

Anna Maria Świdwińska-Gajewska  
Sławomir Czerczak

## NANOCZĄSTKI DITLENKU TYTANU – DZIAŁANIE BIOLOGICZNE

TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES – BIOLOGICAL EFFECTS

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

### STRESZCZENIE

Ditlenek tytanu ( $\text{TiO}_2$ ) może występować w postaci cząstek o różnej wielkości. Najczęściej wykorzystywane są cząstki o rozmiarze do 100 nm odpowiadające wielkością nanocząstkom oraz cząstki o wielkości z przedziału 0,1–3 mm. Ditlenek tytanu nie jest klasyfikowany jako substancja szkodliwa w postaci większych cząstek, jednak nanocząstki  $\text{TiO}_2$  mogą wywołać wiele negatywnych efektów zdrowotnych. Narażenie inhalacyjne na nano- $\text{TiO}_2$  wywołuje stan zapalny, mogący prowadzić do zmian zwłóknieniowych i proliferacyjnych w płucach. Istnieje wiele prac na temat genotoksycznego działania  $\text{TiO}_2$  na komórki ssaków i ludzi, szczególnie w przypadku nanocząstek. U szczurów narażanych inhalacyjnie na nanocząstki  $\text{TiO}_2$  zaobserwowano powstawanie nowotworów. Nie ma jednak dowodów na wzrost dodatkowego ryzyka wystąpienia raka płuca lub zgonu związanego z tą chorobą u osób zawodowo narażonych na pył  $\text{TiO}_2$ . Istnieją badania potwierdzające negatywny wpływ nanocząstek  $\text{TiO}_2$  na rozwój płodu i funkcje układu rozrodczego u zwierząt. Nanocząstki  $\text{TiO}_2$  znajdują coraz szersze zastosowanie i tym samym zwiększa się ryzyko narażenia na nanocząstki ditlenku tytanu w środowisku pracy. Wobec tak niepokojących danych dotyczących biologicznego działania nanocząstek  $\text{TiO}_2$  należy zwrócić większą uwagę na narażenie i jego skutki dla zdrowia pracowników. Właściwości nanocząstek, ze względu na większą powierzchnię i reaktywność, różnią się istotnie od frakcji wdychalnej, dla której obowiązują obecnie normatywy higieniczne w Polsce. Med. Pr. 2014;65(5):651–663

**Słowa kluczowe:** ditlenek tytanu, nanocząstki, narażenie zawodowe, działanie toksyczne

### ABSTRACT

Titanium dioxide occurs as particles of various sizes. Particles of up to 100 nm, corresponding to nanoparticles, and in the size range of 0.1–3 mm are the most frequently used. Titanium dioxide in a bulk form is not classified as dangerous substance, nevertheless nanoparticles may cause adverse health effects. Inhalation exposure to nano- $\text{TiO}_2$  causes pulmonary inflammation that may lead to fibrotic and proliferative changes in the lungs. Many studies confirm the genotoxic effect of  $\text{TiO}_2$ , especially in the form of nanoparticles, on mammal and human cells. In rats exposed to  $\text{TiO}_2$ -nanoparticles by inhalation the development of tumors has been observed. However, there is no evidence of additional lung cancer risk or mortality in workers exposed to  $\text{TiO}_2$  dust. There are some studies demonstrating the adverse effect of  $\text{TiO}_2$ -nanoparticles on fetal development, as well as on reproduction of animals.  $\text{TiO}_2$  nanoparticles find a still wider application and thus the risk of occupational exposure to this substance increases as well. Considering such alarming data on the biological activity of  $\text{TiO}_2$  nanoparticles, more attention should be paid to occupational exposure and its health effects. Properties of the nanoparticles, due to their larger surface area and reactivity, differ significantly from the inhalable dust of  $\text{TiO}_2$ , for which the hygiene standards are mandatory in Poland. Med Pr 2014;65(5):651–663

**Key words:** titanium dioxide, nanoparticles, occupational exposure, toxicity

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: 24 września 2014, zatwierdzono: 16 października 2014

### WSTĘP

Ditlenek tytanu ( $\text{TiO}_2$ ) może występować w postaci cząstek o szerokim zakresie wielkości, które ponadto mogą tworzyć większe agregaty lub aglomeraty. Wielkość pojedynczych cząstek w dużej mierze zależy od

zastosowania ditlenku tytanu i dzieli się na podstawowe zakresy wielkości cząstek:

- ultradrobne (ultrafine): < 100 nm, równe wielkości nanocząstek,
- drobne (fine): 0,1 do ok. 3  $\mu\text{m}$ .

Kształt cząstek ditlenku tytanu jest zazwyczaj półkolisty, ale bywają również inne formy – płaskie lub włókniste. Ditlenek tytanu występuje w 3 odmianach polimorficznych: anataz, rutyl i brukit. Do najszerzej stosowanych należy anataz i rutyl, z których to anataz jest bardziej reaktywny chemicznie, bardziej cytotoxyczny i generuje więcej reaktywnych form tlenu. Z badań porównawczych Warheita i wsp., którzy oceniali nanocząstki ditlenku tytanu pod względem prozapalnego wpływu na płuca, cytotoxyczności, proliferacji komórek i zmian histopatologicznych, wynika, że nanocząstki rutylu mają mniejsze toksyczne działanie od odmiany anataz-rutyl 80:20% (1).

Obecnie wiele nanomateriałów na bazie  $\text{TiO}_2$  jest dostępnych komercyjnie. Najczęściej nanoditlenek tytanu występuje w odmianie anatazu bądź anatazu-rutylu w proporcji 80:20%, rzadziej rutylu. Powierzchnia właściwa nanomateriałów  $\text{TiO}_2$  waha się w dość szerokich granicach: 35–190  $\text{m}^2/\text{g}$ , natomiast gęstość nanoproszków wynosi ok. 4  $\text{g}/\text{ml}$  (2).

Ditlenek tytanu nie jest uznany za substancję szkodliwą, jednak jako nanomateriał może wywoływać negatywne skutki zdrowotne, inne od opisywanych dla konwencjonalnej postaci tego związku. Celem niniejszego opracowania jest zwrócenie uwagi na biologiczne działanie nanocząstek ditlenku tytanu, które ze względu na właściwości – większą powierzchnię i reaktywność cząstek – różnią się istotnie od frakcji wdychalnej (pyłu całkowitego), dla której obowiązują obecnie normatywy higieniczne w Polsce.

## METODY PRZEGLĄDU

Przeglądu piśmiennictwa dokonano w oparciu o bazy internetowe recenzowanych czasopism naukowych. W przygotowaniu niniejszego opracowania wykorzystano prace dotyczące charakterystyki ditlenku tytanu, w szczególności w postaci nanocząstek i ich toksycznego działania. Niewiele jest badań dotyczących wpływu nanocząstek ditlenku tytanu na zdrowie ludzi, dlatego w opracowaniu zawarto informacje pochodzące z eksperymentów przeprowadzonych na zwierzętach. Ze względu na możliwe inhalacyjne narażenie na nanocząstki ditlenku tytanu w miejscu pracy szczególną uwagę zwrócono na badania na zwierzętach narażanych tą drogą.

## WYNIKI PRZEGLĄDU

Przeгляд piśmiennictwa podzielono na podrozdziały dotyczące toksykokinetyki (wchłanianie, rozmieszcze-

nie, metabolizm i wydalanie) i działania toksycznego z podziałem na działanie drażniące i uczulające, a także na poszczególne drogi narażenia. Omówiono również odległe efekty toksyczne, takie jak mutagenność, rakotwórczość i wpływ na rozrodczość.

## Toksykokinetyka

Ditlenek tytanu wchłaniany jest przede wszystkim drogą oddechową. Cząstki ditlenku tytanu w płucach są wychwytywane głównie przez makrofagi pęcherzykowe, w mniejszym stopniu przenikają do pneumocytów typu I. Niewielka liczba komórek wypełnionych  $\text{TiO}_2$  trafia do naczyń kapilarnych, skąd mogą przenikać do krwiobiegu (3).

W eksperymencie przeprowadzonym przez Mühlfelda i wsp. nanocząstki  $\text{TiO}_2$  u szczurów narażanych inhalacyjnie (przez 1 godz.) były rozmieszczone w płucach – w świetle pęcherzyków, w nabłonku, tkance łącznej i w naczyniach włosowatych (4).

W badaniu van Ravenzwaaya i wsp. po inhalowaniu szczurów nano- $\text{TiO}_2$  większość wchłoniętej dawki została zdeponowana w płucach i zaobserwowano translokację do śródpiersiowych węzłów chłonnych (5).

Ditlenek tytanu podawany donosowo może docierać do układu nerwowego. Wyniki badań na myszach wskazują, że podany związek dotarł do mózgu w rejon hipokampa przez opuszkę węchową, gdzie nastąpiło wyraźne zwiększenie procesu peroksydacji lipidów jako objaw uszkodzeń oksydacyjnych (6). Zaobserwowano również odpowiedź zapalną, z podwyższonym poziomem interleukin (IL-1b) i czynnika martwicy nowotworów (TNF-a).

Badania Li i wsp. na myszach, którym podano dotchawczo nano- $\text{TiO}_2$ , wykazały, że nanocząstki mogą wpływać na przepuszczalność bariery pęcherzykowo-kapilarnej w płucach i tą drogą przedostawać się do krwiobiegu i innych narządów (wątroba, nerki) (7). Na podstawie zawartości tytanu w krwi oraz mózgu autorzy sugerują, że nanocząstki ditlenku tytanu mogą pokonywać barierę krew-mózg.

Ditlenek tytanu podany drogą pokarmową może być transportowany wraz z krwią do innych organów (8). W badaniu Wanga i wsp. po upływie 2 tygodni od podania myszom dożołądkowo przez zgłębnik nanocząstek  $\text{TiO}_2$  wykazano obecność ditlenku tytanu w wątrobie, śledzionie, nerkach i płucach, jednak tylko w wątrobie ilość  $\text{TiO}_2$  różniła się statystycznie od grupy kontrolnej.

Jak opisują Cho i wsp., u szczurów, którym podawano z pożywieniem ditlenek tytanu w postaci nanocząstek

przez 13 tygodni, obecność tytanu wykryto również w wątrobie, nerkach, śledzionie, a ponadto w mózgu, ale w znikomym stopniu, bez różnic statystycznie istotnych z grupą zwierząt nienarażanych (9).

Informacje dotyczące wchłaniania przez skórę nie są jednoznaczne. Zweryfikowanie hipotezy wchłaniania się nanocząstek TiO<sub>2</sub> przez skórę wymaga dalszych badań.

Sadrieh i wsp., eksperci Amerykańskiej Organizacji do Spraw Żywności i Leków (Food and Drug Administration – FDA), badali nanocząstki ditlenku tytanu w kierunku wchłaniania przez skórę na modelu skóry świńskiej, najbardziej zbliżonej do skóry ludzkiej (10). Autorzy zaobserwowali, że większość cząstek aplikowanych na skórę jest deponowana w warstwie rogowej naskórka bez penetrowania do wnętrza. Nie wykryto cząstek TiO<sub>2</sub> w organizmie (m.in. w wątrobie) nawet po powtórnej aplikacji i wydłużonym czasie ekspozycji. Eksperci FDA sugerują więc, że istnieje mała szansa wchłaniania się ditlenku tytanu przez skórę.

Monteiro-Riviere i wsp. badali możliwość wchłaniania się ditlenku tytanu przez uszkodzoną skórę po oparzeniach słonecznych (11). Zaobserwowano niewielki wzrost penetracji TiO<sub>2</sub> do górnej warstwy nabłonka, jednak bez oznak wchłaniania.

Wu i wsp. przeprowadzili badania penetracji cząstek TiO<sub>2</sub> przez skórę, wykorzystując metody *in vivo* i *in vitro* (12). W eksperymentach *in vitro* z zastosowaniem izolowanej skóry świńskiej nanocząstki TiO<sub>2</sub> docierały tylko do zewnętrznej części warstwy rogowej naskórka, nie penetrując do jego głębszych warstw i skóry właściwej. Odmiennie wyniki uzyskano w tym samym eksperymencie w badaniu *in vivo*, po aplikowaniu nanocząstek TiO<sub>2</sub> na skórę świni i skórę myszy (12). Po aplikowaniu przez 30 dni nanocząstek TiO<sub>2</sub> (4–60 nm) na ucho świni substancję wykryto w naskórku (warstwie rogowej, ziarnistej, kolczystej i podstawnej), a po 60-dniowej aplikacji na skórę myszy nanocząstki TiO<sub>2</sub> przenikały przez skórę, docierając do innych tkanek i narządów. Nanocząstki P25 (21 nm) znaleziono nawet w mózgu, najwięcej jednak zmian zaobserwowano w obrębie skóry i wątroby (zwiększenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i dialdehydu malonowego wskazujące na stres oksydacyjny wywołany depozycją nanocząstek). Ponadto długotrwała ekspozycja dermalna na nanocząstki wyraźnie zredukowała ilość kolagenu w skórze myszy. Możliwość wchłaniania nanocząstek TiO<sub>2</sub> przez skórę powinna zostać bardziej wnikliwie zbadana w celu zweryfikowania, czy długotrwała aplikacja na skórę może być szkodliwa dla zdrowia (12).

W innych badaniach po dożylnym podaniu myszom lub szczurom nanoditlenku tytanu aglomeraty cząstek były obecne głównie w wątrobie, płucach i śledzionie. Autorzy tych badań zauważyli jednak znaczne stężenie ditlenku tytanu we krwi i tkankach nienarażanych zwierząt, co świadczy o obecności ditlenku tytanu w karmie (13,14).

Z kolei podanie podskórne, jak wykazali Umbreit i wsp., skutkowało obecnością aglomeratów TiO<sub>2</sub> przede wszystkim w węzłach chłonnych, a w mniejszym stopniu w wątrobie, śledzionie i płucach (13).

Nie ma danych na temat metabolizmu ditlenku tytanu. Wstrzykiwany myszom i szczurom wydalanany jest głównie z moczem i w mniejszym stopniu z kałem (15). Z kolei podany drogą pokarmową został wykryty głównie w kale (9).

### Działanie drażniące i uczulające

Ditlenek tytanu nie działa drażniąco na skórę i oczy, poza działaniem mechanicznym, które może wywołać odwracalne zmiany niewielkiego stopnia. W testach toksyczności przeprowadzonych pod kierunkiem Warheita u nowozelandzkich białych królików, którym zastosowano do oka nano-TiO<sub>2</sub>, zaobserwowano jedynie zaczerwienienie spojówki (bez uszkodzeń rogówki), które ustąpiło w ciągu 24–48 godzin (16). Badacze nie wykazali działania drażniącego na skórę, podając jednorazowo nano-TiO<sub>2</sub> na ogoloną, nieuszkodzoną skórę królików tego samego gatunku. Nie zaobserwowali oni również działania uczulającego tego związku u myszy w badaniach z zastosowaniem testu LLNA (local lymph node assay – lokalnych węzłów chłonnych) (16).

Istnieje niewiele prac opisujących potencjalne działanie uczulające nanocząstek ditlenku tytanu na drogi oddechowe. De Haar i wsp. wykazali niewielki stan zapalny w drogach oddechowych i aktywność adjuwanta immunologicznego u myszy uczulonych na owoalbuminę (OVA) (17). W innym badaniu Jonasson i wsp. opisali, że inhalacyjne narażenie na nanocząstki TiO<sub>2</sub> wzmacniało reakcję alergiczną u myszy uczulonych na OVA. Autorzy eksperymentu sugerują, że narażenie na nanocząstki może zaostrzać objawy alergii układu oddechowego (18).

### Narażenie drogą pokarmową

Warheit i wsp. nie zaobserwowali zmian w masie ciała ani żadnych poważnych uszkodzeń wewnętrznych u szczurów, którym podawano nanocząstki TiO<sub>2</sub> przez zgłębnik (16). Wystąpiło jedynie szare zabarwienie kału. Autorzy publikacji wyznaczyli wartość LD<sub>50</sub> dla

nanocząstek  $\text{TiO}_2$ , która u samic szczura wyniosła powyżej 5000 mg/kg masy ciała (16).

Wang i wsp. u myszy narażanych dożołądkowo na nanocząstki  $\text{TiO}_2$  zaobserwowali nieprawidłowości parametrów biochemicznych w surowicy (wzrost wskaźnika aminotransferaz ALT/AST – alanine aminotransferase – aminotransferaza alaninowa / aspartate aminotransferase – aminotransferaza asparaginianowa), aktywności LDH (lactate dehydrogenase – dehydrogenazy mleczanowej),  $\alpha$ -HBDH ( $\alpha$ -hydroxybutyrate dehydrogenase – dehydrogenazy  $\alpha$ -hydroksymasłanowej) oraz poziomu BUN (blood urea nitrogen – azotu moczownikowego) (8). Powyższe wyniki mogą wskazywać na uszkodzenia wątroby, nerek i mięśnia sercowego w następstwie narażenia na nanocząstki  $\text{TiO}_2$ .

Ci sami autorzy w badaniach histopatologicznych zaobserwowali zwyrodnienie wodniczkowe wokół żyły środkowej zrazików wątrobowych, a także martwicę hepatocytów, płyn białkowy w kanalikach nerkowych i obrzęk kłębuszków nerkowych. W sercu, płucach, gruczołach płciowych ani śledzionie nie zaobserwowano jednak poważnych zmian patologicznych (8).

Bu i wsp. przeprowadzili analizę metabolomiczną (opartą na spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego, nuclear magnetic resonance – NMR) szczurów, którym dożołądkowo przez zgłębnik podawano nanocząstki  $\text{TiO}_2$  przez 14 dni (19). Analiza wykazała liczne nieprawidłowości biochemiczne w moczu oraz surowicy, wskazujące na zaburzenia gospodarki energetycznej (cyklu Krebsa) oraz metabolizmu aminokwasów (19). Zaobserwowano m.in. wzrost stężenia tauryny, histydyny, cytruliny, kwasu cytrynowego, N-tlenku trimetyloaminy (trimethylamine-N-oxide – TMAO),  $\alpha$ -ketoglutaranu i octanu. Wykazano też obniżenie poziomu metioniny, treoniny, leucyny, pirogronianu, kwasu 3-D-hydroksymasłowego (3-D-hydroxybutyrate – 3-D-HB) i choline w moczu narażanych zwierząt. Analiza surowicy wykazała wzrost 3-D-HB, kreatyny, choline, fosfocholine i TMAO oraz obniżenie stężenia metioniny, glutaminy, glutamianu, glutationu, pirogronianu i acetylooctanu.

O zaburzeniach cyklu Krebsa może świadczyć obniżenie stężenia pirogronianu w surowicy i moczu (który ulega szybszej przemianie do acetylokoenzymu A (acetylo-Co A)), oraz podwyższenie stężenia cytrynianu i  $\alpha$ -ketoglutaranu w moczu (produktów pośrednich cyklu) (19). Na skutek przyspieszenia przemian cyklu Krebsa następuje zwiększenie poziomu ciał ketonowych (3-D-HB) w surowicy, a przemiany nadmiaru acetylo-Co A powodują zwiększenie stężenia octanu w moczu (19).

Bu i wsp. zaobserwowali ponadto w surowicy zwierząt narażanych na nano- $\text{TiO}_2$  podwyższony poziom choline i fosfocholine, produktów rozpadu głównego składnika błon – fosfatydylocholine (19). O uszkodzeniach błon komórkowych może również świadczyć zwiększony, w surowicy i w moczu narażanych szczurów, poziom TMAO, produktu rozpadu choline. Z kolei wysoka aktywność LDH oraz kinazy kreatynowej może świadczyć o uszkodzeniach mięśnia sercowego, a podwyższenie aktywności enzymów wątrobowych ALT/AST – o uszkodzeniach komórek wątrobowych. W tkance serca badacze zaobserwowali ponadto obrzęk mitochondriów (19).

Badania krwi w opisywanym powyżej eksperymencie wykazały zmiany w parametrach hematologicznych – zwiększenie liczby białych krwinek, w szczególności monocytów wskazuje na stan zapalny spowodowany narażeniem na nanocząstki  $\text{TiO}_2$  (19).

Na podstawie powyższych wyników badań Bu i wsp. sugerują, że przewlekłe narażenie drogą pokarmową na nanocząstki  $\text{TiO}_2$  może mieć szkodliwy wpływ na serce i wątrobę (19).

Nanocząstki podane drogą pokarmową mogą wywierać wpływ także na inne organy, np. mózg czy nerki. W badaniach Hu i wsp. u myszy, którym nano- $\text{TiO}_2$  podawano przez 60 dni dożołądkowo, zaobserwowano kumulowanie się cząstek w hipokampie (20). Nagromadzone cząstki indukowały zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu w tej części mózgu, przyspieszały apoptozę komórek (zwiększenie aktywności kaspaz 3 i 9 i zahamowanie aktywności białka regulatorowego Bcl-2) oraz powodowały zaburzenia pamięci przestrzennej (mierzonej testem labiryntu w kształcie litery „Y”).

Z kolei u myszy, którym nano- $\text{TiO}_2$  podawano dożołądkowo przez 90 dni, nanocząstki wykryto w nerkach, jak opisują Gui i wsp. (21). Zmiany zaobserwowane w nerkach to: stan zapalny, martwica komórek i zaburzenia ich funkcji, spowodowane zmianami ekspresji cytokin i zmniejszeniem wydajności procesów detoksykacji  $\text{TiO}_2$ .

### **Narażenie drogą inhalacyjną**

Negatywne skutki działania ditlenku tytanu obserwuje się przede wszystkim w następstwie narażenia drogą oddechową. Związek działa głównie na układ oddechowy, wywołując objawy stanu zapalnego. Obserwuje się liczne makrofagi pęcherzykowe przeładowane cząstkami oraz cząstki przenikające do tkanki śródmiąższowej płuc.



Prace, w których badano różne wielkości cząstek ditlenku tytanu, wykazały, że cząstki mniejsze niż 100 nm wywołują większe zmiany, co jest skorelowane z większą powierzchnią cząstek (22–24). Ponadto mniejsze cząstki łatwiej przenikają do tkanki śródmiąższowej. W efekcie zostaje wydłużony czas retencji cząstek. Poza stanem zapalnym obserwowano również zmiany zwłóknieniowe i proliferacyjne w płucach. Porównanie wrażliwości na działanie TiO<sub>2</sub> różnych gatunków gryzoni, dokonane przez Bermudeza i wsp., wykazało, że najbardziej wrażliwe są szczury, następnie myszy, a najmniej chomiki (25). Zmiany wywoływane przez nanocząstki TiO<sub>2</sub> w dużej mierze zależą również od czasu trwania narażenia (22–31).

LeBlanc i wsp. nie odnotowali zmian patologicznych w płucach u szczurów narażanych inhalacyjnie na nano-TiO<sub>2</sub> przez 4–12 godz. Wykryto jedynie zawierające cząstki makrofagi znajdujące się w bezpośrednim kontakcie ze ścianą pęcherzyków płucnych. Badacze zaobserwowali natomiast nieprawidłowości funkcjonowania mikronaczyń (zaburzenia procesu rozszerzania tętniczek zależnego od śródbłónka) na skutek wzrostu ilości reaktywnych form tlenu, zwiększenia stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego oraz zmniejszenia produkcji tlenu azotu (NO) (26).

Grassian i wsp. nie wykazali u myszy działania toksycznego w wyniku ostrego (4-godzinnego) narażenia na nanocząstki TiO<sub>2</sub>, natomiast przedłużone narażenie (10 dni) wywołało znaczącą odpowiedź zapalną, która ustąpiła po 3 tygodniach po ekspozycji (27).

Inni autorzy, w badaniu przeprowadzonym na szczurach (5 dni), zaobserwowali zwiększenie masy i stan zapalny płuc, objawiający się wzrostem liczby neutrofilów, poziomu białka całkowitego i aktywności enzymów w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (bronchoalveolar lavage fluid – BALF), oraz zwiększoną replikację komórek w oskrzelach i oskrzelikach (28). Z kolei u szczurów narażanych na nanocząstki TiO<sub>2</sub> (23,5 mg/m<sup>3</sup>) przez 12 tygodni zaobserwowano depozyty cząstek w dolnych drogach oddechowych, makrofagi przeładowane cząstkami i kolagenowe zwłóknienie ścian pęcherzyków płucnych (22). U zwierząt wystąpił ostry stan zapalny w płucach. Nanocząstki przenikały do tkanki śródmiąższowej płuc szybciej niż większe cząstki. Zaobserwowano także wydłużenie czasu retencji w porównaniu z większymi cząstkami: klirens dla nanocząstek TiO<sub>2</sub> o wielkości 21 nm wyniósł 501 dni, a dla cząstek 250 nm – 174 dni (23). U inhalowanych szczurów zaobserwowano proliferację pneumocytów typu II i niedrożność porów Kohna, a także ogniska

zwłóknieniowe śródmiąższu i upośledzenie funkcji makrofagów pęcherzykowych. Zmiany te były zależne od wielkości powierzchni cząstek (24).

Bermudez i wsp. narażali inhalacyjnie różne gatunki zwierząt (szczur, chomik, mysz) przez 13 tygodni na nanocząstki w stężeniu 0,5–10 mg/m<sup>3</sup> (25). U wszystkich zwierząt zaobserwowano w płucach i okolicznych węzłach chłonnych depozyty cząstek, których liczba wzrastała wraz z zastosowanym stężeniem. Zmiany te były również zależne od gatunku. Najmniej wrażliwy na działanie nano-TiO<sub>2</sub> był chomik, najbardziej – szczur. U myszy i szczurów wydłużył się czas retencji cząstek, zaobserwowano również objawy stanu zapalnego – zwiększenie liczby makrofagów i neutrofilów oraz aktywności LDH i białek w BALF. U szczurów narażanych na najwyższe stężenie zaobserwowano kumulację cząstek w tkance śródmiąższowej płuc oraz zmiany proliferacyjne i zwłóknieniowe w płucach.

Heinrich i wsp. przeprowadzili przewlekłe badania na 2 gatunkach gryzoni narażanych na nanocząstki TiO<sub>2</sub> (29). U szczurów w 2-letnim eksperymencie inhalacyjnym zaobserwowano wydłużony czas retencji cząstek, stan zapalny (wzrost stężenia białek i aktywności LDH w BALF), zwłóknienie śródmiąższowe i rozrost oskrzelowo-pęcherzykowy. Z kolei u myszy, które narażano przez krótszy czas (13,5 miesiąca), zmiany wystąpiły jedynie w płucach w postaci depozytów cząstek. Ponadto, podobnie jak u szczurów, zwiększyła się śmiertelność narażanych myszy. Wyniki podprzewlekłych i przewlekłych eksperymentów inhalacyjnych na zwierzętach (22–25,29–31) zestawiono w tabeli 1.

### **Działanie mutagenne i genotoksyczne**

Mutagenne działanie ditlenku tytanu jest raczej znikome. Opublikowano natomiast wiele prac na temat genotoksycznego wpływu nanocząstek TiO<sub>2</sub> na komórki ssaków i ludzi. Wyniki badań genotoksyczności nano-TiO<sub>2</sub> z zastosowaniem promieniowania ultrafioletowego (UV) oraz światła widzialnego (Vis) wskazują, że czynniki te działają synergistycznie, a szkodliwe działanie ditlenku tytanu jest wzmacniane światłem z zakresu UV-Vis. Badania dotyczące działania mutagennego i genotoksycznego zestawiono w tabeli 2.

Ditlenek tytanu nie wykazuje działania mutagennego u bakterii *Salmonella Typhimurium* ani w komórkach ssaków *in vitro* (32–34). Substancja ta wywołuje uszkodzenia DNA w ludzkich komórkach i komórkach ssaków, szczególnie w przypadku ekspozycji na nanocząstki TiO<sub>2</sub> (20–30 nm) (35,36). Efekt ten wzmacnia wcześniejsze napromieniowanie komórek

**Tabela 1.** Wyniki badań inhalacyjnych – zmiany nienowotworowe  
**Table 1.** Results of inhalation experiments – non-neoplastic effects

Rodzaj $\text{TiO}_2$ (rozmiar cząstek / odmiana) Characteristics of $\text{TiO}_2$ (particle size / form)	Gatunek zwierząt, stężenie $\text{TiO}_2$ , czas narażenia Species, $\text{TiO}_2$ concentration, duration of exposure	Wynik Result	Piśmiennictwo Reference
20 nm	szczur F344: 23,5 mg/m <sup>3</sup> , 6 godz./dzień, 5 dni/tydz. przez 12 tyg. / F344 rats: 23.5 mg/m <sup>3</sup> , 6 h/day, 5 days/week for 12 weeks	obecność makrofagów przeładowanych cząstkami i kolagenowe zwłóknienie ścian pęcherzyków płucnych / the presence of particle-overloaded macrophages in the lung collagen fibrosis of alveolar walls	(22)
21 nm (anatataz) / (anatase) 250 nm (anatataz) / (anatase)	szczur F344: 23,5 mg/m <sup>3</sup> , 6 godz./dzień, 5 dni/tydz. przez 12 tyg. / F344 rats: 23.5 mg/m <sup>3</sup> , 6 h/day, 5 days/week for 12 weeks	depozycja cząstek w dolnych drogach oddechowych, ostry stan zapalny w płucach, szybsze przenikanie nanocząstek do tkanki śródmiąższowej płuc, wydłużenie czasu retencji w porównaniu z większymi cząstkami (klirens dla $\text{TiO}_2$ : 21 nm – $t_{1/2}$ = 501 dni, $\text{TiO}_2$ : 250 nm – $t_{1/2}$ = 174 dni), proliferacja pneumocytów typu II, niedrożność porów Kohna, ogniska zwłóknieniowe śródmiąższu, upośledzenie funkcji makrofagów pęcherzykowych (korelacja zmian z wielkością powierzchni) / particle deposition in the lower airways, acute inflammatory response the increased translocation of the nanoparticles to the pulmonary interstitium, prolongation in lung retention compared with a larger particle size (pulmonary clearance of $\text{TiO}_2$ : 21 nm – $t_{1/2}$ = 501 days and of $\text{TiO}_2$ : 250 nm – $t_{1/2}$ = 174 days), type II cell proliferation; occlusion of pores of Kohn, the interstitial fibrotic foci, impairment of alveolar macrophage function (effects correlated with particle area size)	(23,24)
21 nm anatataz-rutyl 80:20% / / 21 nm anatase-rutile 80:20%	szczur CDF (F344)/CrIBR, chomik LVG (SYR) BR, mysz B3C3F1/ChIBR: 0,5; 2; 10 mg/m <sup>3</sup> , 6 godz./dzień, 5 dni/tydz. przez 13 tyg. / CDF (F344)/ChIBR rats, LVG (SYR) BR hamsters, B3C3F1/ChIBR mice: 0,5; 2; 10 mg/m <sup>3</sup> , 6 h/day, 5 days/week for 13 weeks	depozycja cząstek w płucach i okolicznych węzłach chłonnych we wszystkich narażonych grupach – zależnie od stężenia, najmniejsza u chomików; 0,5 mg/m <sup>3</sup> – wydłużony czas retencji cząstek – u myszy i szczurów, 2 mg/m <sup>3</sup> – zwiększenie liczby makrofagów w neutrofilii oraz aktywności LDH i białek w BALF (stan zapalny) u myszy i szczurów, 10 mg/m <sup>3</sup> – zmiany proliferacyjne i zwłóknieniowe w płucach, kumulacja cząstek w tkance śródmiąższowej płuc – szczury / particle deposition in the lungs and local lymph nodes in all exposed animal groups, depending on the concentration, the lowest in hamsters; 0,5 mg/m <sup>3</sup> – retardation of particle clearance – in mice and rats; 2 mg/m <sup>3</sup> – increased number of macrophages and neutrophils, LDH activity and protein in BALF (inflammation) in mice and rats; 10 mg/m <sup>3</sup> – proliferative and fibrotic changes in the lungs, accumulation of particles in the lung interstitium – rats	(25)
15–40 nm anatataz-rutyl 80:20%, SSA 48±2 m <sup>2</sup> /g / / 15–40 nm anatase-rutile 80:20%, SSA 48±2 m <sup>2</sup> /g	szczur Wistar: 10 g/m <sup>3</sup> , 18 godz./dzień, 5 dni/tydz. przez 2 lata / Wistar rats: 10 mg/m <sup>3</sup> , 18 h/day, 5 day/week for 2 years mysz NMRI: 10 g/m <sup>3</sup> , 18 godz./dzień, 5 dni/tydz. przez 13,5 miesięcy / NMRI mice: 10 mg/m <sup>3</sup> , 18 h/day, 5 day/week for 13.5 months	zwiększona śmiertelność, zmiany w płucach: depozycja cząstek (oba gatunki), wydłużony czas retencji cząstek, stan zapalny (wzrost stężenia białek i aktywności LDH w BALF), zwłóknienie śródmiąższowe, roztrost oskrzelowo-pęcherzykowy (tylko szczury) / increased mortality, changes in the lung; particle deposition (both species), increased particle retention, inflammation (increase in the protein concentration and LDH activity in BALF), interstitial fibrosis, bronchoalveolar hyperplasia (rats only)	(29)
~84% cząstek / particles < 13 μm; MMAD : 1,5–1,7 μm	szczur rasy CD: 10, 50, 250 mg/m <sup>3</sup> , 6 godz./dzień, 5 dni/tydz. przez 2 lata / / CD rats: 10, 50, 250 mg/m <sup>3</sup> , 6 h/day, 5 days/week for 2 years	niewielki wzrost przypadków zapalenia płuc, tchawicy, śluzówki nosa we wszystkich narażonych grupach zwierząt / a slight increase in cases of the inflammation of the lungs, trachea, nasal mucosa in all exposed animal groups 50 i 250 mg/m <sup>3</sup> – zależnie od dawki: gromadzenie się plankwatów makrofagów pęcherzykowych, rozrost pneumocytów typu II, proteinoza pęcherzyków płucnych, ziarniaki cholesterolowe, zwłóknienie kolagenowe, ogniskowe zapalenie oplucnej, depozycja cząstek w tchawiczo-oskrzelowych węzłach chłonnych; 250 mg/m <sup>3</sup> – duża akumulacja cząstek znacznie upośledzająca klirens płuc / 50 and 250 mg/m <sup>3</sup> – a dose-dependent accumulation of foamy macrophages, type II pneumocyte proliferation, alveolar proteinosis, cholesterol granulomas, collagen fibrosis, focal pleuritis, particle deposition in the tracheobronchial lymph nodes; 250 mg/m <sup>3</sup> – a large accumulation of particles significantly interfering with the clearance of the lungs	(30,31)

SSA – specyficzne pole powierzchni / specific surface area, MMAD – aerodynamiczna mediana, LDH – dehydrogenaza mleczanowa / lactate dehydrogenase, BALF – popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe / bronchoalveolar lavage fluid.

**Tabela 2.** Wyniki testów genotoksycznego i mutagennego działania ditlenku tytanu  
**Table 2.** Results of titanium dioxide genotoxicity and mutagenicity tests

Test	UV-Vis UVA	Wynik Result		Rodzaj cząstek TiO <sub>2</sub> TiO <sub>2</sub> particle type	Piśmiennictwo Reference
		bez aktywacji metabolicznej without metabolic activation	z aktywacją metaboliczną with metabolic activation		
<i>In vitro</i> mutacje powrotne / reverse mutation					
S. Typhimurium TA100, TA102, TA98	-	-	n.b.	anatraz / anatase: 21 nm	(32)
S. Typhimurium TA100, TA102, TA98, TA1535, TA1537	-	-	n.b.	anatraz / anatase: 1 nm	(33)
mutacje genowe / gene mutation					
komórki chłoniaka myszy L5178Y / L5178Y mouse lymphoma cells	±	-	n.b.	anatraz / anatase: 21 nm	(32)
komórki jajnika chomika chińskiego CHO-K1 lokus Hprt / Chinese hamster CHO-K1 cells Hprt locus	-	-	n.b.	anatraz / anatase: < 25 nm	(34)
pęknięcia nici DNA, test kometowy / DNA strand breaks, comet assay					
komórki chłoniaka myszy L5178Y / L5178Y mouse lymphoma cells	-	-	n.b.	anatraz / anatase: 21 nm	(32)
fibroblasty płuc chomika chińskiego / Chinese hamsters lung fibroblast cells	+	+	n.b.	anatraz / anatase: 21 nm	(35)
	-	+	n.b.	anatraz / anatase: 6 nm, anatraz / anatase: 34 nm, nanoflamenty rutylu / rutile nanoflaments: 15 nm	(35)
ludzkie komórki limfoblastoidalne TK6 / TK6 human lymphoblastoid cells	-	-	n.b.	anatraz / anatase: 10 nm	(33)
komórki jajnika chomika chińskiego CHO-K1 / Chinese hamster CHO-K1 cells	-	-	n.b.	anatraz / anatase: < 25 nm	(34)
ludzkie limfocyty krwi obwodowej / human peripheral blood lymphocytes	+	+	n.b.	anatraz / anatase: 20 nm	(37)
	-	(+)	n.b.	rutyl / rutile: 30 nm	(36)
ludzkie komórki nabłonka owodni (WISH) / human amnion epithelial (WISH) cells	-	+	n.b.	anatraz / anatase: < 100 nm	(38)
nowotworowe komórki linii HEp-2 / cancer HEp-2 line cells	-	+	n.b.	anatraz / anatase: 10 nm, 20 nm	(39)
oksydacyjne uszkodzenia DNA / oxidative DNA damage					
ludzkie komórki nabłonka oskrzelowego BEAS-2B / human BEAS-2B bronchial epithelial cells	-	+	n.b.	anatraz / anatase: 20 nm, rutyl / rutile: 20 nm	(41)
MN, test mikrojądrowy / micronucleus formation					
komórki nabłonka wątrobowego szczura RLE / rat RLE liver epithelial cells	±	-	n.b.	≤ 20 nm	(39)
embrionalne fibroblasty chomika syryjskiego SHE / Syrian hamster SHE embryo fibroblasts	-	+	n.b.	anatraz / anatase: 10 nm, 20 nm	(40)
ludzkie komórki nabłonka oskrzelowego BEAS-2B / human BEAS-2B bronchial epithelial cells	-	+	n.b.	anatraz / anatase: 20 nm	(37)
ludzkie limfocyty krwi obwodowej / human peripheral blood lymphocytes	+	+	n.b.		
	-	(+)	n.b.		
nowotworowe komórki linii HEp-2 / cancer HEp-2 line cells	-	+	n.b.	anatraz / anatase: < 100 nm	(38)

**Tabela 2.** Wyniki testów genotoksycznego i mutagennego działania ditlenku tytanu – cd.  
**Table 2.** Results of titanium dioxide genotoxicity and mutagenicity tests – cont.

Test	Wynik Result		Rodzaj cząstek TiO <sub>2</sub> TiO <sub>2</sub> particle type	Piśmiennictwo Reference
	UV-Vis UVA	bez aktywacji without metabolic activation		
aberracje chromosomowe / chromosomal aberration				
komórki chłoniaka myszy L5178Y / L5178Y mouse lymphoma cells	-	-	anataz / anatase: 21 nm	(32)
komórki jajnika chomika chińskiego CHO / Chinese hamster CHO ovary cells	±	-	anataz / anatase: 21 nm	(42)
<i>In vivo</i>				
pęknięcia nici DNA, test kometowy / DNA strand breaks, comet test				
komórki szpiku kostnego i komórki watroby myszy / mouse bone-marrow cells and liver cells		+	anataz / anatase: 33 nm	(43)
addukty DNA / DNA adducts				
płuca szczura (narażenie inhalacyjne, 2 lata, stężenie: 10,4 mg/m <sup>3</sup> ) / rat lung (inhalation exposure, 2 years, concentration: 10.4 mg/m <sup>3</sup> )		-	anataz / anatase: 15–30 nm	(44)

„+” – wynik pozytywny / positive, „(+)” – wynik słabo pozytywny / weak positive, „-” – nie badano / not tested.  
 UV-Vis/UVA – badanie poprzedzone promieniowaniem UV-Vis bądź UVA / after UV-Vis or UVA radiation, „±” – oba badania z udziałem i bez promieniowania UV-Vis bądź UVA / after or without UV-Vis or UVA radiation.

światłem z zakresu UV-Vis lub UVA (37). Mikrojądra zaobserwowano w nowotworowych komórkach linii HEp-2 (38). Pozytywne wyniki tego testu dla nanocząstek TiO<sub>2</sub> uzyskano w przypadku embrionalnych fibroblastów chomika syryjskiego, ludzkich komórek nabłonka oskrzelowego i w ludzkich limfocytach krwi obwodowej (39,40,44). Negatywny wynik testu mikrojądrowego uzyskano tylko w jednym badaniu – w komórkach nabłonka wątrobowego szczura (41).

W limfocytach zaobserwowano także wpływ promieniowania UV-Vis na genotoksyczność (44). Aberacje chromosomowe wystąpiły w komórkach chłonia-ka myszy po poprzednim napromieniowaniu, natomiast nie zaobserwowano ich w komórkach jajnika chomika chińskiego zarówno bez napromieniowania, jak i po nim (42). W testach *in vivo* ditlenek tytanu wywoływał pęknięcia nici DNA (43), ale nie zaobserwowano adduktów DNA (44).

### Działanie rakotwórcze

Eksperti Narodowego Instytutu Bezpieczeństwa i Higieny Pracy (National Institute for Occupational Safety and Health – NIOSH) przeprowadzili wnikliwą analizę dostępnych badań na temat skutków narażenia na TiO<sub>2</sub> na układ oddechowy (45). Na podstawie badań eksperymentalnych i ilościowej oceny ryzyka uznano, że nanocząstki TiO<sub>2</sub> (frakcja ultrafine) działają rakotwórczo. Zdaniem ekspertów NIOSH ditlenek tytanu nie jest bezpośrednim kancerogenem, ale działa poprzez wtórny mechanizm genotoksyczny, związany z wielkością cząstek i ich polem powierzchni (45).

Badania nad rakotwórczym działaniem ditlenku tytanu podawanego w paszy myszom i szczurom, przeprowadzone przez ekspertów z Narodowego Instytutu Nowotworów w Stanach Zjednoczonych (National Cancer Institute – NCI), nie wykazały statystycznie istotnych różnic w występowaniu nowotworów między zwierzętami narażanymi a kontrolnymi (46). W badaniu nie określono jednak wielkości cząstek.

Działanie rakotwórcze ditlenku tytanu opisano jedynie u szczurów narażanych inhalacyjnie na nanocząstki (29,30). Nowotwory indukowane przez TiO<sub>2</sub> to raki kolczystokomórkowe, gruczolaki, gruczolakoraki i raki płuc.

Heinrich i wsp. przeprowadzili 2-letni eksperyment inhalacyjny na myszach i szczurach narażanych na nanocząstki TiO<sub>2</sub> (15–40 nm) (29). U myszy zaobserwowano wzrost śmiertelności oraz występowanie gruczolaków i gruczolakoraków w płucach. Uzyskane wyniki nie były jednak istotnie różne statystycznie od uzyskanych



w grupie kontrolnej. Z kolei u szczurów nowotwory złośliwe (raki kolczystokomórkowe, gruczolaki lub gruczolakoraki) wystąpiły u 19/100 zwierząt, podczas gdy w grupie kontrolnej wystąpił 1 nowotwór płuc – gruczolakorak (istotność statystyczna:  $p < 0,05$ ) (29).

Dla porównania w badaniu Lee i wsp. szczury narażano inhalacyjnie przez 2 lata na większe cząstki ditlenku tytanu (~84% cząstek  $< 13 \mu\text{m}$ ; MMAD (aerodynamiczna mediana średnicy / mass median aerodynamic diameter): 1,5–1,7  $\mu\text{m}$ ) (30). Nie zaobserwowano różnic w przeżywalności ani masie ciała między zwierzętami narażanymi a tymi z grupy kontrolnej. Zapadalność na nowotwory płuc (gruczolaki, raki kolczystokomórkowe) różniła się statystycznie, jednak autorzy publikacji zwracają uwagę na biologiczne różnice, m.in. w typie nowotworu, jego lokalizacji anatomicznej i mechanizmie powstawania nowotworów między guzami zaobserwowanymi u szczurów a rakiem płuca występującym u ludzi. Rakotwórcze działanie ditlenku tytanu może więc dotyczyć jedynie zwierząt (30).

Warheit i Frame w późniejszym opracowaniu dotyczącym wyżej opisanego eksperymentu zmienili klasyfikację 11 z 15 raków kolczystokomórkowych na nienowotworowe zmiany płucne – torbiele keratynowe, charakterystyczne dla stanu przeładowania płuc u szczurów (47).

Z kolei Pott i Roller badali 19 ziarnistych pyłów (m.in. ditlenek tytanu o różnej wielkości cząstek – 25 i 200 nm), które podawali szczurom dotchawczo. Autorzy wykazali statystycznie istotny wzrost częstości nowotworów płuc (raki kolczystokomórkowe, gruczolaki i raki) u narażanych zwierząt w porównaniu z grupą kontrolną, a także zależność efektu od wielkości cząstek (48,49).

### **Wpływ na rozwój płodu i rozrodczość**

Sun i wsp. opisują badania potwierdzające negatywny wpływ nanocząstek na rozwój płodu i na funkcje układu rozrodczego u zwierząt (50). Nanocząstki TiO<sub>2</sub> mogą przechodzić przez barierę krew-łożysko i wpływać na płód. Jak wskazują Yamashita i wsp., po dożylnym podaniu nanocząstek TiO<sub>2</sub> ciężarnym myszom substancję wykryto w łożysku oraz wątrobie i mózgu płodu (51). Ponadto zaobserwowano zmniejszenie masy ciała płodów oraz zmniejszenie macicy u matki.

Prenatalne narażenie na nanocząstki ditlenku tytanu może wpływać na rozwój płodowy potomstwa u myszy, w tym na ośrodkowy układ nerwowy. U potomstwa myszy, którym nano-TiO<sub>2</sub> wstrzykiwano podskórnym w czasie ciąży, zaobserwowano:

- zmienioną ekspresję genów związanych z apoptozą, rozwojem mózgu, neurotransmiterami oraz odpowiedzią na stres oksydacyjny (52),
- znaczący statystycznie wzrost poziomu dopaminy i jej metabolitów w 2 obszarach mózgu – korze przedczołowej i jądrze ogoniastym (neostriatum) (53),
- zmiany w korze mózgowej, opuszce węchowej i niektórych rejonach związanych z układem dopaminergicznym (54),
- zwiększenie liczby neuronów mitralnych zawierających kaspazę 3 (marker apoptozy) w opuszce węchowej (55),
- zmiany w ekspresji genów związanych ze szlakiem sygnałowym kwasu retinowego w komórkach wątroby samic myszy narażanych prenatalnie (56).

Nanocząstki ditlenku tytanu przechodzące z organizmu narażanej matki do organizmu płodów mogą wywoływać uszkodzenia w funkcjonowaniu męskiego układu rozrodczego i zmiany w nerwie węchowym u potomstwa. Takeda i wsp. zaobserwowali obecność ditlenku tytanu w jądrach (komórkach Leydiga, Sertoliego i spermatydach) u męskiego potomstwa myszy narażanego prenatalnie oraz obniżenie masy ciała młodych samców (55). Ponadto wystąpiły nieprawidłowości w budowie kanalików nasiennych i zmniejszenie ilości dojrzałej spermy w ich świetle.

Prenatalne narażenie na nanoditlenek tytanu nie wpływało natomiast na działanie żeńskiego układu rozrodczego u młodych samic, badanego mutacją w locus ESTR (markerem mutagenności wobec żeńskich komórek rozrodczych) u myszy z pokolenia F1 i F2, jak opisują Boisen i wsp. (57).

Hougaard i wsp. wskazują, że u potomstwa myszy eksponowanych na ditlenek tytanu mogą wystąpić zmiany neurobehawioralne (58). W badaniu opisanym przez ww. autorów dorosłe myszy narażane prenatalnie (inhalacja ciężarnych matek) poddano testom behawioralnym. Zwierzęta unikały centralnego obszaru w teście otwartego pola, a u narażanych prenatalnie samic zaobserwowano większą skuteczność przedbodźca w hamowaniu reakcji zaskoczenia na bodziec słuchowy. Funkcje poznawcze, badane w teście labiryntu wodnego Morrissa, nie zostały zmienione.

Ditlenek tytanu w formie nanocząstek może szkodliwie wpływać na rozrodczość u narażanych zwierząt, zarówno samic jak i samców, jak opisują Gao i wsp. (59,60). U samic myszy eksponowanych na ten związek drogą pokarmową zaobserwowano groma-

dzenie się  $\text{TiO}_2$  w jajnikach i zaburzenia w zawartości mikroelementów odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie tych gruczołów (59). U narażanych zwierząt ponadto istotnie zmniejszyły się wskaźniki płodności (wskaźnik krycia, zapłodnień, żywych płodów i urodzeń). Zaburzona została także gospodarka hormonów płciowych – wzrost stężenia estradiolu i hormonu folikulotropowego, obniżenie progesteronu, hormonu luteinizującego i testosteronu. Badania ekspresji genów wskazują na wzmożoną syntezę estradiolu oraz zwiększony metabolizm progesteronu.

Z kolei u samców myszy narażanych dożyłkowo nanocząstki  $\text{TiO}_2$  pokonywały barierę krew–jądra, kumulując się w jądrach, wywołując w nich zmiany i zaburzenia w produkcji spermy (zmniejszenie liczby i ruchliwości plemników oraz zwiększenie liczby plemników o nieprawidłowej budowie) (60). Ponadto zaobserwowano zmiany stężenia hormonów płciowych w surowicy krwi. Zmieniła się ekspresja 142 genów odpowiedzialnych za spermatogenezę oraz przemiany steroidów i hormonów.

## WNIOSKI

Ditlenek tytanu nie ma klasyfikacji zharmonizowanej ani nie znajduje 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 (61). Jest substancją uznawaną za bezpieczną i obojętną dla zdrowia. Coraz szersze zastosowanie nanocząstek  $\text{TiO}_2$ , głównie jako blokera promieniowania UV, spowodowało jednak większe zainteresowanie biologicznym działaniem tej substancji. Wiadomo, że nanocząstki różnią się właściwościami od formy wielkocząstkowej, a zatem działaniem biologicznym i stopniem toksyczności.

Nanocząstki  $\text{TiO}_2$  mogą się wchłaniać drogą oddechową lub pokarmową. Dane dotyczące wchłaniania przez skórę nie są jednoznaczne, dlatego wymagają potwierdzenia w dalszych badaniach. Z punktu widzenia narażenia zawodowego największe niebezpieczeństwo stwarza narażenie drogą inhalacyjną. Nanocząstki ditlenku tytanu docierają głównie do płuc, wątroby i śledziony, ale wykrywano je także w mózgu narażanych zwierząt. Mogą powodować zmiany parametrów bio-

chemicznych i ekspresji genów, co wskazuje na możliwość uszkodzenia wątroby, nerek, mięśnia sercowego i narządów płciowych.

Przewlekłe narażenie na nanocząstki ditlenku tytanu drogą inhalacyjną powoduje przede wszystkim objawy stanu zapalnego, które mogą prowadzić do zmian zwłóknieniowych i proliferacyjnych. Istnieją też badania potwierdzające negatywny wpływ nanocząstek  $\text{TiO}_2$  na rozwój płodu, jak również na funkcje układu rozrodczego u zwierząt. Działanie mutagenne nanoditlenku tytanu jest nieznaczne, w przeciwieństwie do działania genotoksycznego na komórki ssaków i ludzi, potwierdzonego w wielu pracach. Działanie to jest silniejsze po uprzednim napromieniowaniu komórek światłem z zakresu UV-Vis. Rakotwórcze działanie nanoditlenku tytanu zaobserwowano głównie u szczurów narażanych inhalacyjnie.

Wobec tak niepokojących danych dotyczących nanocząstek należy zwrócić większą uwagę na narażenie na tę postać ditlenku tytanu i jego skutki dla zdrowia ludzi. Istnieje niewiele prac opisujących stan zdrowia osób pracujących w narażeniu na nano- $\text{TiO}_2$ . Przeważająca większość danych dotyczy frakcji wdychalnej ditlenku tytanu, podczas gdy to głównie nanocząstki są odpowiedzialne za potencjalne szkodliwe skutki dla zdrowia. W obecnej sytuacji możliwe jest szacowanie ryzyka zdrowotnego narażenia na nanocząstki ditlenku tytanu jedynie w oparciu o dane pochodzące z badań na zwierzętach.

## PIŚMIENNICTWO

1. Warheit D.B., Webb T.R., Reed K.L., Frerichs S., Sayes C.M.: Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine- $\text{TiO}_2$  particles: Differential responses related to surface properties. *Toxicology* 2007;230: 90–104, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2006.11.002>
2. Nanopowders and nanoparticle dispersions [cytowany 20 marca 2014]. Adres: <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/material-science-products.html?TablePage=18010474>
3. Eydner M., Schaudien D., Creutzenberg O., Ernst H., Hansen T., Baumgärtner W. i wsp.: Impacts after inhalation of nano- and fine-sized titanium dioxide particles: Morphological changes, translocation within the rat lung, and evaluation of particle deposition using the relative deposition index. *Inhal. Toxicol.* 2012;24(9):557–569, <http://dx.doi.org/10.3109/08958378.2012.697494>
4. Mühlfeld C., Geiser M., Kapp N., Gehr P., Rothen-Rutishauser B.: Re-evaluation of pulmonary titanium dioxide

- nanoparticle distribution using the „relative deposition index”: Evidence for clearance through microvasculature. *Part. Fibre Toxicol.* 2007;29(4):7, <http://dx.doi.org/10.1186/1743-8977-4-7>
5. van Ravenzwaay B., Landsiedel R., Fabian E., Burkhardt S., Strauss V., Ma-Hock L.: Comparing fate and effects of three particles of different surface properties: Nano-TiO<sub>2</sub>, pigmentary TiO<sub>2</sub> and quartz. *Toxicol. Lett.* 2009;186(3):152–159, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.11.020>
  6. Wang J., Liu Y., Jiao F., Lao F., Li W., Gu Y. i wsp.: Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Toxicology* 2008;254(1–2):82–90, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2008.09.014>
  7. Li Y., Li J., Yin J., Li W., Kang C., Huang Q. i wsp.: Systematic influence induced by 3 nm titanium dioxide following intratracheal instillation of mice. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2010;10(12):8544–8549, <http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2010.2690>
  8. Wang J., Zhou G., Chen C., Yu H., Wang T., Ma Y. i wsp.: Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol. Lett.* 2007;168(2):176–185, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.12.001>
  9. Cho W.S., Kang B.C., Lee J.K., Jeong J., Che J.H., Seok S.H.: Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. *Part. Fibre Toxicol.* 2013;10:9, <http://dx.doi.org/10.1186/1743-8977-10-9>
  10. Sadrieh N., Wokovich A.M., Gopee N.V., Zheng J., Haines D., Parmiter D. i wsp.: Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO<sub>2</sub> particles. *Toxicol. Sci.* 2010;115(1):156–166, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfq041>
  11. Monteiro-Riviere N.A., Wiench K., Landsiedel R., Schulte S., Inman A.O., Riviere J.E.: Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in UVB sunburned skin: An *in vitro* and *in vivo* study. *Toxicol. Sci.* 2011;123(1):264–280, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfr148>
  12. Wu J., Liu W., Xue C., Zhou S., Lan F., Bi L. i wsp.: Toxicity and penetration of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol. Lett.* 2009;191(1):1–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.05.020>
  13. Umbreit T.H., Francke-Carroll S., Weaver J.L., Miller T.J., Goering P.L., Sadrieh N. i wsp.: Tissue distribution and histopathological effects of titanium dioxide nanoparticles after intravenous or subcutaneous injection in mice. *J. Appl. Toxicol.* 2012;32(5):350–357, <http://dx.doi.org/10.1002/jat.1700>
  14. Sugibayashi K., Todo H., Kimura E.: Safety evaluation of titanium dioxide nanoparticles by their absorption and elimination profiles. *J. Toxicol. Sci.* 2008;33(3):293–298, <http://dx.doi.org/10.2131/jts.33.293>
  15. Xie G., Wang C., Sun J., Zhong G.: Tissue distribution and excretion of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 2011;205(1):55–61, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.04.034>
  16. Warheit D.B., Hoke R.A., Finlay C., Donner E.M., Reed K.L., Sayes C.M.: Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO<sub>2</sub> particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicol. Lett.* 2007;171(3):99–110, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.04.008>
  17. de Haar C., Hassing I., Bol M., Bleumink R., Pieters R.: Ultrafine but not fine particulate matter causes airway inflammation and allergic airway sensitization to co-administered antigen in mice. *Clin. Exp. Allergy* 2006;36(11):1469–1479, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02586.x>
  18. Jonasson S., Gustafsson A., Koch B., Bucht A.: Inhalation exposure of nano-scaled titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) particles alters the inflammatory responses in asthmatic mice. *Inhal Toxicol.* 2013;25(4):179–191, <http://dx.doi.org/10.3109/08958378.2013.770939>
  19. Bu Q., Yan G., Deng P., Peng F., Lin H., Xu Y. i wsp.: NMR-based metabonomic study of the sub-acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles in rats after oral administration. *Nanotechnology* 2010;21(12):125105, <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/21/12/125105>
  20. Hu R., Zheng L., Zhang T., Gao G., Cui Y., Cheng Z. i wsp.: Molecular mechanism of hippocampal apoptosis of mice following exposure to titanium dioxide nanoparticles. *J. Hazard. Mater.* 2011;191(1–3):32–40, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.04.027>
  21. Gui S., Zhang Z., Zheng L., Cui Y., Liu X., Li N. i wsp.: Molecular mechanism of kidney injury of mice caused by exposure to titanium dioxide nanoparticles. *J. Hazard. Mater.* 2011;195:365–370, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.08.055>
  22. Baggs R.B., Ferin J., Oberdörster G.: Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats. *Vet. Pathol.* 1997;34(6):592–597, <http://dx.doi.org/10.1177/030098589703400607>
  23. Ferin J., Oberdörster G., Penney D.P.: Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am. J. Resp. Cell. Mol.* 1992;6(5):535–542, <http://dx.doi.org/10.1165/ajrcmb/6.5.535>

24. Oberdörster G., Ferin J., Lehnert B.E.: Correlation between particle size, *in vivo* particle persistence, and lung injury. *Environ. Health Persp.* 1994;102(5):173–9, <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.94102s5173>
25. Bermudez E., Mangum J.B., Wong B.A., Asgharian B., Hext P.M., Warheit D.B. i wsp.: Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol. Sci.* 2004;77(2): 347–357, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfh019>
26. LeBlanc A.J., Moseley A.M., Chen B.T., Frazer D., Castranova V., Nurkiewicz T.R.: Nanoparticle inhalation impairs coronary microvascular reactivity via a local reactive oxygen species-dependent mechanism. *Cardiovasc. Toxicol.* 2010;10(1):27–36, <http://dx.doi.org/10.1007/s12012-009-9060-4>
27. Grassian V.H., O’Shaughnessy P.T., Adamcakova-Dodd A., Pettibone J.M., Thorne P.S.: Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. *Environ. Health Persp.* 2007;115(3): 397–402, <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.9469>
28. Ma-Hock L., Burkhardt S., Strauss V., Gamer A.O., Wiench K., van Ravenzwaay B. i wsp.: Development of a short-term inhalation test in the rat using nano-titanium dioxide as a model substance. *Inhal. Toxicol.* 2009;21(2): 102–118, <http://dx.doi.org/10.1080/08958370802361057>
29. Heinrich U., Fuhst R., Rittinghausen S., Creutzenberg O., Bellmann B., Koch W. i wsp.: Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to diesel-engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhal. Toxicol.* 1995;7(4):533–556, <http://dx.doi.org/10.3109/08958379509015211>
30. Lee K.P., Trochimowicz H.J., Reinhardt C.F.: Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) by inhalation for two years. *Toxicol. Appl. Pharm.* 1985;79: 179–192, [http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X\(85\)90339-4](http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X(85)90339-4)
31. Trochimowicz H.J., Lee K.P., Reinhardt C.F.: Chronic inhalation exposure of rats to titanium dioxide dust. *J. Appl. Toxicol.* 1988;8(6):383–385
32. Nakagawa Y., Wakuri S., Sakamoto K., Tanaka N.: The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. *Mutat. Res./Gen. Toxicol. Environ. Mutag.* 1997;394:125–132, [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(97\)00126-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(97)00126-5)
33. Woodruff R.S., Li Y., Yan J., Bishop M., Jones M.Y., Watanabe F. i wsp.: Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles using the Ames test and Comet assay. *J. Appl. Toxicol.* 2012;32(11):934–943, <http://dx.doi.org/10.1002/jat.2781>
34. Wang S., Hunter L.A., Arslan Z., Wilkerson M.G., Wickliffe J.K.: Chronic exposure to nanosized, anatase titanium dioxide is not cyto- or genotoxic to Chinese hamster ovary cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 2011;52(8): 614–622, <http://dx.doi.org/10.1002/em.20660>
35. Hamzeh M., Sunahara G.I.: *In vitro* cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells. *Toxicol. In Vitro* 2013;27(2):864–873, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2012.12.018>
36. Saquib Q., Al-Khedhairi A.A., Siddiqui M.A., Abou-Tarboush F.M., Azam A., Musarrat J.: Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. *Toxicol. In Vitro* 2012;26(2):351–361, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.12.011>
37. Kang S.J., Lee Y.J., Kim B.M., Choi Y.J., Chung H.W.: Cytotoxicity and genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in UVA-irradiated normal peripheral blood lymphocytes. *Drug. Chem. Toxicol.* 2011;34(3):277–284, <http://dx.doi.org/10.3109/01480545.2010.546800>
38. Osman I.F., Baumgartner A., Cemeli E., Fletcher J.N., Anderson D.: Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in HEp-2 cells. *Nanomedicine (Lond)* 2010;5(8):1193–1203, <http://dx.doi.org/10.2217/nnm.10.52>
39. Rahman Q., Lohani M., Dopp E., Pemsel H., Jonas L., Weiss D.G. i wsp.: Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environ. Health Persp.* 2002;110: 797–800, <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.02110797>
40. Gurr J.R., Wang A.S., Chen C.H., Jan K.Y.: Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 2005;213:66–73, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2005.05.007>
41. Linnainmaa K., Kivipensas P., Vainio H.: Toxicity and cytogenetic studies of ultrafine titanium dioxide in cultured rat liver epithelial cells. *Toxicol. In Vitro* 1997;11: 329–335, [http://dx.doi.org/10.1016/S0887-2333\(97\)00000-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0887-2333(97)00000-3)
42. Theogaraj E., Riley S., Hughes L., Maier M., Kirkland D.: An investigation of the photo-clastogenic potential of ultrafine titanium dioxide particles. *Mutat. Res. Gen. Toxicol. Environ. Mutag.* 2007;634(1–2):205–219, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.08.002>
43. Sycheva L.P., Zhurkov V.S., Iurchenko V.V., Daugel-Dauge N.O., Kovalenko M.A., Krivtsova E.K. i wsp.: Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice *in vivo*. *Mutat. Res. Gen. Toxicol. Environ. Mutag.* 2011;726(1): 8–14, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.07.010>
44. Gallagher J., Heinrich U., George M., Hendee L., Phillips D.H., Lewtas J.: Formation of DNA adducts in rat



- lung following chronic inhalation of diesel emissions, carbon black and titanium dioxide particles. *Carcinogenesis* 1994;15:1291–1299, <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/15.7.1291>
45. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health. Occupational exposure to titanium dioxide. *Current Intelligence Bulletin* 63: NIOSH; April 2011 [cytowany 20 września 2014]. Adres: <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2011-160/pdfs/2011-160.pdf>
46. National Cancer Institute: Carcinogenesis. Technical report series no. 97. Bioassay of titanium dioxide for possible carcinogenicity. CAS No. 13463-67-7, NCI-CG-TR-97, 1979
47. Warheit D.B., Frame S.R.: Characterization and reclassification of titanium dioxide-related pulmonary lesions. *J. Occup. Environ. Med.* 2006;48:1308–1313, <http://dx.doi.org/10.1097/01.jom.0000215385.71548.b0>
48. Pott F., Roller M.: Carcinogenicity study with nineteen granular dusts in rats. *Eur. J. Oncol.* 2005;10(4):249–281
49. Mohr U., Ernst H., Roller M., Pott F.: Pulmonary tumor types induced in Wistar rats of the so-called „19-dust study”. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2006;58(1):13–20, <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2006.06.001>
50. Sun J., Zhang Q., Wang Z., Yan B.: Effects of nanotoxicity on female reproductivity and fetal development in animal models. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:9319–9337, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms14059319>
51. Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Mimura K., Morishita Y., Nozaki M. i wsp.: Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat. Nanotechnol.* 2011;6(5):321–328, <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2011.41>
52. Shimizu M., Tainaka H., Oba T., Mizuo K., Umezawa M., Takeda K.: Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse. *Part. Fibre Toxicol.* 2009;6:20, <http://dx.doi.org/10.1186/1743-8977-6-20>
53. Takahashi Y., Shinkai Y., Mizuo K., Oshio S., Takeda K.: Prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticles increases dopamine levels in the prefrontal cortex and neostriatum of mice. *J. Toxicol. Sci.* 2010;35(5):749–756, <http://dx.doi.org/10.2131/jts.35.749>
54. Umezawa M., Tainaka H., Kawashima N., Shimizu M., Takeda K.: Effect of fetal exposure to titanium dioxide nanoparticle on brain development – brain region information. *J. Toxicol. Sci.* 2012;37(6):1247–1252, <http://dx.doi.org/10.2131/jts.37.1247>
55. Takeda K., Suzuki K.I., Ishihara A., Kubo-Irie M., Fujimoto R., Tabata M. i wsp.: Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. *J. Health Sci.* 2009;55(1):95–102, <http://dx.doi.org/10.1248/jhs.55.95>
56. Jackson P., Halappanavar S., Hougaard K.S., Williams A., Madsen A.M., Lamson J.S. i wsp.: Maternal inhalation of surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan) in C57BL/6 mice: Effects in prenatally exposed offspring on hepatic DNA damage and gene expression. *Nanotoxicology* 2013;7(1):85–96, <http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2011.633715>
57. Boisen A.M., Shipley T., Jackson P., Hougaard K.S., Wallin H., Yauk C.L. i wsp.: NanoTiO<sub>2</sub> (UV-Titan) does not induce ESTR mutations in the germline of prenatally exposed female mice. *Part. Fibre Toxicol.* 2012;9:19, <http://dx.doi.org/10.1186/1743-8977-9-19>
58. Hougaard K.S., Jackson P., Jensen K.A., Sloth J.J., Löschner K., Larsen E.H. i wsp.: Effects of prenatal exposure to surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan). A study in mice. *Part. Fibre Toxicol.* 2010;7:16, <http://dx.doi.org/10.1186/1743-8977-7-16>
59. Gao G., Ze Y., Li B., Zhao X., Zhang T., Sheng L. i wsp.: Ovarian dysfunction and gene-expressed characteristics of female mice caused by long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. *J. Hazard. Mater.* 2012;243:19–27, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.08.049>
60. Gao G., Ze Y., Zhao X., Sang X., Zheng L., Ze X. i wsp.: Titanium dioxide nanoparticle-induced testicular damage, spermatogenesis suppression, and gene expression alterations in male mice. *J. Hazard. Mater.* 2013;258–259: 133–143, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.04.046>
61. 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. *DzUrz UE L* 353 z 31 grudnia 2008 r., s. 1