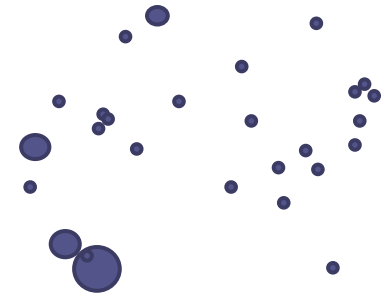


TOXICITA NANOČÁSTIC KOVŮ V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

Pavel Coufalík

Lékařská toxikologie, podzim 2017





iac
brno

- Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i.
- Veveří 97, 602 00 Brno
- <http://www.iach.cz/uiach-n/cz/index.htm>
- Oddělení analytické chemie životního prostředí
- Oddělení bioanalytické instrumentace
- Oddělení elektromigračních metod
- Oddělení separací v tekutých fázích
- Oddělení stopové prvkové analýzy



Úvod

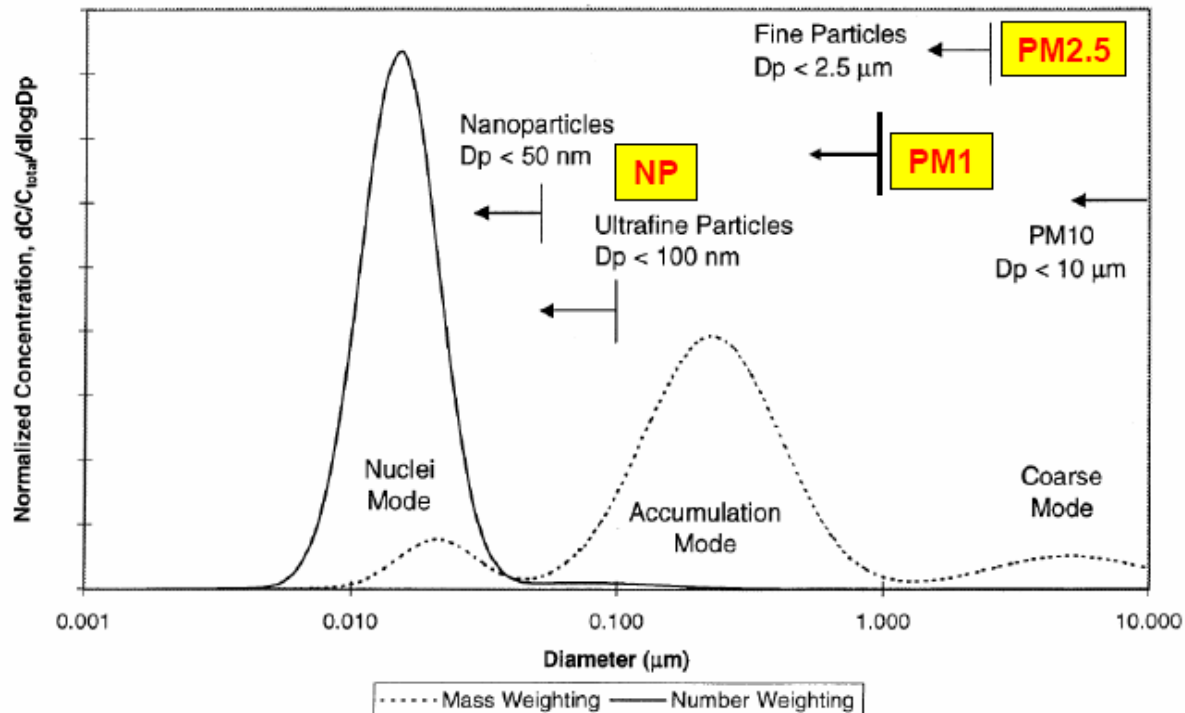
- Proč studovat kvalitu ovzduší?
- Vnitřní x vnější prostředí
- Plynné polutanty a polutanty vázané na částice
- Inhalační vstup látek do organismu – velmi nebezpečná cesta vstupu do organismu; velmi rychlé vstřebávání
- Osud látek v organismu; interakce; synergický efekt působení polutantů

Aerosol

- Tuhé i kapalně částice suspendované ve vzduchu
- TSP = total suspended particles
- PM = particulate matter
- PM₁₀ – velikost pod 10 μm
- PM_{2.5} – velikost pod 2,5 μm
- PM₁ – velikost pod 1 μm
- Nanočástice – částice, která má alespoň jeden rozměr pod 100 nm

Aerosol

- Přírodní a antropogenní zdroje
- Antropogenní zdroje – spalovací procesy, doprava, stavební a zemědělská činnost, těžební průmysl
- Aerosol v městském prostředí – jsou koncentrace v ovzduší „všude“ stejné?

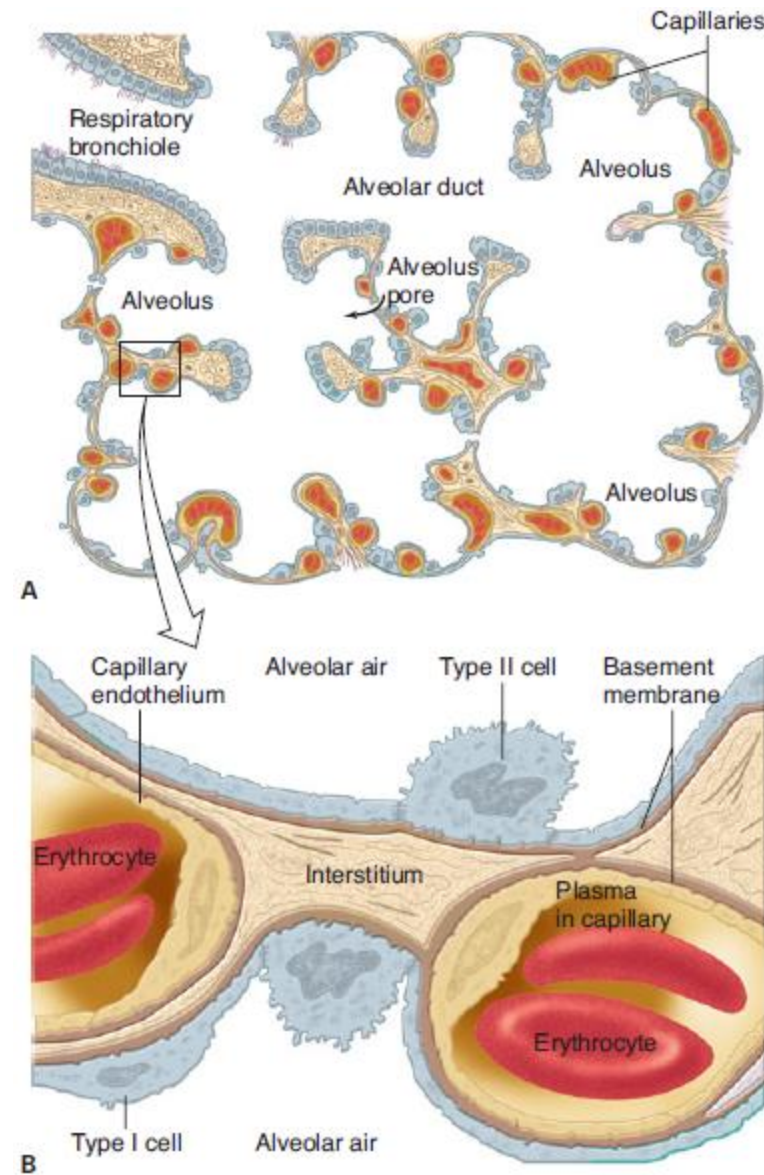


Zdravotní rizika

- Vysoká koncentrace aerosolu v životním prostředí zvyšuje výskyt chorob srdce a cév, způsobuje respirační a plicní choroby, astma
- Akutní a chronické účinky
- Částice PM10 – pronikání přes hrtan do dolních cest dýchacích
- Částice PM1 – pronikání částic až do plicních sklípků

Nanočástice

- Průnik mezibuněčnými prostory do organismu, fagocytóza, transcytóza
- Transport krví, mizou
- Depozice



Plicní sklípky

Nanočástice

- Vysoká reaktivita nanočástic = poškození obranných mechanismů plic, zánětlivé reakce, uvolňování volných radikálů
- Nanoparticles (NPs) – jaká mají rizika ???
- Spontánní tvorba NPs při kondenzaci z plynné fáze x uměle vyráběné NPs a nanomateriály
- Studium toxicity NPs *in-vitro* (studium vlastností, testy s buňkami plicní tkáně), *in-vivo* (testy na pokusných zvířatech – myši, potkani)
- Chování NPs v organismu a jejich toxicita závisí na: velikosti, tvaru, distribuci velikostí, struktuře, chemickém složení, obsahu nečistot, velikosti povrchu, stupni agregace, a případně i způsobu přípravy
- Toxicita NPs v aerosolech závisí na zdrojích emisí → studium chemického složení aerosolu → vzorkování aerosolu a následná detekce polutantů → vyhodnocení rizik

Vzorkování aerosolu

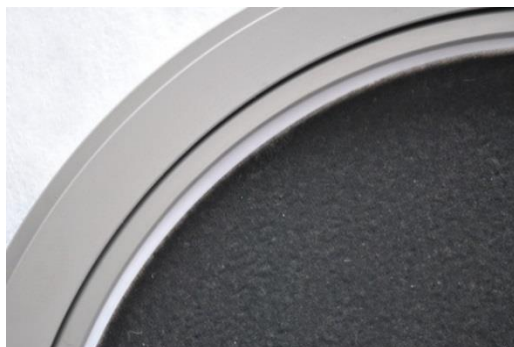
- On-line analýza x vzorkování aerosolu na filtry
- Velkoobjemový vzorkovač – záchyt aerosolu na 150 mm filtr; vzorkovací hlava pro PM₁₀, PM_{2.5}, PM₁
- Vzorkování např. 24 hod a následná analýza – složení aerosolu (uhlík, organické a anorganické polutanty)

Co studujeme:

- Městský aerosol, emise z paliv a z biopaliv z motorů, emise ze spalování biomasy, emise z průmyslu ...
- Analýza plynů – NH₃, NO_x, O₃



aerosol - Brno



emise z biopaliva



DHA-80 (Digitel)

Vzorkování aerosolu

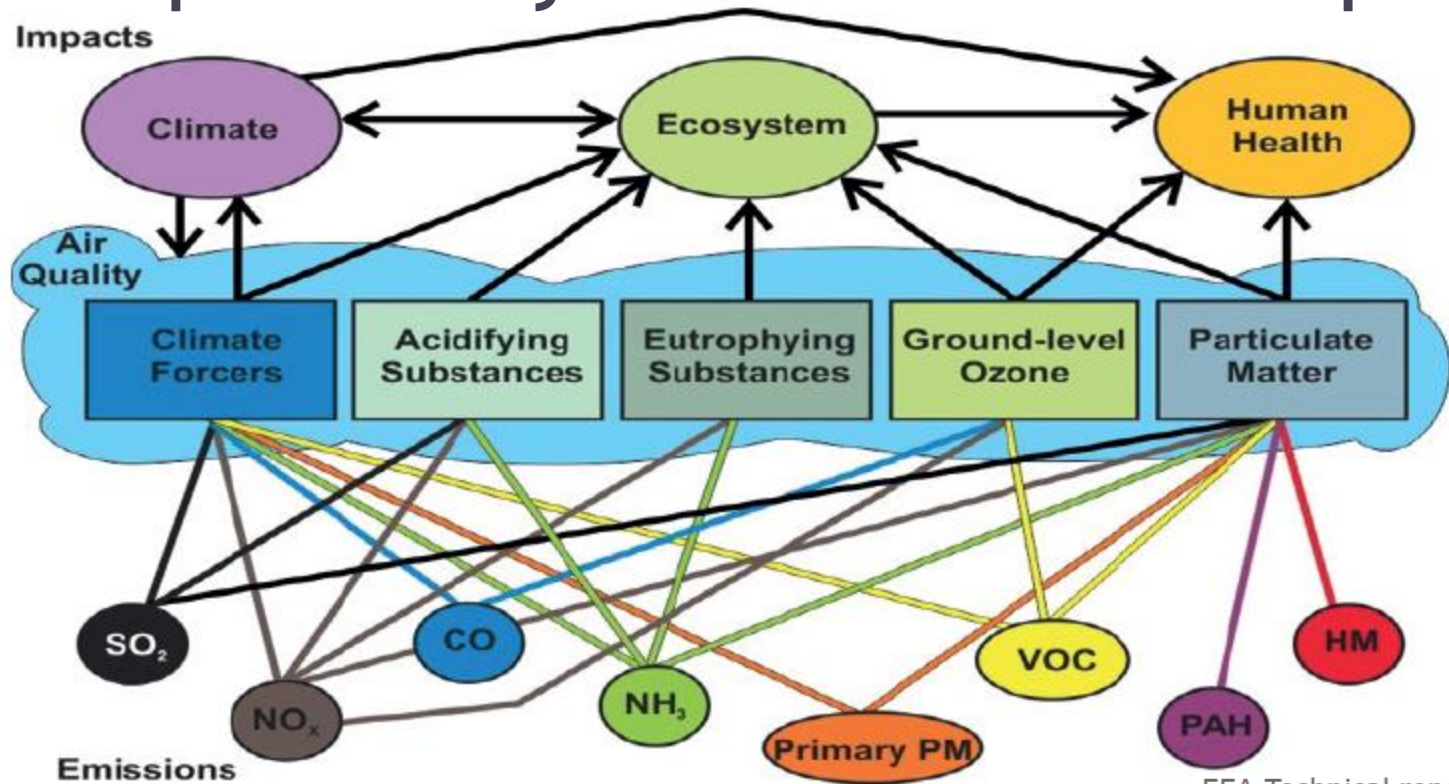
- Vzorkování celkových suspendovaných částic (TSP)
- Vzorkování nízkoobjemovými vzorkovači
- Vzorkování aerosolu pomocí kolektoru se záchytem částic do vodných vzorků
- Vzorkování pouličního prachu, městských půd ...



Vzorkování aerosolu Svalbard (Špicberky)

- Stanovení Al, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, As, Cd, Pb
- Detekován Al, Mn, Co, Pb
- Zdroj: uhlí z okolí + spalování nafty
- Vzorkování sněhu – atmosférická depozice

Hlavní polutanty v aerosolu v Evropě

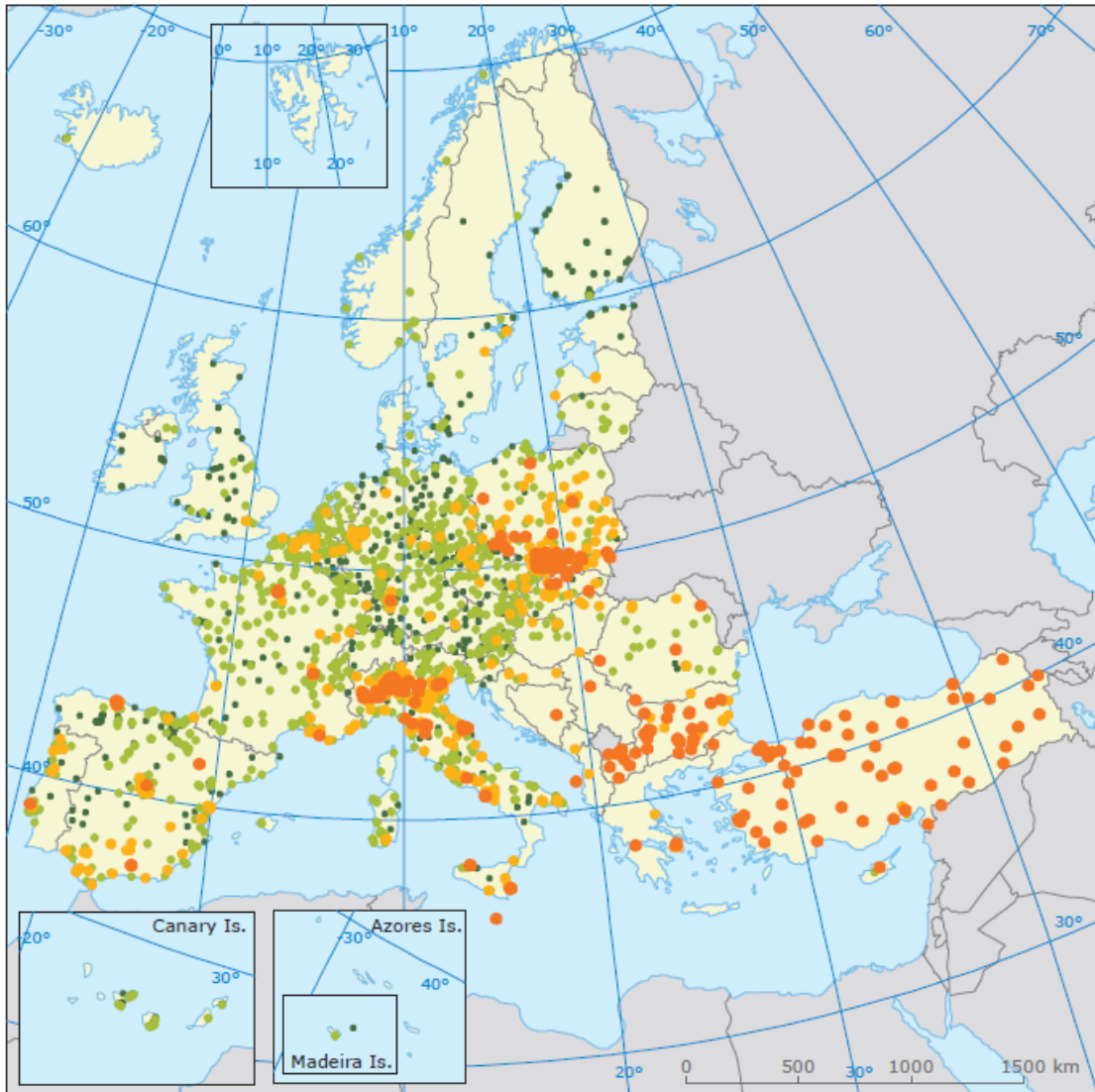


EEA Technical report | No 12/2011

Air quality limit and target values for As, Cd, Ni and Pb regulated by EU, and WHO air quality guidelines

| Pollutant | EU target or limit value ^(a) | WHO AQG |
|-----------|---|------------------------------------|
| Arsenic | 6 ng/m ³ ^(b) | - |
| Cadmium | 5 ng/m ³ ^(b) | 5 ng/m ³ ^(d) |
| Nickel | 20 ng/m ³ ^(b) | - |
| Lead | 500 ng/m ³ ^(c) | 500 ng/m ³ |

PM10 v Evropě

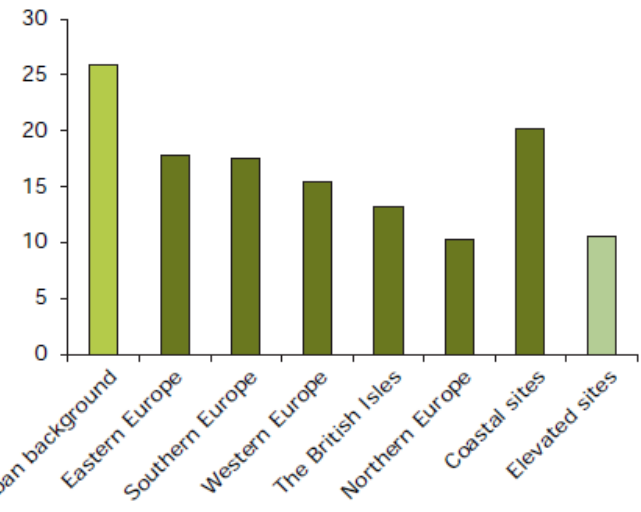


Annual mean, particulate matter (PM₁₀), 2009, based on daily averages with percentage of valid measurements 75 % in µg/m³

- ≤ 20
- 20-31
- 31-40
- ≥ 40

■ Outside data coverage

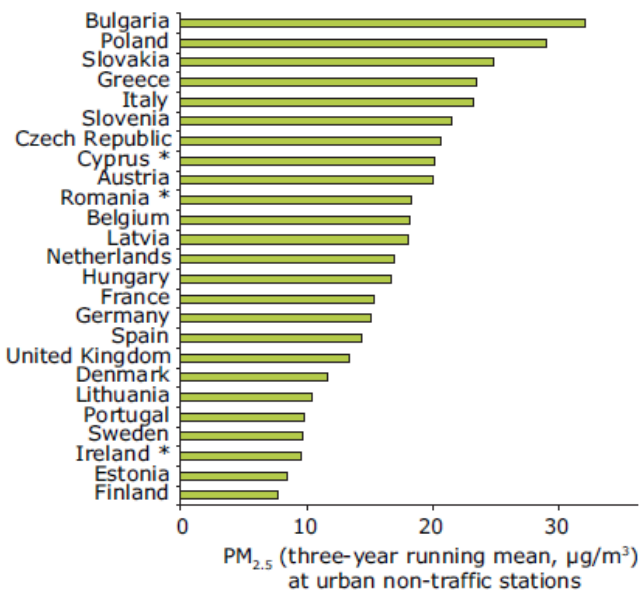
Concentration of PM₁₀ (µg/m³)



Stanovení kovů v aerosolu (Brno)

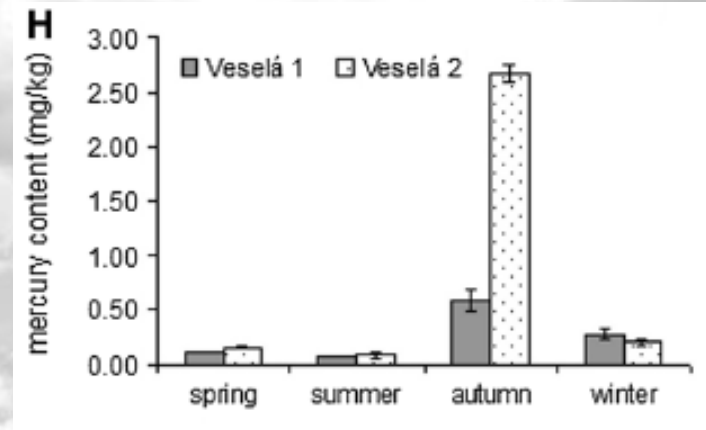
Průměrné koncentrace kovů v PM1 (ng/m³)

| Prvek | Netopná sezóna | | Topná sezóna | |
|-------|----------------|--------|--------------|--------|
| | Prac. týden | Víkend | Prac. týden | Víkend |
| Al | 7,1 | 5,6 | 3,3 | 13,7 |
| Fe | 52 | 22 | 32 | 23 |
| Mn | 3,7 | 1,15 | 2,0 | 1,36 |
| Ce | 0,049 | 0,039 | 0,035 | 0,031 |
| V | 0,140 | 0,168 | 0,176 | 0,28 |
| Cr | 0,80 | 0,46 | – | 0,44 |
| Ni | 0,63 | 0,39 | – | 0,45 |
| Cu | 1,80 | 1,08 | 1,91 | 1,54 |
| Zn | 11,6 | 10,8 | 19,3 | 17,3 |
| Cd | 0,082 | 0,112 | 0,130 | 0,166 |
| Pb | 3,2 | 2,7 | 5,3 | 3,2 |



Urban PM_{2.5} concentrations presented as multi-annual average in selected European countries, 2007–2009

Stanovení rtuti v pouličním prachu v Brně

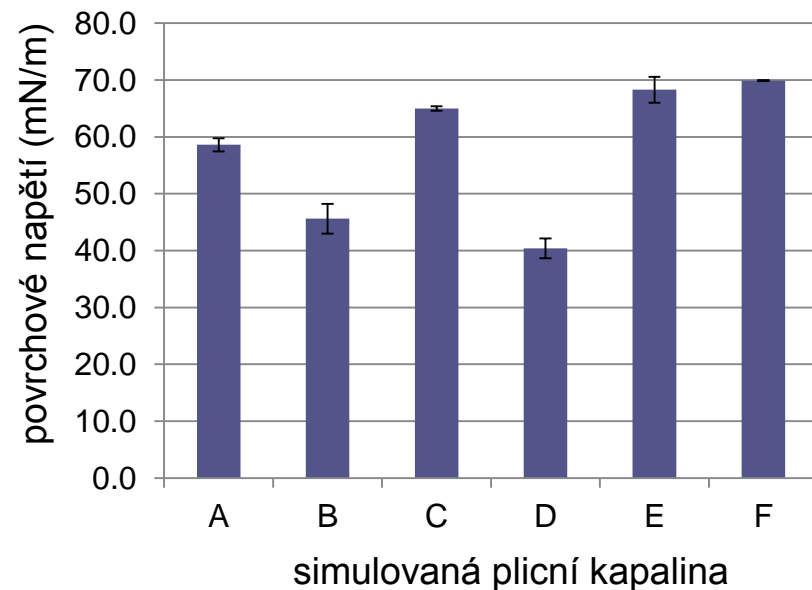


Určení biodostupnosti

- Celkový obsah kovů – mineralizace v podvarové HNO_3
- Biodostupný podíl – extrakce v simulovaných plicních kapalinách

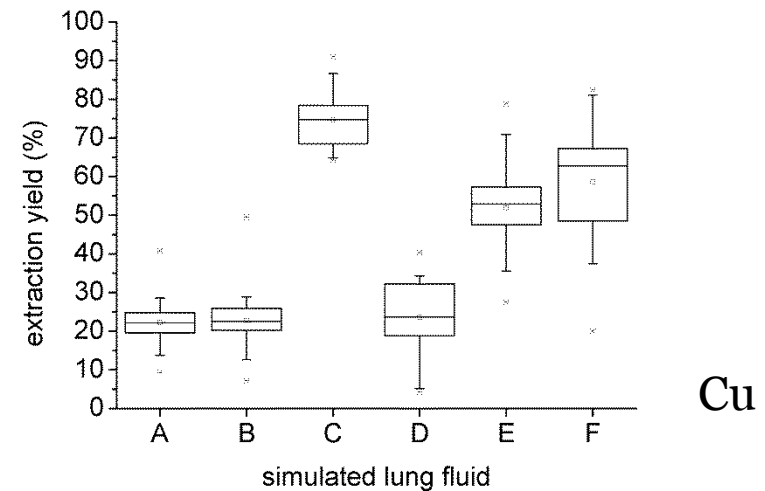
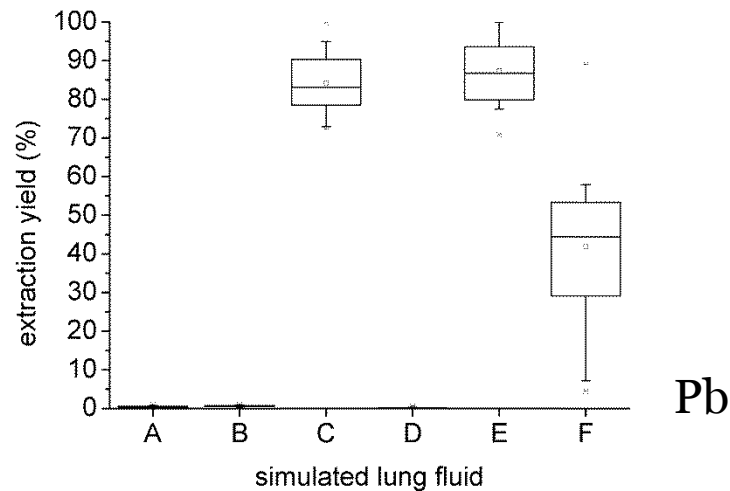
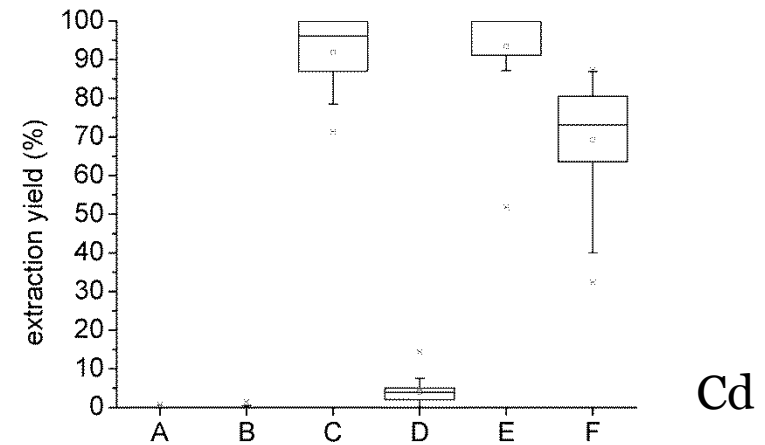
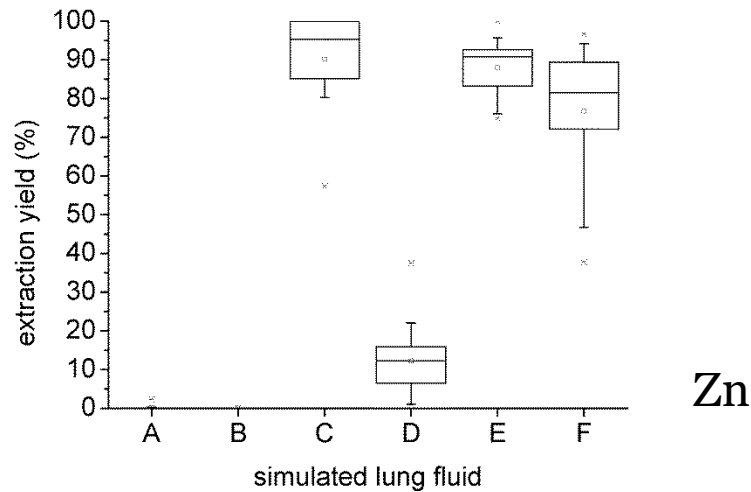
Použité simulované plicní kapaliny:

- | | |
|---|-------------------------------|
| A | Gambleův roztok |
| B | Gambleův roztok s DPPC |
| C | ALF |
| D | Nově navržená kapalina s DPPC |
| E | Fyziologický roztok |
| F | Deionizovaná voda |



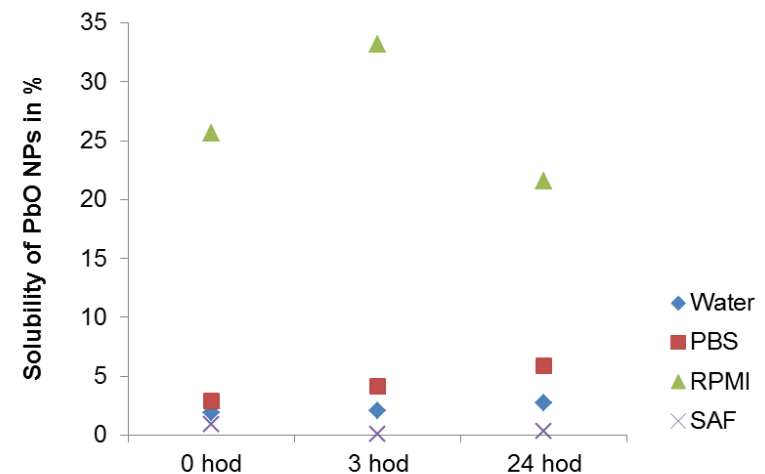
- DPPC = dipalmitoyl fosfatidylcholin – povrchově aktivní látka
- Kapaliny s DPPC se svým chováním spíše blíží nativnímu plicnímu surfaktantu (povrchové napětí blízké nule)

Biodostupnost kovů v aerosolu (Brno)



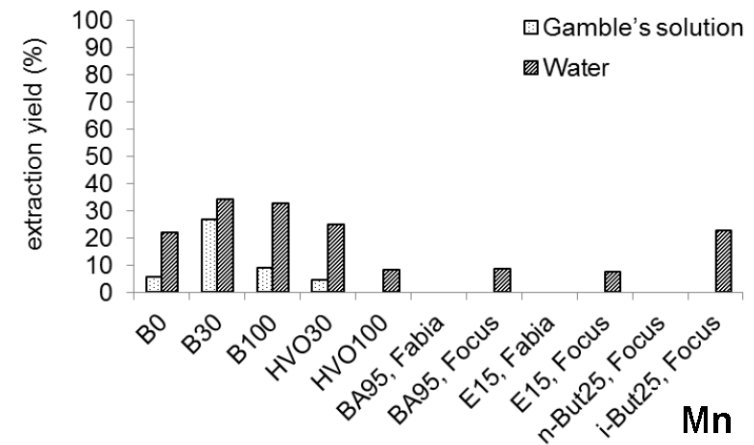
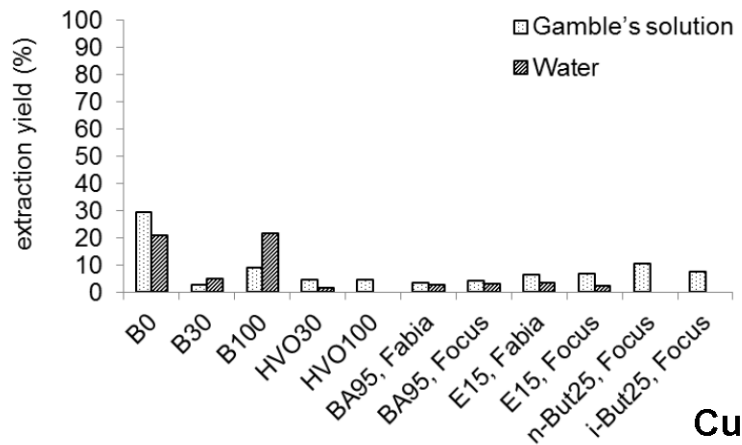
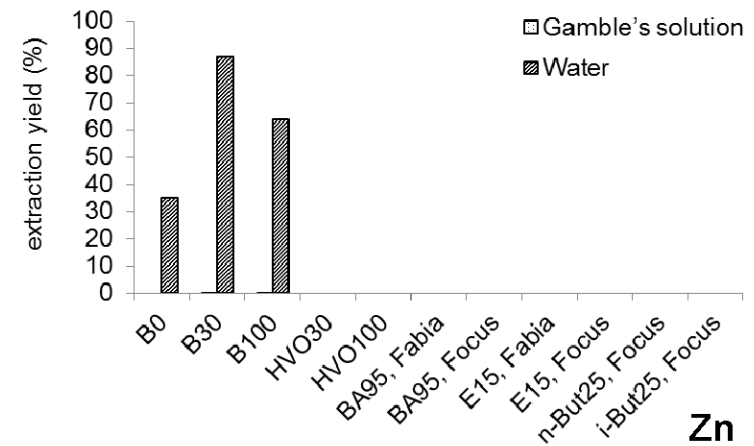
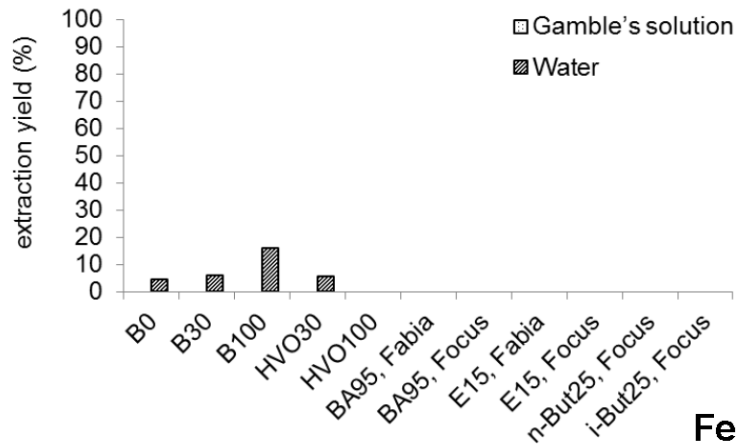
Stanovení kovů v emisích z paliv

- Je používání biopaliv (nebo paliva s příměsí biosložky) „ekologické“?
- Kolik PM, organických i anorganických polutantů vzniká jejich spalováním?
- Testování paliv i mazacích olejů v různých typech motorů při různém zatížení (normované provozní cykly simulující jízdu) → analýza emisí
- Koncentrace PM_{2.5} klesají s přidavkem biosložky (především u nafty)
- Koncentrace kovů v PM_{2.5} neklesají s přidavkem biosložky!
- Rozhodující vliv otěrových kovů
- Biosložka zvyšuje biodostupný podíl
- **Pěstování potravin x paliva**
- Jaký je přínos ???

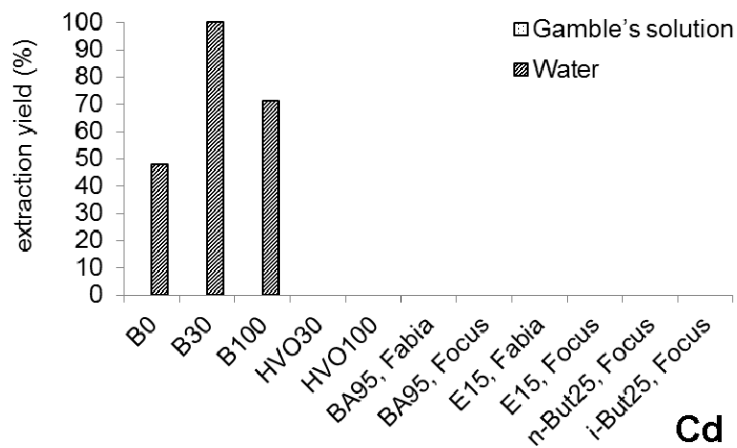
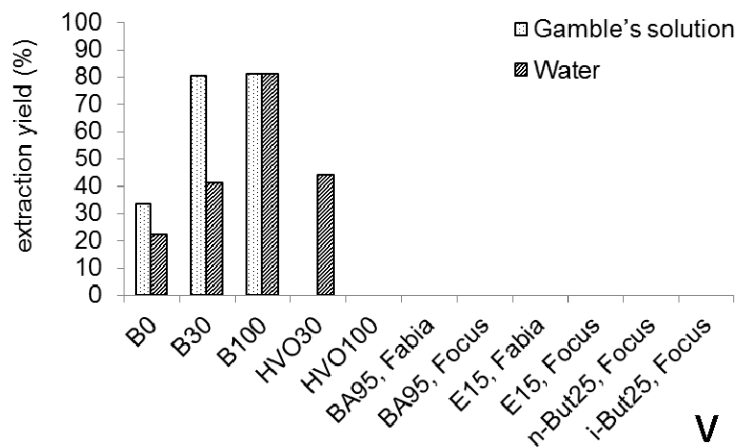
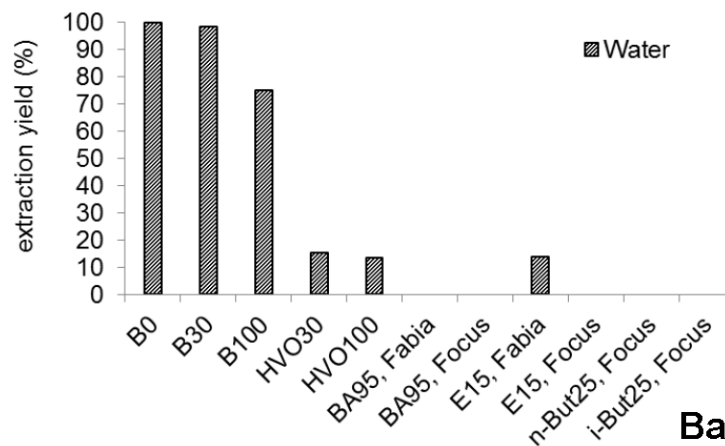
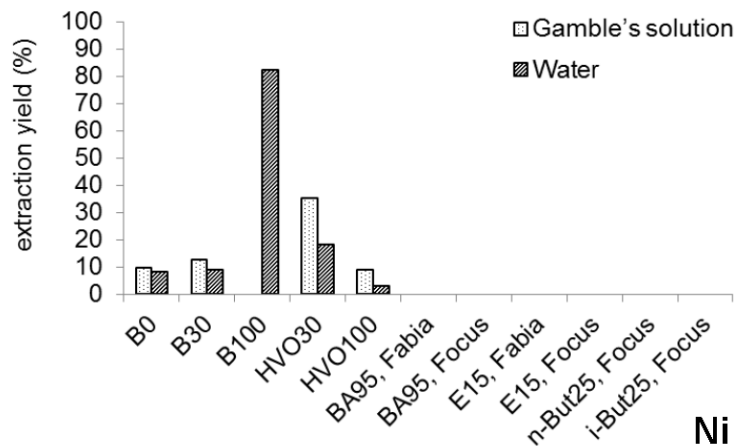


Rozpustnost generovaných nanočástic PbO

Stanovení kovů v emisích z paliv

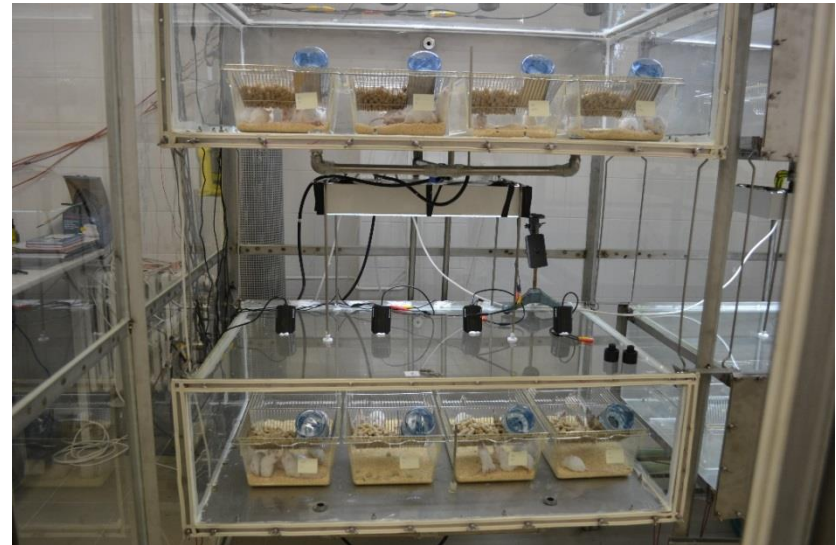


Stanovení kovů v emisích z paliv



Studium toxicity nanočástic *in-vivo*

- Experimenty se zvířaty – laboratorní myši exponované NPs
- Cíl experimentu: posouzení toxicity nanočástic Cd, Pb, Ti, Zn, Mn, Cu
- Studium mobility NPs v organismu (vstup, depozice, obranné mechanismy)
- Studium fyziologických změn tkání orgánů
- Studium imunologické odezvy na intoxikaci (cytotoxicita, vznik zánětu)
- Studium mechanismu působení NPs



Studium toxicity NPs *in-vivo*

- Termické generování NPs v reaktoru z čistých kovů nebo organických prekurzorů
- Zavádění NPs do inhalačních komor jednotlivých skupin myší
- Kontrolní a exponované skupiny v různých koncentracích NPs
- Odběr vzorků – 3 dny, 14 dnů, 6 týdnů, 3 měsíce
- Měření vstupu – distribuce NPs po celou dobu experimentu



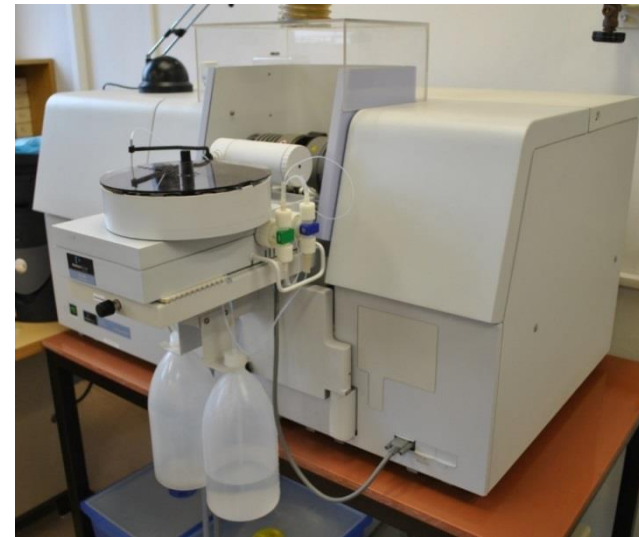
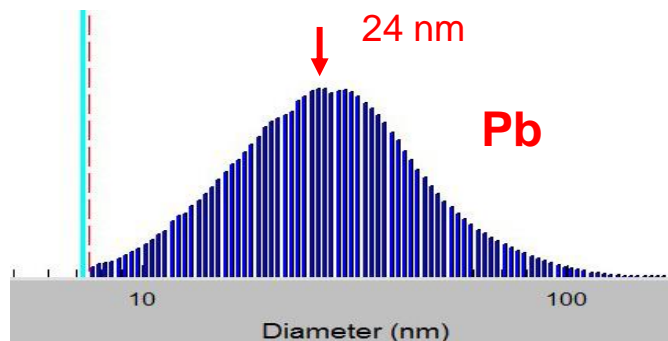
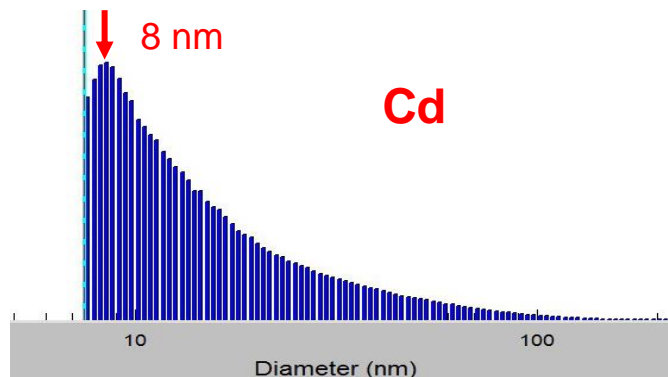
Inhalační komora



Měření distribuce NPs (SMPS)

Studium toxicity NPs *in-vivo*

- Chemická analýza orgánů (plíce, mozek, ledviny, játra, slezina, srdce) a krve
- Specifikace NPs (transmisní elektronová mikroskopie, SMPS, rozpustnost)
- Průtoková cytometrie, proliferační aktivita lymfocytů, mikroskopie

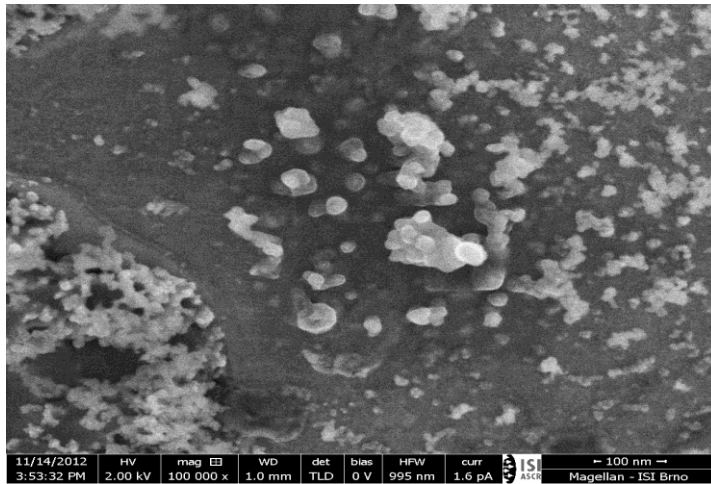
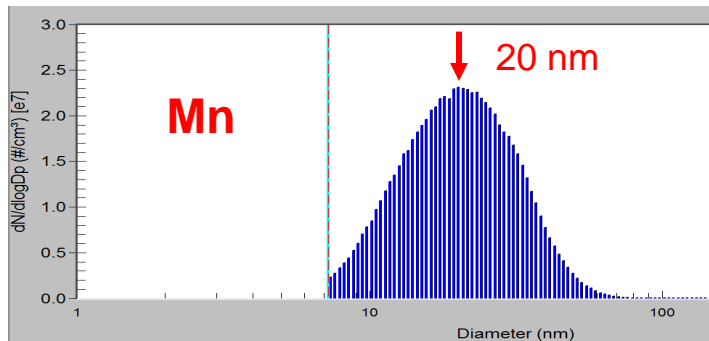


Stanovení kovů (AAS)

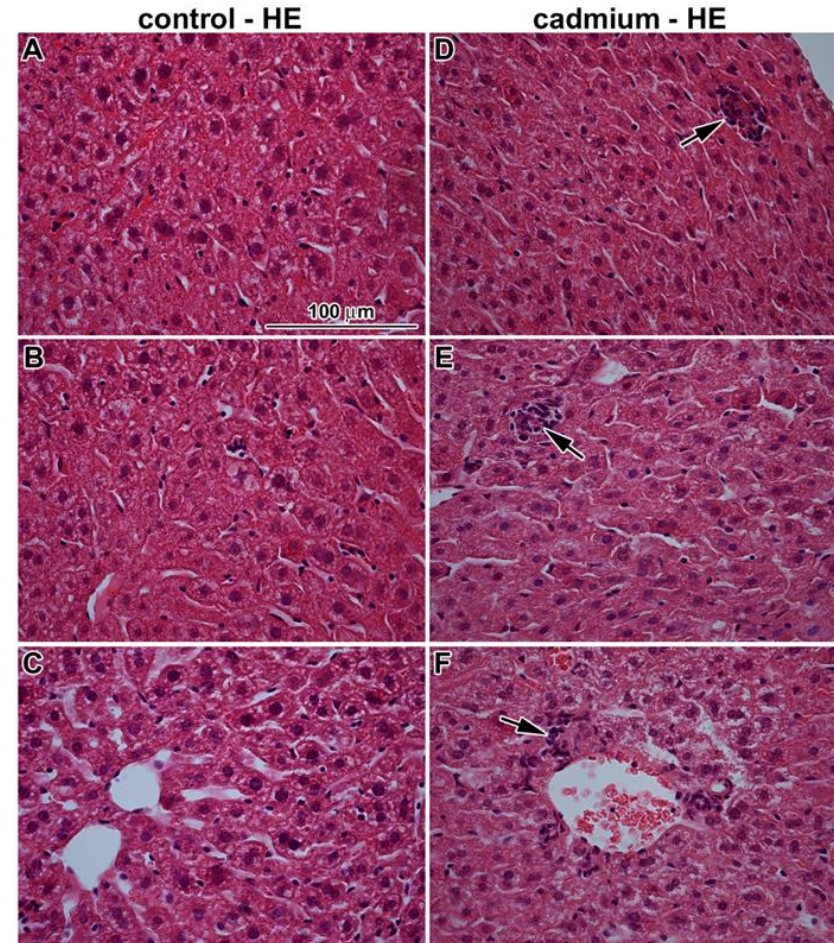
Distribuce NPs (SMPS)

Studium toxicity NPs *in-vivo*

- V orgánech byly nalezeny oblasti zánětlivých ložisek
- Potvrzena přítomnost agregátů NPs



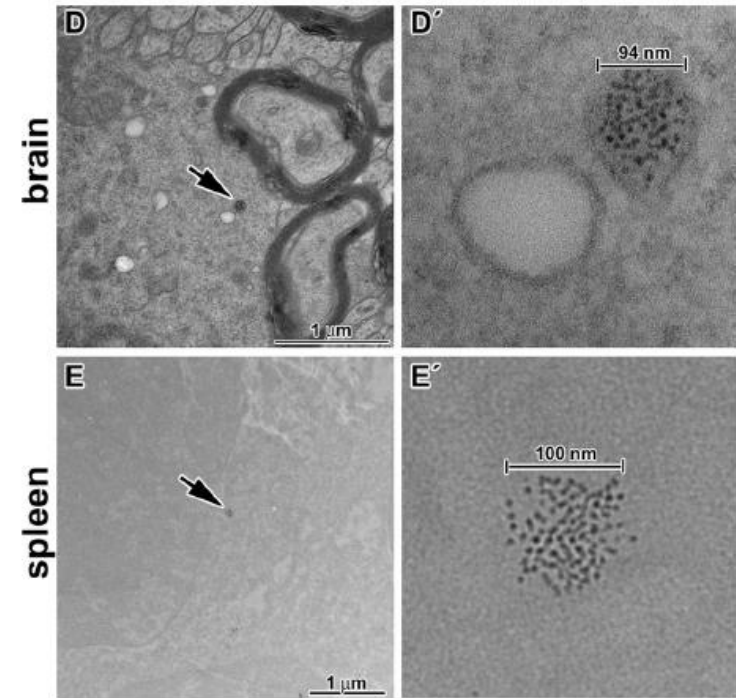
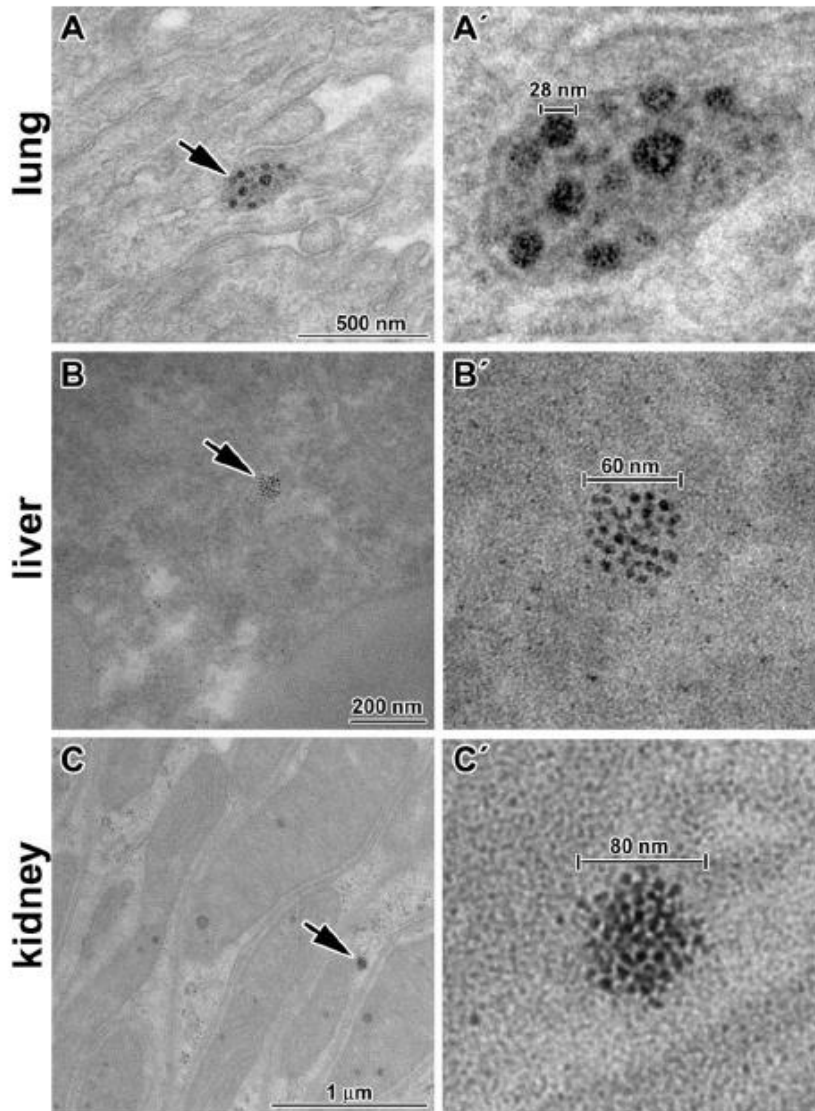
Morfologická analýza Mn₃O₄ NPs



Histologická analýza jater (CdO NPs)

Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 874

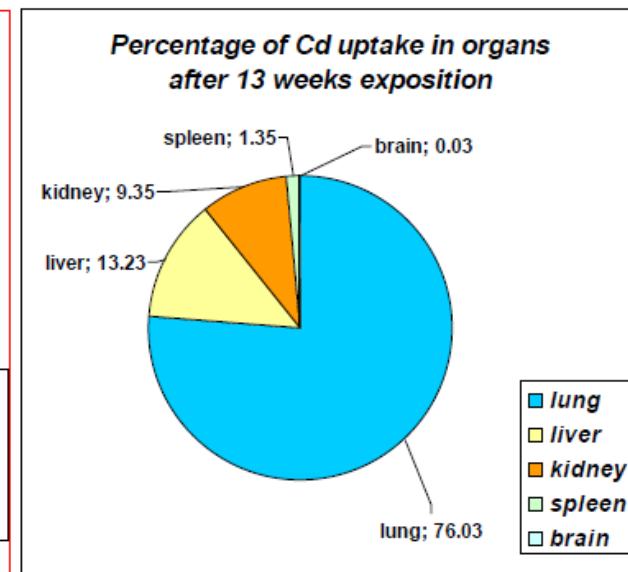
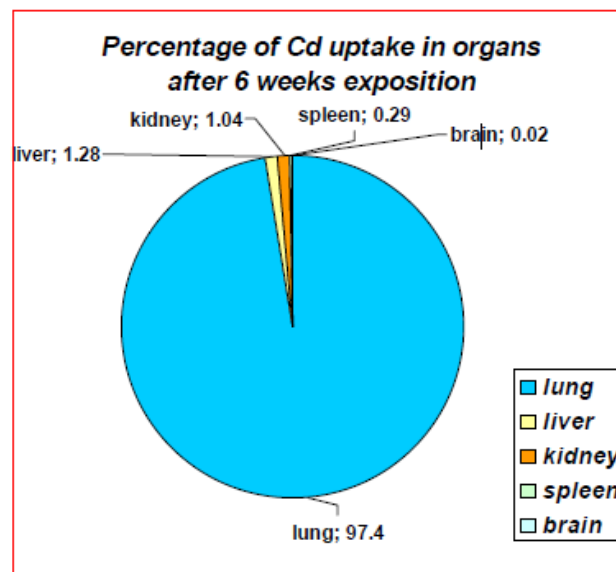
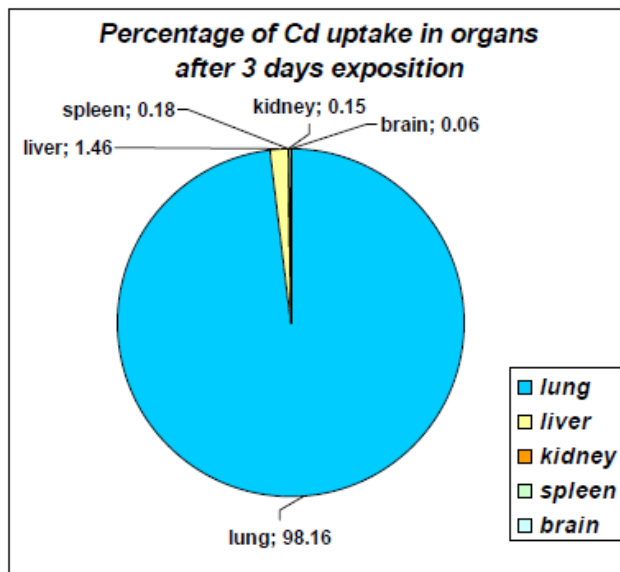
Studium toxicity NPs *in-vivo*



Transmission electron microscopy of target tissues after long-term exposure to cadmium oxide nanoparticles: nanoparticles observed in small clusters inside pneumocytes in lung (A, A'—detail); nanoparticles located inside of hepatocytes (B, B'—detail); nanoparticles located in epithelial cell cytoplasm of proximal tubules of kidney (C, C'—detail), brain (D, D'—detail), and spleen tissue (E, E'—detail)

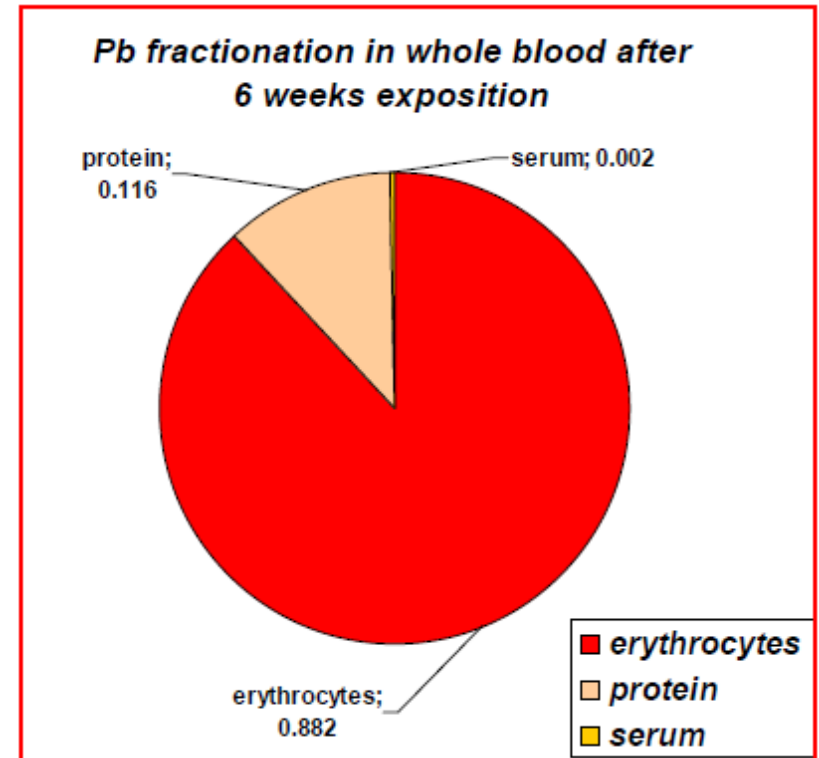
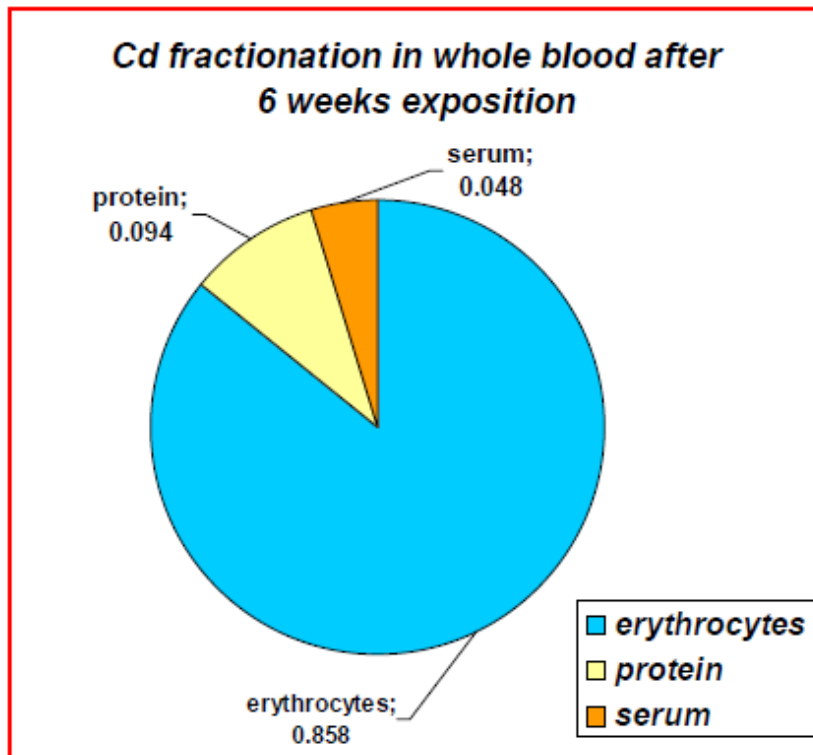
Studium toxicity NPs *in-vivo*

- Obsah Cd v plicích i sekundárních orgánech značně vzrostl již po šesti týdnech expozice
- Nejvyšší akumulace byla zaznamenána v plicích, méně v ledvinách, a poté ve slezině a játrech
- Obsah Cd v orgánech exponovaných myší byl vyšší než u kontrolní skupiny 7500 x pro plíce, 140 x pro ledviny, 79 x pro slezinu a 19 x pro játra

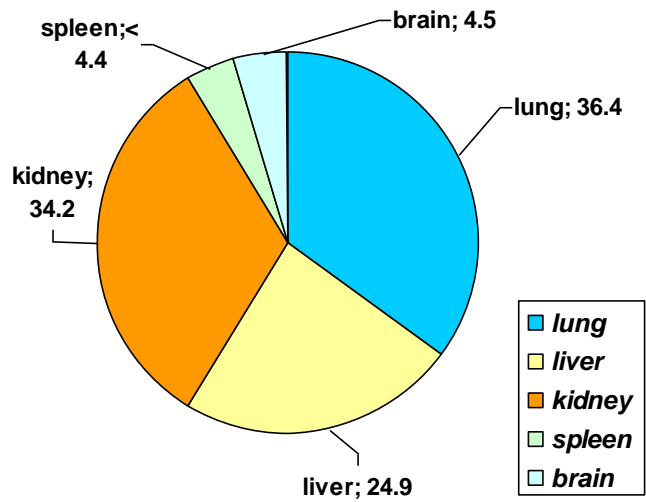


Studium toxicity NPs *in-vivo*

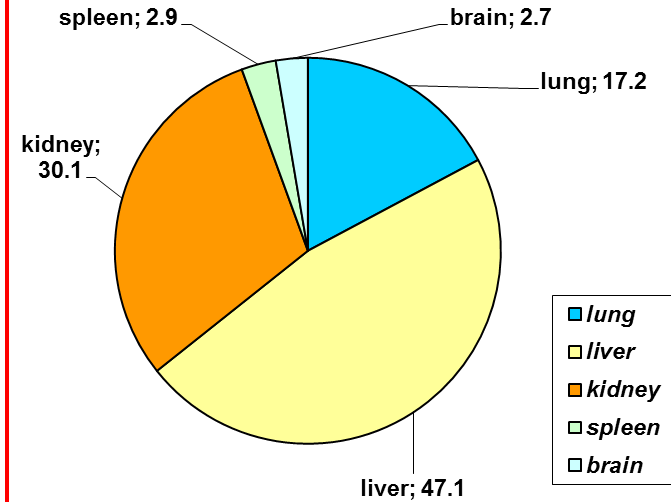
- Koncentrace Cd v krvi byla po šesti týdnech 80 ng g^{-1} , zatímco u kontrolní skupiny byl obsah Cd pod limitem detekce (2 ng g^{-1})
- 86% Cd bylo vázáno na erythrocyty, 9% na plasmu a 5% na krevní sérum



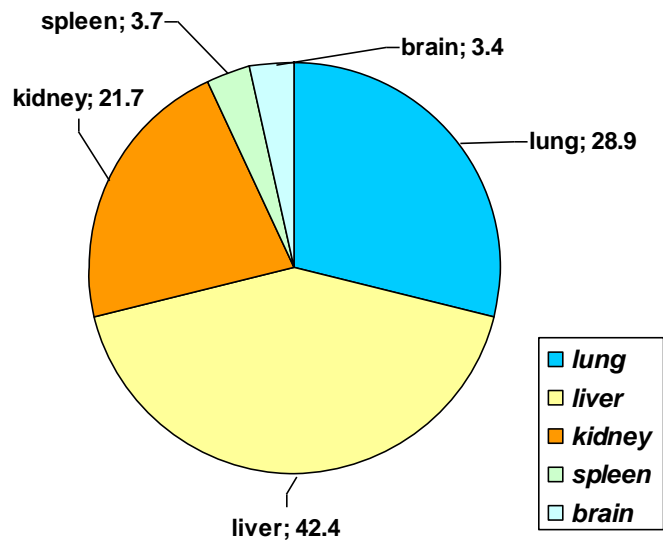
Percentage of Pb uptake in organs after 72 h exposition



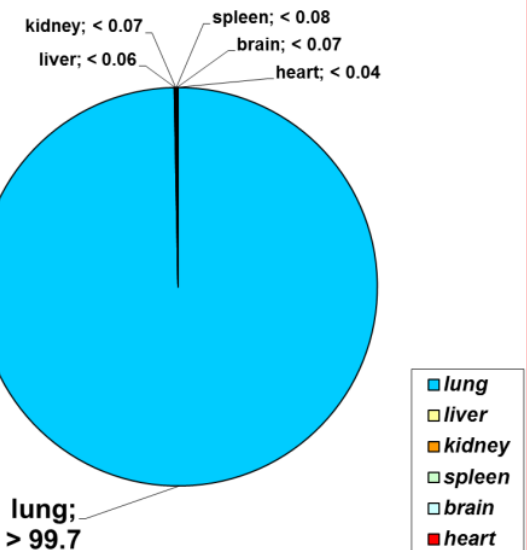
Percentage of Pb uptake in organs after 6 weeks exposition



Percentage of Pb uptake in organs after 11 weeks exposition

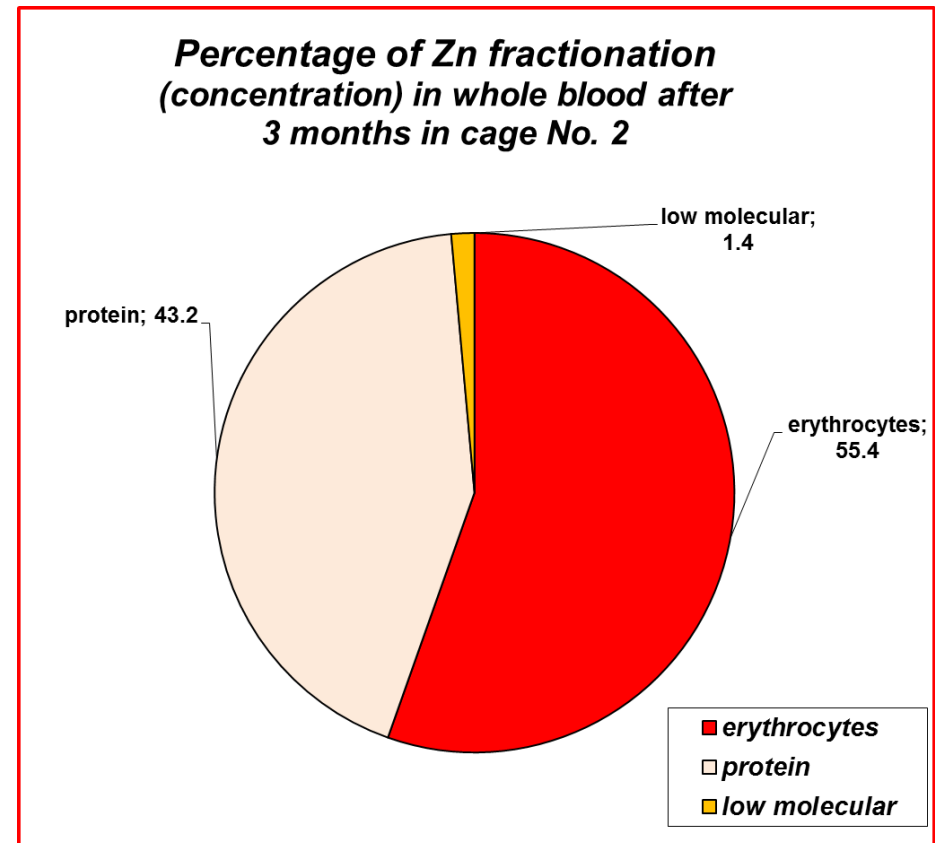
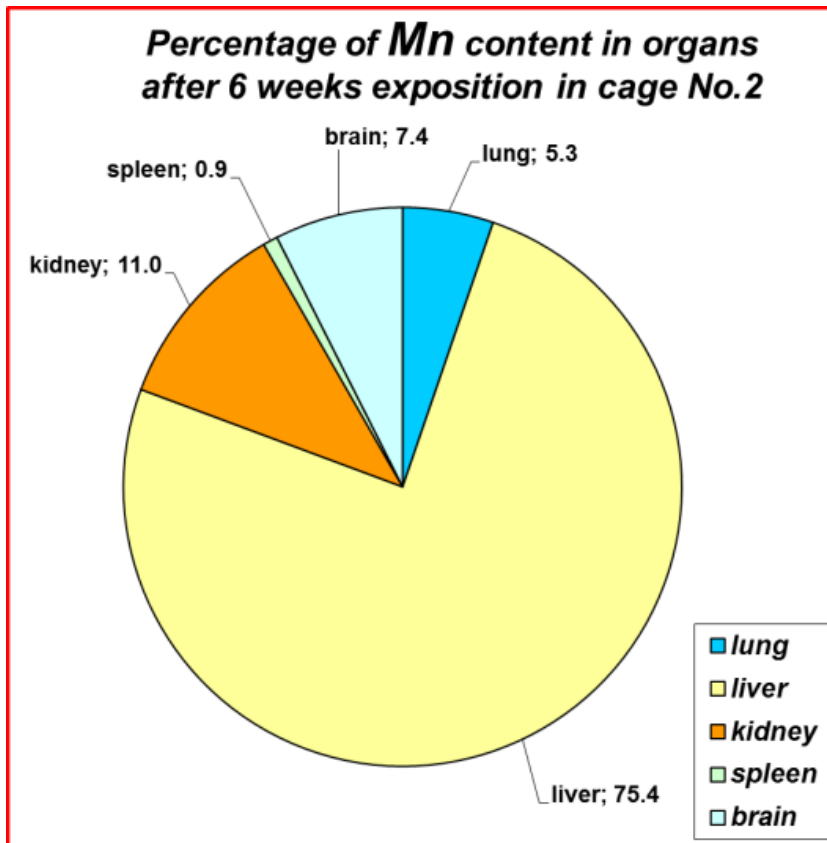


Percentage of Ti content in organs after 87 days exposition in cage No. 2

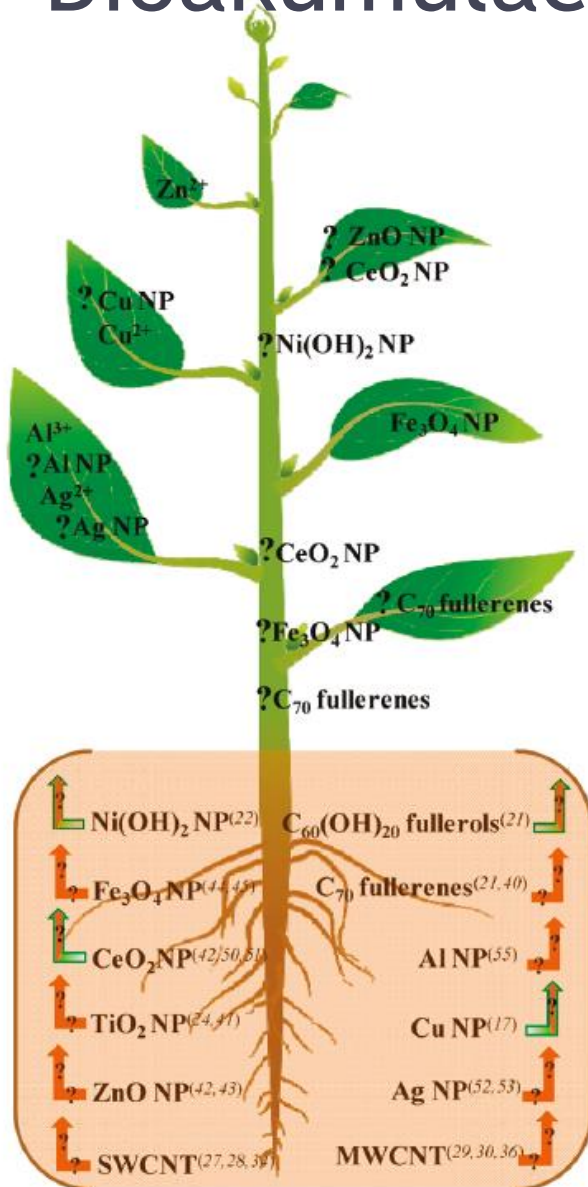


Studium toxicity NPs *in-vivo*

- Koncentrace Zn v jednotlivých složkách krve se vzájemně neliší v závislosti na kontrolních či exponovaných jedincích, i v závislosti na stáří myši resp. délce inhalace nanočástic



Bioakumulace nanočástic v rostlinách



- Selektivní příjem a translokace kovů rostlinou
- Mobilita kovů v půdním roztoku x působení nanočástic i nanomateriálů
- Dochází k zakoncentrování NPs potravním řetězcem?
- Genotoxicita a fytotoxicita NPs?
- Potvrzeno snížení klíčivosti obilovin
- Omezení růstu plodin a zkrácení kořenů

? Studies with varied conclusions (indicative of species dependency)



Uptaken and translocated

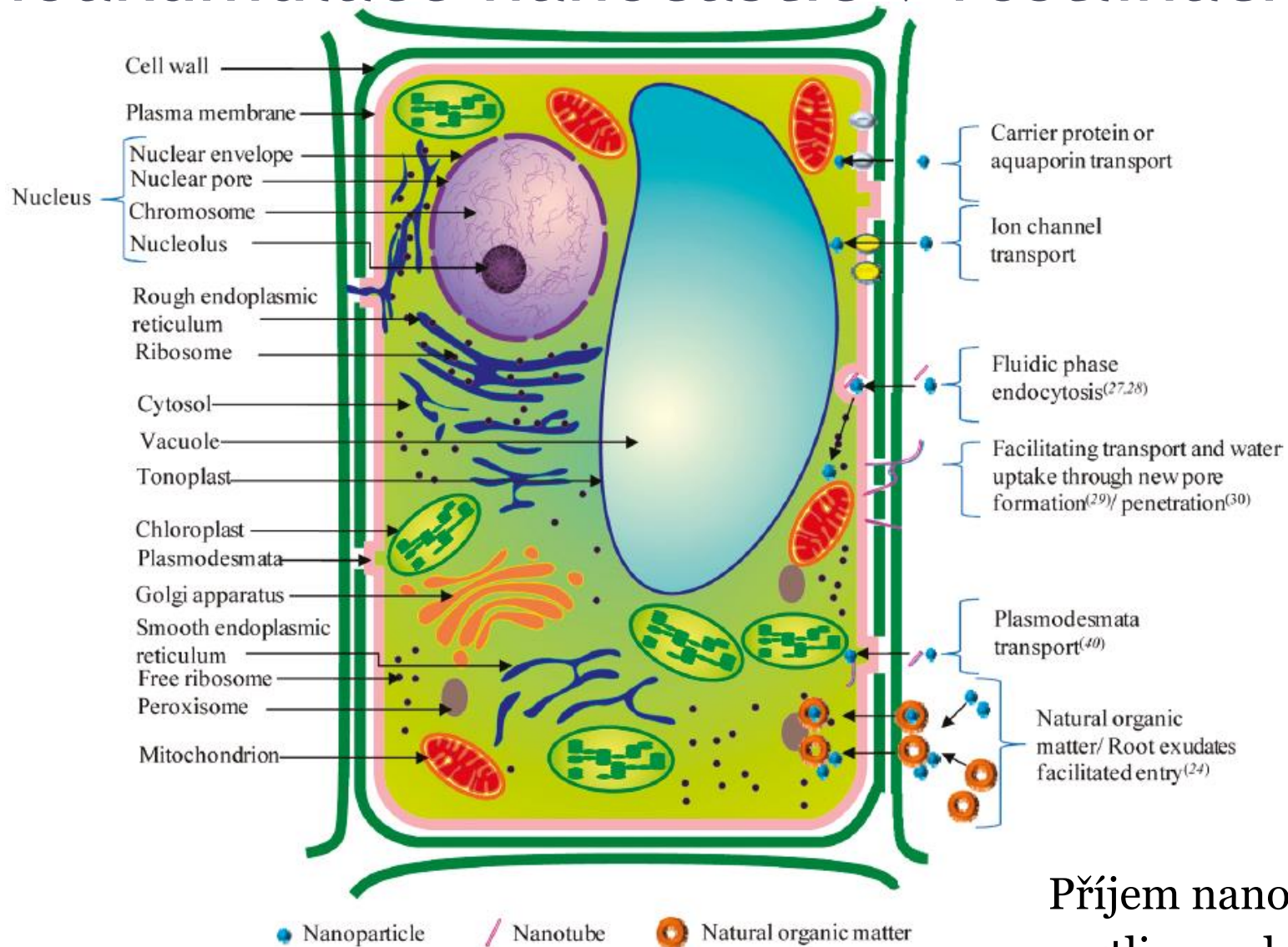


Uptake/translocation not confirmed (varied conclusions)



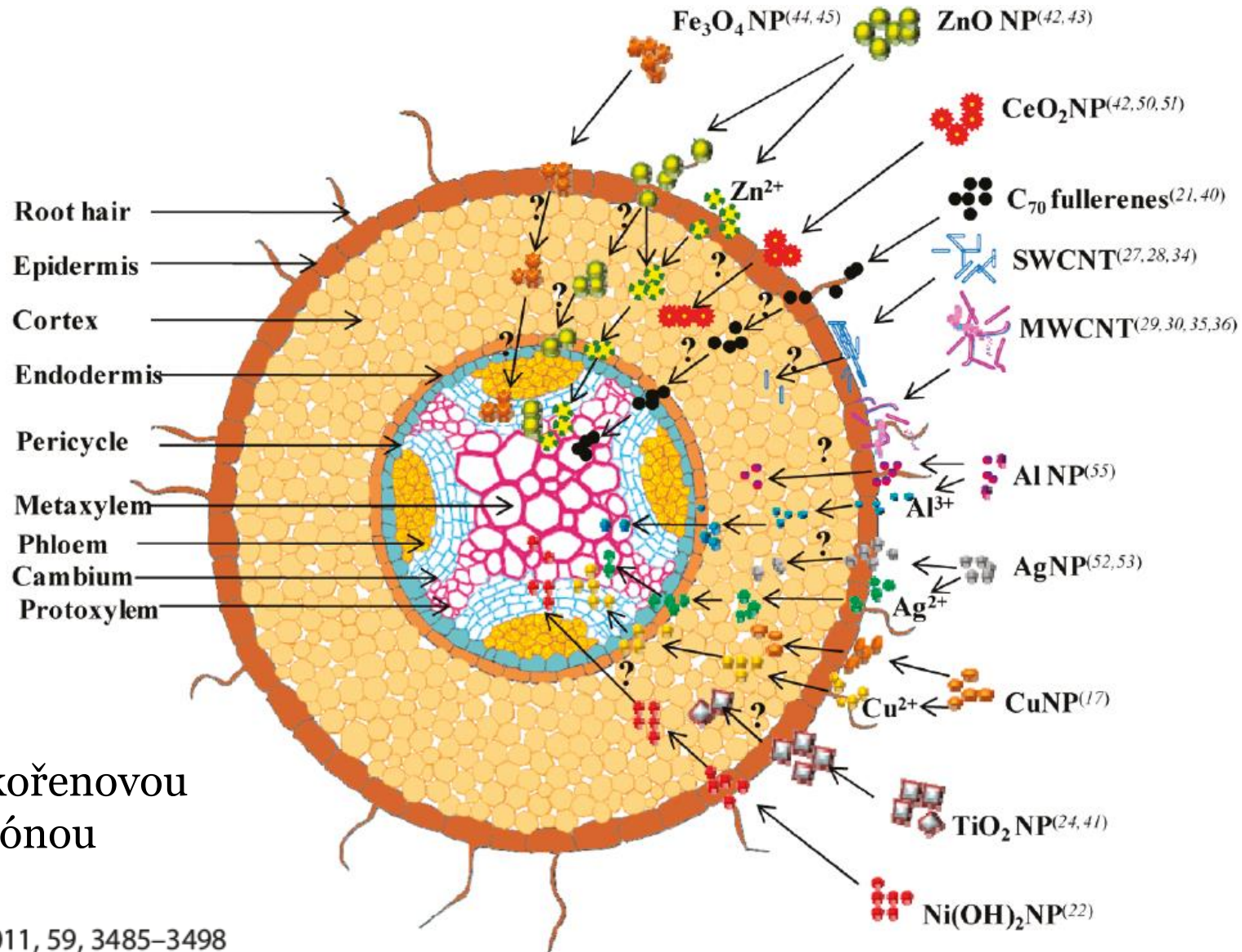
Uptake by roots; but translocation not studied/ not confirmed due to very few studies on the NP

Bioakumulace nanočástic v rostlinách



Příjem nanočástic
rostlinnou buňkou

Bioakumulace nanočástic v rostlinách



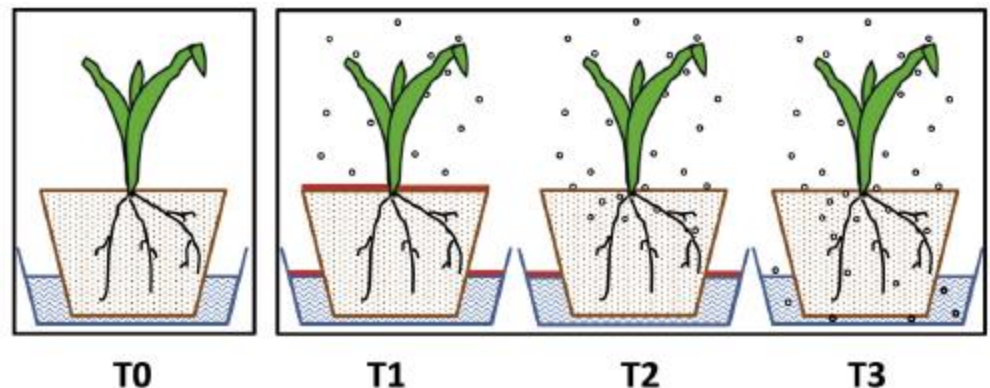
Příčný řez kořenovou
absorpční zónou

Bioakumulace nanočástic v rostlinách

- Mechanismus působení NPs na rostliny není zcela objasněn – změna chemismu rhizosféry?
- Toxicita NPs je často sledována za vysokých koncentrací a v umělých podmínkách; experimenty často nezahrnují celý životní cyklus rostliny

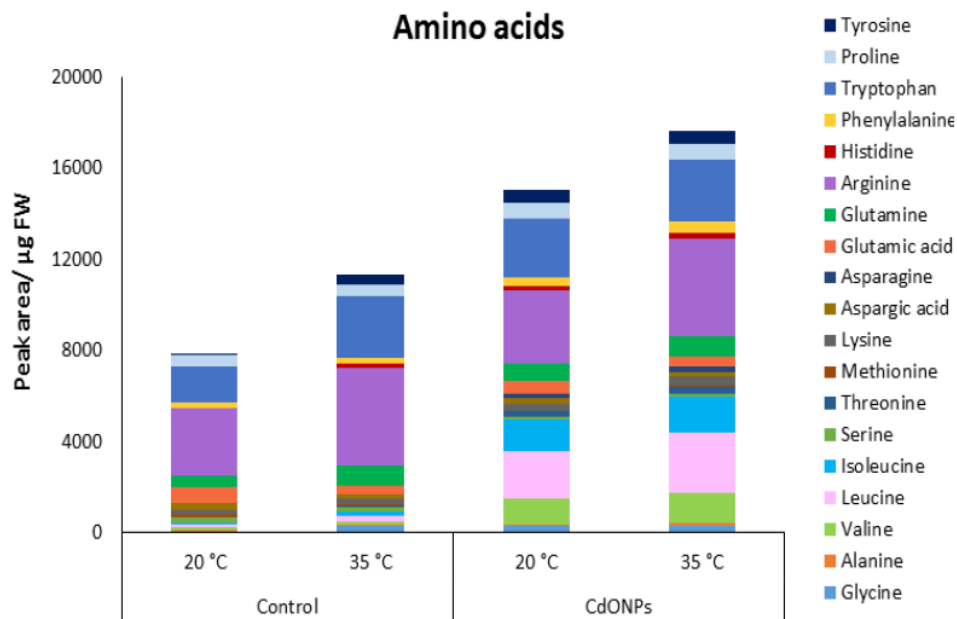
Experiment s expozicí ječmenu nanočásticím kadmia

- Změny koncentrací primárních metabolitů (aminokyseliny a sacharidy)
- Přímá absorpce Cd listy ječmenu + transport Cd z kořenů (cca 40%)
- Nejvyšší vliv NPs pro volný vstup NPs (varianta T3)
- Vysoký obsah Cd v listech, cca 40% na povrchu



Bioakumulace nanočástic v rostlinách

- Experiment s expozicí smrku ztepilého a buku lesního nanočásticím kadmia – 14 dnů
- Smrk ztepilý – značná ztráta olistění během experimentu; změny biochemického složení; relativně malé změny v koncentracích Cd mezi kontrolní a exponovanou skupinou

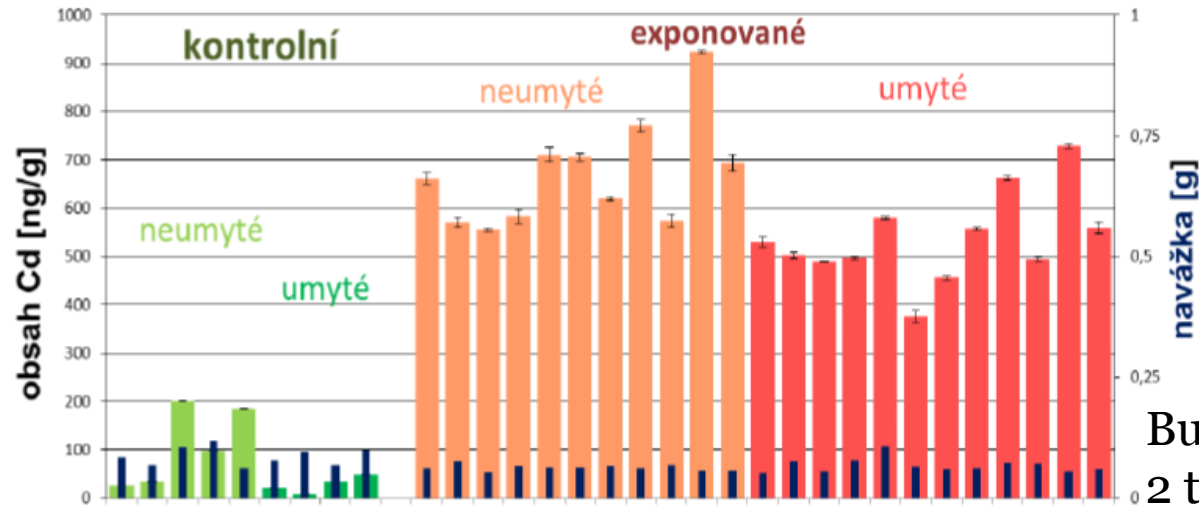


Obsah aminokyselin ve smrkových jehlicích



Buk lesní

Bioakumulace nanočástic v rostlinách

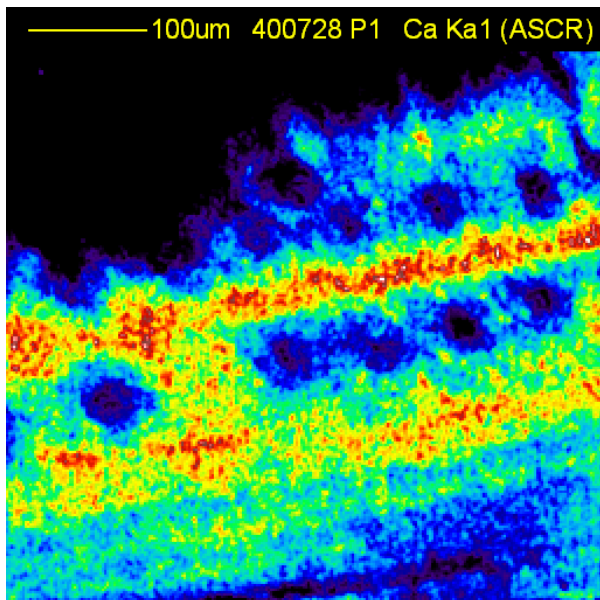


Buk lesní,
2 týdny expozice

| Experimenty se smrky i buky | | | | | | | | | |
|-----------------------------|---------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|
| expozice | dřevina | kontrolní | | | | exponované | | | |
| | | neumyté | | umyté | | neumyté | | umyté | |
| | | obsah Cd [ng/g] | SD Cd [ng/g] | obsah Cd [ng/g] | SD Cd [ng/g] | obsah Cd [ng/g] | SD Cd [ng/g] | obsah Cd [ng/g] | SD Cd [ng/g] |
| 1 týden | smrk | 41 | 0,7 | 21 | 0,3 | 42 | 0,4 | 35 | 1,0 |
| | buk | 291 | 2,2 | 47 | 0,4 | 570 | 5,5 | 355 | 1,9 |
| 2 týdny | smrk | 172 | 0,9 | 49 | 0,5 | 556 | 6,9 | 325 | 7,9 |
| | buk | 95 | 0,9 | 35 | 0,6 | 666 | 10,3 | 536 | 5,5 |

Bioakumulace nanočástic v rostlinách

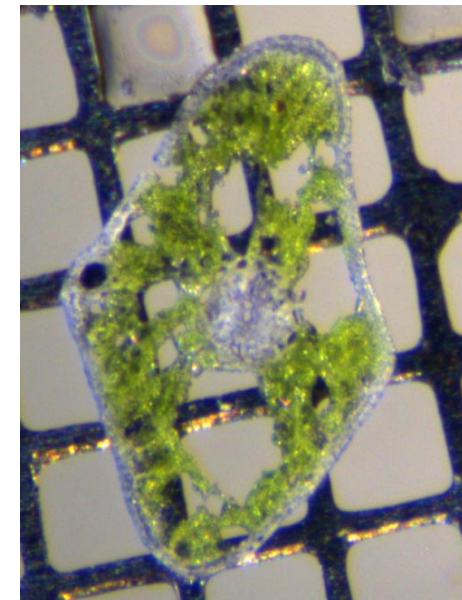
- Jak významný je přímý vstup NPs průduchy listů?
- Stanovení Cd pomocí PIXE (protonově indukované rentgenové emise)
- Potvrzení přítomnosti Cd na povrchu jehlice
- Obsah Cd ve stomatech pod limitem detekce metody – limitace experimentu poškozením rostlin za vysokých koncentrací NPs



Ca v jehlici smrku (PIXE)



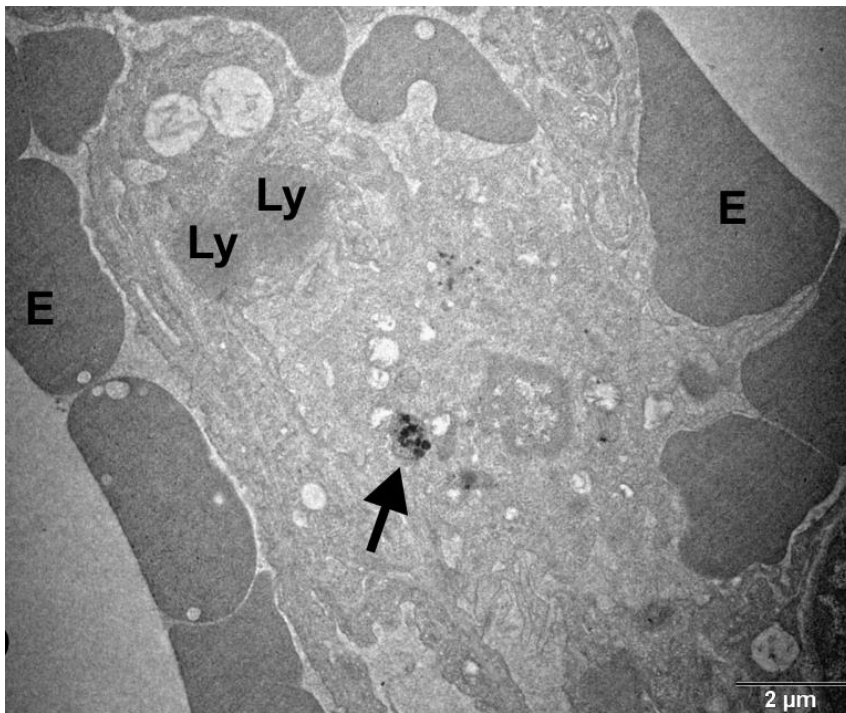
Stomata



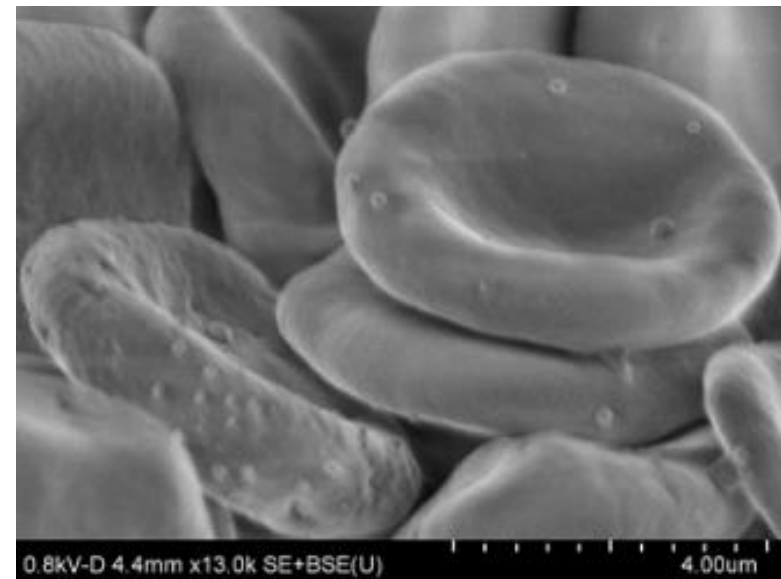
Příčný řez

Jsou nanočástice nebezpečné?

Děkuji za pozornost



Agregát NPs PbOx v pneumocytu typu II



Agregát NPs PbOx na povrchu erytrocytu