska
Sławomir Czerczak

NANORURKI WĘGLOWE – CHARAKTERYSTYKA SUBSTANCJI, DZIAŁANIE BIOLOGICZNE I DOPUSZCZALNE POZIOMY NARAŻENIA ZAWODOWEGO

CARBON NANOTUBES – CHARACTERISTIC OF THE SUBSTANCE,
BIOLOGICAL EFFECTS AND OCCUPATIONAL EXPOSURE LEVELS

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

STRESZCZENIE

Nanorurki węglowe (carbon nanotubes – CNT) są grupą nanoobjektów zróżnicowaną pod względem budowy, rozmiaru (długości i średnicy), kształtu oraz własności. Dzięki wielu interesującym właściwościom znajdują szerokie zastosowanie w różnych dziedzinach. Rosnące zainteresowanie tymi strukturami pociąga za sobą zwiększenie liczby osób pracujących w narażeniu na CNT. Ekspozycja zawodowa na nanorurki może występować zarówno w laboratoriach prowadzących nad nimi badania, jak i w zakładach produkujących CNT lub zawierające je nanokompozyty. Poziomy stężenie liczbowych CNT w pobliżu źródła ich emisji mogą sięgać wielkości rzędu 10^7 cząstek/cm³. Wartości te jednak znacznie się obniżają po zastosowaniu odpowiedniej wentylacji. Z badań na zwierzętach wynika, że główną drogą narażenia jest inhalacja. Nie ma dowodów na wchłanianie przez skórę. Nanorurki węglowe podawane drogą pokarmową w znacznym stopniu są wydalane z kałem. Nie opisano metabolizmu nanorurek węglowych. W badaniach inhalacyjnych na zwierzętach CNT wywoływały głównie stan zapalny, na skutek stresu oksydacyjnego, prowadząc przede wszystkim do zmian w płucach. U zwierząt narażanych drogą dermalną główny efekt to stres oksydacyjny wywołujący miejscowy stan zapalny. Najmniej objawów toksyczności zaobserwowano u zwierząt eksponowanych drogą pokarmową. Nanorurki węglowe nie indukowały mutacji w testach bakteryjnych, jednak działały genotoksycznie w wielu testach prowadzonych zarówno na komórkach *in vitro*, jak również u narażanych myszy *in vivo*. Działanie embriotoksyczne CNT zależy głównie od ich modyfikacji, natomiast rakotwórcze – od rozmiaru i sztywności. Zaproponowane przez światowych ekspertów wartości dopuszczalnych poziomów narażenia zawodowego dla CNT mieszczą się w przedziale 1–80 µg/m³. Różnorodność skutków działania CNT skłania do tego, żeby każdy rodzaj nanorurek był traktowany jak oddzielna substancja wymagająca osobnego szacowania normatywy higienicznej. Med. Pr. 2017;68(2):259–276

Słowa kluczowe: narażenie zawodowe, nanoobjekty, toksyczność, nanorurki węglowe, nanowłókna, narażenie inhalacyjne

ABSTRACT

Carbon nanotubes (CNTs) are a diverse group of nano-objects in terms of structure, size (length, diameter), shape and characteristics. The growing interest in these structures is due to the increasing number of people working in exposure to CNTs. Occupational exposure to carbon nanotubes may occur in research laboratories, as well as in plants producing CNTs and their nanocomposites. Carbon nanotubes concentration at the emission source may reach 10^7 particles/cm³. These values, however, are considerably reduced after the application of adequate ventilation. Animal studies suggest that the main route of exposure is inhalation. Carbon nanotubes administered orally are largely excreted in the feces. In animals exposed by inhalation, CNTs caused mainly inflammation, as a result of oxidative stress, leading above all to changes in the lungs. The main effect of animal dermal exposure is oxidative stress causing local inflammation. In animals exposed by ingestion the mild or no toxicity was observed. Carbon nanotubes did not induce mutations in the bacterial tests, but they were genotoxic in a series of tests on cells *in vitro*, as well as in exposed mice *in vivo*. Embryotoxicity of nanotubes depends mainly on their modifications and carcinogenicity – primarily on the CNT size and its rigidity. Occupational exposure limits for CNTs proposed by world experts fall within the range of 1–80 µg/m³. The different effects of various kinds of CNT, leads to the conclusion that each type of nanotube should be treated as a separate substance with individual estimation of hygienic normative. Med Pr 2017;68(2):259–276

Key words: occupational exposure, nanoobjects, toxicity, carbon nanotubes, nanofibers, inhalation

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: 25 kwietnia 2016, zatwierdzono: 14 lipca 2016

WSTĘP

Nanotechnologia jest jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin. Nowe materiały o niespotykanych wcześniej właściwościach stwarzają wiele możliwości zastosowań. Z roku na rok rośnie liczba kolejnych aplikacji nanomateriałów, a wraz z nią liczba narażonych osób pracujących przy ich wytwarzaniu, obróbce czy użytkowaniu. Jednymi z najbardziej obiecujących nanoobjektów są nanorurki węglowe. Budzą one szczególne obawy ze względu na potencjalne podobieństwo do włókien azbestu. Warto więc przeanalizować ich budowę, właściwości i działanie biologiczne pod kątem toksyczności. Umożliwi to ocenę istniejących zagrożeń i stosowanie odpowiednich środków kontroli ryzyka, żeby praca z nanomateriałami na bazie nanorurek węglowych była bezpieczna.

METODY PRZEGLĄDU

Przeglądu piśmiennictwa dokonano w oparciu o bazy internetowe naukowych czasopism recenzowanych. W przygotowaniu niniejszego opracowania wykorzystano prace z lat 2004–2015, głównie w języku angielskim, dotyczące działania biologicznego nanorurek węglowych, zastosowania, narażenia zawodowego, a także dopuszczalnych poziomów narażenia.

WYNIKI PRZEGLĄDU

Przeгляд piśmiennictwa podzielono na podrozdziały dotyczące: charakterystyki, właściwości fizykochemicznych, klasyfikacji nanorurek węglowych, a także ich zastosowania, narażenia zawodowego, jak również właściwości biologicznych, takich jak toksykokinetyka, działanie toksyczne na zwierzęta z podziałem na drogi narażenia, oraz odległych skutków, takich jak działanie mutagenne, genotoksyczne, rakotwórcze i reprotoksyczne. W ostatnim rozdziale zestawiono dopuszczalne poziomy narażenia zawodowego dla nanorurek węglowych, proponowane przez międzynarodowe grupy ekspertów.

Charakterystyka nanorurek węglowych

Odkrycie nanorurek węglowych (carbon nanotubes – CNT) przypisuje się Sumio Iijimie, który w 1991 r., oglądając próbkę sadzy pod mikroskopem elektronowym, zauważył włókna o średnicy kilku nanometrów (nm) i długości kilku mikrometrów (μm), zbudowane z atomów węgla. Nazwano je nanorurkami węglowymi [1].

Nanorurki węglowe są zbudowane z atomów węgla tworzących strukturę heksagonalną. Jedną z odmian alotropowych tego pierwiastka jest grafen, w którym atomy węgla są ułożone w jednej płaszczyźnie. Zwinęta cylindrycznie folia grafenowa tworzy nanorurkę węglową. W zależności od sposobu zwinienia płaszczyzny grafenowej i ułożenia pierścieni heksagonalnych względem osi nanorurki można wyróżnić 3 typy CNT: fotelowy (armchair), zygzakowy (zig-zag) i skrętny (chiralny). Nanorurki węglowe mogą być zbudowane z 1 zwinętej warstwy grafenu lub kilku (nanorurki jedno-, dwu- lub wielościenne). Wielościenne CNT mogą mieć strukturę zwinętej w rulon pojedynczej warstwy grafenowej lub koncentrycznie ułożonych, zamkniętych, jednowarstwowych rurek o różnych średnicach [1].

Nanorurki węglowe różnią się znacznie pod względem rozmiarów, kształtów i struktury. Ich średnica może być znacznie zróżnicowana i wynosić od mniej niż 1 nm do ponad 100 nm. W dużej mierze zależy to od liczby warstw – ścian nanorurek, a także przyłączonych grup funkcyjnych. Jednościenne nanorurki węglowe mogą mieć średnicę 0,7–3 nm, dwuścienne: 2–6 nm, a wielościenne: 10–200 nm [1].

Modelowy kształt nanorurki to cylinder o heksagonalnym przekroju, ale raczej rzadko nanorurki mają prostą i sztywną budowę. Ze względu na defekty w heksagonalnej strukturze atomów węgla najczęściej spotyka się postać splątana, która przybiera formę penta-, hepta-, a nawet oktagonálną. Makroskopowo nanorurki węglowe mogą więc przybierać różne kształty – od włóknistych do kulistych. Kształt może determinować ich właściwości i działanie biologiczne [1].

Nanorurki węglowe są przede wszystkim wytworem człowieka, jednak w niewielkich ilościach występują w środowisku naturalnym jako produkty spalania w wysokich temperaturach w obecności katalizatorów metalicznych podczas pożarów budynków czy w spaliniach paliw gazowych [1].

Właściwości fizykochemiczne

Właściwości fizykochemiczne nanorurek węglowych są następujące [1,2]:

- wzór sumaryczny – C_x ,
- nazwa – nanorurki węglowe (carbon nanotubes – CNT),
- SWCNT – jednościenne nanorurki węglowe (single-walled carbon nanotubes),
- DWCNT – dwuścienne nanorurki węglowe (double-walled carbon nanotubes),

- MWCNT – wielościennie nanorurki węglowe (multi-walled carbon nanotubes),
- nazwa wg CAS (Chemical Abstracts Service) – grafit syntetyczny,
- numer w rejestrze CAS – 308068-56-6,
- numer EINECS (European Inventory of Existing Chemical Substances) – 608-533-6 (fulereny cylindryczne),
- postać, wygląd – czarny proszek,
- temperatura topnienia – 4526°C,
- gęstość – 2,6 g/cm³,
- rozpuszczalność w wodzie – substancja nierozpuszczalna.

Klasyfikacja nanorurek węglowych

Nanorurki węglowe nie posiadają zharmonizowanej klasyfikacji, nie znajdują się w wykazach substancji stwarzających zagrożenie zamieszczonych w załączniku VI do Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 127/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniającego i uchylającego dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 [3].

Nanorurki węglowe zostały jednak zaklasyfikowane przez rejestrujących (w Europejskiej Agencji ds. Chemikaliów) ze względu na działanie na zdrowie człowieka. Większość rejestrujących uznała, że CNT działają drażniąco na oczy, a także mogą powodować podrażnienie dróg oddechowych w następstwie jednorazowego narażenia [2].

Z kolei Narodowy System Zgłaszania i Oceny Chemikaliów Przemysłowych (National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme – NICNAS) w Australii zaproponował następującą klasyfikację wielościennych nanorurek węglowych (MWCNT):

- podejrzewa się, że może powodować raka,
- może działać szkodliwie na płuca / układ oddechowy w następstwie długotrwałego lub powtarzanego narażenia inhalacyjnego [4].

Właściwości i zastosowanie nanorurek węglowych

Nanorurki węglowe wykazują wiele interesujących właściwości w zależności od rodzaju, średnicy i liczby ścian. Są odporne chemicznie, podobnie jak grafit, charakteryzują się dużą wytrzymałością, przewyższającą nawet stal, a także osobliwymi właściwościami elektrycznymi. Jednościenne CNT, w zależności od typu ułożenia pierścieni heksagonalnych, mogą wykazywać różne własności przewodzące – metaliczne lub

półprzewodnikowe. Ze względu na właściwości magnetyczne nanorurki węglowe należą do grupy diamagnetyków, co oznacza, że osadzone w zewnętrznym polu magnetycznym wytwarzają pole przeciwnie, osłabiając właściwości pola zewnętrznego [5].

Doskonała wytrzymałość na rozciąganie jednościennych nanorurek węglowych wynika z właściwości i ułożenia wiązań węglowych. W połączeniu z olbrzymią elastycznością sprawia to, że CNT są materiałem o niezwykłych własnościach mechanicznych. Są także znakomitymi przewodnikami cieplnymi [5].

Nanorurki węglowe, dzięki niewielkim rozmiarom i wielu osobliwym właściwościom, budzą duże zainteresowanie w wielu gałęziach przemysłu, począwszy od medycyny, gdzie mogą być wykorzystywane w terapii celowanej jako nośnik leków. Umieszczając w CNT rdzeń ferromagnetyczny i stosując pole magnetyczne, można dostarczać leki bezpośrednio w miejsce działania, np. w chemioterapii. Nanorurki węglowe mogłyby również pełnić funkcję biosensorów, wskazując np. stężenie glukozy we krwi chorych na cukrzycę [5].

Z uwagi na postępującą miniaturyzację układów scalonych nanorurki węglowe wydaje się cechować ogromny potencjał w wytwarzaniu elementów elektronicznych. Ich niespotykane właściwości przewodzące, ciepłe i mechaniczne umożliwiają konstruowanie elastycznej elektroniki. Na bazie jednościennych nanorurek węglowych, z wykorzystaniem emisji światła na ich końcach, powstał wyświetlacz FED (Field Emission Display – wyświetlacz z emisją polową) o wyjątkowych właściwościach – dużej jasności i rozdzielczości. Metaliczne nanorurki, mogące przewodzić elektrony w sposób balistyczny (nierozpraszający się na węzłach sieci), stwarzają perspektywy budowy komputerów kwantowych, a także dokładniejszych mikroskopów elektronowych [5].

Wyjątkowe właściwości mechaniczne CNT dają szansę na wytwarzanie niedostępnych wcześniej nanokompozytów – bardzo wytrzymałych, a przy tym bardzo lekkich. Udało się nawet wyprodukować rower o masie 1 kg. Ze względu na dużą powierzchnię nanorurki węglowe można wykorzystać jako adsorbenty gazów, szczególnie wodoru, co wydaje się obiecujące m.in. w dziedzinie motoryzacji [5].

Nanorurki węglowe znajdują szerokie zastosowanie w przemyśle tworzyw sztucznych jako dodatki (nanonapełniacze) do kompozytów polimerowych. Wykorzystując właściwości przewodzące nanorurek węglowych, wbudowuje się je w tworzywa sztuczne używane w technologii elektronicznej, zwłaszcza w mikroelektro-

nice, do produkcji m.in. napędów dysków. Nanorurki węglowe znajdują się w dodatkach do barwników i pokryć, w powłokach elektrostatycznych, a także – jako nośniki różnorodnych katalizatorów – w elektrodach i elektrolitach baterii czy ogniw paliwowych. Stosowane są również w medycznej inżynierii materiałowej, a ponadto w technologii obrazującej jako znaczniki w diagnostyce medycznej [6,7].

Nanorurki węglowe wykorzystuje się także w motoryzacji, m.in. w przewodach paliwowych, ognioodpornych powłokach pianek tapicerskich czy oponach. W przemyśle zbrojeniowym zaczęto stosować CNT w urządzeniach służących do komunikacji, noktowizji, nawigacji czy w urządzeniach elektronicznych, zmniejszając ich rozmiary i masę. Nanorurki węglowe znajdują się ponadto w pancerzach pojazdów, dzięki czemu uzyskiwane są trwalsze i lżejsze osłony. Nanorurki węglowe są także stosowane do wzmacniania struktury kadłubów statków i samolotów. W budownictwie kompozyty o matrycy cementowej są wzbogacane przez CNT, tworząc zbrojenie rozproszone w betonie lub wzmacniając betony komórkowe [8,9].

Według szacunków Komisji Europejskiej z 2009 r. roczna światowa produkcja CNT i nanowłókien mogła sięgać od kilkuset do kilku tysięcy ton. W 2009 r. na rynku ogólnoswiatowym było 200–250 ton CNT (głównie MWCNT o średnicy poniżej 20 nm) [7]. Obecnie liczby te mogą być jeszcze większe z uwagi na ciągły rozwój nanotechnologii.

Narażenie zawodowe

Duże zainteresowanie nanorurkami węglowymi wiąże się z rosnącą liczbą badań eksperymentalnych i wdrożeń w przemyśle. Pociąga to za sobą wzrastającą liczbę osób narażonych zawodowo na te nanoobiekty. Ekspozycja zawodowa na CNT może więc występować zarówno w laboratoriach prowadzących badania nad tymi strukturami, jak i zakładach je produkujących lub przetwarzających.

Maynard i wsp. [10] badali narażenie inhalacyjne i dermalne na SWCNT podczas produkcji. Pomiarów wykonywano w 4 zakładach podczas przenoszenia surowego materiału CNT do dalszej obróbki. Produkcję prowadzono za pomocą 2 technik – ablacji laserowej (laser ablation – LA) i wysokociśnieniowego dysproporcjonowania tlenku węgla (high-pressure carbon monoxide – HiPCO). Przeprowadzono także analizę fizyczną aerozolu powstałego na skutek wstrząsania mechanicznego w warunkach laboratoryjnych.

Pomiarów powstałych obiektów dokonano przy użyciu kondensacyjnego licznika cząstek (condensation particle counter – CPC) i systemu analizy wymiarowej cząstek (scanning mobility particle sizer – SMPS). Analizę uwolnionych cząstek przeprowadzono za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (scanning electron microscope – SEM). Próbkę były zbierane przez cały czas, w którym pracownicy przebywali w zamkniętym pomieszczeniu roboczym (ok. 30 min).

Zakres zmierzonych stężeń nanorurek węglowych w powietrzu środowiska pracy mieścił się w przedziale od 0,7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (w procesie LA) do 53 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (przy użyciu HiPCO). Stężenie liczbowe cząstek sięgało $8,9 \times 10^5$ cząstek/ cm^3 dla przedziału rozmiarowego 10–1000 nm. Analiza SEM ujawniła, że większość SWCNT występowała w postaci agregatów i aglomeratów o gęstej, splątanej strukturze.

W dalszej części badań Maynarda i wsp. [10] prowadzono ocenę narażenia dermalnego w wyżej opisanych procesach. Zmierzono ilość SWCNT zgromadzonych na rękawicach pracowników, która wyniosła 217–6020 μg . Zdecydowana większość zgromadzonych SWCNT była obecna na powierzchniach mających bezpośredni kontakt z substancją, choć nie wykluczono możliwości osadzania się na skórze (w tym niechronionej) cząstek aerozolu z powietrza.

Han i wsp. [11] badali narażenie na MWCNT w laboratoriach badawczych. Monitoring środowiska pracy przeprowadzono wśród osób pracujących z surowym materiałem. Pomiarów wykonywano w procesie poprodukcyjnym – podczas odzyskiwania, przetwarzania i mieszania MWCNT. Najwyższe stężenie MWCNT odnotowano podczas mieszania (0,43 mg/m^3), przed wprowadzeniem środków kontroli ryzyka.

Po zainstalowaniu wentylacji ogólnej i miejscowej stężenie MWCNT zmniejszyło się 10-krotnie – do wartości 0,04 mg/m^3 . Stężenia liczbowe podczas mieszania wyniosły 172,9–193,6 włókien/ cm^3 przed wprowadzeniem środków kontroli ryzyka, a 0,018–0,05 włókien/ cm^3 po zastosowaniu wentylacji. Pomiarów stężeń wykonywano technikami SMPS (w zakresie 14–630 nm) oraz spektrometrem do pomiaru średnicy aerodynamicznej APS (aerodynamic particle sizer – aerodynamiczny spektrometr cząstek) (w zakresie 0,5–20 μm). Oceniono charakterystykę zmierzonych włókien. Wykryto najwięcej włókien o średnicy 52–56 nm i długości 1473–1760 nm. Zaobserwowano występowanie włókien zarówno pojedynczych, jak i splątanych.

Bello i wsp. (2008) [12] badali narażenie na nanoobiekty podczas syntezy pionowo ułożonych nanorurek

węglowych, tzw. lasów nanorurkowych, metodą chemicznego osadzania par z fazy gazowej (chemical vapor deposition – CVD) w warunkach laboratoryjnych. Pomiary wykonywano w trakcie procesów syntezy oraz odzyskiwania produktu. Nie zaobserwowano wzrostu stężenia cząstek w porównaniu z poziomem tła. Badania przy zastosowaniu systemu analizy wymiarowej cząstek FMPS (Fast Mobility Particle Sizer – ultraszybki spektrometr wielkości cząstek) ujawniły, że w rozkładzie wymiarowym cząstek przeważały cząstki z zakresu 10–100 nm, które po obrazowaniu transmisyjnym mikroskopem elektronowym (transmission electron microscopy – TEM) okazały się częścią tła powietrza wewnątrz laboratorium. Spektroskopia EDS (energy-dispersive X-ray spectroscopy – spektrometria dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego) potwierdziła obecność w powietrzu cząstek o średnicy do 1 μm zawierających węgiel, jednak na podstawie TEM nie stwierdzono w powietrzu laboratorium obecności nanorurek węglowych ani innych nanostruktur.

Bello i wsp. [13] w innej pracy (2009) obserwowała narażenie na włókna występujące podczas obróbki kompozytów hybrydowych zawierających nanorurki węglowe. Pomiary włókien w powietrzu wykonywano podczas ścierania/cięcia 2 kompozytów trójfazowych, na sucho i mokro, blisko źródła emisji nanorurek oraz w strefie oddychania pracownika. Wykorzystywano obrazowanie mikroskopem elektronowym oraz zintegrowany system poboru prób włókien i cząstek respirabilnych. Pomiary wykonywano za pomocą systemów FMPS i APS mierzących rozkład wielkości cząstek, licznika CPC mierzącego stężenie liczbowe cząstek oraz jonizatora dyfuzyjnego (diffusion charger – DC) mierzącego stężenie powierzchniowe.

W powyższych badaniach mierzono stężenie liczbowe cząstek w czasie rzeczywistym i rozkład wielkości cząstek w zakresie 5 nm–20 μm . Większe stężenie obserwowano w miejscu emisji cząstek w porównaniu ze strefą oddychania. W przypadku cięcia na mokro stężenie mierzonych cząstek nie różniło się znacząco od wartości tła. Znaczące zwiększenie stężenia nanoobjektów stwierdzono w przypadku cięcia na sucho obu kompozytów, bez zastosowania środków kontroli ryzyka. Oszacowano, że większość uwolnionych cząstek należy do frakcji respirabilnej z zakresu 1–10 μm , z czego 10% stanowią nanoobjekty. Co więcej, obrazowanie mikroskopem elektronowym nie ujawniło obecności nanorurek węglowych w badanych próbach. Zmierzone stężenia liczbowe cząstek w procesie ścierania na sucho różniły się w zależności od zastosowanego kom-

pozytu i osiągały wartość rzędu 1 000 000 cząstek/ cm^3 . W pomiarach stężeń włókien respirabilnych w tym samym procesie stwierdzono 2–4 włókien/ cm^3 [13].

Bello i wsp. w kolejnej pracy (2010) [14] opisali badanie oceniające narażenie na nanorurki węglowe podczas obróbki mechanicznej (wiercenie) kompozytów hybrydowych zawierających nanorurki węglowe, takich, jakie były już stosowane w poprzednim badaniu (2009) [13]. Pomiary wykonywano podobnie jak w wyżej opisanej pracy: w miejscu uwalniania się cząstek oraz w strefie oddychania pracownika. Badanie prowadzono w 2 różnych dniach, środowisko pracy monitorowano przez 6 godz., w którym to czasie przeprowadzono 10–30 procesów wiercenia trwających do 5 min. Mierzono stężenie masowe i liczbowe cząstek, wymiarowy rozkład cząstek (z zakresu 5 nm–20 μm) oraz stężenie powierzchniowe. W porównaniu z procesami ścierania/cięcia opisanymi w pracy [13] podczas wiercenia zaobserwowano różnice w rozkładzie wielkości i morfologii uwalnianych cząstek, stężeniu włókien, a także agregatów nanorurek węglowych obecnych w powietrzu środowiska pracy [14].

W badaniu z 2009 r. obserwowano emisję nanoobjektów uwalnianych podczas obróbki tych samych kompozytów – cięcia na sucho lub na mokro z użyciem piły, podczas gdy późniejsze badanie obejmowało proces wiercenia. Największe różnice w narażeniu między badaniami odnotowano w rozkładzie wielkości uwalnianych cząstek, morfologii cząstek oraz występowaniu agregatów nanorurek węglowych. Podczas wiercenia uwalniało się ogólnie więcej cząstek w porównaniu z cięciem. Zakresy stężeń dla poszczególnych procesów przedstawiają się następująco: $3,9 \times 10^6$ – 1×10^7 cząstek/ cm^3 (wiercenie) i 2×10^4 – 6×10^6 cząstek/ cm^3 (cięcie). Różnice występowały także w rozkładzie wielkości cząstek. W przypadku cięcia obserwowano 2 ostre piki przy rozmiarze 10–20 nm i 1 μm (zarówno w strefie oddychania pracownika, jak i blisko źródła emisji). Podczas wiercenia powstający aerozol był bardziej zróżnicowany pod względem wielkości cząstek. Pierwszy pik, jaki odnotowano, wystąpił już w zakresie poniżej 10 nm, potem szeroki zakres 20–80 nm i 0,6–0,8 μm . Rozkłady te różniły się w zależności od rodzaju kompozytu. Istotne różnice między badanymi procesami dotyczyły uwalniania włókien. Cięcie skutkowało uwalnianiem większej ilości włókien respirabilnych, ale nie obserwowano wśród nich nanorurek węglowych, podczas gdy w procesie wiercenia stężenie włókien respirabilnych było niższe, ale obserwowano pojawienie się agregatów CNT [14].

Lee i wsp. [15] oceniali narażenie na nanorurki węglowe na 7 stanowiskach pracy związanych z produkcją, obróbką lub stosowaniem wielościennych nanorurek węglowych. Procesy, w jakich badano narażenie, były związane z metodą chemicznego osadzania par z fazy gazowej (CVD), elektrolizą w wodzie roztworu koloidalnego MWCNT, jak również metodami wykorzystującymi ultradźwiękową dyspersję i natryskiwanie roztworu CNT. Na stanowiskach stosowano zarówno wentylację naturalną, jak i miejscową wywiewną tylko w postaci wyciągu bądź jeszcze dodatkowo w układzie zamkniętym. Próbkę pobierano w strefie oddychania pracownika (dozymetria indywidualna) oraz miejscowo (stacjonarnie). Pomiarów wykonywano w czasie rzeczywistym za pomocą pyłomierza, systemu SMPS oraz etalometru, mierząc stężenie masowe, liczbowe oraz liczbowy rozkład cząstek.

Ogólne wyniki pomiarów we wszystkich badanych przez Lee i wsp. [15] procesach wykazały, że stężenie uwalnianych cząstek wynosiło 7,8–321 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (dozymetria indywidualna) i 12,6–187 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (pomiar stacjonarny). Na podstawie obrazowania TEM wykryto strukturę MWCNT oraz cząstki metali, głównie żelaza i glinu, będące katalizatorami w procesie wytwarzania nanorurek węglowych. Największe stężenie cząstek obserwowano tuż po utworzeniu pokrywy CVD po syntezie MWCNT. Średnica uwolnionych obiektów wynosiła 20–50 nm, z czego większość stanowiły cząstki katalizatorów (metali). Zwiększona liczba uwalnianych nanocząstek (20–30 nm) była obserwowana również w procesie przygotowania katalizatorów. Cząstki drobne (120–300 nm) wykryto z kolei podczas procesu rozpraszania ultradźwiękowego, w którym zidentyfikowano agregaty nanocząstek i nanorurek węglowych. Niestety pomiary tła, ze względów technicznych, wykonywano jedynie na niektórych stanowiskach. Lee i wsp. [15] uznali jednak, że narażenie zawodowe na nanorurki węglowe w procesach ich wytwarzania jest niewielkie.

Tsai i wsp. [16] badali narażenie na SWCNT i MWCNT w zakładzie produkcyjnym wykorzystującym metodę CVD. Pomiarów wykonywano za pomocą FMPS i APS. Średnica zmierzonych obiektów wynosiła 5–560 nm. Morfologia i skład uwolnionych cząstek badano za pomocą skaningowego i transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Badania procesu produkcji SWCNT wykazały wysokie stężenia uwalnianych się obiektów o średniej średnicy 50 nm, rzędu 10^7 cząstek/ cm^3 , dla pomiarów wykonywanych blisko źródła cząstek. W strefie oddychania pracowników, poza wyciągiem, stężenie utrzymywało się jednak

poniżej 2×10^3 cząstek/ cm^3 , przyjmując wartości zbliżone do wartości tła. Podczas syntezy SWCNT uwalnianie cząstek zaobserwowano jedynie w pobliżu źródła. Przy sprawnej wentylacji miejscowej nie przedostawały się one do strefy oddychania pracownika. Zmierzone cząstki były wielkości do 100 nm i zidentyfikowano je jako węglowy półprodukt w procesie syntezy metodą CVD. Autorzy badania sugerują występowanie znikomego narażenia na SWCNT podczas ich produkcji przy sprawnej wentylacji miejscowej.

W tym samym badaniu w procesie produkcji MWCNT odnotowano wyższe stężenia – sięgające 4×10^6 cząstek/ cm^3 – w pobliżu źródła nanoobjektów. Rozkład wielkości cząstek uwolnionych był zróżnicowany w zależności od warunków procesu, jednak średnica większości cząstek była mniejsza niż 300 nm. Całkowite stężenie cząstek wielkości poniżej 560 nm w pobliżu źródła wynosiło ok. $2\text{--}3 \times 10^6$ cząstek/ cm^3 , podczas gdy poza wyciągiem stężenie cząstek było zbliżone do poziomu tła. W obrazowaniu mikroskopowym wykryto obecność filamentów CNT o średnicy kilku nanometrów i długości kilku mikrometrów. W próbkach zidentyfikowano również obecność klastrów cząstek zawierających węgiel i żelazo pochodzące od katalizatora. W obu badanych procesach produkcyjnych nie odnotowano wzrostu stężenia nanoobjektów w powietrzu laboratorium pracy, co wskazuje na wysoką wydajność stosowania wentylacji miejscowej w zapobieganiu przedostawaniu się cząstek w strefę oddychania pracowników [16].

Ogura i wsp. [17] przeprowadzili ocenę narażenia na SWCNT podczas produkcji i obróbki tych nanoobjektów. Nanorurki syntetyzowano metodą CVD. Wykorzystano optyczny licznik cząstek (optical particle counter – OPC), CPC, SMPS i mikroskopię elektronową. Pomiarów wykonywano blisko źródła uwalniania (wewnątrz komory rękawicowej) oraz pod wyciągiem (dygestorium) w celu oszacowania potencjalnego narażenia pracowników przy braku stosowania środków kontroli, a także na zewnątrz – w strefie oddychania pracownika. Zmierzono również poziom tła bliskiego, tj. w miejscu wykonywania procesu przed jego rozpoczęciem. Najwyższe stężenia odnotowano podczas oddzielania gotowego produktu SWCNT od substratu wewnątrz komory rękawicowej: 4400 cząstek/ cm^3 (10–1000 nm, CPC) i 300 cząstek/ cm^3 (300–3000 nm, OPC).

Zdaniem Ogury i wsp. [17] wyniki OPC mogą być niedoszacowane z uwagi na dużą niepewność pomiaru. Nie zaobserwowano różnic w stężeniu cząstek w powietrzu środowiska pracy w strefie oddychania pra-

cownika w porównaniu z wartościami tła. Wartości tła utrzymywały się na poziomie 200–3000 cząstek/cm³. Nanorurki węglowe zidentyfikowane mikroskopowo jako fragmenty lasów nanorurkowych – agregaty, aglomeraty, zaobserwowano jedynie we wnętrzu komory rękawicowej lub pod wyciągiem. Zdaniem autorów badania pracownicy stosujący środki kontroli narażenia, takie jak komora rękawicowa i wyciąg, powinni być wystarczająco zabezpieczeni.

Możliwość uwalniania się MWCNT z tkaniny zawierającej nanorurki oceniał zespół Takaya i wsp. [18]. Zaobserwowano, że podczas procesu tkania na skutek działania sił mechanicznych mogą uwalniać się fragmenty zawierające MWCNT o rozmiarach mikrometrowych. Nie zaobserwowano natomiast obiektów nanometrowych. Wartość stężenia MWCNT (wielkość > 6600 nm) nie przekraczała 5,3 µg/cm³.

Poziomy narażenia zawodowego na nanorurki węglowe występujące podczas produkcji i obróbki CNT oraz nanomateriałów zawierających CNT przedstawiono w tabeli 1.

Toksykokinetyka

Główną drogą narażenia na nanorurki węglowe jest inhalacja. Wykazano, że po narażeniu inhalacyjnym CNT mogą pozostawać w płucach nawet wiele miesięcy. Istotne ze względu na miejsce depozycji w układzie oddechowym są: kształt CNT oraz stopień ich agregacji i aglomeracji. Drobniejsze cząstki (mniejsze agregaty) wnikały głębiej, ulegały szybszej translokacji i wywołały ostrzejszy skutek toksyczny u zwierząt laboratoryjnych [19].

Ingle i wsp. (2013) [20] podają, że u myszy inhalowanych aerozolem SWCNT (średnica włókien 0,8–2,4 nm) zaobserwowano translokację nanorurek węglowych do układu krążenia. Zwierzęta inhalowano przez 15 min i badano po 24 godz. Detekcja metodą spektroskopii Ramana wykazała obecność nanorurek węglowych w rejonie pęcherzykowym płuc i we krwi obwodowej.

Zaobserwowano, że w następstwie jednokrotnego narażenia inhalacyjnego (6 godz.) na MWCNT (0,3–50 µm) w stężeniu 30 mg/m³ u myszy struktury te wystąpiły w ścianie podopłucnowej i makrofagach. W pierwszym dniu po narażeniu na powierzchni opłucnej obserwowano duże skupiska fagocytów jednojądrzastych z makrofagami wypełnionymi MWCNT, a w czasie 2–6 tygodni po ustaniu narażenia pojawiało się zwłóknienie podopłucnowe. Objawy nie występowały u myszy narażanych na niskie stężenie MWCNT (1 mg/m³) oraz u zwierząt narażanych na nanocząstki sadzy technicznej [21].

Tabela 1. Poziomy stężenie nanorurek węglowych (CNT) występujących podczas ich produkcji lub obróbki
Table 1. The concentration levels of carbon nanotubes (CNT) occurring during their production or processing

Proces / Process	Typ i rozmiar CNT / CNT type and size	Stężenie masowe / Mass concentration [µg/m ³]	Zakres wielkości cząstek / Particle size range [nm]	Stężenie liczbowe / Particle number concentration [cząstek/cm ³]	Stężenie powierzchniowe / Surface area concentration [µm ² /cm ³]	Obecność CNT w obrazie TEM/SEM / CNT structures on TEM/SEM	Piśmiennictwo / References
Zakład produkcyjny / Production facilities produkcja CNT metodami: LA i HiPCO – usunięcie produktu z wnętrza reaktora / / CNT production by LA and HiPCO – removing the product from the reactor	SWCNT średnica / diameter: 20–50 nm	0,7–53,0	10–1 000	< 8,90×10 ⁵	-	aglomeraty CNT / / CNT agglomerates	10
Laboratorium badawcze / Research laboratory produkcja CNT metodą CVD / / CNT production by CVD growth	MWCNT średnica / diameter: 52–56 nm długość / length: 1,47–1,76 µm	< 430,0	14–630 500–20 000	< 3,00×10 ⁴ < 1,20×10 ⁴	-	0,005 włókien/cm ³	11
Laboratorium badawcze / Research laboratory produkcja CNT metodą CVD / / CNT production by CVD growth	MWCNT SWCNT	- -	5–560 ~50	2,00–3,00×10 ⁶ 1,00×10 ⁷	- -	pojedyncze CNT lub aglomeraty / / individual CNT or agglomerates	16

Tabela 1. Poziomy stężenie nanorurek węglowych (CNT) występujących podczas ich produkcji lub obróbki – cd.
Table 1. The concentration levels of carbon nanotubes (CNT) occurring during their production or processing – cont.

Proces Process	Typ i rozmiar CNT CNT type and size	Stężenie masowe Mass concentration [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	Zakres wielkości cząstek Particle size range [nm]	Stężenie liczbowe Particle number concentration [cząstek/ cm^3]	Stężenie powierzchniowe Surface area concentration [$\mu\text{m}^2/\text{cm}^3$]	Obecność CNT w obrazie TEM/SEM CNT structures on TEM/SEM	Pismienictwo References
Laboratorium badawcze / Research laboratory ważenie, sonikacja / weighing, sonication	MWCNT średnica / / diameter: 20 nm długość / length: 10,00–30,00 μm	–	10–1 000 300–500 500–1 000	1,48–2,80 $\times 10^3$ 0,24–1,40 $\times 10^2$ 4,00–34,00	–	aglomeraty CNT / / CNT agglomerates	14
Zakłady produkcyjne, laboratoria badawcze / / Production facilities, research laboratories produkcja metodą CVD / / CNT production by CVD	MWCNT	–	14–500 250–3 200	0,70–1,69 $\times 10^4$ 1,52–4,32 $\times 10^2$	–	pojedyncze włókna CNT / individual CNT fibers	15
Laboratorium badawcze / Research laboratory produkcja SWCNT metodą CVD / / SWCNT production by CVD	SWCNT	–	10–1 000 300–10 000	4,40 $\times 10^3$ 3,00 $\times 10^2$	–	aglomeraty CNT / / CNT agglomerates	17
Zakład produkcji tekstylnej / Textile factory tkanie przędzy pokrytej MWCNT / / weaving MWCNT coated yarn	MWCNT	< 5,3	< 6 600	–	–	aglomeraty CNT / / CNT agglomerates	18
Laboratorium badawcze / Research laboratory obrobka kompozytów zawierających CNT – wiercenie / treatment of CNT containing composites – drilling		~120 000,0	6–560 500–20 000	3,90–11,00 $\times 10^6$	< 686	agregaty CNT / / CNT aggregates	14

LA – ablacja laserowa / laser ablation, HIPCO – wysokociśnieniowe dysproporcjonowanie tlenku węgla / high-pressure carbon monoxide, CVD – chemiczne osadzanie par z fazy gazowej / chemical vapor deposition, SWCNT – jednościennie nanorurki węglowe / single-walled carbon nanotubes, MWCNT – wielościennie nanorurki węglowe / multi-walled carbon nanotubes, TEM – transmisyjny mikroskop elektronowy / transmitting electron microscopy, SEM – skaningowy mikroskop elektronowy / scanning electron microscope.

Myszy C57BL/6J inhalowano przez 3 tygodnie (4 dni/tydzień, 5 godz. dziennie) na MWCNT w stężeniu 5 mg/m^3 . Zaobserwowano, że nanorurki były deponowane głównie w płucach, gdzie wywoływały utrzymujące się zwłóknienia nawet do 336 dni po ustaniu narażenia [22]. Nanorurki z płuc przedostawały się do opłucnej ściennej, mięśni oddechowych, a także do wątroby, nerek, serca i mózgu [23].

Znacznie mniejsze znaczenie w przypadku wchłaniania ma narażenie drogą pokarmową. U szczurów narażanych dożołądkowo na SWCNT i MWCNT przez 28 dni (dzienna dawka odpowiednio $12,5 \text{ mg/kg mc.}$ lub 50 mg/kg mc.) nie zaobserwowano objawów toksyczności. Nanorurki węglowe docierały do jelit w postaci aglomeratów, a większość podanych dawek była wydalana z kałem [24].

Nie ma opublikowanych badań potwierdzających wchłanianie się nanorurek węglowych przez skórę. Nie znaleziono informacji na temat metabolizmu nanorurek węglowych.

Działanie toksyczne na zwierzęta

Nanorurki węglowe w badaniach inhalacyjnych na zwierzętach wywoływały głównie stan zapalny na skutek stresu oksydacyjnego, prowadząc przede wszystkim do zmian w płucach, takich jak zwłóknienia, zmiany ziarniniakowe i rozrostowe. U zwierząt narażanych drogą dermalną główny efekt to stres oksydacyjny wywołujący miejscowy stan zapalny. Najmniej objawów toksyczności zaobserwowano u zwierząt eksponowanych drogą pokarmową.

Droga inhalacyjna

U myszy zaobserwowano wczesne objawy stanu zapalnego i stres oksydacyjny, prowadzący do wielogniskowego, ziarnistego zapalenia płuc i zwłóknień śródmiąższowych. Zwierzęta narażano na nieoczyszczone SWCNT (zawartość żelaza: 17,7%) inhalacyjnie przez 5 godz. dziennie przez 4 dni [25].

Zmiany zapalne i obciążenie płuc nanorurkami wzrastało wraz z wydłużaniem czasu narażenia u myszy, które inhalowano aerozolem MWCNT w stężeniu 10 mg/m^3 przez 5 godz. dziennie przez 2–12 dni. U tych gryzoni mierzono liczbę leukocytów wielojądrowych w popłuczynach płucnych (whole lung lavage – WLL) jako objawy zapalne płuc na skutek narażenia, a także aktywność LDH (lactic dehydrogenase – dehydrogenaza mleczanowa) oraz stężenie albumin w WLL jako marker integralności pęcherzykowej bariery powietrze–krew. Zaobserwowano znaczący

wzrost wszystkich powyższych parametrów u narażanych myszy w porównaniu z grupą kontrolną, w sposób zależny od czasu narażenia. Zmiany histopatologiczne w płucach eksponowanych myszy obejmowały: zapalenie środkowooskrzelikowe, rozrost i przerost nabłonkowo-oskrzelikowy, zwłóknienie, zmiany naczyniowe i niewielką penetrację opłucnej. Opisano translokację MWCNT do lokalnych węzłów chłonnych. Autorzy badania wnioskują, że ostre i przedłużone narażenie na MWCNT może wywoływać zapalenie płuc w stopniu zależnym od dawki, a także zmiany zwłóknieniowe w płucach. Autorzy wskazują również na możliwość docierania nanorurek do opłucnej w następstwie narażenia inhalacyjnego [26].

Nie obserwowano natomiast znaczących objawów stanu zapalnego płuc ani zmian histopatologicznych w płucach w badaniach 14-dniowych. U myszy, które inhalowano aerozolem respirabilnych agregatów MWCNT (w stężeniach $0,3 \text{ mg/m}^3$, 1 mg/m^3 , 5 mg/m^3 przez 7 lub 14 dni), zaobserwowano jednak makrofagi wypełnione czarnymi cząstkami (przeładowane nanorurkami). Wystąpiły natomiast zmiany funkcji układu immunologicznego. U myszy narażanych przez 14 dni na MWCNT w stężeniu $0,3 \text{ mg/m}^3$ zaobserwowano immunosupresję układową, która objawiała się poprzez słabszą odpowiedź na erytrocyty owcze (zmniejszoną liczbą produkowanych przeciwciał zależnych od limfocytów T), jak również zmniejszoną zdolność proliferacji limfocytów T w obecności mitogenu konkanawaliny A. U myszy narażanych na stężenie 1 mg/m^3 zaobserwowano zmniejszoną aktywność komórek NK (natural killer – naturalni zabójcy). Na podstawie analizy ekspresji genów cytokin (interleukiny IL-10, oksydoreduktazy NAD(P)H: chinon 1 (NQO1)) stwierdzono wystąpienie stresu oksydacyjnego w śledzionie, ale nie w płucach [27].

Zmiany zapalne obserwowano także u szczurów, jednak głównie w przypadku narażenia na MWCNT. Szczury F344 narażano inhalacyjnie na MWCNT w stężeniu $0,2 \text{ mg/m}^3$, 1 mg/m^3 i 5 mg/m^3 przez 6 godz. dziennie, 6 dni/tydzień, przez 2 tygodnie. Część zwierząt obserwowano jeszcze przez kolejne 4 tygodnie. Nanorurki były deponowane w płucach we wszystkich narażanych grupach zwierząt i pozostawały tam przez cały okres obserwacji. Zmiany ziarniniakowe w płucach występowały u szczurów narażanych na najwyższe stężenie (5 mg/m^3) i utrzymywały się (lub łagodnie pogarszały) w czasie obserwacji po ustaniu narażenia [28].

U szczurów z grup narażenia $1\text{--}5 \text{ mg/m}^3$ obserwowano zwiększoną liczbę neutrofilów, wyższy odsetek

dwu- i wielojądrowych makrofagów pęcherzykowych, wzrost aktywności fosfatazy alkalicznej oraz stężenia całkowitego białek i albumin w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (bronchoalveolar lavage fluid – BALF). Podwyższone stężenia pozostawały do końca 4-tygodniowego okresu obserwacji. W powyższych grupach ($1\text{--}5\text{ mg/m}^3$) w jamie nosowej i nosowej części gardła wystąpiły rozrosty komórek kubkowych, jednak zmiany te zmniejszały się po ustaniu narażenia. Autorzy badania oszacowali poziom NOAEL (no observable adverse effect level – poziom niewywołujący dających się zaobserwować szkodliwych skutków) na podstawie zmian zapalnych i histopatologicznych dla badań 2-tygodniowych – $0,2\text{ mg/m}^3$ [28].

Z kolei jednościenne nanorurki węglowe nie wywoływały efektów toksycznych u szczurów Wistar. Gryzonie narażano inhalacyjnie na SWCNT (rozmiar agregatów: średnica $0,2\text{ }\mu\text{m}$, długość $0,7\text{ }\mu\text{m}$) w stężeniach $0,03\text{ mg/m}^3$ i $0,13\text{ mg/m}^3$ przez 4 tygodnie i następnie obserwowano do 3 miesięcy po ustaniu narażenia. Nie stwierdzono zmian w parametrach BALF świadczących o stanie zapalnym w płucach [29]. Ta sama grupa badaczy wykazała, że narażenie w podobnych warunkach szczurów na MWCNT (średni rozmiar włókien: średnica 63 nm , długość $1,1\text{ }\mu\text{m}$) w stężeniu $0,37\text{ mg/m}^3$ przez 4 tygodnie wywołało zmiany zapalne w płucach. Włókna wielościennych nanorurek węglowych były rozproszone w porównaniu z jednościennymi, które tworzyły większe agregaty, co mogło wpływać na efekt toksyczny [30].

Zmiany zapalne oraz histopatologiczne obserwowano natomiast u szczurów Wistar, które narażano inhalacyjnie przez 13 tygodni na MWCNT Baytubes® (średnica 10 nm , długość $200\text{--}300\text{ nm}$, struktura splątana). Zwierzęta były ekspozycjonowane przez 6 godz. dziennie, 5 dni/tydzień na respirabilny aerozol nanorurek w stężeniach $0,1\text{ mg/m}^3$, $0,4\text{ mg/m}^3$, $1,5\text{ mg/m}^3$ i 6 mg/m^3 . Badania kinetyczne wykazały opóźniony klirens płuc wywołany przeładowaniem u narażanych szczurów. U zwierząt ekspozycjonowanych na 2 najwyższe stężenia ($1,5\text{ mg/m}^3$, 6 mg/m^3) znacząco zwiększyła się masa płuc oraz lokalnych węzłów chłonnych związanych z płucami (lung-associated lymph nodes – LALN). Zaobserwowano także translokację MWCNT z płuc do LALN [31].

W BALF podwyższony poziom wielojądrowych neutrofilii odnotowano w grupach narażenia $0,4\text{--}6\text{ mg/m}^3$. W tych grupach wystąpiły również zmiany histopatologiczne w górnych i dolnych drogach oddechowych (m.in. rozrost i metaplasja komórek kubkowych, zmia-

ny zapalne w rejonie oskrzelikowo-pęcherzykowym, śródmiąższowe zwłóknienia kolagenowe). Przy najwyższym stężeniu zaobserwowano zmiany ziarninowe oraz rozrost oskrzelikowo-pęcherzykowy. Stężenie $0,1\text{ mg/m}^3$ zostało określone jako NOAEL. Pauluhn [31] sugeruje, że efekt toksyczny działania nanorurek węglowych wynika z efektu przeładowania płuc CNT.

W innym badaniu 90-dniowym nanowłókna węglowe (średnica 158 nm , długość $5,8\text{ }\mu\text{m}$) podawano szczerom inhalacyjnie przez 6 godz. dziennie, 5 dni w tygodniu, w stężeniach $0,5\text{ mg/m}^3$, $2,5\text{ mg/m}^3$ i 25 mg/m^3 . Zwierzęta obserwowano jeszcze przez 3 miesiące po zakończeniu narażenia. Zauważono niewielkie skupiska włókien poza płucami, w stopniu zależnym od stężenia. W grupach narażanych na 2 wyższe stężenia ($2,5\text{ mg/m}^3$, 25 mg/m^3) wystąpił stan zapalny w rejonie oskrzelikowo-pęcherzykowym oraz skupiska makrofagów pęcherzykowych wypełnionych włóknami. Przy stężeniu $2,5\text{ mg/m}^3$ odnotowano niewielką infiltrację komórek zapalnych, a przy 25 mg/m^3 – zapalenie wraz ze zgrubieniem ścian pęcherzyków oraz niewielki rozrost lub przerost pneumocytów typu II. Po okresie rekonwalescencji (3 miesiące) stan zapalny się zmniejszył. U zwierząt narażanych na najniższe stężenie nie zaobserwowano skutków toksycznych, więc stężenie $0,54\text{ mg/m}^3$ ($4,9\text{ włókien/cm}^3$) uznano za NOAEL [32].

W kolejnym 90-dniowym eksperymencie inhalacyjnym szczury narażano na wielościenne nanorurki (Nanocyl NC 7000; średnica $5\text{--}15\text{ nm}$, długość $0,1\text{--}10\text{ }\mu\text{m}$, struktura splątana) przez 6 godz. dziennie, 5 dni w tygodniu w stężeniach $0,1\text{ mg/m}^3$, $0,5\text{ mg/m}^3$ i $2,5\text{ mg/m}^3$. Nie zaobserwowano objawów toksyczności układowej. W grupach narażanych na stężenia $0,5\text{ mg/m}^3$ i $2,5\text{ mg/m}^3$ odnotowano zwiększenie masy płuc, wyraźne wielogniskowe zapalenie ziarniniakowe, rozproszone zapalenie histiocytarne i neutrofilowe oraz lipoproteinozę wewnątrzpęcherzykową w płucach i związanych z nimi węzłach chłonnych LALN. Ponadto u szczurów narażanych na najwyższe stężenie wystąpiła łagodna neutrofilia we krwi. Zmiany te i ich intensywność wzrastały wraz z zastosowanym stężeniem. Nie ustalono poziomu NOAEL ze względu na to, że niewielkie ziarniniakowe zapalenie płuc zaobserwowano nawet przy najniższym stężeniu, tj. $0,1\text{ mg/m}^3$ [33].

Dodatkowe badania histopatologiczne ujawniły, że chociaż u szczurów narażanych na stężenie $0,5\text{ mg/m}^3$ i większe nie wykryto zwiększonej liczby włókien kolagenu w ścianach pęcherzyków, to jednak nieznaczne zwiększenie kolagenu wystąpiło w mikroziarnach (microgranulomas). Nie wykazano też zwiększenia

włókien kolagenu w opłucnej, jedynie nieznaczny wzrost włókien retikuliny w ścianach pęcherzyków płucnych. U 1 ze zwierząt z grupy najniższego narażenia zaobserwowano wzrost kolagenu w ziarnach (granulomas) bez wzrostu ilości retikuliny. Obrazowanie mikroskopem elektronowym ujawniło obecność splecionych nanorurek MWCNT w makrofagach pęcherzykowych. Obserwowano także pojedyncze fagosome z produktami degradacji MWCNT. Nanorurki węglowe były więc degradowane w makrofagach pęcherzykowych, nie utrzymując się cały czas w płucach. Efektem narażenia inhalacyjnego było zapalenie ziarninowe w obrębie mięszu płuc, ale nie w opłucnej. Nie odnotowano więc takich objawów jak przy ekspozycji na azbest – zapalenia opłucnej czy zwłóknienia prowadzących do mezoteliomy [34].

Droga pokarmowa

Szczurom podawano przez zgłębnik nanorurki węglowe w 4 dawkach w odstępach godzinnych. Jednościenne nanorurki węglowe podawano w całkowitej dawce 50 mg/kg mc., a MWCNT – 200 mg/kg mc. Podane dawki nie wywoływały skutków toksycznych, nie odnotowano zgonów zwierząt, więc wartość LD_{50} drogą dożołądkową przekracza zastosowane dawki 50 mg/kg mc. i 200 mg/kg mc. odpowiednio dla SWCNT i MWCNT [24].

Nie zaobserwowano objawów toksyczności u zwierząt również w 28-dniowym badaniu toksyczności nanorurek węglowych podanych drogą pokarmową. Jednościenne i wielościenne nanorurki węglowe podawano przez zgłębnik szczurom w dawkach odpowiednio 0,125–12,5 mg/kg mc. (SWCNT) lub 0,5–50 mg/kg mc. (MWCNT). Dla dawki powtarzanej NOAEL ustalono na poziomie 12,5 mg/kg mc. dla SWCNT oraz 50 mg/kg mc. dla MWCNT [24].

Jednościenne nanorurki węglowe podawano szczurom F344 przez zgłębnik jednorazowo w dawce 0,064 mg/kg mc. lub 0,64 mg/kg mc. w oleju kukurydzianym. U zwierząt nie wystąpiły efekty toksyczne w błonie śluzowej jelit. Zaobserwowano natomiast wzrost stężenia 8-oksoguaniny jako markera oksydacyjnych uszkodzeń DNA w wątrobie i płucach [35].

Droga dermalna

Wykazano, że nanorurki w narażeniu dermalnym u myszy wywoływały stres oksydacyjny, zmniejszenie ilości glutationu, utlenienie grup tiolowych i karbonylowych białek, jak również wzmożoną aktywność mieloperoksydazy. Nagim myszom SKH-1 aplikowa-

no na skórę SWCNT w dawce 40 µg/mysz, 80 µg/mysz lub 160 µg/mysz, przez kolejne 5 dni. U gryzoni zaobserwowano ponadto zwiększenie liczby komórek skóry i zgrubienie wywołane kumulacją leukocytów wielojądrowych i komórek tłuszczowych. Wyniki wskazują na to, że narażenie dermalne na niemodyfikowane SWCNT indukuje powstawanie reaktywnych form tlenu, stres oksydacyjny oraz stan zapalny w obrębie skóry [36].

Odległe efekty działania toksycznego

Działanie mutagenne i genotoksyczne

Nanorurki węglowe (zarówno SWCNT, jak i MWCNT) nie indukowały mutacji w systemach bakteryjnych [37,38].

W teście kometowym zaobserwowano wzrost częstości uszkodzeń DNA w przypadku SWCNT lub MWCNT w wielu liniach komórkowych (fibroblasty chomika chińskiego, komórki embrionalne myszy, mysie makrofagi, ludzkie komórki nabłonka oskrzelowego czy ludzkie fibroblasty skóry) [38,39]. Brak uszkodzeń DNA zaobserwowano w ludzkich limfocytach krwi obwodowej narażanych na SWCNT [40].

Narażenie *in vitro* na MWCNT (średnica ok. 70 nm) wywoływało zwiększoną częstość wymiany chromatyd siostrzanych w komórkach jajowych chomika chińskiego oraz aberracje chromosomowe (liczbowe, brak strukturalnych) [41,42]. Stwierdzono, że SWCNT i MWCNT: Baytubes® oraz Nanotec (średnica 10–30 nm), nie wykazywały działania genotoksycznego (aberracji chromosomowych i zwiększenia częstości wymiany chromatyd siostrzanych) w fibroblastach chomika chińskiego lub ludzkich limfocytach [37,38]. W ludzkich komórkach nabłonka oddechowego eksponowanych na SWCNT zaobserwowano zaburzenia podziałów mitotycznych [43].

W teście mikrojądrowym wyniki dodatnie uzyskano dla ludzkich komórek nabłonka oskrzelowego BEAS2B, ludzkich limfocytów, mysich makrofagów RAW264.7 eksponowanych na SWCNT oraz fibroblastów chomika chińskiego, komórek nabłonka płucnego szczurów, ludzkich limfocytów i mysich makrofagów RAW264.7 inkubowanych z MWCNT [38,44].

W badaniach *in vivo* zaobserwowano dodatnie wyniki testu kometowego u myszy narażanych dotchawiczo, dootrzewnowo, zarówno na SWCNT, jak i MWCNT [39,42,45]. Jednościenne nanorurki węglowe indukowały również uszkodzenia DNA mitochondrialnego u myszy aspirowanych dogardłowo [46]. Poza pęknięciami nici obserwowano też oksydacyjne uszkodzenia DNA w komórkach płuc i wątroby u szczurów narażanych dożołądkowo na SWCNT, a także w ko-

mórkach płuc myszy eksponowanych dotchawczo na MWCNT (średnica 70–110 nm) [35,42].

U myszy narażanych na MWCNT (średnica 15–30 nm) dootrzewnowo zaobserwowano zwiększenie częstości aberracji chromosomowych oraz powstawanie mikrojąder [39,44]. Wyniki ujemne testu mikrojądrowego odnotowano natomiast w komórkach szpiku kostnego myszy narażanych na SWCNT przez zgłębnik [37].

Nanorurki węglowe nie indukowały mutacji w testach bakteryjnych, jednak działały genotoksycznie w wielu testach (kometowym, mikrojądrowym, wymiany chromatyd siostrzanych, aberracji chromosomowych) prowadzonych zarówno na komórkach *in vitro*, jak również u narażanych myszy *in vivo*.

Działanie rakotwórcze

Grupa badaczy pod kierunkiem Nagai [47] badała różne rodzaje MWCNT w kierunku działania rakotwórczego, porównując z włóknami azbestu. Przeprowadzono badania *in vitro* z zastosowaniem komórek mezotelialnych oraz *in vivo* – podając dootrzewnowo szczurom. Badano kilka rodzajów nanorurek różniących się średnicą i sztywnością – splątane, cienkie włókna (średnica 2–20 nm) oraz sztywne o średnicach ok. 50 nm, 115 nm i 140 nm.

W badaniach *in vitro* MWCNT – 50 nm penetrowały komórki, przebijając błony komórkowe, a nawet jądro, inaczej niż włókna azbestu, które ulegały internalizacji. Pozostałe MWCNT nie wywoływały podobnych skutków. Autorzy badali inne czynniki mogące wpływać na cytotoksyczność nanorurek, takie jak: długość włókien, defekty strukturalne, indukowanie wolnych rodników, różna liczba włókien, zanieczyszczenie metalami czy wielkość powierzchni. W wyniku wielu eksperymentów wykazali, że to średnica włókien oraz sztywność są czynnikami krytycznymi, wywołującymi uszkodzenia komórek mezotelialnych [47].

W tych samych badaniach Nagai i wsp. [47] na zwierzętach również wykazano, że MWCNT – 50 nm wywoływały największe efekty toksyczne – włókniste zapalenie otrzewnej i proliferację komórek mezotelialnych. W celu określenia działania rakotwórczego MWCNT szczurom wstrzykiwano 2 dawki dootrzewnowo MWCNT o różnych średnicach w odstępie tygodniowym, po czym obserwowano zwierzęta przez rok. W przypadku MWCNT – 50 nm odnotowano wyższą częstość występowania złośliwych międzybłoniaków i wcześniejszą ich progresję w porównaniu z MWCNT o większej średnicy lub mniejszej sztyw-

ności. Zaobserwowano więc, że nanorurki o średnicy 50 nm są najbardziej toksyczne w badaniach zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [47].

Nagai i wsp. [48] kontynuowali badania, obserwując szczury, którym podawali dootrzewnowo MWCNT (średnica ok. 15 nm, długość 3 μ m, o splątanej strukturze) w wysokiej dawce (dawka całkowita 10 mg/szczura). U żadnego ze szczurów nie zaobserwowano międzybłoniaków w okresie do 3 lat od podania. Tym samym autorzy potwierdzili, że indukowanie międzybłoniaków przez nanorurki wiąże się ściśle z ich właściwościami takimi jak średnica, kształt i sztywność. U szczurów wystąpiły inne typy nowotworów: gruczolak kory nadnerczy, gruczolakowłókniak sutka i nowotwór komórek wysp Langerhansa, rak wątrobowokomórkowy, gruczolak przewodów żółciowych, nowotwory komórek Leydiga oraz gruczolakorak płuc. Większość z tych nowotworów występuje jednak u tej rasy szczurów spontanicznie i autorzy badania nie wiążą tych zachorowań z narażeniem na nanorurki węglowe [48].

W badaniach na samcach szczurów Fisher 344 domosznowo wstrzykiwano MWCNT (średnica ok. 50 nm) w pojedynczej dawce 1 mg/kg mc. U 6/7 zwierząt, które padły przed upływem 4 tygodni, zaobserwowano rozsiiane ogniska międzybłoniaków otrzewnej z krwistym wodobrzuszem. U narażanych szczurów obserwowano przerost i rozrost nabłonka mezotelialnego otrzewnej. Międzybłoniaki naciekały sąsiednie narządy i tkanki, dając często przerzuty do opłucnej [49].

Wielościennie nanorurki węglowe-7 (MWCNT-7) (50 nm) wywoływały międzybłoniaki u heterozygotycznych mutantów myszy (p53 \pm) po podaniu dootrzewnowym. Wykazano zależność dawka–odpowiedź w indukcji międzybłoniaków u heterozygotycznych myszy p53 narażanych dootrzewnowo na MWCNT-7 (50 nm) [50].

Działanie rakotwórcze MWCNT potwierdziły 2-letnie badania na szczurach Wistar, którym dootrzewnowo wstrzykiwano 4 rodzaje wielościennych nanorurek węglowych. Nanorurki węglowe różniły się rozmiarami:

- MWCNT-A – średnica ok. 85 nm, długość 8,5 μ m;
- MWCNT-B – średnica ok. 62 nm, długość 9,3 μ m;
- MWCNT-C – średnica 40 nm, długość 10,2 μ m;
- MWCNT-D – średnica 37 nm, długość 7,9 μ m.

Każdy rodzaj nanorurek podawano w 2 dawkach. Kontrolę ujemną stanowił nośnik, a kontrolę dodatnią – włókna azbestowe – amozytu. Grupy liczyły 50 szczurów. W grupach kontrolnych międzybłoniaki wystąpiły u 2% zwierząt (nośnik) oraz 66% zwierząt (amozyt). We wszystkich grupach narażanych na MWCNT wystąpiły międzybłoniaki, przy czym najmniej u szczurów na-

rażanych na MWCNT-D (40% i 70%). W pozostałych grupach zwierzęta z nowotworami stanowiły 84–98%. Autorzy badania sugerują, że rakotwórczość i toksyczność CNT zależy nie tylko od średnicy, ale i długości, a ponadto kształtu – im bardziej prosty (sztywny), tym większe są właściwości toksyczne [51].

Badania nad działaniem rakotwórczym MWCNT (średnica 100 nm, długość 10 μm) prowadzono także na myszach rasy H2, którym podawano podskórnie nanorurki lub sadzę techniczną. Nie zaobserwowano indukcji nowotworów u myszy narażanych na MWCNT, jedynie pojedynczy guz zapalny w śledzionie u 1 myszy. U zwierząt narażanych na sadzę techniczną z kolei zaobserwowano pojedyncze przypadki nowotworów, jednak bez istotności statystycznej. Oceniono więc, że działanie rakotwórcze MWCNT (średnica 100 nm, długość 10 μm) jest mniejsze niż sadzy technicznej [52].

Varga i Szendi [53] przeprowadzili badania nad działaniem rakotwórczym SWCNT i MWCNT, które podawali dootrzewnowo szczurom F344, po czym obserwowali je przez rok. Wymiary SWCNT: średnica < 2 nm, długość 4–15 μm ; MWCNT: średnica 10–30 nm, długość 4–15 μm . Nie zaobserwowano międzybłoniaków, a jedynie ziarniniaki.

W 2-letnim eksperymencie nie zanotowano międzybłoniaków po podaniu dootrzewnowym szczurom MWCNT (średnica ok. 11 nm, długość ok. 0,7 μm). Kontrolę dodatnią stanowiły włókna azbestu – krokidolitu, które w podobnych warunkach indukowały międzybłoniaki u 35% narażanych szczurów [44].

Grupa robocza IARC (International Agency for Research on Cancer – Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem) przeprowadziła ocenę działania rakotwórczego nanorurek węglowych. Eksperci wskazują na istniejące badania potwierdzające takie działanie CNT na gryzoniach. Szczególny rodzaj wielościennych nanorurek węglowych MWCNT-7 (o średnicy ok. 50 nm) wywoływał międzybłoniaki otrzewnej u samic i samców szczura po 1-krotnym podaniu dootrzewnowym [47], po podaniu domosznym [49] oraz u samców myszy p53 \pm w 2 badaniach (podanie dootrzewnowe) [50]. Stwierdzono ponadto, że MWCNT-7 inhalacyjnie mogą być czynnikiem ułatwiającym promocję raków i gruczolaków pęcherzykowo-oskrzelikowych u samców myszy [54]. Jednocześnie nie ma informacji na temat rakotwórczego działania CNT u ludzi [55].

Badania na gryzoniach dostarczają dowodów na możliwość translokacji MWCNT do opłucnej [22]. Ponadto obserwowano u gryzoni, w następstwie narażenia inhalacyjnego na MWCNT lub SWCNT, ostre lub

utrzymujące się zapalenie płuc, tworzenie się ziarniaków, zwłóknień oraz rozrost oskrzelikowy i pęcherzykowo-oskrzelikowy [31].

Biorąc pod uwagę powyższe badania, zdaniem ekspertów grupy IARC istnieją wystarczające dowody na działanie rakotwórcze MWCNT-7, ograniczone dowody dla innych typów MWCNT (o podobnych rozmiarach) oraz nie ma wystarczających dowodów dla SWCNT. Eksperci IARC uznali ponadto, że mechanizm toksyczności CNT może dotyczyć również człowieka, jednak trudno jednoznacznie stwierdzić, czy mechanizm rakotwórczości obserwowany u zwierząt będzie występował także u ludzi i czy będzie on wspólny dla różnych rodzajów CNT. Grupa robocza IARC zaklasyfikowała więc konkretny rodzaj nanorurek, MWCNT-7, do grupy 2B (o możliwym działaniu rakotwórczym na człowieka), a pozostałe rodzaje jedno- i wielościennych nanorurek węglowych do grupy 3 – nieklasyfikowanych pod względem rakotwórczości dla człowieka [55].

Badania na zwierzętach dotyczące działania rakotwórczego nanorurek węglowych wskazują, że niektóre MWCNT mogą działać na komórki mezotelialne podobnie do włókien azbestu. Zależy to jednak od różnych czynników, takich jak rozmiar (średnica i długość nanorurek), sztywność oraz modyfikacje powierzchniowe [38].

Działanie embriotoksyczne, teratogenne, wpływ na rozrodczość

Niemodyfikowane nanorurki węglowe nie wpływały na płód ciężarnych myszy i szczurów, niezależnie od drogi podania. Nanorurki węglowe z podstawnikami hydrofilowymi mogły jednak pokonywać barierę krew-łożysko u ciężarnych myszy i działały embriotoksycznie.

W badaniach samic myszy C57BL/6J, którym dołączawczo podano MWCNT – NM-400 (średnica ok. 10 nm, długość ok. 200–1000 nm) przed kojarzeniem z samcami, nie obserwowano zmian u płodów. U samic-matek wystąpiły objawy toksyczności – zmiany patologiczne w płucach i wątrobie [56].

Narażenie drogą pokarmową ciężarnych samic szczura (6–19. dnia ciąży) na MWCNT (CM-95, średnica 10–15 nm, długość ok. 20 μm) w dawce 1000 mg/kg mc. nie wywoływało skutków embriotoksycznych [57].

Jednościenne nanorurki węglowe modyfikowane grupą hydroksylową (średnica 1–2 nm, długość 5–30 μm) podawano ciężarnym samicom myszy CD-1 przez zgłębnik w 9. dniu ciąży (podczas organogenezy) w jednorazowej dawce 10 mg/kg mc. lub 100 mg/kg mc. Zaobserwowano statystycznie istotne różnice między gru-

pą kontrolną a grupą narażaną dawką 10 mg/kg mc. w liczbie płodów, które uległy resorpcji oraz płodów z nieprawidłowościami w budowie szkieletu [58].

Badano wpływ SWCNT w formie niezmodyfikowanej oraz utlenionej na rozwój zarodkowy u myszy, którym wstrzykiwano dożylnie w 6. dobie ciąży. Najniższą dawką działającą toksycznie na płód było 3,3 µg/kg mc. Wyższy odsetek poronień oraz płodów z nieprawidłowościami zaobserwowano u myszy narażanych na zmodyfikowane nanorurki węglowe (utlenione). W łożyskach nieprawidłowych płodów oraz w samych płodach odnotowano zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu, czego nie obserwowano w organizmach matek. W grupie kontrolnej nie wystąpiły żadne z opisywanych objawów toksyczności [59].

Utlenione wielościennie nanorurki węglowe (oMWCNT – średnica 10–30 nm, długość 1–2 µm) w następstwie narażenia prenatalnego (po wstrzyknięciu dożylnym ciężarnym samicom myszy) mogą przedostawać się przez barierę krew–łożysko do płodów, w których kumulują się głównie w wątrobie, płucach i sercu. Zaobserwowano, że oMWCNT obniżają stężenie progesteronu, zwiększając przy tym stężenie estradiolu w surowicy matek. Qi i wsp. [60] wykazali, że wpływ oMWCNT na płód zależy od dawki i maleje wraz z kolejnymi dniami ciąży. Wykazano, że narażenie na oMWCNT powodowało zwężenie naczyń krwionośnych oraz zmniejszenie ich liczby w łożysku. Zmiany w funkcjonowaniu łożyska opóźniały wzrost płodów, wywoływały uszkodzenia w sercu i mózgu, a także zwiększały liczbę poronień.

Dopuszczalne poziomy narażenia w środowisku pracy dla nanorurek węglowych

Nie ma prawnie obowiązujących normatywów higienicznych w środowisku pracy dla nanorurek węglowych. Istnieją jednak propozycje światowych ekspertów dotyczące jednościennych lub wielościennych nanorurek węglowych oraz nanowłókien. Najwięcej propozycji dotyczy MWCNT, których wartości mieszczą się w przedziale 1–80 µg/m³. Są to propozycje zarówno dla szczególnych rodzajów nanorurek, takich jak Baytubes[®] czy Nanocyl NC 7000, jak i ogólne poziomy dla SWCNT lub MWCNT (organizacja NEDO – New Energy and Industrial Technology Development Organization – Organizacja Rozwoju Nowych Energii i Technologii Przemysłowych) oraz wspólna wartość dla nanorurek węglowych i nanowłókien (NIOSH – National Institute for Occupational Safety and Health – Narodowy Instytut Bezpieczeństwa i Higieny Pracy).

Dla MWCNT Baytubes[®] dopuszczalny poziom narażenia zawodowego został opracowany przez Pauluhna [61]. Podstawą tego szacowania jest 13-tygodniowy eksperyment inhalacyjny na szczurach, które narażano na nanorurki Baytubes[®] (średnica 10–15 nm, długość 200–1000 nm) o stężeniu 11 mg/m³ i 241 mg/m³ [31]. Obserwacje prowadzono przez okres 3 lub 6 miesięcy po ustaniu ekspozycji. Przyjęty w tym eksperymencie efekt krytyczny to przewlekły stan zapalny będący skutkiem przeciążenia płuc i upośledzenia funkcji ich oczyszczania.

Do ekstrapolacji wyników do odpowiednich stężeń dla człowieka wykorzystano różnice depozytów pęcherzykowych, wentylacji i zdolności akumulacji cząstek w zależności od czasu (półokresu oczyszczania płuc z cząstek). Wewnątrzgatunkowe zróżnicowanie jest pomijane ze względu na brak biodostępności nanorurek Baytubes[®] oraz na mechanizm toksyczności związany z przeciążeniem płuc niezależnym od metabolizmu. Zróżnicowanie związane z czasem narażenia jest uwzględnione w różnicach międzygatunkowych w kinetyce retencji i stopniu przeładowania makrofagów pęcherzykowych. Po wzięciu pod uwagę poziomu NOAEL = 0,1 mg/m³ i ogólnego współczynnika uwzględniającego zróżnicowanie międzygatunkowe, wynoszącego 2, otrzymano dopuszczalny poziom narażenia zawodowego OEL (occupational exposure limit) równy 0,05 mg/m³ [61].

Luizi [62] oszacował OEL dla MWCNT Nanocyl NC 7000 (średnica 5–15 nm, długość 100 nm–10 µm). Dopuszczalny poziom został wyznaczony w oparciu o 13-tygodniowy eksperyment inhalacyjny na szczurach, w którym zwierzęta narażano na MWCNT w stężeniach 0,1 mg/m³, 0,5 mg/m³, i 2,5 mg/m³ [33]. Jako efekt krytyczny opisano zmiany zapalne oraz rozwój ziarnistości w płucach i okolicznych węzłach chłonnych. Pojedyncze ziarnistości związane ze stanem zapalnym w płucach zaobserwowano nawet przy najniższym zastosowanym stężeniu, więc stężenie 0,1 mg/m³ zostało uznane jako LOAEC (lowest observed adverse effect concentration – najniższe stężenie skutkujące niepożądanymi efektami). Biorąc pod uwagę współczynnik ogólny: 40 (brak szczegółowych opisów), oszacowany OEL wyniósł 2,5 µg/m³.

Efektom pracy japońskich ekspertów pod kierunkiem Junko Nakanishi w ramach projektu Organizacji Rozwoju Nowych Energii i Technologii Przemysłowych (NEDO) są wartości zawodowych poziomów dopuszczalnych dla jedno- i wielościennych nanorurek węglowych [63].

Za podstawę wyliczeń dopuszczalnego poziomu dla MWCNT przyjęto 4-tygodniowe badanie inhalacyjne na szczurach. Zwierzętom podawano wielościennie nanorurki węglowe (średnica 30 nm, długość > 1 μm , powierzchnia właściwa 69 m^2/g) o stężeniu 0,37 mg/m^3 , po zakończeniu ekspozycji obserwację prowadzono przez 3, 28 i 91 dni [30]. Objawy stanu zapalnego w płucach przyjęto jako efekt krytyczny. Wobec braku powyższych zmian zastosowane stężenie przyjęto jako NOAEL. Wartość współczynnika uwzględniającego zróżnicowanie międzygatunkowe: 3 – oparto na różnicach w długość dziennej ekspozycji, objętości oddechowej płuc, frakcji depozytywnej nanoobjektów w płucach i powierzchni pęcherzyków płucnych. Zastosowano także współczynnik uwzględniający ekstrapolację z narażenia podprzewlekłego do przewlekłego – 2. W rezultacie otrzymano OEL równy 0,08 mg/m^3 [63].

Podstawą szacowania OEL dla jednościennych nanorurek węglowych jest badanie 4-tygodniowe inhalacyjne na szczurach, które poddano działaniu SWCNT (średnica 3 nm, długości nie określono, powierzchnia właściwa 1064 m^2/g) o stężeniu 0,03 mg/m^3 i 0,13 mg/m^3 [29]. Za efekt krytyczny przyjęto objawy stanu zapalnego w płucach, jednak nie zaobserwowano powyższych zmian u narażonych zwierząt przez okres do 3 miesięcy po zakończeniu ekspozycji, więc 0,13 mg/m^3 przyjęto jako NOAEL. Po zastosowaniu analogicznych współczynników otrzymano wartość: OEL – 0,03 mg/m^3 [63].

Eksperti NIOSH oszacowali rekomendowany poziom narażenia zawodowego dla nanorurek i nanowłókien węglowych z wykorzystaniem modelowania ryzyka przy użyciu dawki wyznaczającej BMD (benchmark dose – dawka wyznaczająca). W oparciu o wyniki 13-tygodniowych badań toksyczności MWCNT u szczurów [31,32] ustalono, że u osób pracujących 45 lat w narażeniu na nanorurki o stężeniu 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ryzyko wczesnych zmian w płucach zwiększa się o 0,5–16%. Wyliczone ryzyko na podstawie innych badań na zwierzętach z udziałem jedno- lub wielościennych nanorurek szacuje się na podobnym poziomie. Rekomendowany przez NIOSH poziom narażenia na nanorurki węglowe i nanowłókna to 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ mierzony jako stężenie węgla w 8-godzinnej frakcji respirabilnej [64].

WNIOSKI

Nanorurki węglowe są zróżnicowaną grupą nanoobjektów zarówno pod względem budowy i rozmiarów (jedno-, wielościennie), kształtu (sztywne włók-

na, splątana nić), jak i właściwości. Biorąc pod uwagę jeszcze olbrzymie możliwości modyfikacji, jak również obecność zanieczyszczeń, które mogą wpływać na toksyczność, ustalenie jednego normatywu dla tej grupy wydaje się nieosiągalne. Różnorodność wyników badań eksperymentalnych dotyczących działania toksycznego, m.in. rakotwórczego czy embriotoksycznego, skłania do tego, żeby każdy rodzaj nanorurek był traktowany jak oddzielna substancja, wymagająca osobnego szacowania normatywu, jak w przypadku nanorurek Baytubes®.

Inną kwestią jest miara, która powinna być wyrażona stężeniem liczbowym (liczba włókien w jednostce objętości powietrza) lub stężeniem powierzchniowym. Niezbędne wydaje się również obrazowanie mikroskopem elektronowym w celu identyfikacji włókien i ich agregatów czy aglomeratów.

Najważniejsze jest jednak stosowanie środków kontroli ryzyka, m.in. w postaci odpowiedniej wentylacji, która, jak wynika z badań prowadzonych na stanowiskach pracy, jest niezbędna, żeby zminimalizować potencjalne ryzyko niekorzystnego wpływu nanorurek węglowych na zdrowie pracowników.

PIŚMIENNICTWO

1. Poland C., Hankin S., de Brouwere K., van Holderberke M.: Carbon nanotubes criteria document for the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits (SCOEL). Raport końcowy. European Commission Joint Research Centre, Ispra 2012
2. The European Chemicals Agency [Internet]: Agency, Helsinki 2016 [cytowany 6 lipca 2016]. Adres: <http://echa.europa.eu>
3. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 127/2008 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 UE z 2008 r., L 353
4. National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme: Human health. Hazard assessment and classification of carbon nanotubes [Internet]: Safe Work Australia, Canberra 2010 [cytowany 6 lipca 2016]. Adres: http://www.safeworkaustralia.gov.au/sites/SWA/about/Publications/Documents/725/Human_Health_Hazard_Assessment_and_Classification_of_Carbon_%20Nanotubes.pdf
5. Łukaszczyk P.: Badania nad technologią separacji i dyspersji jednościennych nanorurek węglowych na metaliczne i półprzewodnikowe [praca doktorska]. Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie,

- Szczecin 2013 [cytowany 6 lipca 2016]. Adres: http://zbc.ksiaznica.szczecin.pl/Content/29501/Pawe%C5%82%20%C5%81ukaszczyk%20PhD_Final_13-06-10.pdf
6. Zapór L.: Zagrożenia nanomateriałami w przemyśle tworzyw sztucznych. Zalecenia do oceny i ograniczania ryzyka zawodowego [Internet]: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa 2013 [cytowany 6 lipca 2016]. Adres: https://www.ciop.pl/.../chempyl_Tworzywa_sztuczne_nanomaterialy.pdf
 7. European Commission, Commission Staff Working Paper: Types and uses of nanomaterials, including safety aspects [Internet]: Commission, Brussels 2012 [cytowany 6 lipca 2016]. Adres: http://ec.europa.eu/health/nanotechnology/docs/swd_2012_288_en.pdf
 8. Czerwińska M.: Zastosowanie nanomateriałów w przemyśle zbrojeniowym. *CHEMIK* 2014;68(6):536–543
 9. Stankiewicz N., Lelusz M.: Nanotechnologia w budownictwie – przegląd zastosowań. *BIS/CEE* 2014;5(3):101–112
 10. Maynard A.D., Baron P.A., Foley M., Shvedova A.A., Kisin E.R., Castranova V.: Exposure to carbon nanotube material: Aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. *J. Toxicol. Environ. Health A* 2004;67(1):87–107, <https://doi.org/10.1080/15287390490253688>
 11. Han J.H., Lee E.J., Lee J.H., So K.P., Lee Y.H., Bae G.N. i wsp.: Monitoring multiwalled carbon nanotube exposure in carbon nanotube research facility. *Inhal. Toxicol.* 2008;20(8):741–749, <https://doi.org/10.1080/08958370801942238>
 12. Bello D., Hart A.J., Ahn K., Hallock M., Yamamoto N., Garcia E.J. i wsp.: Particle exposure levels during CVD growth and subsequent handling of vertically-aligned carbon nanotube films. *Carbon* 2008;46(6):974–977, <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2008.03.003>
 13. Bello D., Wardle B.L., Yamamoto N., deVilloria R.G., Garcia E.J., Hart A.J. i wsp.: Exposure to nanoscale particles and fibers during machining of hybrid advanced composites containing carbon nanotubes. *J. Nanopart. Res.* 2009;11(1):231–249, <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9499-4>
 14. Bello D., Wardle B.L., Zhang J., Yamamoto N., Santeufemio C., Hallock M. i wsp.: Characterization of exposures to nanoscale particles and fibers during solid core drilling of hybrid carbon nanotube advanced composites. *Int. J. Occup. Environ. Health* 2010;16(4):434–450, <https://doi.org/10.1179/oeh.2010.16.4.434>
 15. Lee J.H., Lee S.B., Bae G.N., Jeon K.S., Yoon J.U., Ji J.H. i wsp.: Exposure assessment of carbon nanotube manufacturing workplaces. *Inhal. Toxicol.* 2010;22(5):369–381, <https://doi.org/10.3109/08958370903367359>
 16. Tsai S.J., Hofman M., Hallock M., Ada E., Kong J., Ellenbecker M.: Characterization and evaluation of nanoparticle release during the synthesis of single-walled and multiwalled carbon nanotubes by chemical vapor deposition. *Environ. Sci. Technol.* 2009;43(15):6017–6023, <https://doi.org/10.1021/es900486y>
 17. Ogura I., Sakurai H., Mizuno K., Gamo M.: Release potential of single-wall carbon nanotubes produced by super-growth method during manufacturing and handling. *J. Nanopart. Res.* 2011;13(3):1265–1280, <https://doi.org/10.1007/s11051-010-0119-8>
 18. Takaya M., Ono-Ogasawara M., Shinohara Y., Kubota H., Tsuruoka S., Koda S.: Evaluation of exposure risk in the weaving process of MWCNT-coated yarn with real-time particle concentration measurements and characterization of dust particles. *Ind. Health* 2012;50(2):147–155, <https://doi.org/10.2486/indhealth.MS1312>
 19. Hedmer M., Karedal M., Gustavsson P., Rissler J.: The Nordic Expert Group for Criteria Documentation of Health Risks from Chemicals. 148. Carbon nanotubes. *Arbete och Hälsa* 2013;47(5)
 20. Ingle T., Dervishi E., Biris A.R., Mustafa T., Buchanan R.A., Biris A.S.: Raman spectroscopy analysis and mapping the biodistribution of inhaled carbon nanotubes in the lungs and blood of mice. *J. Appl. Toxicol.* 2013;33(10):1044–1052, <https://doi.org/10.1002/jat.2796>
 21. Ryman-Rasmussen J.P., Cesta M.F., Brody A.R., Shipley-Phillips J.K., Everitt J.I., Tewksbury E.W. i wsp.: Inhaled carbon nanotubes reach the subpleural tissue in mice. *Nat. Nanotechnol.* 2009;4(11):747–751, <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.305>
 22. Mercer R.R., Scabilloni J.F., Hubbs A.F., Battelli L.A., McKinney W., Friend S. i wsp.: Distribution and fibrotic response following inhalation exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Part. Fibre Toxicol.* 2013;10:33, <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-33>
 23. Mercer R.R., Scabilloni J.F., Hubbs A.F., Wang L., Battelli L.A., McKinney W. i wsp.: Extrapulmonary transport of MWCNT following inhalation exposure. *Part. Fibre Toxicol.* 2013;10:38, <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-38>
 24. Matsumoto M., Serizawa H., Sunaga M., Kato H., Takahashi M., Hirata-Koizumi M. i wsp.: No toxicological effects on acute and repeated oral gavage doses of single-wall or multi-wall carbon nanotube in rats. *J. Toxicol. Sci.* 2012;37(3):463–474, <https://doi.org/10.2131/jts.37.463>
 25. Shvedova A.A., Kisin E., Murray A.R., Johnson V.J., Gorelik O., Arepalli S. i wsp.: Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: Inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *Am. J. Physiol.*

- Lung Cell. Mol. Physiol. 2008;295(4):L552–565, <https://doi.org/10.1152/ajplung.90287.2008>
26. Porter D.W., Hubbs A.F., Chen B.T., McKinney W., Mercer R.R., Wolfarth M.G. i wsp.: Acute pulmonary dose-responses to inhaled multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology* 2013;7(7):1179–1194, <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.719649>
 27. Mitchell L.A., Gao J., Wal R.V., Gigliotti A., Burchiel S.W., McDonald J.D.: Pulmonary and systemic immune response to inhaled multiwalled carbon nanotubes. *Toxicol. Sci.* 2007;100(1):203–214, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm196>
 28. Umeda Y., Kasai T., Saito M., Kondo H., Toya T., Aiso S. i wsp.: Two-week toxicity of multi-walled carbon nanotubes by whole-body inhalation exposure in rats. *J. Toxicol. Pathol.* 2013;26(2):131–140, <https://doi.org/10.1293/tox.26.131>
 29. Morimoto Y., Hirohashi M., Kobayashi N., Ogami A., Horie M., Oyabu T. i wsp.: Pulmonary toxicity of well-dispersed single-wall carbon nanotubes after inhalation. *Nanotoxicology* 2012;6(7):766–775, <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.620719>
 30. Morimoto Y., Hirohashi M., Ogami A., Oyabu T., Myojo T., Todoroki M. i wsp.: Pulmonary toxicity of well-dispersed multi-wall carbon nanotubes following inhalation and intratracheal instillation. *Nanotoxicology* 2012;6(6):587–599, <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.594912>
 31. Pauluhn J.: Subchronic 13-week inhalation exposure of rats to multiwalled carbon nanotubes: toxic effects are determined by density of agglomerate structures, not fibrillar structures. *Toxicol. Sci.* 2010;113(1):226–242, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp247>
 32. DeLorme M.P., Muro Y., Arai T., Banas D.A., Frame S.R., Reed K.L. i wsp.: Ninety-day inhalation toxicity study with a vapor grown carbon nanofiber in rats. *Toxicol. Sci.* 2012;128(2):449–460, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs172>
 33. Ma-Hock L., Treumann S., Strauss V., Brill S., Luizi F., Mertler M. i wsp.: Inhalation toxicity of multiwall carbon nanotubes in rats exposed for 3 months. *Toxicol. Sci.* 2009;112(2):468–481, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp146>
 34. Treumann S., Ma-Hock L., Gröters S., Landsiedel R., van Ravenzwaay B.: Additional histopathologic examination of the lungs from a 3-month inhalation toxicity study with multiwall carbon nanotubes in rats. *Toxicol. Sci.* 2013;134(1):103–110, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft089>
 35. Folkmann J.K., Risom L., Jacobsen N.R., Wallin H., Loft S., Møller P.: Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to C60 fullerenes and single-walled carbon nanotubes. *Environ. Health Perspect.* 2009;117(5):703–708, <https://doi.org/10.1289/ehp.11922>
 36. Murray A.R., Kisin E., Leonard S.S., Young S.H., Kommineni C., Kagan V.E. i wsp.: Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes. *Toxicology* 2009;257(3):161–171, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.12.023>
 37. Naya M., Kobayashi N., Mizuno K., Matsumoto K., Ema M., Nakanishi J.: Evaluation of the genotoxic potential of single-wall carbon nanotubes by using a battery of *in vitro* and *in vivo* genotoxicity assays. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2011;61(2):192–198, <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.07.008>
 38. Toyokuni S.: Genotoxicity and carcinogenicity risk of carbon nanotubes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013;65(15):2098–2110, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.05.011>
 39. Patlolla A., Knighten B., Tchounwou P.: Multi-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis in normal human dermal fibroblast cells. *Ethn. Dis.* 2010;20(1, Supl. 1):S1-65-72
 40. Zeni O., Palumbo R., Bernini R., Zeni L., Sarti M., Scarfi M.R.: Cytotoxicity investigation on cultured human blood cells treated with single-wall carbon nanotubes. *Sensors* 2008;8(1):488–499, <https://doi.org/10.3390/s8010488>
 41. Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Takaya M., Koda S., Nagano K. i wsp.: Genotoxicity and cytotoxicity of multi-wall carbon nanotubes in cultured Chinese hamster lung cells in comparison with chrysotile A fibers. *J. Occup. Health* 2010;52(3):155–166, <https://doi.org/10.1539/joh.L9150>
 42. Kato T., Totsuka Y., Ishino K., Matsumoto Y., Tada Y., Nakae D. i wsp.: Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both *in vitro* and *in vivo* assay systems. *Nanotoxicology* 2013;7(4):452–461, <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.674571>
 43. Sargent L.M., Hubbs A.F., Young S.H., Kashon M.L., Dinu C.Z., Salisbury J.L. i wsp.: Single-walled carbon nanotube-induced mitotic disruption. *Mutat. Res.* 2012;745(1–2):28–37, <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.11.017>
 44. Muller J., Decordier I., Hoet P.H., Lombaert N., Thomasen L., Huaux F. i wsp.: Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis* 2008;29(2):427–433, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm243>
 45. Jacobsen N.R., Møller P., Jensen K.A., Vogel U., Ladefoged O., Loft S. i wsp.: Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE^{-/-} mice. *Part. Fibre Toxicol.* 2009;6:2, <https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-2>
 46. Li Z., Hulderman T., Salmen R., Chapman R., Leonard S.S., Young S.H.: Cardiovascular effects of pulmonary exposure

- to single-wall carbon nanotubes. *Environ. Health Perspect.* 2007;115(3):377–382, <https://doi.org/10.1289/ehp.9688>
47. Nagai H., Okazaki Y., Chew S.H., Misawa N., Yamashita Y., Akatsuka S. i wsp.: Diameter and rigidity of multi-walled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011;108(49):E1330–1338, <https://doi.org/10.1073/pnas.1110013108>
48. Nagai H., Okazaki Y., Chew S.H., Misawa N., Miyata Y., Shinohara H. i wsp.: Intraperitoneal administration of tangled multiwalled carbon nanotubes of 15 nm in diameter does not induce mesothelial carcinogenesis in rats. *Pathol. Int.* 2013;63(9):457–462, <https://doi.org/10.1111/pin.12093>
49. Sakamoto Y., Nakae D., Fukumori N., Tayama K., Maekawa A., Imai K. i wsp.: Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Sci.* 2009;34(1): 65–76, <https://doi.org/10.2131/jts.34.65>
50. Takagi A., Hirose A., Futakuchi M., Tsuda H., Kanno J.: Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. *Cancer Sci.* 2012;103(8):1440–1444, <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02318.x>
51. Rittinghausen S., Hackbarth A., Creutzenberg O., Ernst H., Heinrich U., Leonhardt A. i wsp.: The carcinogenic effect of various multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) after intraperitoneal injection in rats. *Part. Fibre Toxicol.* 2014;11:59, <https://doi.org/10.1186/s12989-014-0059-z>
52. Takanashi S., Hara K., Aoki K., Usui Y., Shimizu M., Haniu H. i wsp.: Carcinogenicity evaluation for the application of carbon nanotubes as biomaterials in rasH2 mice. *Sci. Rep.* 2012;2:498, <https://doi.org/10.1038/srep00498>
53. Varga C., Szendi K.: Carbon nanotubes induce granulomas but not mesotheliomas. *In Vivo.* 2010;24(2):153–156
54. Sargent L.M., Porter D.W., Staska L.M., Hubbs A.F., Lowry D.T., Battelli L. i wsp.: Promotion of lung adenocarcinoma following inhalation exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Part. Fibre Toxicol.* 2014;11:3, <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-3>
55. Grosse Y., Loomis D., Guyton K.Z., Lauby-Secretan B., El Ghissassi F., Bouvard V. i wsp.: Carcinogenicity of fluoro-edenite, silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes. *Lancet Oncol.* 2014;15(13):1427–1428, [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71109-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71109-X)
56. Hougaard K.S., Jackson P., Kyjovska Z.O., Birkedal R.K., de Temmerman P.J., Brunelli A. i wsp.: Effects of lung exposure to carbon nanotubes on female fertility and pregnancy. A study in mice. *Reprod. Toxicol.* 2013;41:86–97, <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.05.006>
57. Lim J.H., Kim S.H., Shin I.S., Park N.H., Moon C., Kang S.S. i wsp.: Maternal exposure to multi-wall carbon nanotubes does not induce embryo-fetal developmental toxicity in rats. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 2011;92(1):69–76, <https://doi.org/10.1002/bdrb.20283>
58. Philbrook N.A., Walker V.K., Afrooz A.R., Saleh N.B., Winn L.M.: Investigating the effects of functionalized carbon nanotubes on reproduction and development in *Drosophila melanogaster* and CD-1 mice. *Reprod. Toxicol.* 2011;32(4):442–448, <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.09.002>
59. Pietroiusti A., Massimiani M., Fenoglio I., Colonna M., Valentini F., Palleschi G. i wsp.: Low doses of pristine and oxidized single-wall carbon nanotubes affect mammalian embryonic development. *ACS Nano.* 2011;5(6):4624–4633, <https://doi.org/10.1021/nn200372g>
60. Qi W., Bi J., Zhang X., Wang J., Wang J., Liu P. i wsp.: Damaging effects of multi-walled carbon nanotubes on pregnant mice with different pregnancy times. *Sci. Rep.* 2014;4:4352, <https://doi.org/10.1038/srep04352>
61. Pauluhn J.: Multi-walled carbon nanotubes (Baytubes®): Approach for derivation of occupational exposure limit. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2010;57:78–89, <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2009.12.012>
62. Luizi F.: Responsible care and nanomaterials case study nanocyl [Internet]: European Responsible Care Conference. 21–23 października 2009; Praga, Czechy [cytowany 6 lipca 2016]. Adres: http://www.cefic.org/Documents/ResponsibleCare/04_Nanocyl.pdf
63. Nakanishi J. [red.]: Risk assessment of manufactured nanomaterials – Carbon Nanotubes (CNT). New Energy and Industrial Technology Development Organization, 2011
64. National Institute for Occupational Safety and Health: Occupational exposure to carbon nanotubes and nanofibers. Current Intelligence Bulletin 65 [Internet]: Institute 2013 [cytowany 6 lipca 2016]. Adres: <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2013-145/pdfs/2013-145.pdf>