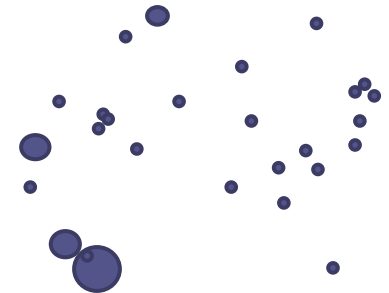


# TOXICITA NANOČÁSTIC KOVŮ V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

Pavel Coufalík

*Lékařská toxikologie, podzim 2023*





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

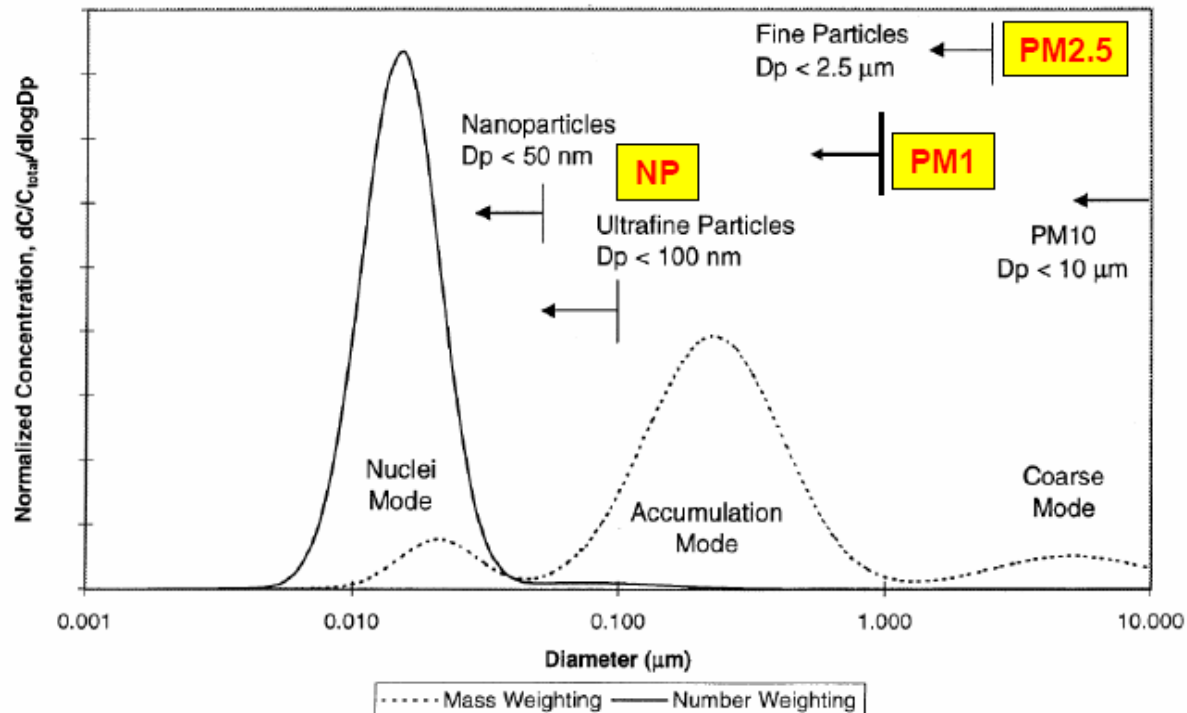
- Proč studovat kvalitu ovzduší?
- Vnitřní x vnější prostředí
- Plynné polutanty a polutanty vázané na částice
- Inhalační vstup látek do organismu – velmi nebezpečná cesta vstupu do organismu; velmi rychlé vstřebávání
- Osud látek v organismu; interakce; synergický efekt působení polutantů

## Aerosol

- Tuhé i kapalně částice suspendované ve vzduchu
- TSP = total suspended particles
- PM = particulate matter
- PM<sub>10</sub> – velikost pod 10  $\mu\text{m}$
- PM<sub>2.5</sub> – velikost pod 2,5  $\mu\text{m}$
- PM<sub>1</sub> – velikost pod 1  $\mu\text{m}$
- 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?

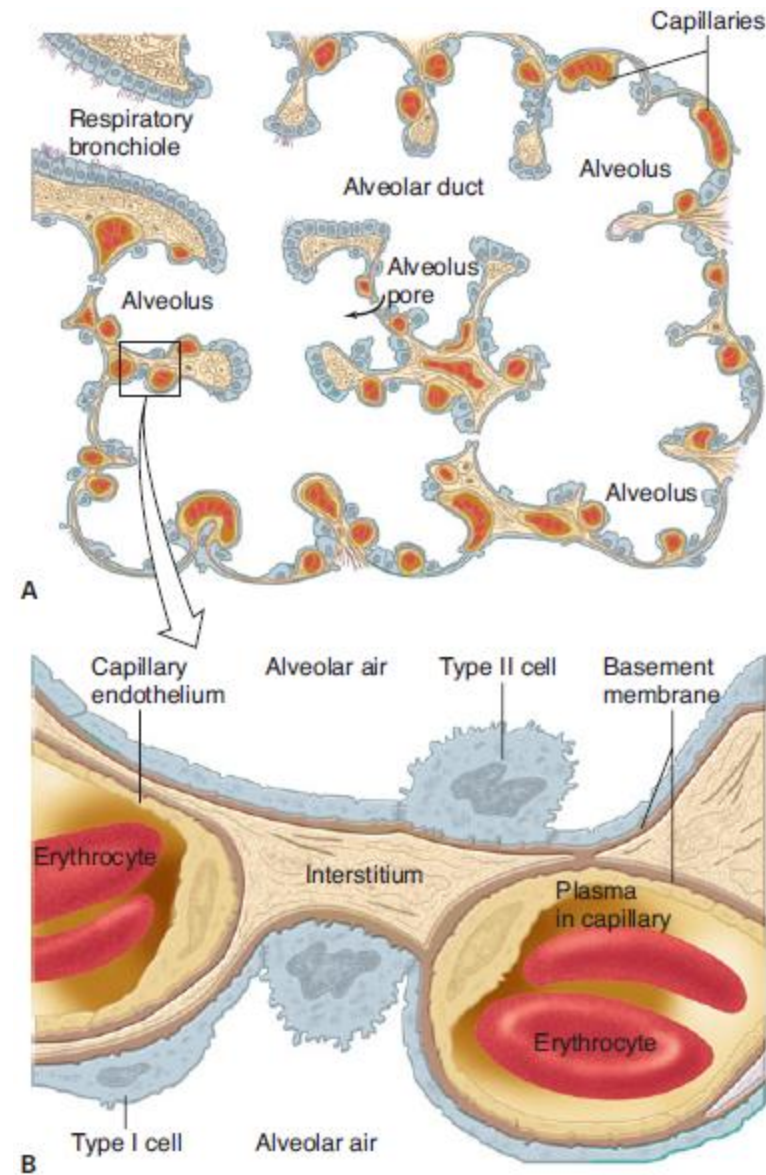


# Zdravotní rizika

- Vysoká koncentrace aerosolu v životním prostředí zvyšuje výskyt chorob srdce a cév, způsobuje respirační a plicní choroby, astma
- Akutní a chronické účinky
- Částice PM<sub>10</sub> – pronikání přes hrtan do dolních cest dýchacích
- Částice PM<sub>1</sub> – 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

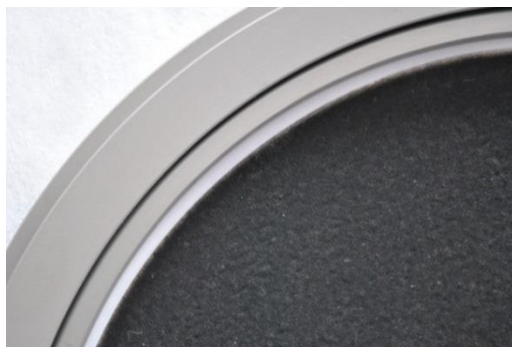
- On-line analýza x vzorkování aerosolu na filtry
- Velkoobjemový vzorkovač – záchyt aerosolu na 150 mm filtr; vzorkovací hlava pro PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>1</sub>
- Vzorkování např. 24 hod a následná analýza – složení aerosolu (uhlík, organické a anorganické polutanty)

Co studujeme:

- Městský aerosol, emise z paliv a z biopaliv z motorů, emise ze spalování biomasy, emise z průmyslu ...
- Analýza plynů – NH<sub>3</sub>, NO<sub>x</sub>, O<sub>3</sub>



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 ...

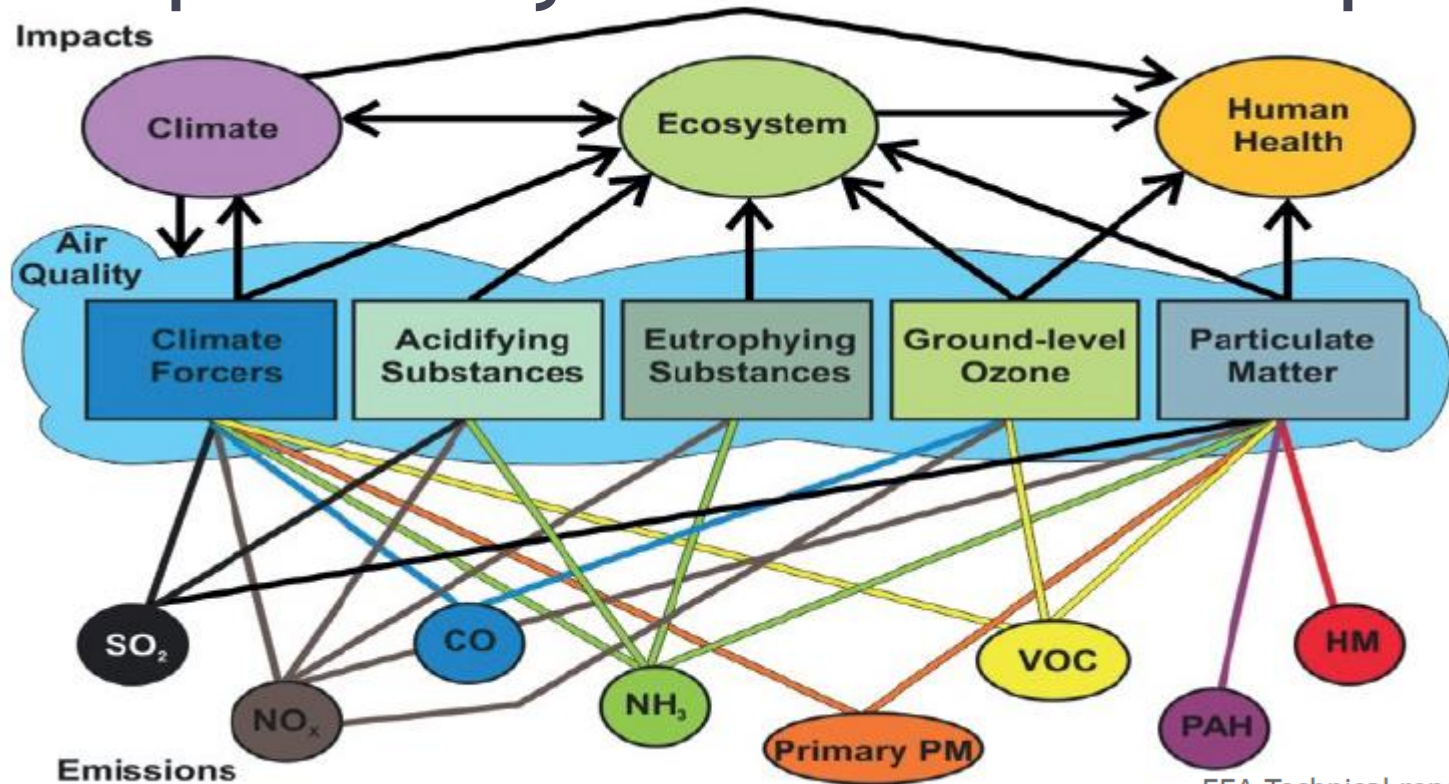


## **Vzorkování aerosolu Svalbard (Špicberky)**

- 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

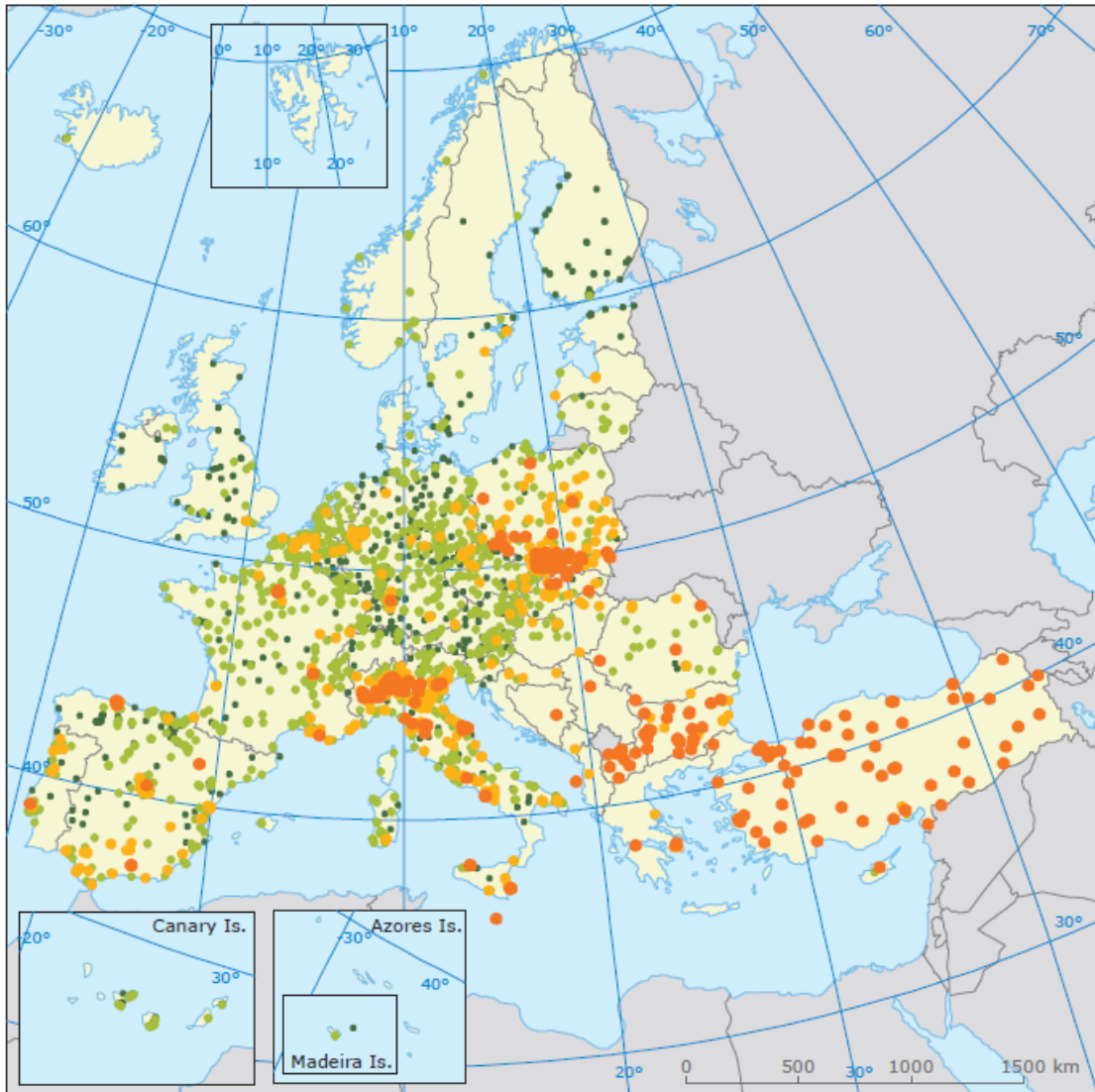


EEA Technical report | No 12/2011

## 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 <sup>(a)</sup>	WHO AQG
Arsenic	6 ng/m <sup>3</sup> <sup>(b)</sup>	-
Cadmium	5 ng/m <sup>3</sup> <sup>(b)</sup>	5 ng/m <sup>3</sup> <sup>(d)</sup>
Nickel	20 ng/m <sup>3</sup> <sup>(b)</sup>	-
Lead	500 ng/m <sup>3</sup> <sup>(c)</sup>	500 ng/m <sup>3</sup>

# PM<sub>10</sub> v Evropě

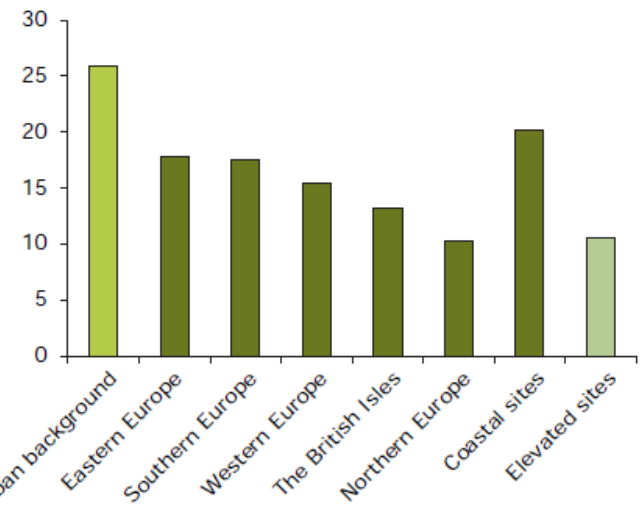


Annual mean, particulate matter (PM<sub>10</sub>), 2009, based on daily averages with percentage of valid measurements 75 % in  $\mu\text{g}/\text{m}^3$

- $\leq 20$
- 20-31
- 31-40
- $\geq 40$

■ Outside data coverage

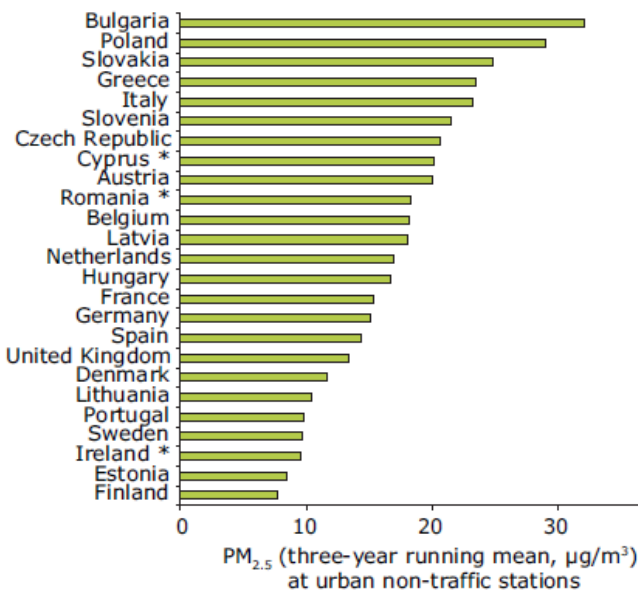
Concentration of PM<sub>10</sub> ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )



# Stanovení kovů v aerosolu (Brno)

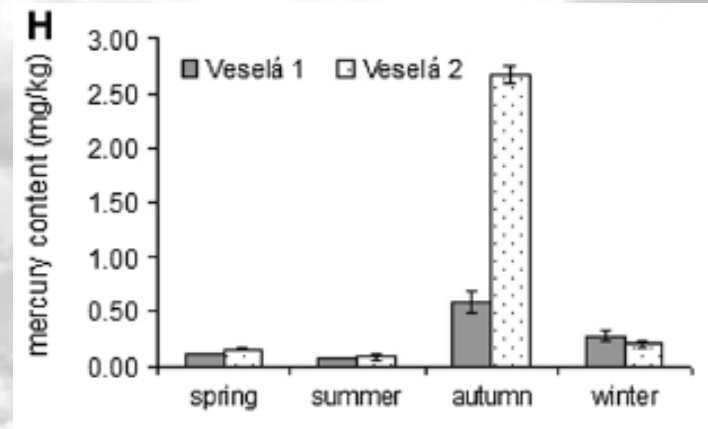
Průměrné koncentrace kovů v PM1 (ng/m<sup>3</sup>)

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<sub>2.5</sub> concentrations presented as multi-annual average in selected European countries, 2007–2009**

# Stanovení rtuti v pouličním prachu v Brně



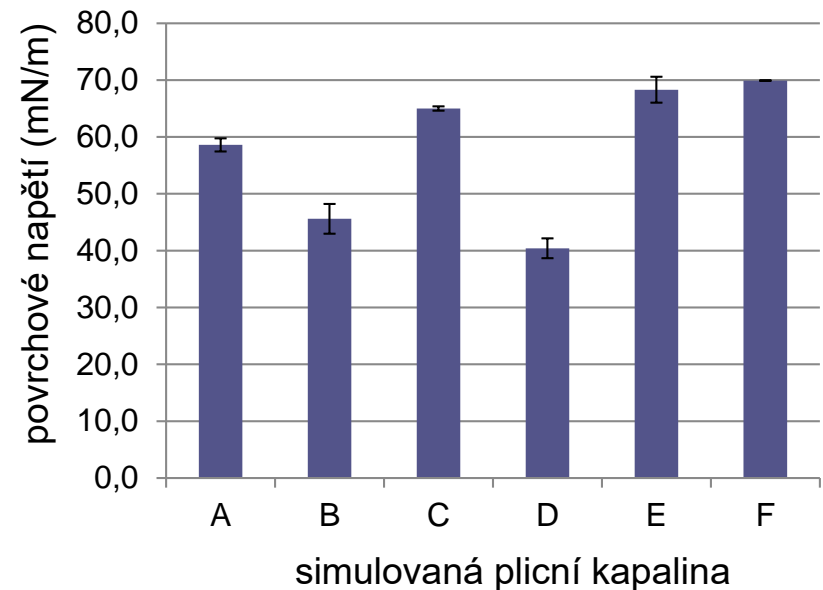


# Určení biodostupnosti

- Celkový obsah kovů – mineralizace v podvarové  $\text{HNO}_3$
- Biodostupný podíl – extrakce v simulovaných plicních kapalinách

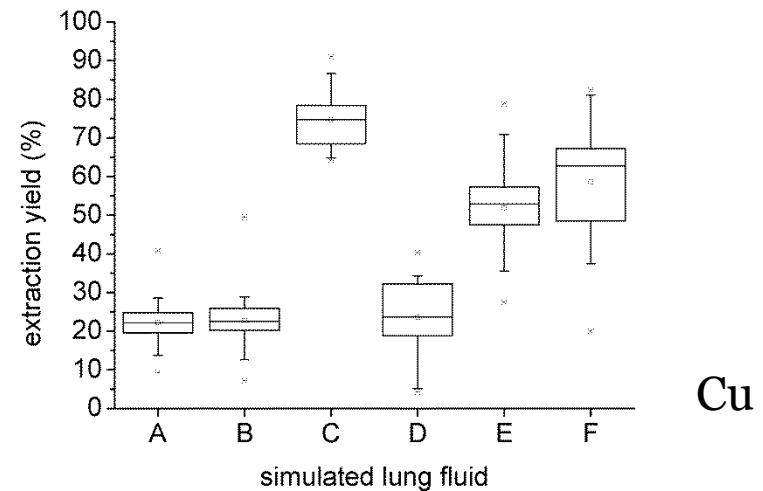
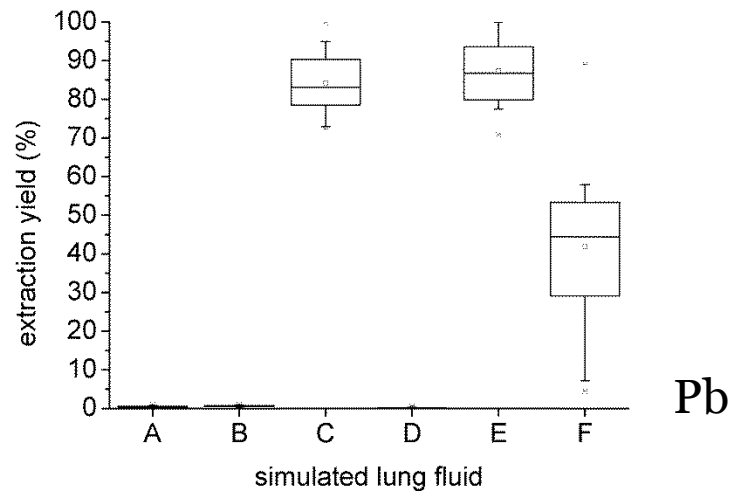
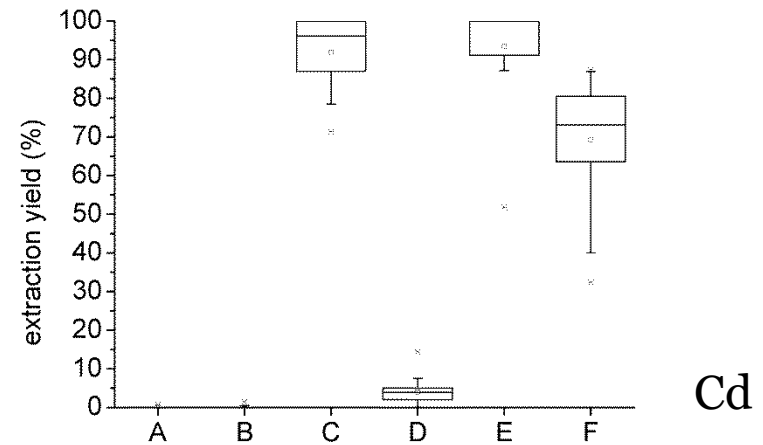
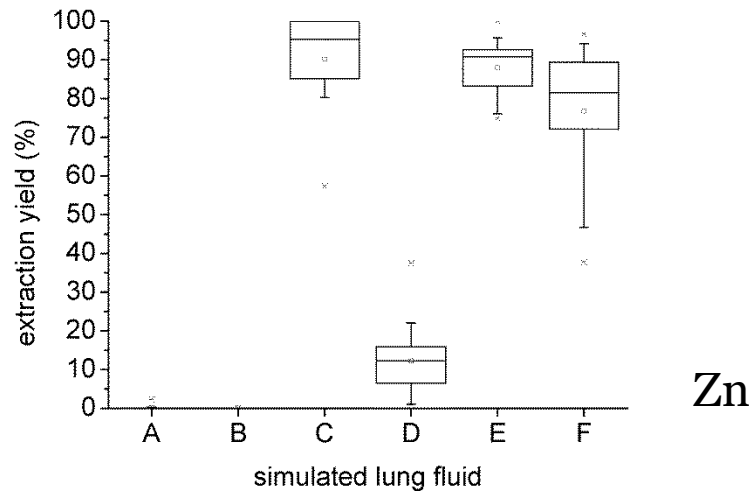
Použité simulované plicní kapaliny:

- |   |                               |
|---|-------------------------------|
| 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)

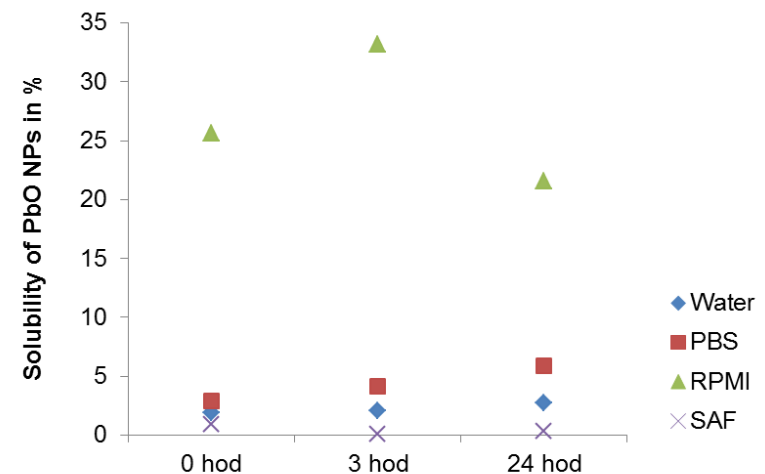
# Biodostupnost kovů v aerosolu (Brno)





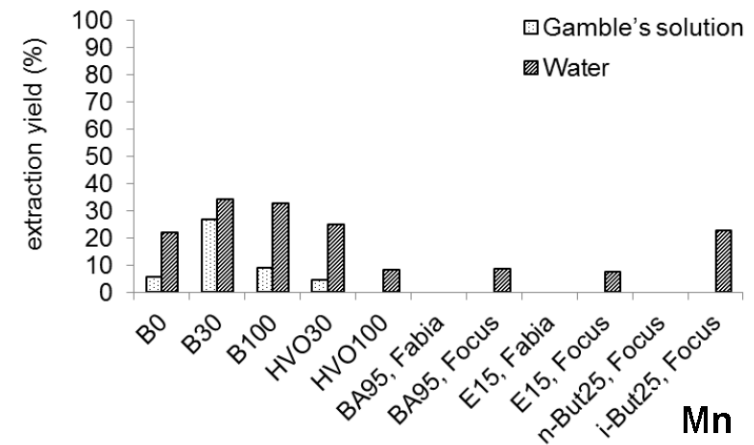
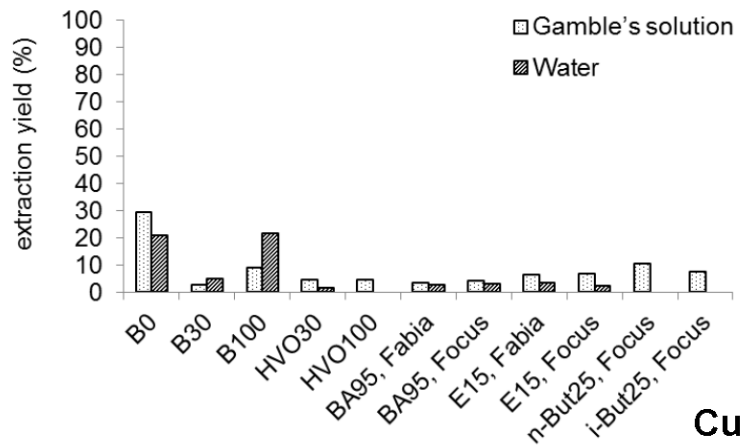
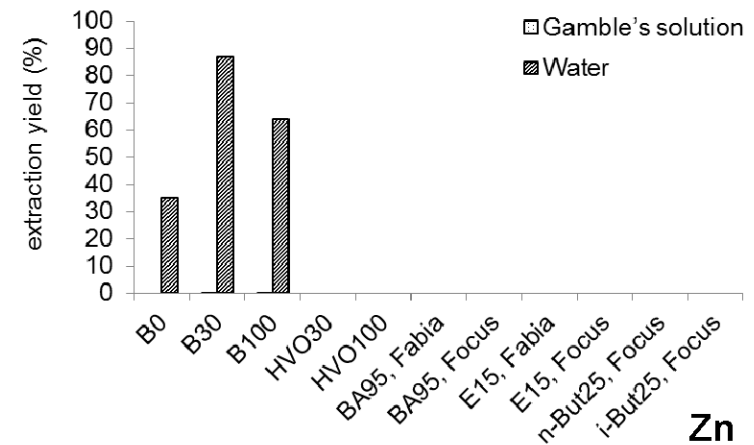
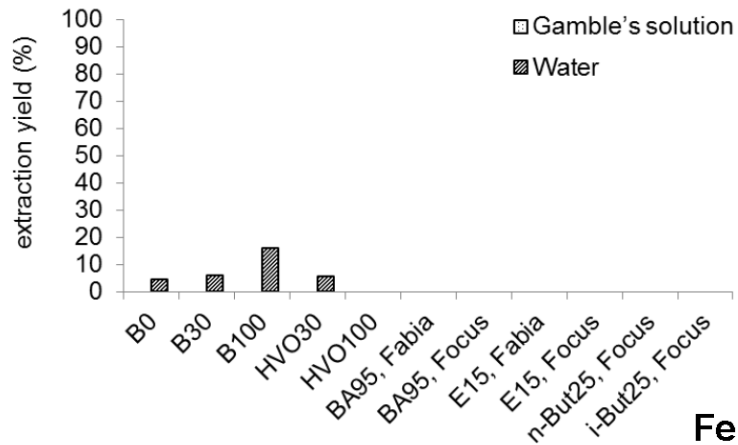
# Stanovení kovů v emisích z paliv

- 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<sub>2.5</sub> klesají s přidavkem biosložky (především u nafty)
- Koncentrace kovů v PM<sub>2.5</sub> neklesají s přidavkem biosložky!
- Rozhodující vliv otěrových kovů
- Biosložka zvyšuje biodostupný podíl
- **Pěstování potravin x paliva**
- Jaký je přínos ???

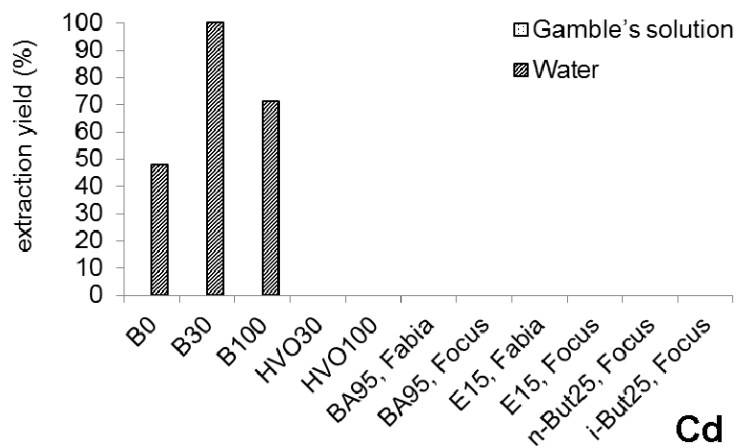
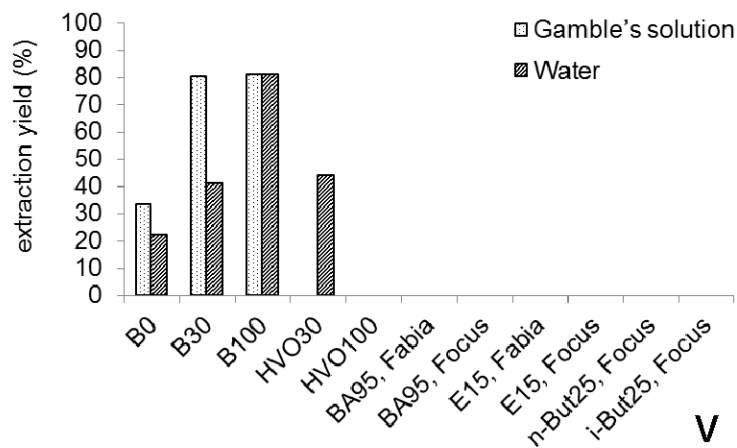
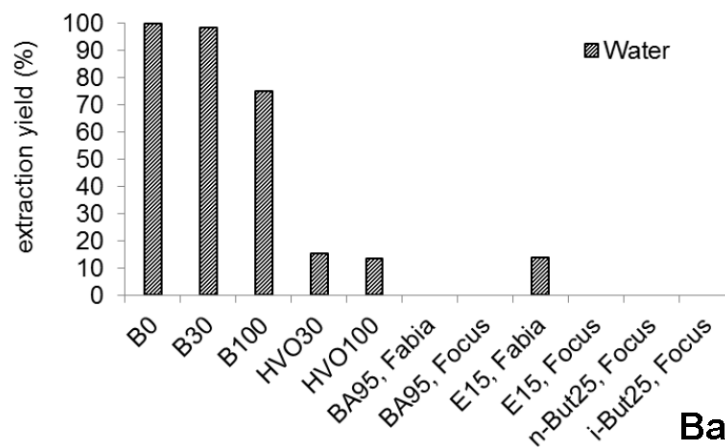
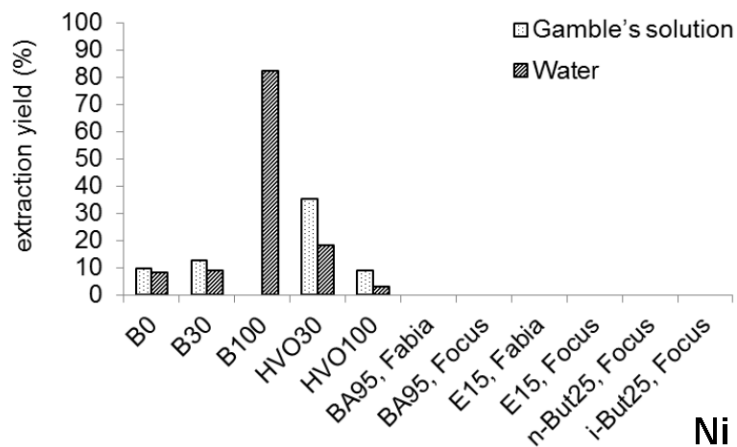


Rozpustnost generovaných nanočástic PbO

# Stanovení kovů v emisích z paliv

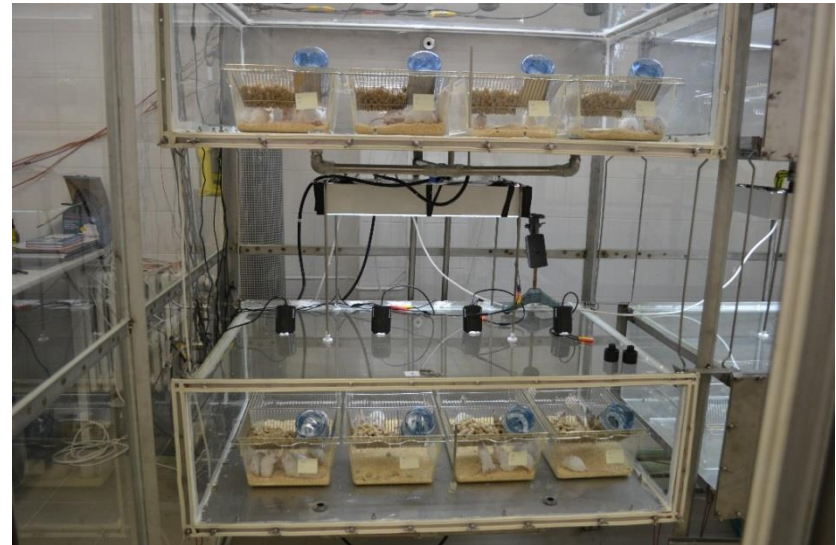


# Stanovení kovů v emisích z paliv



# 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

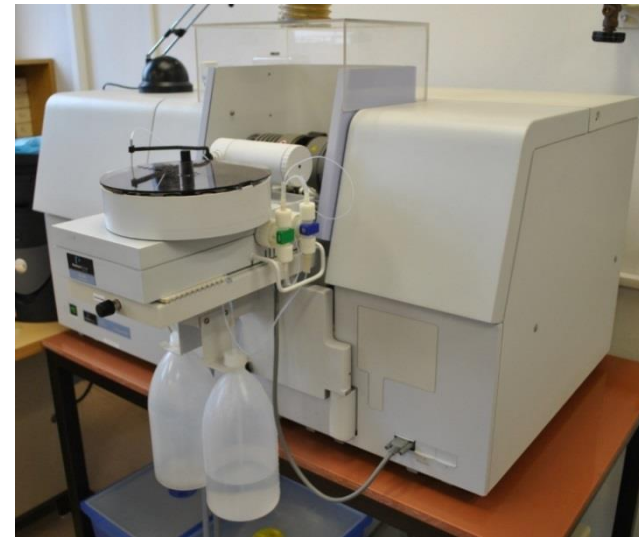
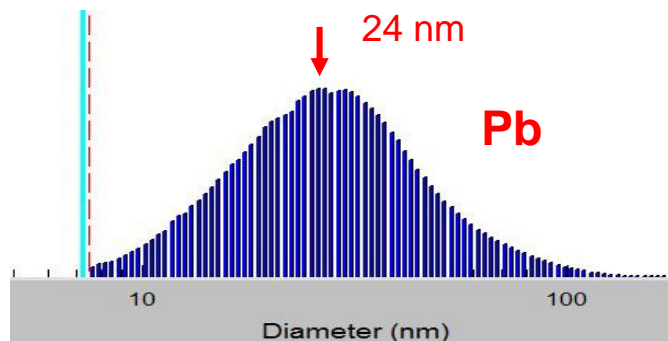
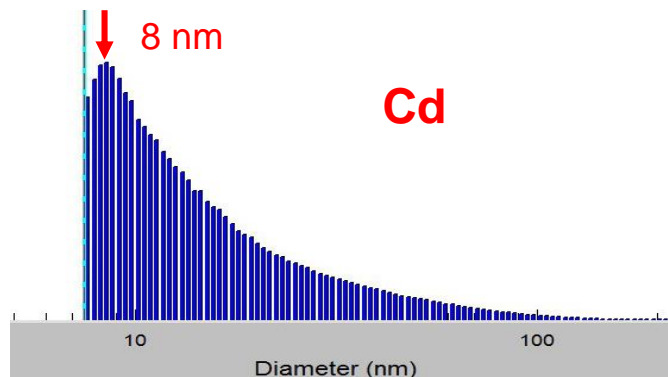


Měření distribuce NPs (SMPS)



# 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



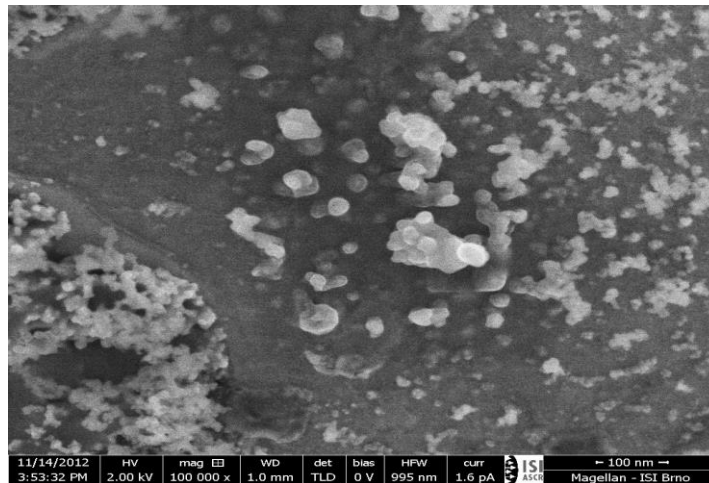
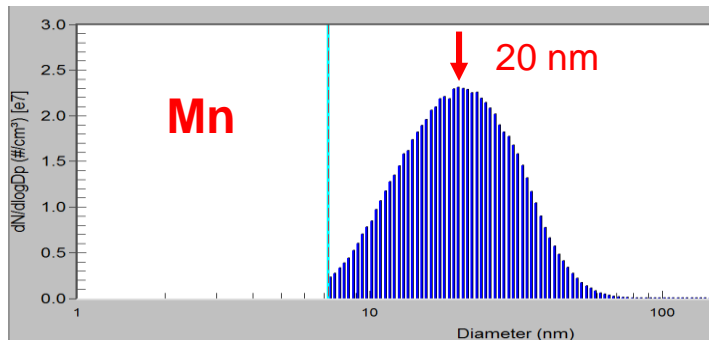
Stanovení kovů (AAS)

Distribuce NPs (SMPS)

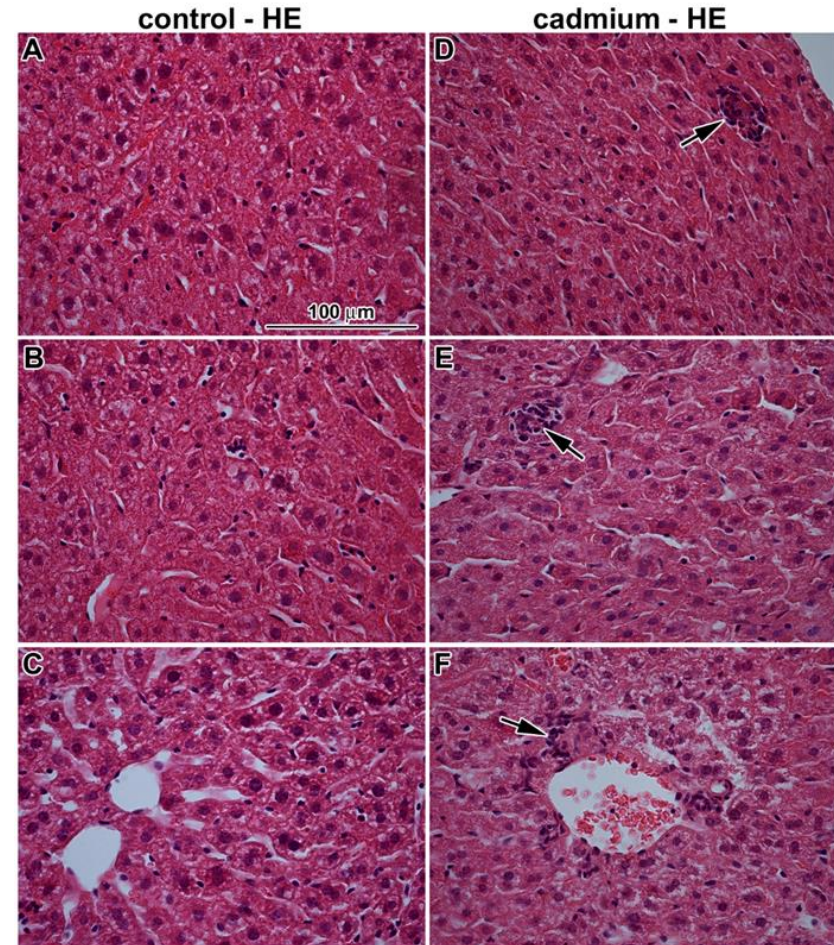


# Studium toxicity NPs *in-vivo*

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



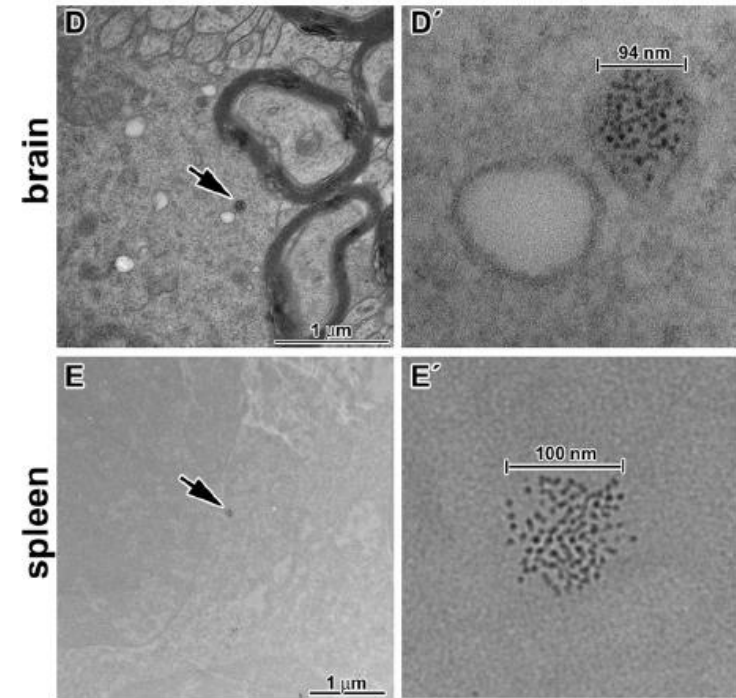
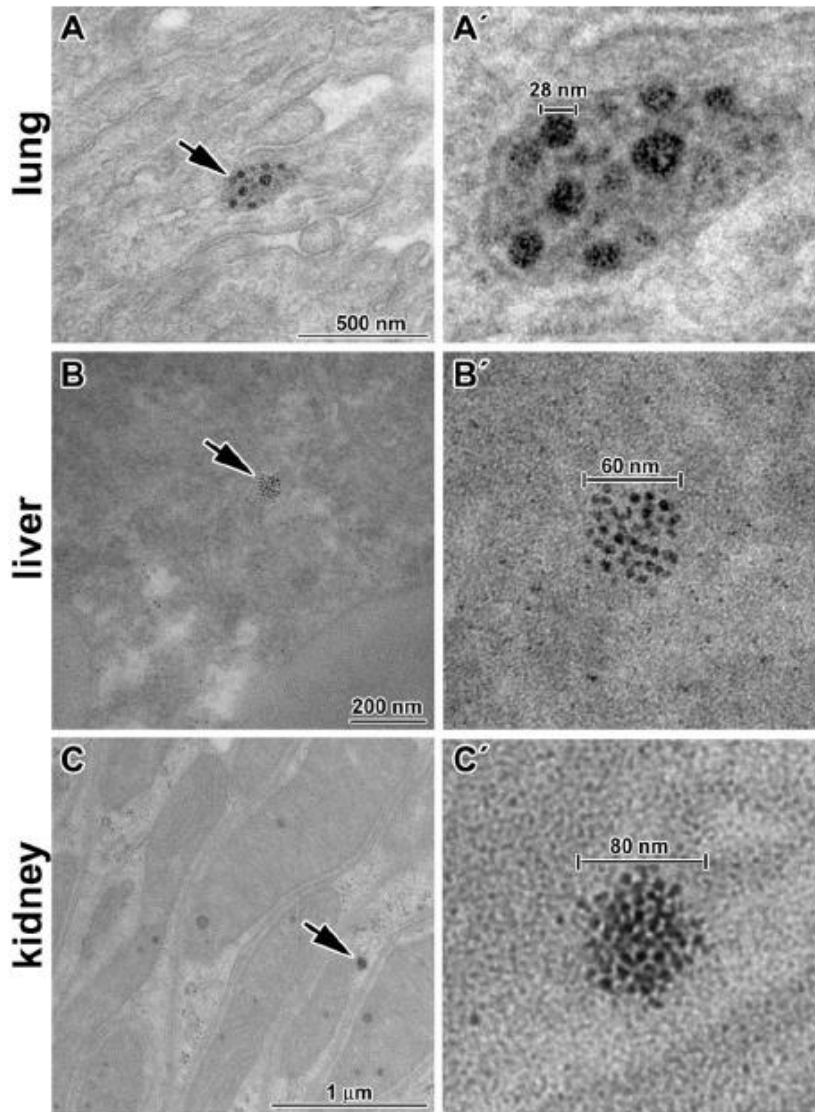
Morfologická analýza  $\text{Mn}_3\text{O}_4$  NPs



Histologická analýza jater (CdO NPs)

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

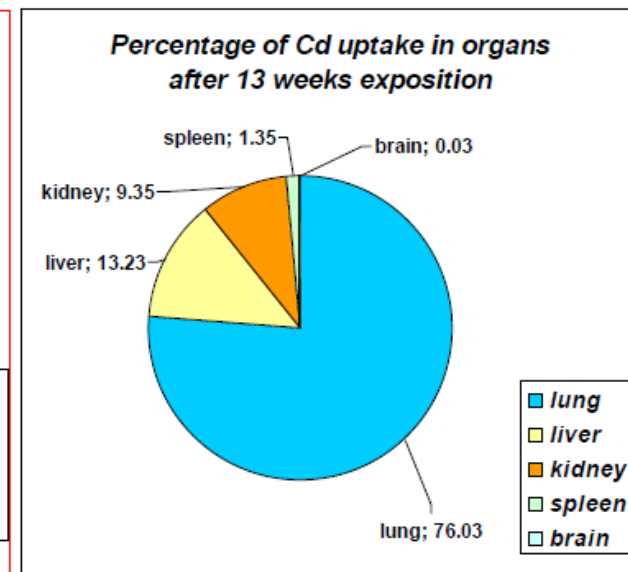
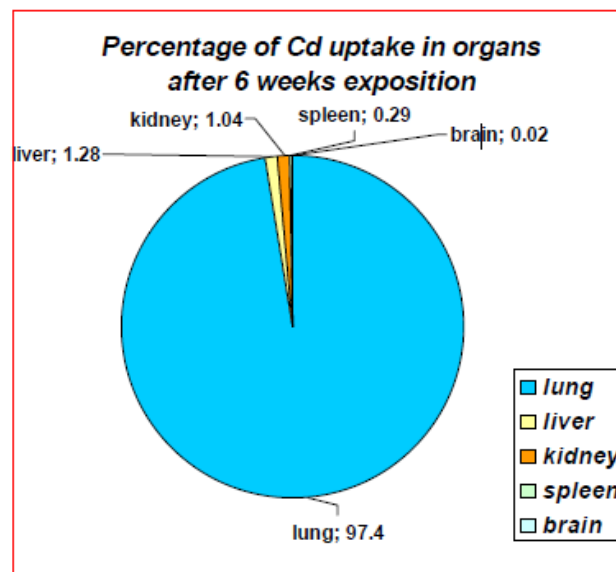
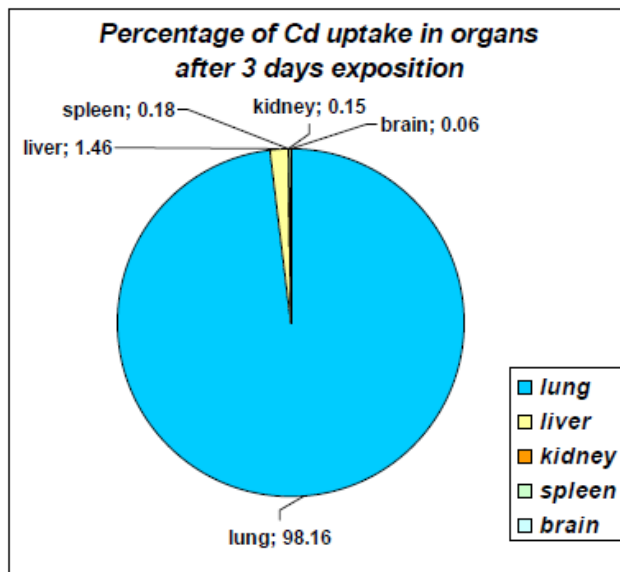
# Studium toxicity NPs *in-vivo*



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*

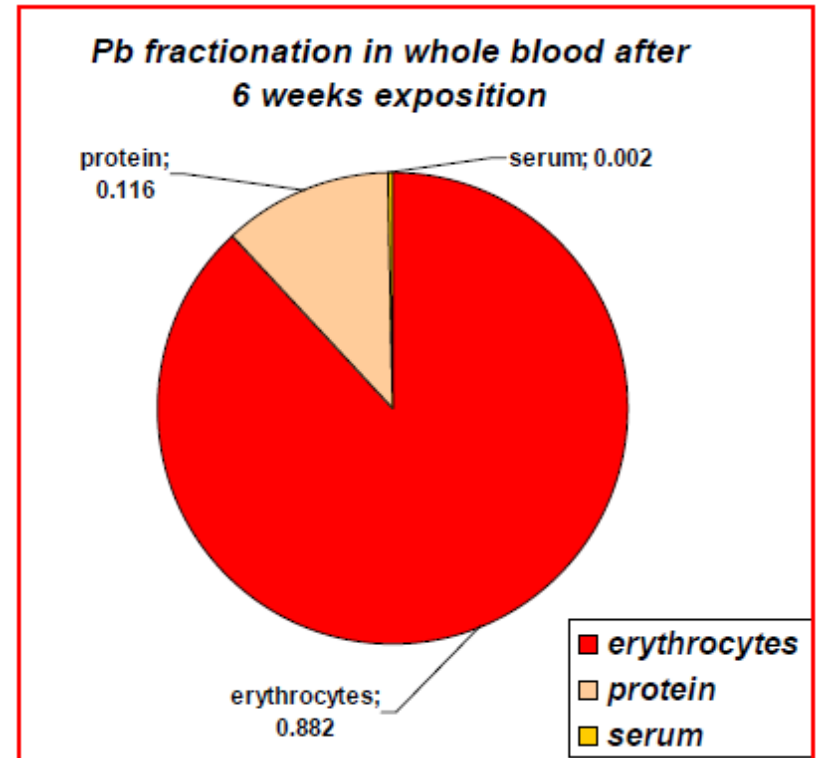
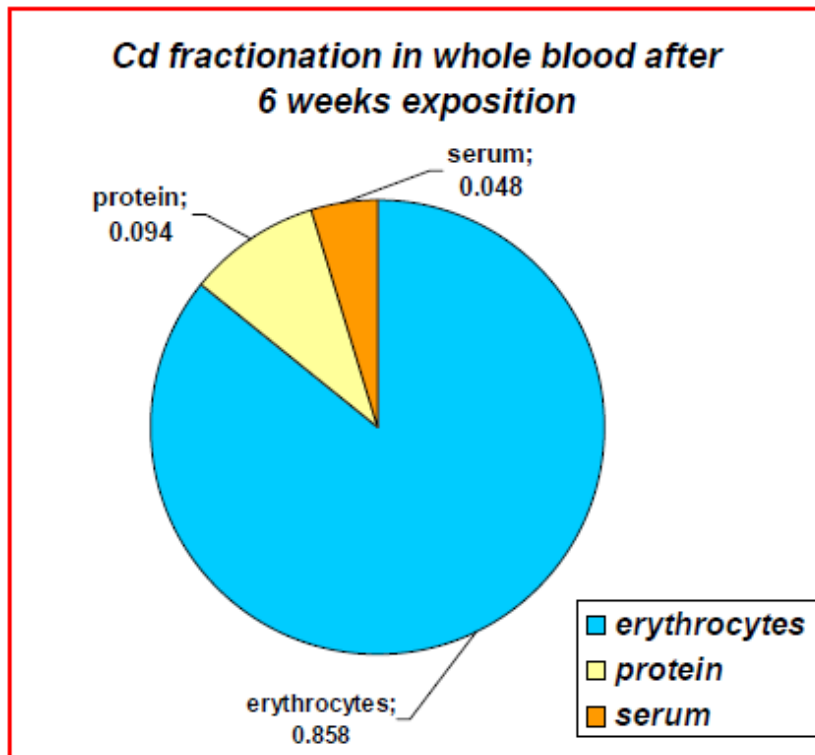
- Obsah Cd v plicích i sekundárních orgánech značně vzrostl již po šesti týdnech expozice
- Nejvyšší akumulace byla zaznamenána v plicích, méně v ledvinách, a poté ve slezině a játrech
- Obsah Cd v orgánech exponovaných myší byl vyšší než u kontrolní skupiny 7500 x pro plíce, 140 x pro ledviny, 79 x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



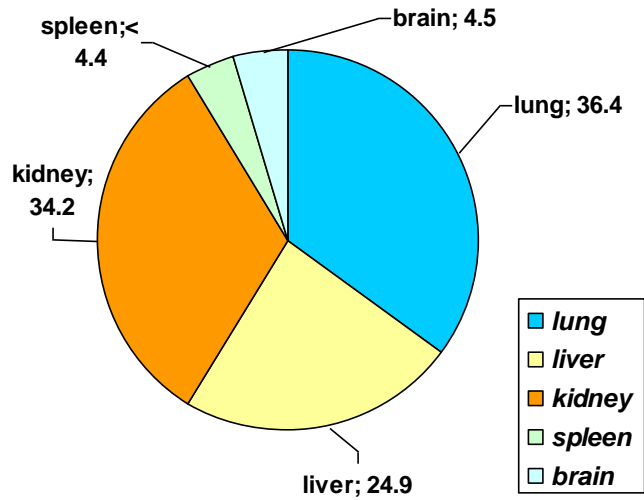


# Studium toxicity NPs *in-vivo*

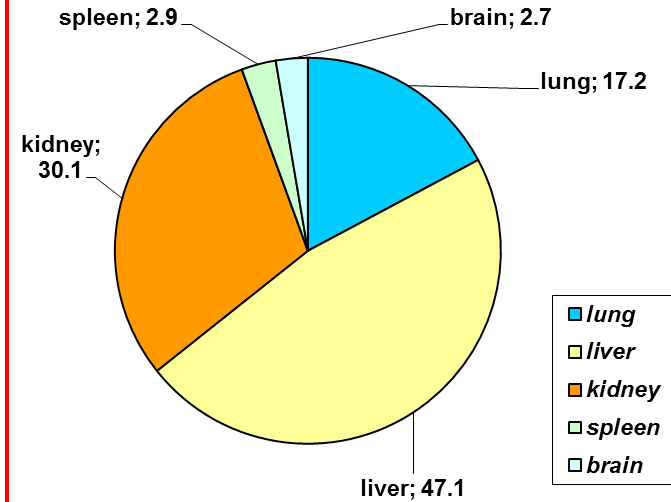
- Koncentrace Cd v krvi byla po šesti týdnech  $80 \text{ ng g}^{-1}$ , zatímco u kontrolní skupiny byl obsah Cd pod limitem detekce ( $2 \text{ ng g}^{-1}$ )
- 86% Cd bylo vázáno na erythrocyty, 9% na plasmu a 5% na krevní sérum



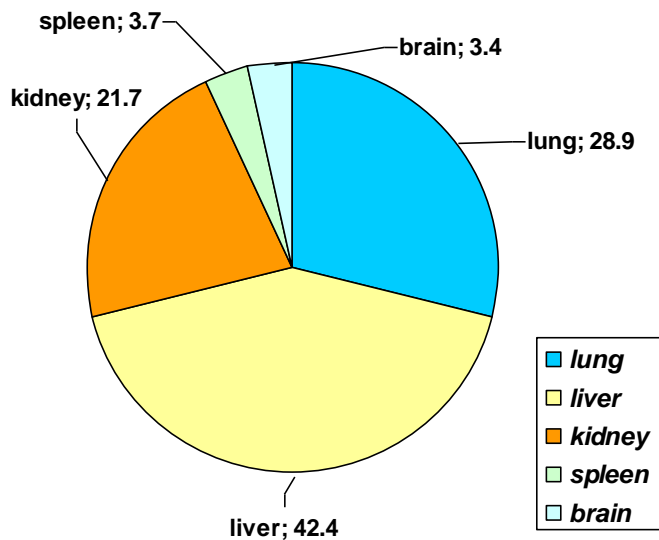
**Percentage of Pb uptake in organs after 72 h exposition**



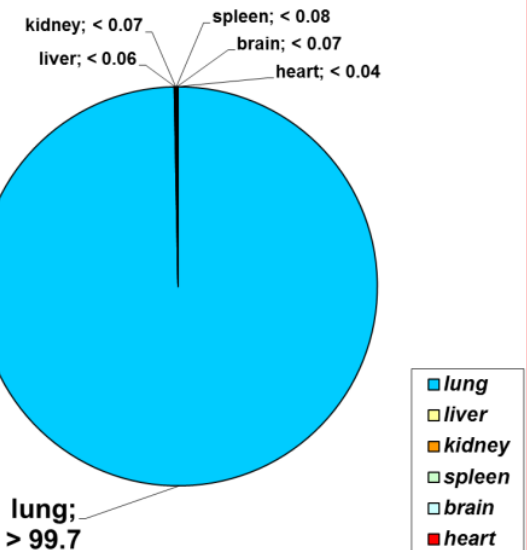
**Percentage of Pb uptake in organs after 6 weeks exposition**



**Percentage of Pb uptake in organs after 11 weeks exposition**

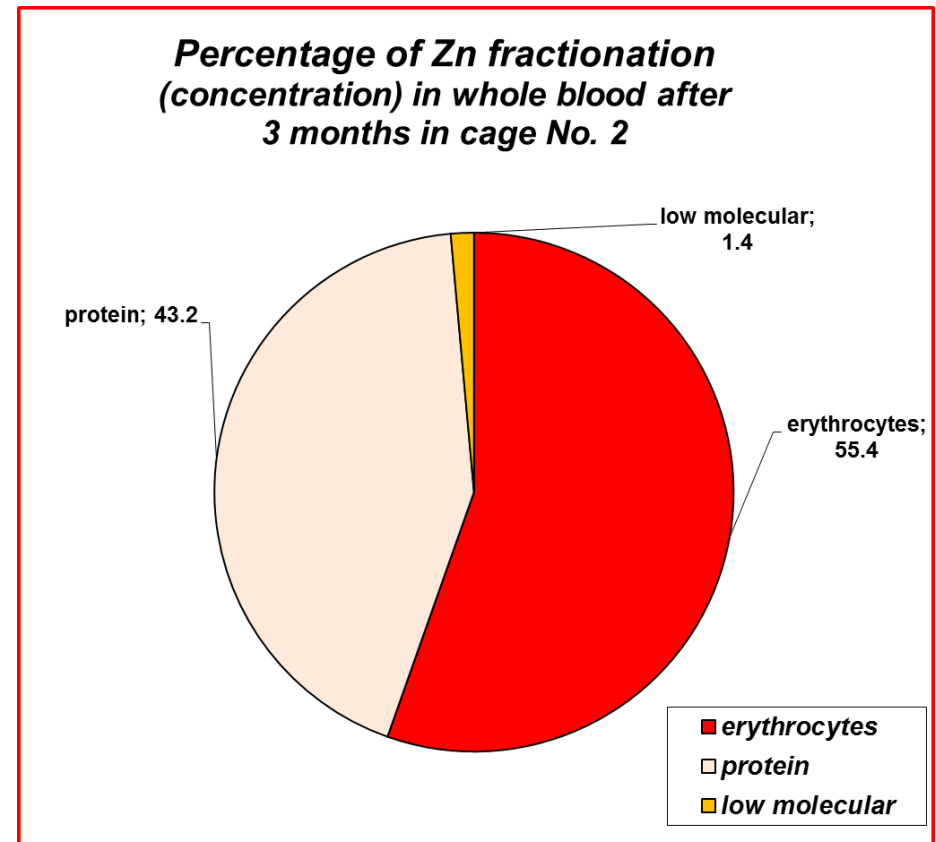
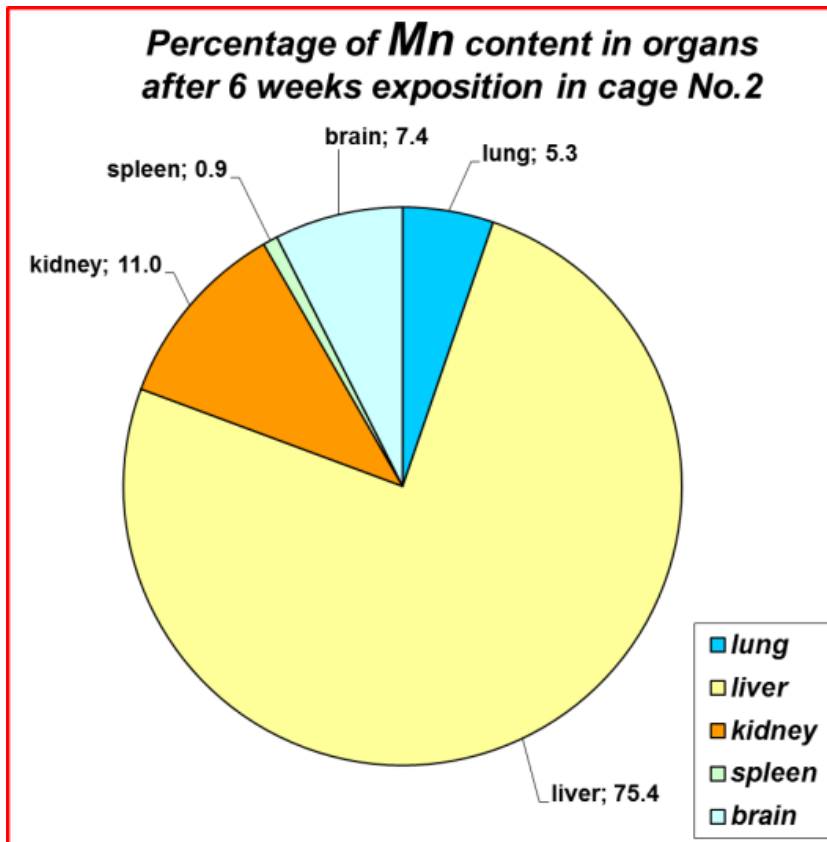


**Percentage of Ti content in organs after 87 days exposition in cage No. 2**



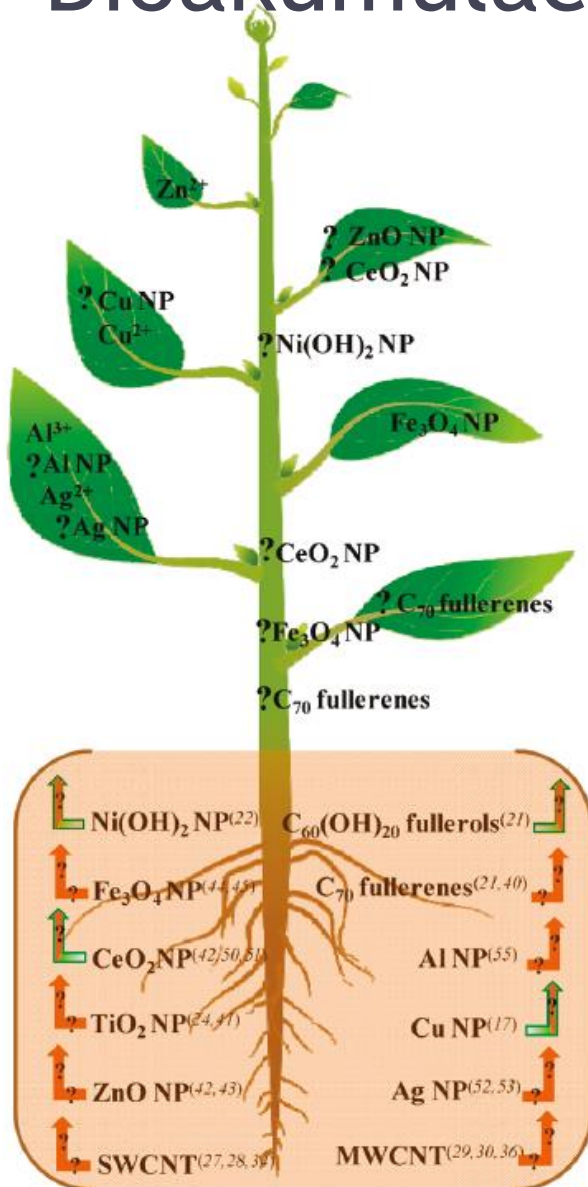
# Studium toxicity NPs *in-vivo*

- 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

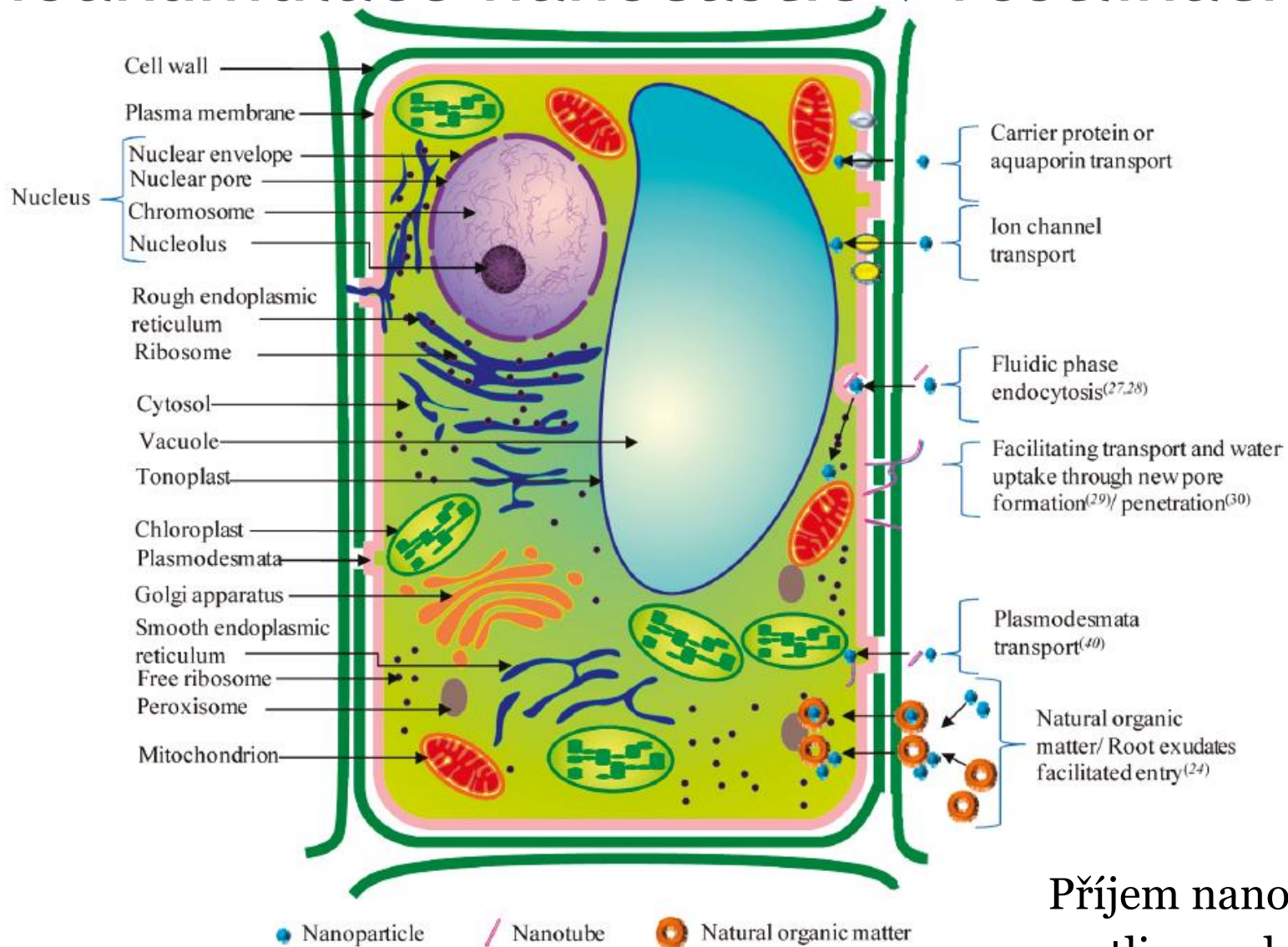


Uptake/translocation not confirmed (varied conclusions)



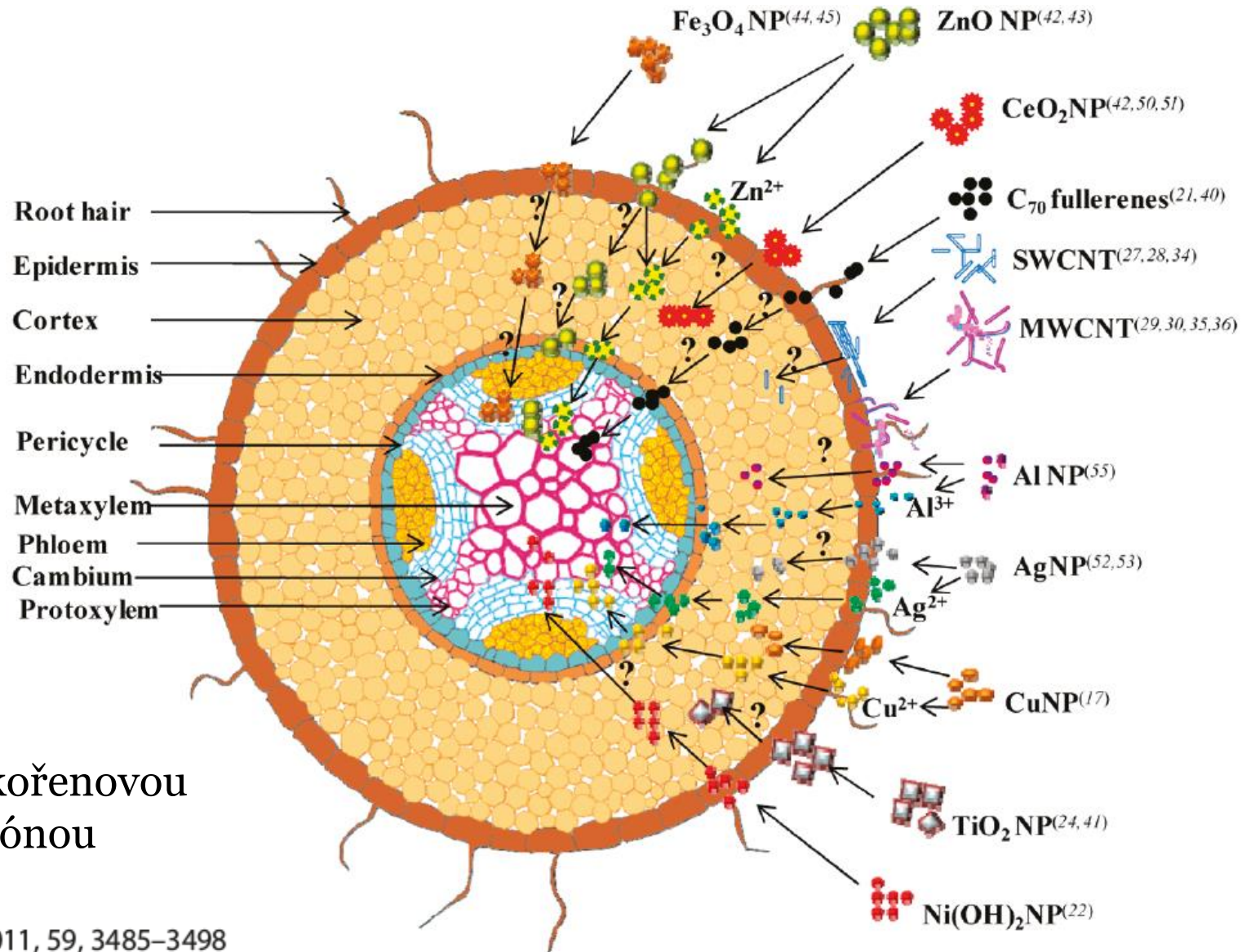
Uptake by roots; but translocation not studied/ not confirmed due to very few studies on the NP

# Bioakumulace nanočástic v rostlinách



Příjem nanočástic  
rostlinnou buňkou

# Bioakumulace nanočástic v rostlinách



Příčný řez kořenovou  
absorpční zónou

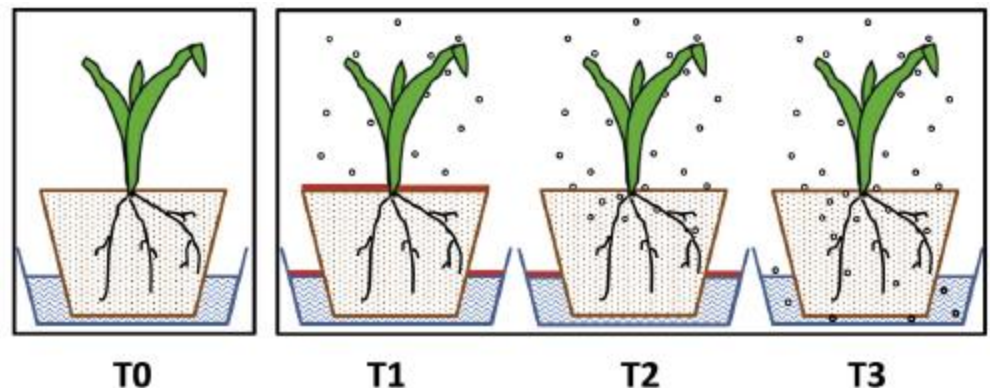


# Bioakumulace nanočástic v rostlinách

- 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

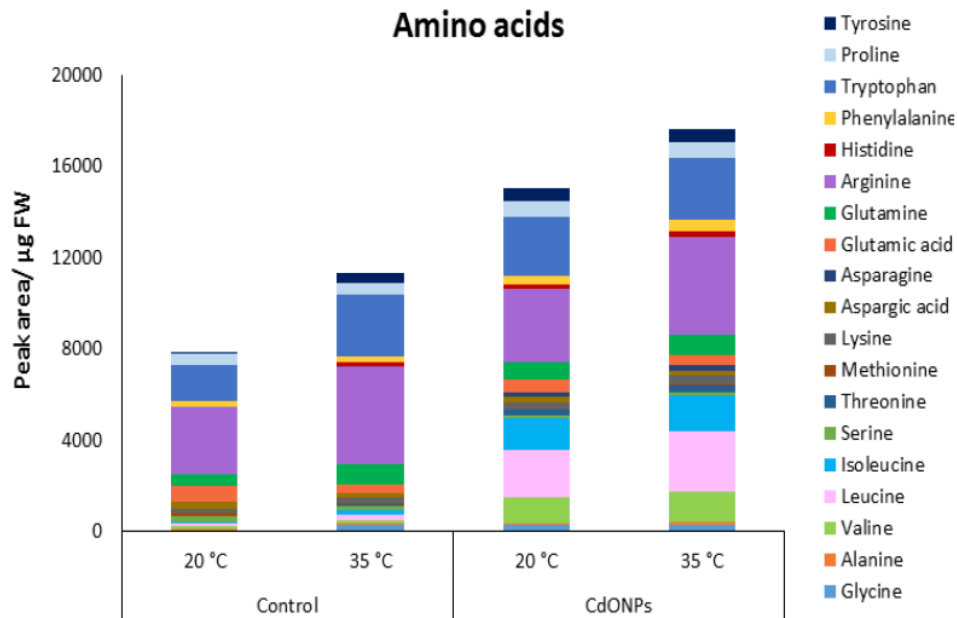
## Experiment s expozicí ječmenu nanočásticím kadmia

- 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



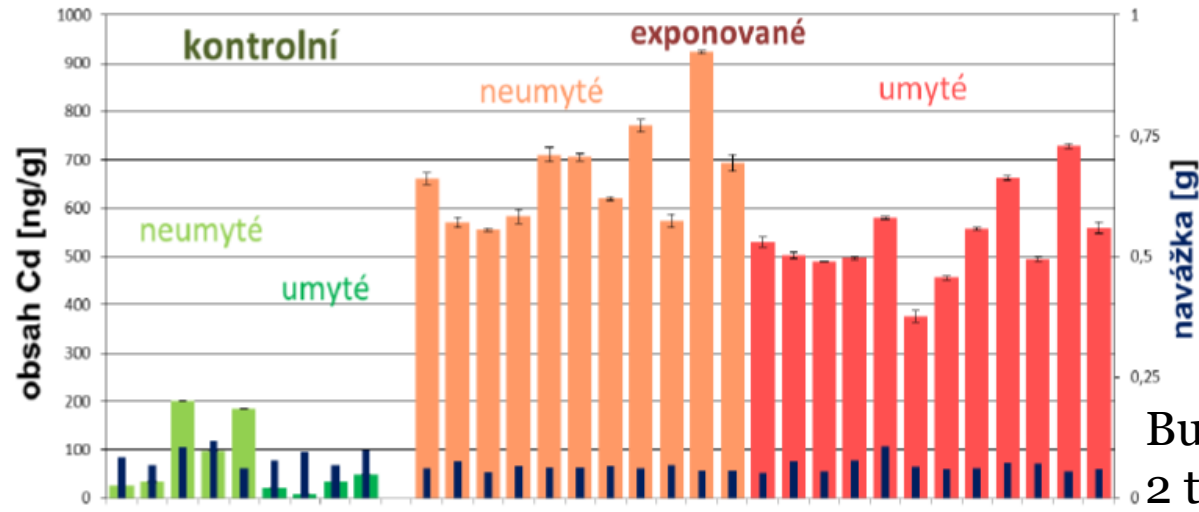
Obsah aminokyselin ve smrkových jehlicích



Buk lesní



# Bioakumulace nanočástic v rostlinách

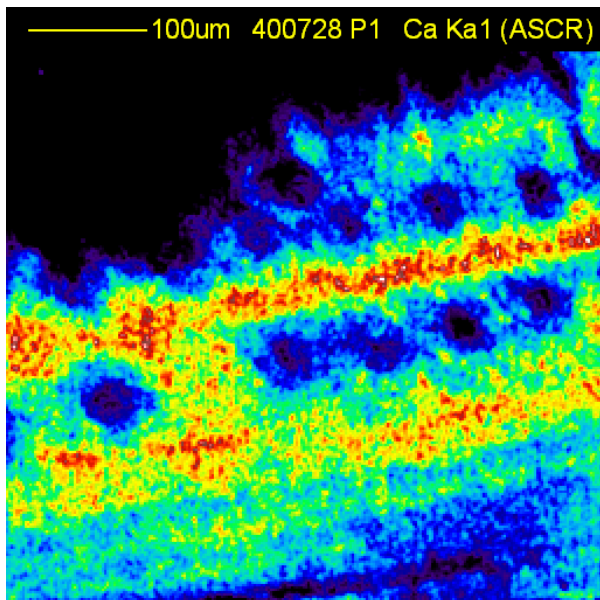


Buk lesní,  
2 týdny expozice

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

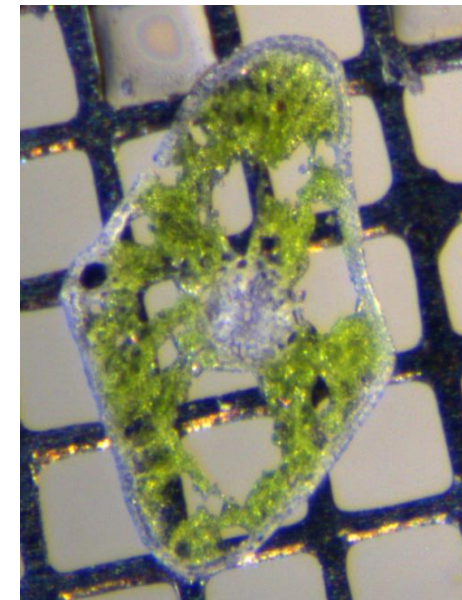
- Jak významný je přímý vstup NPs průduchy listů?
- Stanovení Cd pomocí PIXE (protonově indukované rentgenové emise)
- Potvrzení přítomnosti Cd na povrchu jehlice
- Obsah Cd ve stomatech pod limitem detekce metody – limitace experimentu poškozením rostlin za vysokých koncentrací NPs



Ca v jehlici smrku (PIXE)



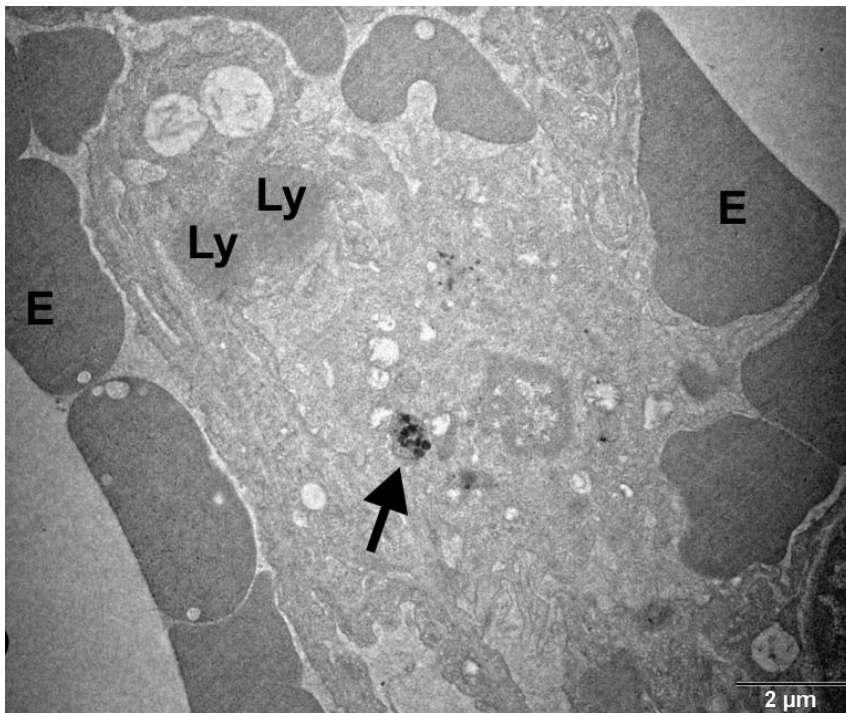
Stomata



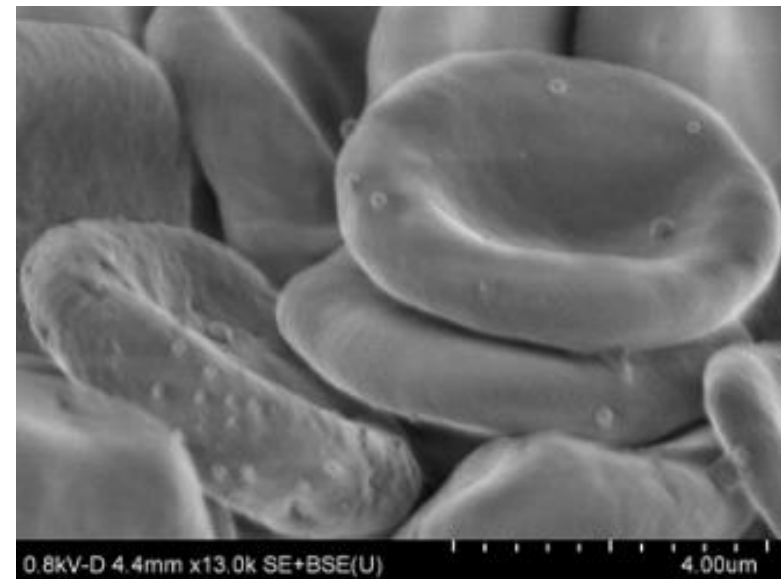
Příčný řez

# Jsou nanočástice nebezpečné?

**Děkuji za pozornost**



Agregát NPs PbOx v pneumocytu typu II



Agregát NPs PbOx na povrchu erytrocytu