

Anna Maria Świdwińska-Gajewska
Sławomir Czerczak

NANOZŁOTO – DZIAŁANIE BIOLOGICZNE I DOPUSZCZALNE POZIOMY NARAŻENIA ZAWODOWEGO

NANOGOLD – 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

Nanozłoto różni się właściwościami i działaniem biologicznym od złota metalicznego. Może ono znaleźć zastosowanie w wielu dziedzinach, takich jak medycyna, diagnostyka laboratoryjna czy elektronika. Z badań przeprowadzonych na zwierzętach laboratoryjnych wynika, że nanozłoto może się wchłaniać drogą oddechową i pokarmową. Może penetrować w głąb naskórka i skóry właściwej, ale nie ma dowodów, że wchłania się przez skórę. Nanoobiekty złota kumulują się głównie w wątrobie i śledzionie, ale mogą docierać do innych narządów wewnętrznych. Nanozłoto może pokonywać bariery krew–mózg i krew–łożysko. Toksykokinetyka nanozłota zależy od wielkości cząstek, kształtu oraz ładunku powierzchniowego. U zwierząt narażanych drogą inhalacyjną nanocząstki złota wywoływały niewielkie zmiany w płucach. Podawane drogą pokarmową nie powodowały negatywnych skutków zdrowotnych u gryzoni. U zwierząt, którym wstrzykiwano dootrzewnowo nanoobiekty złota, obserwowano zmiany w wątrobie i płucach. Wykazano genotoksyczność nanozłota w badaniach *in vitro* na komórkach, ale nie potwierdzono takiego działania u zwierząt. Nie zaobserwowano szkodliwego wpływu nanoobiektów na płód czy rozrodczość. Nie ma badań dotyczących działania rakotwórczego nanocząstek złota. Mechanizm działania toksycznego nanozłota może być związany z jego oddziaływaniem z białkami i DNA, co w efekcie prowadzi do indukowania stresu oksydacyjnego lub uszkodzeń materiału genetycznego. Wpływ nanostruktur na zdrowie człowieka nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony. Osoby pracujące z nanomateriałami powinny zachować szczególną ostrożność i stosować istniejące zalecenia przy ocenie narażenia zawodowego na nanoobiekty. Przeprowadzona ocena ryzyka powinna stanowić podstawę do podejmowania odpowiednich działań ograniczających potencjalne narażenie na nanometale, w tym również nanozłoto. Med. Pr. 2017;68(4):545–556

Słowa kluczowe: nanocząstki, narażenie zawodowe, nanoobiekty, toksyczność, nanozłoto, toksykokinetyka

ABSTRACT

Nanogold has different properties and biological activity compared to metallic gold. It can be applied in many fields, such as medicine, laboratory diagnostics and electronics. Studies on laboratory animals show that nanogold can be absorbed by inhalation and ingestion. It can penetrate deep into the epidermis and dermis, but there is no evidence that it is absorbed through the skin. Gold nanoobjects accumulate mainly in the liver and spleen, but they can also reach other internal organs. Nanogold can cross the blood–brain and blood–placenta barriers. Toxicokinetics of nanogold depends on the particle size, shape and surface charge. In animals exposure to gold nanoparticles via inhalation induces slight changes in the lungs. Exposure to nanogold by the oral route does not cause adverse health effects in rodents. In animals after injection of gold nanoobjects changes in the liver and lungs were observed. Nanogold induced genotoxic effects in cells, but not in animals. No adverse effects on the fetus or reproduction were found. There are no carcinogenicity studies on gold nanoparticles. The mechanism of toxicity may be related to the interaction of gold nanoobjects with proteins and DNA, and it leads to the induction of oxidative stress and genetic material damage. The impact of nanostructures on human health has not yet been fully understood. The person, who works with nanomaterials should exercise extreme caution and apply existing recommendations on the evaluation of nanoobjects exposure. The risk assessment should be the basis for taking appropriate measures to limit potential exposure to nanometals, including nanogold. Med Pr 2017;68(4):545–556

Key words: nanoparticles, occupational exposure, nanoobjects, toxicity, nanogold, toxicokinetics

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: Anna.Gajewska@imp.lodz.pl
Nadesłano: 20 lipca 2016, zatwierdzono: 18 października 2016

WSTĘP

Nanotechnologia jest jedną z szybciej rozwijających się dyscyplin ostatnich lat. Substancje wcześniej dobrze

poznane w skali makro okazują się zupełnie nowym materiałem w skali nano, o odmiennych właściwościach i szerokich możliwościach aplikacyjnych. Nowoczesne metody i techniki, pozwalające syntetyzować

Finansowanie / Funding: w ramach dotacji na działalność statutową, zadanie nr IMP 24.15/2015 pt. „Analiza ryzyka związanego z nanotechnologiami pod kątem wyznaczenia dopuszczalnych poziomów w środowisku pracy dla 4 substancji w postaci nanocząstek”. Kierownik tematu: mgr Anna Maria Świdwińska-Gajewska.

i badać nanostruktury, są wykorzystywane przez zespoły ekspertów z całego świata do wytwarzania nowoczesnych materiałów, które mogą znaleźć zastosowanie w wielu różnorodnych dziedzinach.

Złoto jest metalem znanym od lat jako substancja obojętna i nietoksyczna. Nie znajduje się ona 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 [1]. Złoto nie zostało także zaklasyfikowane przez rejestrujących (w ramach rozporządzenia REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals – w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów)) ze względu na działanie na zdrowie człowieka czy środowisko [2]. Klasyfikacja ta dotyczy jednak złota w postaci makroskopowej.

Nanoobiekty złota mogą wykazywać zupełnie inne właściwości. Nanozłoto może przybierać różnorodne kształty, występuje w szerokim zakresie rozmiarów, a także bardziej lub mniej rozwiniętej strukturze (porowatości). Powierzchnia podlega różnym modyfikacjom, dzięki czemu nanoobiekty złota mogą mieć charakter hydrofilowy lub hydrofobowy, a także posiadać ładunek dodatni lub ujemny. Dzięki wielu możliwościom funkcjonalizacji tych nanoobjektów metal ten znajduje coraz więcej zastosowań [3].

Nanozłoto, dzięki niewielkim rozmiarom i reaktywnej powierzchni, wchodzi w interakcje z molekułami biologicznymi, wiążąc swoiste grupy. W ten sposób wykorzystuje się nanocząstki złota w wykrywaniu wirusów, bakterii i innych patogenów w kolorymetrycznych czujnikach przydatności do spożycia w przemyśle spożywczym. Zdolność swoistego wiązania białek przez nanozłoto jest wykorzystywana w diagnostyce laboratoryjnej do wykrywania biomarkerów chorób serca, nowotworów, zakażeń, a także w testach immunoenzymatycznych w rozmaitych badaniach, m.in. testach ciążowych czy narkotykowych [4].

Duże możliwości aplikacyjne dla nanozłota stwarza medycyna w obszarze dostarczania leków. Opłaszczony nanocząstki złota wiążą na powierzchni różne czynniki ułatwiające dotarcie do wnętrza komórki, co potencjalnie można stosować zarówno

przy wykrywaniu, jak i zwalczaniu komórek nowotworowych. Nanocząstki złota wydzielają ciepło po naświetlaniu światłem (o długości fali 700–800 nm), dzięki czemu działają jako czynnik fototermiczny w terapii fotodynamicznej, zwalczając komórki nowotworowe. Wzmacniają również dawkę w radioterapii [5].

W diagnostyce obrazowej z kolei nanocząstki złota mogą być znacznikami, rozpraszając światło i przyjmując różne barwy. Możliwe jest również zastosowanie nanozłota w transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Zalety nanozłota dostrzeżono także w kosmetologii. Częstki te mogą pomagać w regeneracji tkanki skórnej, opóźniając procesy starzenia [5].

Nanozłoto służy jako katalizator w reakcjach chemicznych. Rozbudowana powierzchnia jego cząstek jest używana do selektywnego utleniania. Szerokie zastosowanie znajduje również w elektronice. Nanocząstki złota służą jako przewodnik w przewodzących atramentach, łącznik rezystorów czy innych elementów w układach elektronicznych. Ponadto są stosowane w ogniwach fotowoltaicznych, stymulując rezonans plazmonowy i zwiększając wydajność konwersji energii słonecznej [5].

Nanozłoto, podobnie jak inne nanoobiekty, znajduje coraz więcej zastosowań. Zwiększa się także liczba badań i procesów technologicznych z udziałem nanoobjektów złota. Wiąże się to również z występowaniem narażenia zawodowego. Dzięki wielu możliwościom funkcjonalizacji powierzchni nanocząstek złota mogą one posiadać różnorodne właściwości, które wpływają także na toksyczność [3]. Warto więc przyjrzeć się szkodliwym skutkom działania biologicznego nanoobjektów złota w organizmach żywych.

METODY PRZEGLĄDU

Przeгляdu piśmiennictwa dokonano w internetowych bazach recenzowanych czasopism naukowych, m.in. EBSCO Discovery Service (EDS), stosując słowa kluczowe: gold nanoparticles application, toxicity, toxicokinetics, exposure, occupational exposure limits (zastosowanie nanocząstek złota, toksyczność, toksykokinetyka, narażenie, dopuszczalne poziomy narażenia zawodowego), oraz dostępnych danych internetowych. W przygotowaniu niniejszego opracowania wykorzystano prace dotyczące działania biologicznego nanozłota i jego zastosowania, narażenia zawodowego, a także dopuszczalnych poziomów narażenia.

WYNIKI PRZEGLĄDU

Rodzaje i właściwości nanoobjektów złota

Nanoobjekty złota występują w kształcie kulistym – sfery, wydłużonym – nanopręty, nanokable, a także innych (nanomuszele, nanoklatki czy nanogwiazdy). Rozmiary nanoobjektów złota są różnorodne, począwszy nawet od 1 nm (klaster kilku atomów) do 200 nm. Na właściwości nanozłota wpływa głównie jego modyfikacja, ponieważ niefunkcjonalizowane cząstki nanozłota są rzadko wykorzystywane. Najczęściej są opłaszczane niewielkimi cząsteczkami, jak cytrynian, polimerami czy peptydami. Mogą być ponadto modyfikowane grupami karboksylowymi lub aminowymi w celu nadania ładunku. Za pomocą sekwencyjnej adsorpcji polielektrolitów na powierzchni nanocząstek złota powstają polimerowe nanokapsuły pokryte przeciwnie naładowanymi multiwarstwami. Proces ten umożliwia różnorodne modyfikacje powierzchniowe, w zależności od zastosowania w układach biologicznych. Są to cząstki zarówno hydrofobowe, jak i hydrofilowe, o ładunku ujemnym bądź dodatnim. Wszystkie te modyfikacje wyraźnie wpływają na działanie biologiczne, wchłanianie, rozmieszczenie czy oddziaływanie z komórkami, a nawet materiałem genetycznym [6].

Wchłanianie nanocząstek złota drogą oddechową i pokarmową

Z badań na szczurach wynika, że nanocząstki złota mogą wchłaniać się drogą oddechową oraz z przewodu pokarmowego, jednak wydajność tego procesu zależy w dużym stopniu od wielkości cząstek. Schleh i wsp. [7] zaobserwowali, że po 2-godzinnej inhalacji myszy aerozolem nanozłota o średnicy 20 nm cząstki pozostawały w płucach (oczyszczanie rzęskowe niewielkiego stopnia) i w krótkim czasie ulegały translokacji do krwi i narządów wewnętrznych.

Yu i wsp. [8] inhalowali szczury przez 5 dni aerozolem nanocząstek (30–110 nm) w stężeniu 2×10^6 cząstek/cm³. U narażanych zwierząt zaobserwowano znaczący wzrost liczby cząstek nanozłota w płucach i opuszcze wężowej w porównaniu z grupą kontrolną. Po 15 dniach złoto wykryto w płucach, przełyku, nerkach, śledzionie, sercu i we krwi obwodowej.

Han i wsp. [9] również zaobserwowali wchłanianie nanocząstek złota drogą oddechową, przy czym wykazali różnice w zależności od zastosowanej wielkości cząstek. Szczury Sprague-Dawley inhalowano przez 5 dni, 6 godz./dzień aerozolem nanocząstek złota (13 nm)

w stężeniu 13 µg/m³ i cząstek (10⁵ nm) w stężeniu 15 µg/m³. Zwierzęta obserwowano do 28 dni po zakończeniu narażenia. Obydwa rodzaje cząstek były deponowane głównie w płucach. Cząstki o mniejszym rozmiarze szybciej docierały jednak do innych (wtórnych) narządów wewnętrznych. Cząstki o większej średnicy wykryto głównie we krwi, podczas gdy mniejsze – w wątrobie, śledzionie, mózgu i jądrach. Półokres eliminacji z płuc był znacznie krótszy w przypadku mniejszych cząstek.

Kreyling i wsp. [10] podawali dotchawczo szczurom nanocząstki złota w różnych rozmiarach (1,4 nm, 2,8 nm, 18 nm, 80 nm, 200 nm) bądź o odmiennym ładunku – ujemnie lub dodatnio naładowane cząstki o średnicy 2,8 nm (modyfikowane grupami karboksylowymi lub aminowymi). Uczeń badali następnie rozmieszczenie złota po 1 godz., 3 godz. i 24 godz. i wykazali, że w przypadku cząstek o średnicy 1,8–80 nm mniejsze cząstki łatwiej pokonują barierę powietrze–krew, odwrotnie proporcjonalnie do średnicy. Inaczej zachowywały się cząstki o średnicy 200 nm – wchłaniały się szybciej niż te o wielkości 80 nm. W badaniach z zastosowaniem odmiennie naładowanych cząstek o średnicy 2,8 nm wykazano, że cząstki naładowane ujemnie wykazywały szybszą translokację od cząstek naładowanych dodatnio.

Semmler-Behnke i wsp. [11] podawali wodną zawiesinę nanocząstek złota o średnicy 1,4 nm lub 18 nm dotchawczo szczurom i zaobserwowali, że do 25% cząstek zostało usunięte z płuc poprzez oczyszczanie rzęskowe lub wtórne połknięcie i wydalone przez układ pokarmowy wraz z kałem. Na podstawie rozmieszczenia w poszczególnych narządach i materiale biologicznym (wątrobie, nerkach, skórze oraz krwi i moczu) oceniono, że drobniejsze nanocząstki złota (1,4 nm) przechodziły przez barierę powietrze–krew układu oddechowego w znacznym stopniu, podczas gdy cząstki 18 nm były prawie w całości zatrzymywane w płucach.

Schleh i wsp. [12] podawali szczurom doprzelykowo cząstki o różnej wielkości i ładunku. Stosowano cząstki o średnicy: 1,4 nm, 5 nm, 18 nm, 80 nm lub 200 nm oraz o średnicy 2,8 nm i ładunku dodatnim lub ujemnym. Zwierzęta badano po 24 godz. Ogólnie największą kumulację w narządach wtórnych zaobserwowano w przypadku najmniejszych cząstek (1,4 nm). W mózgu i sercu wykryto jednak najwięcej cząstek o średnicy 18 nm. W badaniach z zastosowaniem cząstek z odmiennym ładunkiem odnotowano wyższą zawartość cząstek naładowanych ujemnie.

Jo i wsp. [13] porównali wchłanianie nanocząstek złota z jonami złota u szczurów narażanych drogą

pokarmową przez 14 dni. W badaniach stosowano nanocząstki złota o średnicy 5–15 nm, naładowane ujemnie. Wykazano, że nanocząstki złota docierały do krwioobiegu wolniej i kumulowały się w nerkach. Jony złota natomiast wchłaniały się do krwi szybciej, po czym docierały również do nerek (w większej ilości niż nanocząstki). Obecność jonów odnotowano również w wątrobie, płucach i śledzionie.

Przenikanie nanocząstek złota przez skórę

Nie ma badań potwierdzających wchłanianie nanocząstek złota przez skórę u zwierząt. Na podstawie eksperymentów *ex vivo* zaobserwowano, że nanozłoto może penetrować w głąb naskórka i skóry właściwej. Fernandes i wsp. [14,15] badali przenikanie różnych typów nanocząstek złota przez skórę ludzką i myszy *ex vivo*. Celem eksperymentów było sprawdzenie wpływu kształtu, ładunku i funkcjonalizacji nanozłota na zdolność penetracji. W badaniach stosowano nanocząstki kuliste o średnicy 15 nm, pokryte glikolem polietylenowym (polyethylene glycol – PEG) lub peptydami penetrującymi komórkę (cell-penetrating peptide – CPP), oraz nanopęty o rozmiarach 55×20 nm modyfikowane PEG. W celu uzyskania ładunków na powierzchni nanoobjektów powłoka PEG była modyfikowana grupami aminowymi (ładunek dodatni) lub karboksylowymi (ładunek ujemny). Nanocząstki złota wykryto w naskórku i skórze właściwej. Fernandes [15] wykazała, że pęty nanozłota łatwiej wnikały w skórę niż cząstki kuliste. Zaobserwowała także, że nanocząstek z dodatnim ładunkiem przenikało 2–6 razy więcej niż cząstek naładowanych ujemnie. Fernandes [15] odnotowała ponadto nawet 10-krotnie zwiększoną penetrację peptydowo-modyfikowanych nanocząstek złota w porównaniu z cząstkami pokrytymi PEG.

Lee i wsp. [16] w badaniach *in vitro* w komorze dyfuzyjnej Franza wykorzystali odpowiednik ludzkiej skóry – „EpiDerm”, i nanopęty złota o rozmiarach 18×40 nm, modyfikowane powierzchniowo z zastosowaniem syntetycznych polielektrolitów: bromku heksadecylotrimetyloamoni (cetyltrimethylammonium bromide – CTAB), polistyrenosulfonianu (poly(sodium-4-styrenesulfonate) – PSS) i chlorku polidiallilodimetyloamoni (poly(diallyldimethylammonium chloride) – PDADMAC). Zaobserwowano, że więcej anionowych nanopętów złota wniknęło do warstwy rogowej w porównaniu z nanopętami kationowymi ($p < 0,01$).

Labouta i wsp. [17] badali wnikanie w skórę kulistych cząstek o charakterze hydrofilowym lub hydrofobowym o średnicy 6 nm lub 15 nm, w wycinkach skóry

ludzkiej od pacjentów po abdominoplastyce. Badacze wykazali większą penetrację nanocząstek o średnicy 6 nm w porównaniu z cząstkami wielkości 15 nm. Nanocząstki zaobserwowano głównie w warstwie rogowej naskórka. Zaobserwowano ponadto, że powierzchnia hydrofobowa zwiększa penetrację nanocząstek złota w skórze, które docierały do warstwy ziarnistej naskórka.

Rozmieszczenie nanozłota w narządach wewnętrznych

Miejscom kumulacji nanoobjektów złota u zwierząt laboratoryjnych są głównie wątroba i śledziona. Pozostałe narządy, w których wykrywano nanozłoto, to nerki, płuca, trzustka, serce, jądra i mózg. W wielu badaniach przeprowadzonych na gryzoniach wykazano, że sposób rozmieszczenia nanoobjektów złota w narządach wewnętrznych zależał od wielkości cząstek, kształtu, ładunku powierzchniowego i modyfikacji.

Terentyuk i wsp. [18] wstrzykiwali dożylnie szczurom i królikom cząstki koloidalnego złota pokryte PEG o średnicy 15 nm lub 50 nm oraz krzemowo-złote nanomuszki o średnicy 160 nm. Cząstki o większym rozmiarze wykryto głównie w wątrobie i śledzionie, podczas gdy mniejsze docierały do wielu innych narządów. Podobne wyniki uzyskali również De Jong i wsp. [19], którzy podawali szczurom dożylnie nanocząstki złota o średnicy: 10 nm, 50 nm, 100 nm i 250 nm. Po 24 godz. badano zwierzęta. W wątrobie i śledzionie wykryto wszystkie rodzaje cząstek, natomiast te o średnicy 10 nm stwierdzono ponadto w nerkach, jądrach, grasicy, sercu, płucach i mózgu.

Zróznicowanie rozmieszczenia nanozłota wykazali również Sonavane i wsp. [20] w badaniach na myszach, którym wstrzykiwali dożylnie nanocząstki (15 nm, 50 nm, 100 nm, 200 nm). Zwierzęta badano po 24 godz. W wątrobie, płucach i śledzionie kumulowały się wszystkie rodzaje cząstek. Zawartość nanozłota w innych narządach była zależna od rozmiaru. Cząstki o rozmiarach 15 nm i 50 nm wyraźnie pokonywały barierę krew–mózg (obie wielkości wykryto w mózgu). Cząstki w rozmiarze 15 nm obserwowano jeszcze w sercu i żołądku. Zawartość cząstek o największej średnicy – 200 nm, w narządach była znikoma. Najwyższą zawartość nanozłota odnotowano dla cząstek o wielkości 15 nm.

Lasagna-Reeves i wsp. [21] zaobserwowali zależną od dawki kumulację nanocząstek złota (12,5 nm) w wątrobie, nerkach, śledzionie, płucach i mózgu po dootrzewnym podawaniu myszom C57/BL6 przez 8 dni na-

nozłota w dziennych dawkach: 40 µg/kg mc., 200 µg/kg mc. i 400 µg/kg mc. U zwierząt nie wystąpiły objawy toksyczności. Autorzy zwracają szczególną uwagę na pokonywanie przez nanocząstki złota bariery krew-mózg.

Sun i wsp. [22] badali wpływ kształtu nanoobjektów złota na ich rozmieszczenie u myszy szczepu KM, którym wstrzykiwano jednorazową dawkę nanozłota w kształcie sfer, sześciątów lub prętów i obserwowano do 14 dni. Porównując rozmieszczenie nanoobjektów złota, najwięcej wykryto ich w wątrobie, głównie w postaci prętów, zdecydowanie mniej – pozostałych struktur. Drugim narządem pod względem zawartości badanej substancji była śledziona, w której przeważały z kolei sześciiany nanozłota. W płucach i nerkach wykryto nieznaczne ilości nanozłota, bez widocznej różnicy w udziale różnych kształtów.

Zhang i wsp. [23] również opisali różnice w rozmieszczeniu nanoobjektów złota o różnych kształtach. Badali oni występowanie nanozłota w kształcie: klastrów (mniejsze cząstki), prętów i sfer (większe cząstki) u myszy, którym wstrzykiwali dożylnie pojedynczą dawkę (0,5 mg/kg mc.). Nanopręty i nanosfery wykryto głównie w wątrobie i śledzionie, a nanoklastry – w wątrobie i nerkach.

Hirn i wsp. [24] podawali szczurom dożylnie nanocząstki o zróżnicowanej średnicy (1,4 nm, 5 nm, 18 nm, 80 nm, 200 nm) lub ładunku (ujemnie lub dodatnio naładowane cząstki wielkości 2,8 nm). Największą zawartość obserwowano w wątrobie i śledzionie, mniejszą w płucach, nerkach, sercu, mózgu i macicy. Najwięcej wykryto nanocząstek o najmniejszej średnicy (1,4 nm). Cząstki naładowane również kumulowały się głównie w wątrobie i śledzionie, jednak w wątrobie przeważały cząstki naładowane ujemnie, a w śledzionie – dodatnio.

Lee i wsp. [25] badali zależność modyfikacji powierzchniowych nanocząstek złota o średnicy 15 nm. Mysiom wstrzykiwano dożylnie (1 mg/kg mc.) cząstki złota opłaszczane PEG – obojętne oraz modyfikowane grupami karboksylowymi (ładunek ujemny) lub aminowymi (ładunek dodatni). Gryzoniom badano po upływie okresu od 30 min do 6 miesięcy po narażeniu. Wykazano zróżnicowanie rozmieszczenia nanocząstek w zależności od modyfikacji. Najwyższą zawartość nanocząstek obojętnych wykryto w węzłach chłonnych krezki, nerkach, mózgu i jądrach. Ujemnie naładowane cząstki kumulowały się głównie w wątrobie, a dodatnio – w śledzionie, płucach i sercu. Zaobserwowano także wpływ modyfikacji powierzchniowych na kinetykę przepływu krwi oraz wydalanie cząstek złota.

Moraes i wsp. [26] badali biodystrybucję nanocząstek złota (20 nm) zróżnicowanych pod względem modyfikacji powierzchniowych. Wykazano, że nanozłoto kuluje się głównie w wątrobie u szczurów, a opłaszczanie peptydowe wyraźnie zwiększa wychwytywanie nanozłota przez ten narząd. Szczurom wstrzykiwano dootrzewnowo nanocząstki opłaszczane: cytrynianem, kwasem merkaptoundekainowym (mercapto-undecanoic acid – MUA) i pentapeptydami o sekwencjach: CALNN, CALND i CALNS (C – cysteina, A – alanina, L – leucyna, N – asparagina, D – kwas asparaginowy, S – seryna). Cząstki z cytrynianem były najszybciej usuwane z krwiobiegu i po upływie 30 min od narażenia kumulowały się głównie w wątrobie (60%). W płucach wykryto 6% podanej dawki, a w śledzionie – 2,6%. Po 24 godz. od narażenia zawartość nanozłota zmniejszała się, jednak nadal najwięcej wykryto w wątrobie, dalej w śledzionie i we krwi. Podobny profil rozmieszczenia stwierdzono w przypadku cząstek pokrytych MUA. Obserwowano natomiast wyraźnie większą zawartość nanocząstek złota pokrytych peptydami w wątrobie po 24 godz. (74–86%). Analiza transmisyjnym mikroskopem elektronowym wykazała obecność nanocząstek w endosomach hepatocytów i komórek Browicza-Kupffera.

Efekty toksyczne nanoobjektów złota

Sung i wsp. [27] narażali inhalacyjnie szczury Sprague-Dawley (całe ciało) na 3 stężenia aerozolu nanocząstek złota (4–5 nm): $2,36 \times 10^4$ cząstek/cm³, $2,36 \times 10^5$ cząstek/cm³ i $1,85 \times 10^6$ cząstek/cm³ (odpowiednio: 0,04 µg/m³, 0,38 µg/m³ i 20,02 µg/m³). Narażenie trwało 6 godz./dzień, 5 dni/tydzień, przez 90 dni. Zaobserwowano zmiany w testach mierzących czynność płuc: objętość oddechowa i minutowa wykazywały tendencje do zmniejszania się w miarę wzrostu stężenia w porównaniu z grupą kontrolną. Badania histopatologiczne wykazały niewielki naciek zapalny w pęcherzykach płucnych i zwiększoną liczbę makrofagów płucnych u zwierząt narażanych na najwyższe stężenie. Rozmieszczenie tkankowe złota wykazywało zależność od dawki w płucach i nerkach. Zaobserwowano także zależność od płci zwierząt. Większą zawartość w nerkach odnotowano u samic (we wszystkich narażanych grupach), a u samic eksponowanych na najwyższą dawkę zaobserwowano zwiększenie zawartości złota w mózgu w porównaniu z samcami.

Nie zaobserwowano negatywnych skutków u szczurów po narażeniu nanocząstkami złota drogą pokarmową. Jo i wsp. [13] nie wykazali objawów toksyczności

w badaniach histopatologicznych, hematologicznych i biochemicznych u szczurów. Zwierzętom przez 14 dni podawano przez zgłębnik naładowane ujemnie nanocząstki złota o średnicy 5–15 nm. Podobne obserwacje opisali Venkatpurwar i wsp. [28], oceniając toksyczność nanocząstek złota modyfikowanych porfiranem. Po 28 dniach podawania drogą pokarmową nanocząstek o średnicy 14 nm nie wystąpiły zmiany w masie ciała, parametrach hematologicznych i biochemicznych u szczurów.

Rambanapasi i wsp. [29] podawali szczurom dożylnie zawieszinę nanocząstek złota o średnicy 14 nm raz na tydzień przez 7 tygodni (w dawce 2,25 µg/kg mc., 22,5 µg/kg mc. lub 0,22 mg/kg mc.). Nanocząstki wykryto głównie w wątrobie, mniejszą liczbę w płucach i śledzionie. Nie odnotowano jednak zmian w stężeniach lub aktywności markerów hepato- i nefrotoksyczności (aminotransferazy alaninowej (ALAT) i asparaginianowej (AspAT), bilirubiny, kreatyniny i mocznika). Nie zaobserwowano również zmian histopatologicznych w obrazach wątroby, nerek, śledziony i płuc.

Zmiany histopatologiczne w wątrobie zaobserwowali natomiast Abdelhalim i Jarrar [30], narażając szczury Wistar-Kyoto dootrzewnowo na nanocząstki złota o średnicy 10 nm, 20 nm lub 50 nm przez 3 dni lub 7 dni. W porównaniu z grupą kontrolną u narażanych szczurów wystąpiły zmiany w hepatocytach, w obrębie triady wątrobowej i sinusoid wątroby. Zaobserwowano zwyrodnienie, obrzmienie i stłuszczenie hepatocytów, naciek komórek zapalnych oraz zastoinowe rozszerzenie środkowych żył zrazików wątrobowych. Nasilenie zmian było zależne od wielkości cząstek, najbardziej widoczne były w przypadku narażenia na cząstki 10 nm.

Doudi i Setorki [31] opisali negatywne skutki w płucach i wątrobie u szczurów Wistar, które otrzymywały przez 7 dni nanocząstki złota (5–10 nm) dootrzewnowo. Zaobserwowano zwiększenie aktywności ALAT i AspAT w surowicy narażanych szczurów. Zmiany histopatologiczne w wątrobie obejmowały skupiska bazoofilów wokół żyły centralnej i uszkodzenie wątroby. W płucach narażanych zwierząt wystąpiły uszkodzenia pęcherzyków.

Sun i wsp. [22] badali wpływ kształtu nanoobjektów złota na efekty toksyczne u myszy KM, którym wstrzykiwano jednorazową dawkę nanozłota w kształcie kul, sześciąt lub prętów i które obserwowano do 14 dni. U myszy oceniano żywotność, spłycenie oddechu, drgawki, wygięcie grzbietu, mniejsze spożycie paszy, biegunki i wymioty. Wykonano badania bio-

chemiczne surowicy – pomiar aktywności enzymów: ALAT i AspAT, fosfatazy alkalicznej, cholinoesterazy, a także stężenia bilirubiny całkowitej, białka całkowitego, kreatyniny i azotu mocznikowego. Do badań histopatologicznych pobierano wątrobę, śledzionę, płuca i nerki. Najwięcej skutków toksycznych wywołało nanozłoto w kształcie prętów. U myszy, które otrzymały ten rodzaj nanozłota, poza biegunkami i wymiotami obserwowano wszystkie efekty w średnim nasileniu (skróconą żywotność, spłycenie oddechu, drgawki, wygięcie grzbietu i mniejsze spożycie paszy). Najłagodniej działały kuliste nanocząstki złota – poza umiarkowanym skróceniem żywotności wystąpiło jeszcze łagodne spłycenie oddechu i drgawki. Żaden z badanych parametrów biochemicznych nie odbiegał od normy, co wskazuje na brak wpływu podanych nanoobjektów na czynność wątroby i nerek. Potwierdziły to również badania histopatologiczne, w żadnym z badanych narządów (wątrobie, nerkach, śledzionie i płucach) nie zaobserwowano zmian.

Dam i wsp. [32] badali toksyczność nanoobjektów złota w kształcie gwiazd o średnicy ok. 50 nm, modyfikowanych powierzchniowo aptamerem DNA lub/i opłaszczonych PEG i bez modyfikacji (4 grupy). Nanoobjekty wstrzyknięto szczurom w dawkach 0,48–48 mg/kg mc. Złoto wykryto w wątrobie i śledzionie, w niewielkiej ilości również w nerkach i mózgu. Nie wykazano jednak żadnych nieprawidłowości w parametrach biochemicznych, świadczących o zaburzeniach tych narządów. Obrazy histopatologiczne były bez zmian.

Wpływ nanozłota na rozrodczość

Badania przeprowadzone na ciężarnych samicach myszy i szczurów dowodzą, że nanocząstki złota mogą pokonywać barierę krew-łożysko i przedostawać się do płodów. Nie zaobserwowano jednak efektów embriotoksycznych ani teratogennych. Nie ma danych dotyczących szkodliwego działania nanozłota na płodność u zwierząt.

Semmler-Behnke i wsp. [33] opisali badanie przeprowadzone na ciężarnych samicach szczura, którym w 18. dniu ciąży wstrzykiwano ujemnie naładowane nanocząstki złota o średnicy 1,4 nm, 18 nm lub 80 nm w dawkach, odpowiednio, 5 µg/szczura, 3 µg/szczura lub 27 µg/szczura. Nanocząstki podawano również nieciężarnym samicom, stanowiącym grupę kontrolną. Zwierzęta badano po 24 godz. od narażenia. U ciężarnych samic zawartość złota w macicy była o 1 rząd wielkości wyższa niż u nieciężarnych samic. Poza tym

zaobserwowano zależny od wielkości transport nanocząstek z krwi matki do płodów: przez barierę krew-łożysko lub transtrofoblastycznie – przez wody płodowe.

Yang i wsp. [34] obserwowali efekty narażenia na nanocząstki złota zróżnicowane pod względem modyfikacji powierzchniowych na rozmieszczenie u płodów myszy w różnych etapach ciąży. Eksperymentatorzy podawali nanozłoto dożylnie myszom w okresie 5–15. dnia ciąży. Nanocząstki średnicy 13 nm były modyfikowane ferrytyną, PEG lub cytrynianem. Stwierdzono wyraźną kumulację nanocząstek złota w płodach narażonych myszy do 11. dnia ciąży, a w późniejszym okresie – zmniejszenie ilości tej substancji. Były to głównie nanocząstki złota pokryte ferrytyną i PEG, najmniej w organizmach płodów było cząstek złota związanych z cytrynianem. Nie odnotowano żadnych objawów toksyczności nanozłota na płody.

W kolejnej pracy Yang i wsp. [35] obserwowali rozmieszczenie, wydalanie i objawy toksyczności u ciężarnych i nieciążarnych myszy CD-1. Zwierzęta badano po 5 godz. od 1-krotnego, dożylnego wstrzyknięcia nanocząstek złota o zróżnicowanej średnicy (0,5 nm, 4,5 nm, 13 nm, 30 nm i 70 nm). Wykazano zależność rozmieszczenia i wydalania od wielkości cząstek (porównywalnie u ciężarnych i nieciążarnych myszy). Cząstki o średnicy 4,5 nm wykryto głównie w nerkach, mniej w wątrobie, jeszcze mniej w sercu i płucach. Z kolei nanocząstki 30 nm kumulowały się przede wszystkim w płucach, dalej w wątrobie, a najmniej w nerkach i sercu. Najszybszej eliminacji z moczem ulegały cząstki 4,5 nm, a najwolniejszej – 30 nm. Wydaje się, że narażenie na różne wielkości nanocząstek złota nie wywołuje efektów toksycznych (wzrostu śmiertelności, zmienionego zachowania, zmniejszonej masy ciała, zmian morfologicznych narządów poza płucami, krótszego czasu trwania ciąży). Cząstki o średnicy 30 nm powodowały jednak wystąpienie u myszy zmian podobnych do obserwowanych przy rozedmie płuc.

Działanie genotoksyczne nanozłota

Wyniki badań dotyczących działania genotoksycznego nanocząstek złota nie są jednoznaczne. Pajino i wsp. [36] wykazali działanie genotoksyczne nanocząstek złota w badaniach *in vitro* przeprowadzonych na ludzkich komórkach raka wątrobowokomórkowego HepG2 i jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (peripheral blood mononuclear cell – PBMC). W eksperymencie stosowano 2 rodzaje cząstek złota o średnicy 7–20 nm – opłaszczane cytrynianem sodu, naładowane ujemnie oraz modyfikowane powierzch-

niowo dendrymerami poliamidoaminowymi o ładunku dodatnim. Oba rodzaje nanocząstek złota wywoływały uszkodzenia DNA w teście kometowym w obu rodzajach komórek.

Działania genotoksycznego nie potwierdziły natomiast badania *in vivo*. Schulz i wsp. [37] podali dotychczasowo szczurom Wistar 18 µg nanocząstek złota o średnicy 2 nm, 20 nm i 200 nm. Po 72 godz. przeprowadzono test mikrojądrowy i test kometowy na komórkach szpiku i płuc. Wyniki testów były ujemne. Zaobserwowano jedynie niewielkie zmiany histopatologiczne w płucach po narażeniu na cząstki 20 nm i 200 nm. Autorzy sugerują, że nanocząstki złota nie działają genotoksycznie ani nie wywołują szkodliwych następstw miejscowych i ogólnych.

Mechanizm działania toksycznego nanoobjektów złota

Parametry, które wpływają na toksyczność nanoobjektów złota, to przede wszystkim rozmiar, kształt i modyfikacje powierzchniowe. Rozmiar, jak również stopień aglomeracji, sedimentacji czy dyfuzji, wpływa na ich interakcje z komórkami. Także kształt nanozłota wywiera wpływ na ich działanie: kulisty okazuje się mniej cytotoksyczny niż wydłużony. Kluczowym parametrem wydają się jednak modyfikacje powierzchniowe. Wiele białek może spontanicznie wiązać się z powierzchnią nanocząstek złota, tworząc korony białkowe i ułatwiając przemieszczanie się do wnętrza komórek. Ujemnie naładowane nanocząstki złota łatwiej ulegają internalizacji w komórce na drodze endocytozy. Nanocząstki naładowane dodatkowo mogą wiązać się z ujemnymi cząsteczkami DNA, prowadząc do ich uszkodzeń. Cząstki o średnicy 1,4 nm swoim rozmiarem odpowiadają wielkości większego rowka DNA, co zwiększa ryzyko tworzenia adduktów i działania genotoksycznego tych nanocząstek [6].

Abdelhalim i Jarrar [30] na podstawie badań histopatologicznych i obserwacji zmian w hepatocytach nasilających się wraz ze zmniejszaniem średnicy cząstek stwierdzili, że nanocząstki złota – wchodząc w interakcje z białkami, szczególnie z enzymami – zaburzają mechanizmy antyoksydacyjne, prowadząc do zwiększenia generowania reaktywnych form tlenu i stresu oksydacyjnego. W efekcie może dojść do zaniku hepatocytów i martwicy w wątrobie.

Khan i wsp. [38] badali wpływ nanocząstek złota na markery stresu oksydacyjnego: stężenie zredukowanego glutationu (glutathione – GSH) i malonodialdehydu (malonodialdehyde – MDA) w różnych narządach.

W tym celu szczurom Wistar-Kyoto wstrzykiwano dootrzewnowo zawiesinę nanocząstek złota (średnica 10 nm), raz dziennie, przez 3 lub 7 kolejnych dni. Po 24 godz. pobierano do badań wątrobę, płuca i serce. Odnotowano istotne statystycznie ($p = 0,01$) zwiększenie stężenia MDA w wątrobie u szczurów narażanych na nanozłoto przez 3 dni lub 7 dni, w porównaniu z grupą kontrolną. Nie zaobserwowano różnicy w stężeniu MDA w płucach i sercu, jak również w stężeniu GSH we wszystkich badanych narządach. Khan i wsp. stwierdzili, że nanocząstki złota wywoływały peroksydację lipidów na skutek stresu oksydacyjnego w wątrobie, czego nie obserwowano w pozostałych badanych narządach.

Porównanie toksyczności nanocząstek srebra i złota

Z uwagi na możliwe podobieństwo działania biologicznego nanozłota do nanosrebra grupy badaczy porównały skutki działania nanocząstek obu metali.

Katsnelson i wsp. [39] przeprowadzili badanie porównawcze działania nanocząstek złota i srebra. Stabilne zawiesiny nanocząstek złota i srebra, o średniej średnicy, odpowiednio, 50 nm i 49 nm, podano szczurom dotchawiczo w pojedynczej dawce lub w powtarzanych dawkach 10 mg/kg mc. dootrzewnowo 3-krotnie w tygodniu (do 20 dawek). U zwierząt zaobserwowano zmiany biochemiczne i czynnościowe w śledzionie, nerkach i wątrobie. Większe zmiany wystąpiły u szczurów narażanych na nanosrebro niż na nanozłoto. Nanocząstki obu metali zostały deponowane w płucach, jednak nanosrebro silniej indukowało odpowiedź fagocytów, zwłaszcza neutrofilów. Wskaźnik wyrażony stosunkiem liczby neutrofilów do liczby makrofagów pęcherzykowych w BALF (bronchoalveolar lavage fluid – płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego) był wyraźnie wyższy u narażanych szczurów w porównaniu z kontrolą, przy czym u eksponowanych na nanozłoto był niższy niż na nanosrebro. W komórkach neutrofilów i makrofagów wykryto obecność nanocząstek zarówno srebra, jak i złota. Wystąpiły jednak różnice w rozmieszczeniu obu rodzajów nanocząstek w obrębie komórek. Do jądra komórkowego dotarły tylko nanocząstki złota, podczas gdy srebro było obecne głównie w mitochondriach, wpływając na czynność tych organelli. Zauważono niewielkie różnice w rozmieszczeniu obu metali: więcej nanozłota wykryto w wątrobie i śledzionie, a mniej w nerkach, w porównaniu z rozmieszczeniem nanocząstek srebra. Różnice te wynikają najprawdopodobniej z mniejszej rozpuszczalności nanozłota. Na komórkach pochodzących z różnych tkanek

in vivo przeprowadzono test fragmentacji DNA (random amplification of polymorphic DNA – RAPD). Działanie genotoksyczne nanosrebra w tym teście było znacznie silniejsze niż nanozłota.

Różnice w działaniu biologicznym wykazali także Rathore i wsp. [40]. Podawali oni nanocząstki (10 nm lub 25 nm) srebra (3 mg/kg mc.) i złota (20 µg/kg mc.) szczurom Wistar drogą pokarmową, raz dziennie, przez 21 dni. U szczurów narażanych na złoto zaobserwowano upośledzenie czynności wątroby i nerek w porównaniu z narażanymi na srebro. Nanocząstki złota wykazywały większą toksyczność na płuca, a srebra – na mięsień sercowy. Żaden z rodzajów nanocząstek nie wykazywał działania na mózg.

Sung i wsp. przeprowadzili badania inhalacyjne na szczurach Sprague-Dawley, narażając zwierzęta na nanocząstki srebra [41] i złota [27]. W obu eksperymentach szczury narażano w podobnych warunkach przez 13 tygodni (6 godz./dzień, 5 dni/tydzień). Nanocząstki srebra (18–19 nm) podawano w stężeniach: $0,6 \times 10^6$ cząstek/cm³ (49 µg/m³), $1,4 \times 10^6$ cząstek/cm³ (133 µg/m³), $3,0 \times 10^6$ cząstek/cm³ (515 µg/m³), a nanocząstki złota (4–5 nm) w stężeniach: $2,36 \times 10^4$ cząstek/cm³ (0,04 µg/m³), $2,36 \times 10^5$ cząstek/cm³ (0,38 µg/m³), $1,85 \times 10^6$ cząstek/cm³ (20,02 µg/m³). U zwierząt narażanych na nanocząstki srebra wystąpiły zmiany w wątrobie i płucach. Autorzy zaproponowali stężenie 100 µg/m³ jako poziom niepowodujący negatywnych skutków (no observed adverse effect level – NOAEL) dla nanocząstek srebra. U szczurów inhalowanych nanocząstkami złota obserwowano jedynie niewielkie zmiany w płucach. Poziom NOAEL dla tego efektu oszacowano jako 0,38 µg/m³. Z porównania badań Sun-ga i wsp. może wynikać, że nanocząstki złota wykazują działanie toksyczne przy znacznie niższych stężeniach. Dużą rolę może odgrywać w tym przypadku różnica w wielkości cząstek stosowana w obu badaniach. Efekty toksyczne mogą wynikać z innej toksykokinetyki, co wydaje się kluczowe w przypadku nanoobjektów.

Istniejące poziomy dopuszczalne dla nanozłota

Nie ma normatywów higienicznych i poziomów dopuszczalnych dla nanocząstek złota. Gdy nie są dostępne wartości dopuszczalnego poziomu narażenia zawodowego (occupational exposure limit – OEL) ani pochodnych poziomów niepowodujących zmian (derived no-effect levels – DNEL), warto posłużyć się wartościami referencyjnymi dla nanomateriałów (nanoreference values – NRV), opracowanymi przez ekspertów Krajowego Instytutu Zdrowia Publicznego i Środowi-

ska w Holandii (RIVM) [42]. Wartości referencyjne dla nanomateriałów określają poziom ostrzegawczy: gdy są przekroczone wartości referencyjne, należy zastosować odpowiednie środki kontroli narażenia, jednak korzystanie z NRV wymaga pomiaru stężenia liczbowego cząstek i ich średnicy oraz informacji pozwalających na zaklasyfikowanie nanoobjektów do odpowiedniej klasy zagrożenia (kształt nanocząstek, trwałość w środowisku, gęstość). Poszczególne klasy zagrożenia zostały scharakteryzowane w następujący sposób:

1. Sztuczne nanowłókna, trwałe w środowisku, dla których nie można wykluczyć wystąpienia efektów podobnych do działania azbestu. Przykłady: SWCNT (single-walled carbon nanotubes – jednościenne nanorurki węglowe) lub MWCNT (multi-walled carbon nanotubes – wielościenne nanorurki węglowe) lub włókna tlenków metali, o możliwym działaniu podobnym do działania azbestu.
- 2a. Ziarnisty nanomateriał (niewłóknisty), trwały w środowisku, o gęstości $> 6000 \text{ kg/m}^3$. Przykłady: cząstki Ag, Au, CeO_2 , CoO, Fe, Fe_xO_y , La, Pb, Sb_2O_5 lub SnO_2 .
- 2b. Ziarniste nanomateriały i nanowłókna, trwałe w środowisku, o gęstości $< 6000 \text{ kg/m}^3$, dla których efekty działania podobne do azbestu mogą być wykluczone. Przykłady: cząsteczki Al_2O_3 , SiO_2 , TiO_2 , ZnO, CaCO_3 , glinokrzemian warstwowy, sadza, C60, dendrymery, polistyren lub nanowłókna.
3. Ziarnisty nanomateriał, nietrwały w środowisku lub rozpuszczalny w wodzie (rozpuszczalność $> 100 \text{ mg/l}$). Przykłady: NaCl, cząstki lipidów, mąki, sacharozy.

Propozycje wartości referencyjnych NRV dla 4 klas zagrożenia:

- klasa 1 – $0,01 \text{ włókien/cm}^3$,
- klasa 2a – $20\,000 \text{ cząstek/cm}^3$,
- klasa 2b – $40\,000 \text{ cząstek/cm}^3$,
- klasa 3 – wartości OEL.

Posługując się klasyfikacją wartości NRV, nanocząstki złota można zaliczyć do klasy 2a o wartości dopuszczalnej $20\,000 \text{ cząstek/cm}^3$.

WNIOSKI

Nanozłoto ze względu na swoje właściwości ma duże możliwości aplikacyjne. Nanostruktury złota przybierają różnorodne kształty i wielkości oraz podlegają różnym modyfikacjom. Wszystkie te cechy wpływają na działanie biologiczne tych obiektów i efekty toksyczne. Z opisów badań na zwierzętach labora-

toryjnych wynika, że nanozłoto może się wchłaniać drogą oddechową i pokarmową. Może penetrować w głąb naskórka i skóry właściwej, ale nie ma dowodów, że wchłania się przez skórę. Nanoobjekty złota kumulują się głównie w wątrobie i śledzionie, choć docierają także do innych narządów wewnętrznych, takich jak: płuca, nerki, serce czy mózg. Nanozłoto pokonuje bariery krew–mózg i krew–łożysko. Toksykogenetyka tych struktur zależy w dużej mierze od wielkości cząstek, kształtu oraz ładunku powierzchniowego.

U zwierząt narażanych drogą inhalacyjną nanocząstki złota wywoływały niewielkie zmiany w płucach. Nanozłoto podawane drogą pokarmową nie powodowało szkodliwych skutków zdrowotnych u gryzoni. U zwierząt, którym wstrzykiwano nanozłoto, obserwowano zmiany w wątrobie i płucach. Wyniki badań dotyczących działania genotoksycznego nanocząstek złota nie są jednoznaczne. Nanocząstki złota działały genotoksycznie na komórki *in vitro*, ale nie na zwierzęta. Nie zaobserwowano szkodliwego działania nanozłota na płód czy rozrodczość. Nie ma badań dotyczących działania rakotwórczego. Mechanizm działania toksycznego nanozłota może być związany z jego oddziaływaniem z makromolekułami biologicznymi (białka, DNA), co w efekcie prowadzi do indukowania stresu oksydacyjnego lub uszkodzeń materiału genetycznego.

Nie wiadomo, jak duże jest narażenie zawodowe na nanozłoto w Polsce. Z danych statystycznych Głównego Urzędu Statystycznego (GUS) [43–45] wynika, że rozwój nanotechnologii skupia się głównie na działalności badawczo-rozwojowej, która w 2014 r. obejmowała 165 podmiotów, z czego 66 stanowił sektor przedsiębiorstw, 46 – sektor szkolnictwa wyższego, a 53 – sektor rządowy i prywatnych instytucji niekomercyjnych. W 2014 r. ogółem w dziedzinie nanotechnologii były zatrudnione 3664 osoby, a w latach poprzedzających: 3539 osób w roku 2013 i 3909 osób w 2012 r. Liczba osób zatrudnionych w sektorze rządowym i szkolnictwa wyższego malała, a w sektorze przedsiębiorstw wzrastała, co może odzwierciedlać rosnącą liczbę wdrożeń produktów nanotechnologicznych. Obecnie nie ma normatywów higienicznych dla nanoobjektów, w tym nanozłota. Wpływ nanostruktur na zdrowie człowieka nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony. Osoby pracujące z nanomateriałami powinny zachować szczególną ostrożność i stosować istniejące zalecenia przy ocenie narażenia zawodowego na nanoobjekty [46]. Przeprowadzona ocena ryzyka powinna stanowić pod-

stawę do podejmowania odpowiednich działań zapobiegawczych, ograniczających potencjalne narażenie na nanometale, w tym również nanozłoto [47].

PIŚMIENNICTWO

- 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
- The European Chemicals Agency [Internet]: Agency, 2016 [cytowany 15 lipca 2016]. Adres: <http://echa.europa.eu/>
- Yah C.S.: The toxicity of Gold Nanoparticles in relation to their physiochemical properties. *Biomed. Res.* 2013;24(3):400–413
- Gerber A., Bundschuh M., Klingelhofer D., Groneberg D.A.: Gold nanoparticles: Recent aspects for human toxicology. *J. Occup. Med. Toxicol.* 2013;8(1):32, <https://doi.org/10.1186/1745-6673-8-32>
- Alanazi F.K., Radwan A.A., Alsarra I.A.: Biopharmaceutical applications of nanogold. *Saudi Pharm. J.* 2010;18(4):179–193, <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2010.07.002>
- Fratoddi I., Venditti I., Cametti C., Russo M.V.: How toxic are gold nanoparticles? The state-of-the-art. *Nano Res.* 2015;8(6):1771–1799, <https://doi.org/10.1007/s12274-014-0697-3>
- Schleh C., Holzwarth U., Hirn S., Wenk A., Simonelli F., Schäffler M. i wsp.: Biodistribution of inhaled gold nanoparticles in mice and the influence of surfactant protein D. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, luty 2013;26(1):24–30, <http://dx.doi.org/10.1089/jamp.2011.0951>
- Yu L.E., Lanry Yung L.-Y., Ong C.-N., Tan Y.-L., Balasubramaniam K.S., Hartono D. i wsp.: Translocation and effects of gold nanoparticles after inhalation exposure in rats. *Nanotoxicology* 2007;1(3):235–242, <https://doi.org/10.1080/17435390701763108>
- Han S.G., Lee J.S., Ahn K., Kim Y.S., Kim J.K., Lee J.H. i wsp.: Size-dependent clearance of gold nanoparticles from lungs of Sprague-Dawley rats after short-term inhalation exposure. *Arch. Toxicol.*, lipiec 2015;89(7):1083–1094, <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1292-9>
- Kreyling W.G., Hirn S., Möller W., Schleh C., Wenk A., Celik G. i wsp.: Air–blood barrier translocation of tracheally instilled gold nanoparticles inversely depends on particle size. *ACS Nano* 2014;8(1):222–233, <https://doi.org/10.1021/nn403256v>
- Semmler-Behnke M., Kreyling W.G., Lipka J., Fertsch S., Wenk A., Takenaka S. i wsp.: Biodistribution of 1.4- and 18-nm gold particles in rats. *Small* 2008;4(12):2108–2111, <https://doi.org/10.1002/sml.200800922>
- Schleh C., Semmler-Behnke M., Lipka J., Wenk A., Hirn S., Schäffler M. i wsp.: Size and surface charge of gold nanoparticles determine absorption across intestinal barriers and accumulation in secondary target organs after oral administration. *Nanotoxicology* 2012;6(1):36–46, <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.552811>
- Jo M.R., Bae S.H., Go M.R., Kim H.J., Hwang Y.G., Choi S.J.: Toxicity and biokinetics of colloidal gold nanoparticles. *Nanomaterials* 2015;5:835–850, <https://doi.org/10.3390/nano5020835>
- Fernandes R., Smyth N.R., Muskens O.L., Nitti S., Heuer-Jungemann A., Ardern-Jones M.R. i wsp.: Interactions of skin with gold nanoparticles of different surface charge, shape, and functionality. *Small* 2015;11(6):713–721, <https://doi.org/10.1002/sml.201401913>
- Fernandes R.F.M.: Penetration of gold nanoparticles through the skin [praca doktorska] [Internet]: University of Southampton, Southampton 2014 [cytowany 13 lipca 2016]. Adres: http://eprints.soton.ac.uk/381281/1.hasCoversheetVersion/_soton.ac.uk_ude_personalfiles_users_jo1d13_mydesktop_Thesis_Rute%20Fernandes.pdf
- Lee O., Jeong S.H., Shin W.U., Lee G., Oh C., Son S.W.: Influence of surface charge of gold nanorods on skin penetration. *Skin Res. Technol.* 2013;19(1):e390–396, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2012.00656.x>
- Labouta H.I., Liu D.C., Lin L.L., Butler M.K., Grice J.E., Raphael A.P. i wsp.: Gold nanoparticle penetration and reduced metabolism in human skin by toluene. *Pharm. Res.* 2011;28(11):2931–2944, <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0561-z>
- Terentyuk G.S., Maslyakova G.N., Suleymanova L.V., Khlebtsov B.N., Kogan B.Y., Akchurin G.G. i wsp.: Circulation and distribution of gold nanoparticles and induced alterations of tissue morphology at intravenous particle delivery. *J. Biophotonics* 2009;2(5):292–302, <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.200910005>
- De Jong W.H., Hagens W.I., Krystek P., Burger M.C., Sips A.J., Geertsma R.E.: Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* 2008;29(12):1912–1919, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.037>
- Sonavane G., Tomoda K., Makino K.: Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 15 października 2008;66(2):274–280, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.07.004>
- Lasagna-Reeves C., Gonzalez-Romero D., Barria M.A., Olmedo I., Clos A., Sadagopa Ramanujam V.M. i wsp.:

- Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010;393(4):649–655, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.046>
22. Sun Y.N., Wang C.D., Zhang X.M., Ren L., Tian X.H.: Shape dependence of gold nanoparticles on *in vivo* acute toxicological effects and biodistribution. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2011;11(2):1210–1216, <https://doi.org/10.1166/jnn.2011.3094>
23. Zhang J., Nie X., Ji Y., Liu Y., Wu X., Chen C. i wsp.: Quantitative biokinetics and systemic translocation of various gold nanostructures are highly dependent on their size and shape. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014;14(6):4124–4138, <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8274>
24. Hirn S., Semmler-Behnke M., Schleh C., Wenk A., Lipka J., Schäffler M. i wsp.: Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011;77(3):407–416, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.12.029>
25. Lee J.K., Kim T.S., Bae J.Y., Jung A.Y., Lee S.M., Seok J.H. i wsp.: Organ-specific distribution of gold nanoparticles by their surface functionalization. *Appl. Toxicol.* 2015; 35(6):573–580, <https://doi.org/10.1002/jat.3075>
26. Morais T., Soares M.E., Duarte J.A., Soares L., Maia S., Gomes P. i wsp.: Effect of surface coating on the biodistribution profile of gold nanoparticles in the rat. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2012;80(1):185–193, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.09.005>
27. Sung J.H., Ji J.H., Park J.D., Song M.Y., Song K.S., Ryu H.R. i wsp.: Subchronic inhalation toxicity of gold nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* 2011;8:16, <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-16>
28. Venkatpurwar V., Mali V., Bodhankar S., Pokharkar V.: *In vitro* cytotoxicity and *in vivo* subacute oral toxicity assessment of porphyrin reduced gold nanoparticles. *Toxicol. Environ. Chem.* 2012;94(7):1357–1367, <https://doi.org/10.1080/02772248.2012.697731>
29. Rambanapasi C., Zeevaert J.R., Bunting H., Bester C., Kotze D., Hayeshi R. i wsp.: Bioaccumulation and subchronic toxicity of 14 nm gold nanoparticles in rats. *Molecules* 2016;21(6):763, <https://doi.org/10.3390/molecules21060763>
30. Abdelhalim M.A., Jarrar B.M.: Histological alterations in the liver of rats induced by different gold nanoparticle sizes, doses and exposure duration. *J. Nanobiotechnol.* 2012;10:5, <https://doi.org/10.1186/1477-3155-10-5>
31. Doudi M., Setorki M.: The acute liver injury in rat caused by gold nanoparticles. *Nanomed. J.* 2014;1(4): 248–257
32. Dam D.H., Culver K.S., Kandela I., Lee R.C., Chandra K., Lee H. i wsp.: Biodistribution and *in vivo* toxicity of aptamer-loaded gold nanostars. *Nanomedicine* 2015;11 (3):671–679, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.10.005>
33. Semmler-Behnke M., Lipka J., Wenk A., Hirn S., Schäffler M., Tian F. i wsp.: Size dependent translocation and fetal accumulation of gold nanoparticles from maternal blood in the rat. *Part. Fibre Toxicol.* 10 września 2014;11:33, <https://doi.org/10.1186/s12989-014-0033-9>
34. Yang H., Sun C., Fan Z., Tian X., Yan L., Du L. i wsp.: Effects of gestational age and surface modification on maternal-fetal transfer of nanoparticles in murine pregnancy. *Sci. Rep.* 2012;2:847, <https://doi.org/10.1038/srep00847>
35. Yang H., Du L., Tian X., Fan Z., Sun C., Liu Y. i wsp.: Effects of nanoparticle size and gestational age on maternal biodistribution and toxicity of gold nanoparticles in pregnant mice. *Toxicol. Lett.* 2014;230(1):10–18, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.07.030>
36. Paino I.M., Marangoni V.S., de Oliveira R.C., Antunes L.M., Zucolotto V.: Cyto and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol. Lett.* 2012;215(2):119–125, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.09.025>
37. Schulz M., Ma-Hock L., Brill S., Strauss V., Treumann S., Gröters S. i wsp.: Investigation on the genotoxicity of different sizes of gold nanoparticles administered to the lungs of rats. *Mutat. Res.* 2012;745(1–2):51–57, <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.11.016>
38. Khan H.A., Abdelhalim M.A., Al-Ayed M.S., Alhomi-da A.S.: Effect of gold nanoparticles on glutathione and malondialdehyde levels in liver, lung and heart of rats. *Saudi J. Biol. Sci.* 2012;19(4):461–464, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.06.005>
39. Katsnelson B.A., Privalova L.I., Gurvich V.B., Makeyev O.H., Shur V.Y., Beikin Y.B. i wsp.: Comparative *in vivo* assessment of some adverse bioeffects of equidimensional gold and silver nanoparticles and the attenuation of nanosilver's effects with a complex of innocuous bioprotectors. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14(2):2449–2483, <https://doi.org/10.3390/ijms14022449>
40. Rathore M., Mohanty I.R., Maheswari U., Dayal N., Suman R., Joshi D.S.: Comparative *in vivo* assessment of the subacute toxicity of gold and silver nanoparticles. *J. Nanopart. Res.* 2014;16:2338, <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2338-x>
41. Sung J.H., Ji J.H., Yoon J.U., Kim D.S., Song M.Y., Jeong J. i wsp.: Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles. *Inhal. Toxicol.* 2008;20(6):567–574, <https://doi.org/10.1080/08958370701874671>

42. Van Broekhuizen P, van Broekhuizen F, Cornelissen R, Reijnders L.: Workplace exposure to nanoparticles and the application of provisional nanoreference values in times of uncertain risks. *J. Nanopart. Res.* 2012;14:770, <https://doi.org/10.1007/s11051-012-0770-3>
43. Główny Urząd Statystyczny: Nanotechnologia w Polsce w 2012 r. [Internet]: Urząd, Warszawa 2013 [cytowany 15 lipca 2016]. Adres: http://stat.gov.pl/download/gfx/portalinformacyjny/pl/defaultaktualnosci/5496/10/1/1/nt_biotechnologia_w_polsce_2012.pdf
44. Główny Urząd Statystyczny: Nanotechnologia w Polsce w 2013 r. [Internet]: Urząd, Warszawa 2014 [cytowany 15 lipca 2016]. Adres: http://stat.gov.pl/download/gfx/portalinformacyjny/pl/defaultaktualnosci/5496/10/2/1/biotechnologia_w_polsce_w_2013_r.pdf
45. Główny Urząd Statystyczny: Biotechnologia i nanotechnologia w Polsce w 2014 r. [Internet]: Urząd, Warszawa 2015 [cytowany 15 lipca 2016]. Adres: http://stat.gov.pl/download/gfx/portalinformacyjny/pl/defaultaktualnosci/5496/10/3/1/biotechnol_nanotech_sygn_2015.pdf
46. Jankowska E., Łukaszewska J., Zatorski W.: Ocena narażenia zawodowego na nanoobiekty. Zalecenia [Internet]: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa 2013 [cytowany 15 lipca 2016]. Adres: https://www.ciop.pl/CIOPPortalWAR/file/76576/chempyl_Zalecenia_nanoobiekty_Jankowska.pdf
47. Zapór L.: Nanometryczne struktury metali i tlenków metali w środowisku pracy. Potencjalne zagrożenia. Zasady bezpiecznej pracy [Internet]: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa 2013 [cytowany 15 lipca 2016]. Adres: https://www.ciop.pl/CIOPPortalWAR/file/76572/chempyl_Nanometryczne_struktury.pdf