



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΔΙΟΙΚΗΣΗ ΥΠΗΡΕΣΙΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επίδραση νανοσωματιδίων (μετάλλων και οξειδίων μετάλλων) στην in vitro και in vivo κυτταρική ανάπτυξη και τοξικότητα

**Σταυρούλα Ζάχου
Γεωπόνος, Επιστήμων Τροφίμων**

- Επιβλέποντες:**
- 1. Αριστείδης Τσατσάκης, Καθηγητής Τοξικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης**
 - 2. Εμμανουήλ Στρατάκης, Ερευνητής Α', Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λέιζερ, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας**

Ηράκλειο, Μάρτιος 2017

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	1
Abstract.....	2
1. Εισαγωγή	
1.1 Νανοσωματίδια.....	3-4
1.2 Εφαρμογές νανοσωματιδίων μετάλλων και οξειδίων μετάλλων.....	4-5
1.3 Κυτταροτοξικότητα.....	5-7
2. Φυσικοχημικές ιδιότητες νανοσωματιδίων οξειδίων μετάλλων και τοξικότητα	
2.1 Επίδραση του μεγέθους.....	8-9
2.1.1 Τοξικότητα νανοσωματιδίων χρυσού εξαρτώμενη από το μέγεθος .	9-12
2.2 Επίδραση της χημικής σύστασης.....	12-13
2.3 Επίδραση της επιφάνειας.....	13-14
2.3.1 Επίδραση του μεγέθους επιφάνειας και της αντιδραστικότητάς...	14-15
2.3.2 Επίδραση της χημείας της επιφάνειας.....	15
2.3.3 Επίδραση της ηλεκτροστατικής κατάστασης της επιφάνειας.....	15-18
2.3.4 Επίδραση της τροποποίησης της επιφάνειας.....	18-20
2.4 Επίδραση της μορφολογίας και του σχήματος.....	20-22
2.5 Επίδραση της συσσωμάτωσης.....	22-25
2.6 Επίδραση της κρυσταλλικότητας.....	25-27
2.7 Επίδραση της διαλυτότητας και απελευθέρωσης μεταλλικών ιόντων.....	27-30
3. Επίλογος – Συμπεράσματα.....	30-31
4.Βιβλιογραφία.....	32-39

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Εμμανουήλ Στρατάκη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την βοήθειά του, την οικογένεια μου για την υπομονή και την ενθάρρυνση αλλά και τον σύντροφό μου Γιάννη για την στήριξη και την εμπύχωση καθόλη τη διάρκεια της διεξαγωγής αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας.

Περίληψη Μεταπτυχιακής Εργασίας

Τίτλος εργασίας: Επίδραση Νανοσωματιδίων (μετάλλων και οξειδίων μετάλλων) στην in vitro και in vivo κυτταρική ανάπτυξη και τοξικότητα

Της: Σταυρούλας Ζάχου

Υπό τη επίβλεψη των: I. Αριστεΐδη Τσατσάκη, Καθηγήτριας
Τοξικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Παν.Κρήτης

II. Εμμανουήλ Στρατάκη, Ερευνητής Α',
Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ, ΙΤΕ

Ημερομηνία: Μάρτιος 2017

Οι ραγδαίες εξελίξεις στην επιστήμη των νανοϋλικών σηματοδοτούν μια νέα εποχή στον τομέα της Βιοϊατρικής Μηχανικής με προσδοκία την σημαντική συμβολή τους στον τομέα της Υγείας. Ωστόσο, πολλά ερωτήματα σχετικά με την ασφάλεια των νανοσωματιδίων έχουν προκύψει εξαιτίας των πολυάριθμων ιδιοτήτων που εμπλέκονται στην τοξικότητά τους. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ίδιοι οι παράγοντες που καθιστούν τόσο ξεχωριστές τις ιδιότητες των νανοσωματιδίων θα μπορούσαν επίσης να είναι υπεύθυνοι για την ενδεχόμενη τοξικότητά τους. Λαμβάνοντας υπόψη τη χρήση, για την οποία προορίζονται τα νανοϋλικά, καθώς και την ακούσια έκθεση του πληθυσμού σε αυτά, είναι επιτακτική ανάγκη να διερευνηθεί σε βάθος η ασφάλειά τους στα βιολογικά συστήματα.

Στην παρούσα εργασία αρχικά περιγράφονται γενικές έννοιες όπως η νανοτεχνολογία και τα νανοσωματίδια, αναφέρονται οι τάσεις και οι εφαρμογές αυτών και στη συνέχεια εξετάζονται μία προς μία οι βασικές φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων μετάλλων και οξειδίων μετάλλων όπως το μέγεθος, η επιφάνεια, το σχήμα, το φορτίο, η κρυσταλλικότητα, η συσσωμάτωση και η διαλυτότητα και αναλύεται ο τρόπος με τον οποίο αυτές επηρεάζουν την ανάπτυξη και τοξικότητα των κυττάρων.

Λέξεις κλειδιά: νανοτοξικότητα, νανοσωματίδια μετάλλων και οξειδίων μετάλλων, φυσικοχημικές ιδιότητες, νανοτεχνολογία, κυτταροτοξικότητα

Abstract

Title: Effect of (metal and metal oxides) nanoparticles on in vitro and in vivo cell growth and toxicity

By: Stavroula Zachou

Supervisors:

- I. Aristides Tsatsakis , Professor of Toxicology, Medicine Department, University of Crete
- II. Emmanouel Stratakis, Researcher, Institute of Electronic Structure and Laser, FORTH

Date: March, 2017

Rapid developments in the science of nanomaterials mark a new era in the field of Biomedical Engineering with questionable consequences in public health. As a result, significant issues about the safety of nanoparticles have arisen because of the numerous properties that are associated to toxicity. Several studies have shown that the same factors that make nanoparticle properties so special could also be responsible for their possible toxicity. Considering the applications of nanomaterials, as well as accidental exposure of the population, it is imperative to explore in depth their safety in biological systems. In this work, first we describe the importance of nanotechnology, we analyze potential trends and applications of nanoparticles and then review the correlation of basic physicochemical properties of metal and metal oxide nanoparticles, such as size, surface, shape, charge, crystallinity, agglomeration, solubility with growth and cell toxicity.

Key words: nanotoxicity, metal and metal oxide nanoparticles, physicochemical properties, nanotechnology, cytotoxicity

1. Εισαγωγή

Από τις βασικές έννοιες της νανοτεχνολογίας που εισήχθησαν στα μέσα του εικοστού αιώνα από τον Richard Feynman, Norio Taniguchi και Eric Drexler, ένα μεγάλο μέρος της βιβλιογραφίας σχετικά με τα νανοϋλικά έχει συσσωρευτεί και έχει επεκταθεί σημαντικά στον εικοστό πρώτο αιώνα. Πιο συγκεκριμένα, ως «νανοσωματίδια» ορίζονται τα συμπλέγματα ατόμων, το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται από 1nm έως 100nm. Παρουσιάζουν ξεχωριστό επιστημονικό ενδιαφέρον καθώς είναι, στην πραγματικότητα, η γέφυρα μεταξύ μακροσκοπικών (bulk) υλικών και ατομικών/μοριακών δομών. Ενώ οι ιδιότητες των μακροσκοπικών υλικών είναι ανεξάρτητες από το μέγεθός τους, τα σωματίδια με μέγεθος στη νανοκλίμακα αναδύουν μοναδικές μηχανικές, ηλεκτρικές, μαγνητικές, οπτικές και χημικές ιδιότητες. Η ταχεία ανάπτυξη των μεθόδων και εργαλείων για το χαρακτηρισμό νανοϋλικών / κολλοειδών έχει οδηγήσει σε σημαντικές προόδους στην ανάπτυξη υλικών (φουλερένια και νανοσωλήνες άνθρακα) [1]. Εμπνευσμένοι από τις τάσεις αυτές, πολλοί επιστήμονες πλέον τάσσονται υπέρ των νανοϋλικών με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους έναντι των ξεπερασμένων μακροσκοπικών υλικών. Από τις αρχές του 2000, αυτά τα νεότερα υλικά καταλαμβάνουν όλο και περισσότερο χώρο και η επίδρασή τους έχει μπει βαθιά στην καθημερινή μας ζωή, σε εφαρμογές όπως τα ενδύματα, τα καλλυντικά, τα έπιπλα, ακόμη και τα τρόφιμα.

1.1 Νανοσωματίδια

Τα νανοσωματίδια παρασκευάζονται τόσο με φυσικές (π.χ. θερμική εξάχνωση, αποδόμηση στερεών στόχων από ιόντα- sputtering ή λέιζερ κ.α.) όσο και χημικές τεχνικές. Έχουν την εγγενή τάση να συσσωματώνονται σε μεγαλύτερα σωματίδια καθώς όσο αυξάνεται ο όγκος τους, μειώνεται ο λόγος των των επιφανειακών ακόρεστων προς τους εσωτερικούς κορεσμένους δεσμούς συνεισφέροντας στην ελάττωση της εσωτερικής, ανά μονάδα μάζας, ενέργειάς τους. Η αρχική έλξη των σωματιδίων οφείλεται στις δυνάμεις Van der Waals. Για την αποφυγή της συσσωμάτωσης, η σύνθεση γίνεται παράλληλα με την επικάλυψή τους με κάποια προστατευτική επίστρωση, η οποία προκαλεί άπωση, μεταξύ των σωματιδίων, είτε λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων είτε λόγω των θερμοδυναμικών απαιτήσεων (π.χ. μείωση εντροπίας). Όταν τέτοια νανοσωματίδια βρίσκονται μέσα σε υγρά τότε συνιστούν τα λεγόμενα 'αιωρήματα', τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των 'κολλοειδών διασπορών'.

Με βάση τη χημική τους σύνθεση, τα νανοσωματίδια μπορεί να είναι οργανικά, όπως τα πολυμερικά νανοσωματίδια, ανόργανα, όπως τα σωματίδια οξειδίων μετάλλων ή μεταλλικών ιόντων, με μία τουλάχιστον διάσταση στη νανοκλίμακα ή και τα δύο, όπως για παράδειγμα, νανοσωματίδια χρυσού επικαλυμμένα με κάποιο πολυμερές.

Με βάση την πηγή προέλευσής τους διακρίνονται σε φυσικά νανοσωματίδια, ανθρωπογενή και συνθετικά. Τα φυσικά νανοσωματίδια προέρχονται από φυσικές διεργασίες όπως εκρήξεις ηφαιστειών, πυρκαγιές και διαβρώσεις. Κατά την εισπνοή και την είσοδό τους στον οργανισμό, τα νανοσωματίδια διέρχονται από την ρινική κοιλότητα και καταλήγουν στις κυψελίδες των πνευμόνων όπου συχνά τις φράζουν, προκαλώντας ανεπιθύμητες επιπτώσεις στον οργανισμό. Τα ανθρωπογενή νανοσωματίδια αποτελούν μια νέα κατηγορία, η οποία είναι αποτέλεσμα της ανθρώπινης δραστηριότητας, προέρχονται από τα παραπροϊόντα της καύσης και επιβαρύνουν την ανθρώπινη υγεία. Τα τελευταία χρόνια με τη ραγδαία αύξηση της βιομηχανικής δραστηριότητας και την ολοένα και αυξανόμενη χρήση του αυτοκινήτου έχει αυξηθεί επικίνδυνα το ποσοστό των καύσεων καθημερινά και το θέμα αποτελεί πλέον σημαντικό πρόβλημα Δημόσιας Υγείας. Τέλος, τα συνθετικά νανοσωματίδια αποτελούν προϊόντα κατασκευής του ανθρώπου κι έχουν συγκεκριμένη δομή και φυσικοχημική σύνθεση.

Παρόλο που η χημική σύσταση παραμένει ίδια για τα νανοϋλικά και τα μακροσκοπικά υλικά, οι ιδιότητές τους παρουσιάζουν εκπληκτικές διαφορές. Οι βασικοί παράγοντες που διαφοροποιούν αυτές τις δύο κατηγορίες υλικών είναι τα επιφανειακά και κβαντικά φαινόμενα [1,2].

Στην παρούσα εργασία θα εστιάσουμε στις ιδιότητες και την τοξικότητα των νανοσωματιδίων μετάλλων και οξειδίων μετάλλων λόγω της ευρείας χρήσης τους σε καταναλωτικά προϊόντα αλλά και σε βιομηχανικές εφαρμογές.

1.2 Εφαρμογές νανοσωματιδίων μετάλλων και οξειδίων μετάλλων

Τα νανοσωματίδια μετάλλων και οξειδίων μετάλλων ανήκουν στην κατηγορία νανοσωματιδίων με τη μεγαλύτερη χρήση σε εφαρμογές στη βιομηχανία αλλά και ως καταναλωτικά αγαθά. Τα νανοσωματίδια μετάλλων μελετώνται ιδιαίτερα για εφαρμογές στην Οπτοηλεκτρονική, στην Βιοϊατρική Μηχανική και σε περιβαλλοντικές επιστήμες, λόγω των ηλεκτρομαγνητικών, καταλυτικών, φαρμακοκινητικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους. Συγκεκριμένα τα νανοσωματίδια διοξειδίου του τιτανίου (TiO_2), αποτελούν σημαντικό συστατικό στα αντηλιακά προϊόντα, καθώς απορροφούν το υπεριώδες φως (UV) και προστατεύουν αποτελεσματικά το δέρμα από τις επιβλαβείς επιπτώσεις της έκθεσης σε αυτό, αλλά χρησιμοποιούνται και στις οδοντόκρεμες ως λευκαντικοί παράγοντες. Το οξείδιο του ψευδαργύρου (ZnO) και το διοξείδιο του πυριτίου (SiO_2), τα οποία χρησιμοποιούνται κυρίως ως

χρωστικά υλικά, φίλτρα απορρόφησης της υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας έχουν εφαρμογή σε πολλά καλλυντικά, καθώς και ως πρόσθετο τροφίμων για να μειωθεί το ιξώδες και να ρυθμιστεί η οξύτητα [2].

Η επιλεκτική προσρόφησή των νανοσωματιδίων χρυσού σε οργανικά υλικά και βιολογικά μόρια τα καθιστά ιδανικά για δείκτες ή ετικέτες αυτών και δίνει τη δυνατότητα για ανίχνευση των φορέων τους στα φυσικά τους ή άλλα περιβάλλοντα. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί για παράδειγμα να γίνει ανίχνευση ουσιών που σχετίζονται με μορφές καρκίνου και επομένως να πραγματοποιηθεί έγκαιρη διάγνωσή του. Επίσης λόγω των ιδιαίτερων ιδιοτήτων τους, τα νανοσωματίδια χρυσού παίζουν το ρόλο μεταφορέα που έχει την ικανότητα να επιλέξει τον σωστό 'παραλήπτη', αφού δύνανται να μεταφέρουν μικροποσότητες φαρμάκων σε πάσχοντες ιστούς.

Ανόργανα νανοϋλικά, όπως οι κβαντικές κουκκίδες (Quantum Dots), τα νανوسύρματα (Nanowires) και οι νανοράβδοι (Nanorods) μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλές εφαρμογές της Οπτοηλεκτρονικής λόγω των ξεχωριστών οπτικών και ηλεκτρονικών ιδιοτήτων τους. Επιπλέον, τα νανοϋλικά δύνανται να χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά και με οργανικά υλικά σε συσκευές όπως οργανικά φωτοβολταϊκά στοιχεία (OPVs) και οργανικές δίοδοι εκπομπής φωτός (OLEDs).

Λόγω των ισχυρών αντιμικροβιακών χαρακτηριστικών τους, τα νανοσωματίδια αργύρου (Ag) και οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) χρησιμοποιούνται ευρέως σε μια ποικιλία από καθαριστικά καθώς και στον αθλητικό εξοπλισμό. Επιπλέον, λόγω των ημιαγωγικών ιδιοτήτων τους, τα νανοσωματίδια μετάλλων και οξειδίων μετάλλων βρίσκουν εφαρμογή σε αισθητήρες, φωτοβολταϊκά πάνελ, ηλεκτρονικά κυκλώματα, (σε κάρτες μνήμης και κινητά τηλέφωνα) και σε ημιαγωγούς. Επίσης χρησιμοποιούνται στην Αυτοκινητοβιομηχανία και συγκεκριμένα στους καταλύτες, στην Κλωστοϋφαντουργία, στα έξυπνα υφάσματα τα οποία έχουν την ιδιότητα να μην λεκιάζονται ή να μην τσαλακώνονται, στην Βιομηχανία Τροφίμων όπου χρησιμοποιούνται στην έξυπνη συσκευασία για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στα συσκευασμένα τρόφιμα, στην Ιατρική για παρακολούθηση, διάγνωση αλλά και στοχευμένη θεραπεία, σε νανομεμβράνες για το φιλτράρισμα μικροοργανισμών ή φυτοφαρμάκων στο νερό και στην Πράσινη Γεωργία όπου συμβάλλουν στην επίτευξη της αειφορικής ανάπτυξης [3]. Ωστόσο, η ασφάλεια τους αποτελεί θέμα συζήτησης μεταξύ πολλών επιστημόνων και κλινικών ιατρών.

1.3 Κυτταροτοξικότητα

Η κυτταροτοξικότητα των νανοσωματιδίων είναι αποτέλεσμα διαφόρων παραγόντων. Σε ορισμένες περιπτώσεις τα νανοϋλικά επάγουν την κυτταροτοξικότητα λόγω της ίδιας της ουσίας, και άλλες φορές παρουσιάζουν τοξικότητα, της οποίας οι μηχανισμοί δεν έχουν αποσαφηνιστεί [4,5]. Μικρού

μεγέθους νανοσωματίδια συγκεκριμένης ουσίας θεωρείται ότι ενέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο τοξικότητας από ότι μεγαλύτερου μεγέθους σωματίδια της ίδιας ουσίας [6-8]. Κρίσιμα ζητήματα θεωρούνται, η κατανομή των σωματιδίων μέσα στον οργανισμό και η συσσώρευση ενός συγκεκριμένου τύπου σωματιδίων σε ένα συγκεκριμένο μέρος του σώματος, η οποία εξαρτάται από το μέγεθος και τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας του σωματιδίου. [9].

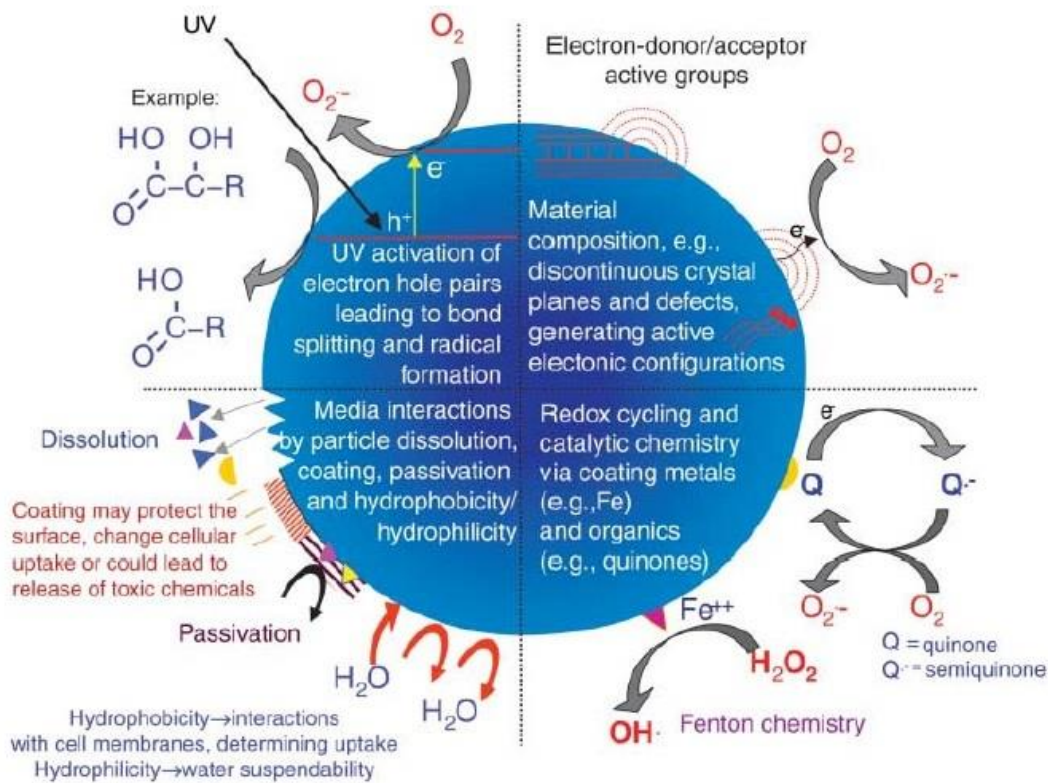
Όταν τα νανοσωματίδια συσσωρεύονται στο σύστημα ενός οργανισμού χωρίς κατάλληλη απέκκριση, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να προκαλούν συνεχή τοξικότητα. Οι κύριες περιοχές κατανομής και τα όργανα-στόχοι για τα νανοσωματίδια είναι άγνωστα, ωστόσο, φαίνεται ότι το ήπαρ και η σπλήνα είναι τα κύρια όργανα-στόχοι [10,11]. Εάν τα νανοσωματίδια εισέλθουν στον οργανισμό μέσω της κατάποσης, της εισπνοής ή του δέρματος, μπορούν να προκαλέσουν το σχηματισμό δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) συμπεριλαμβανομένων των ελεύθερων ριζών [12]. Τα ROS παράγουν οξειδωτικό στρες, φλεγμονή και επακόλουθη βλάβη σε διάφορα βιολογικά υλικά, όπως είναι οι πρωτεΐνες και το DNA. Η παραγωγή ROS των νανοσωματιδίων οξειδίων μετάλλων εξαρτάται από την απελευθέρωση μεταλλικών ιόντων από νανομέταλλα και οξειδία νανομετάλλων, από την φωτοενεργοποίηση του υπεριώδους φωτός, και το pH του μέσου. Είναι σημαντικό να σημειωθεί, ωστόσο, ότι στα ζώντα κύτταρα, τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) είναι φυσιολογικά προϊόντα του οξειδωτικού μεταβολισμού και ως επί το πλείστον παράγονται ως παραπροϊόντα της μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. Τα κύρια ROS περιλαμβάνουν υπεροξειδίο, υπεροξειδίο του υδρογόνου, ρίζα και ιόν υδροξυλίου. Η έκθεση σε υπερβολικά υψηλά επίπεδα των ROS δύναται ωστόσο να προκαλεί οξειδωση των κυτταρικών μακρομορίων και τέλος κυτταροτοξικότητα.

Εκτός από την παραγωγή ROS, άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητα είναι το μέγεθος, η μορφολογία, η κατάσταση της συσσώρευσης, το σχήμα, η χημική σύνθεση, η επιφανειακή δομή, το επιφανειακό φορτίο, η συσσωματώση και η διαλυτότητα [13]. Ως αποτέλεσμα του μικρού μεγέθους τους, τα νανοσωματίδια μπορούν να διασχίσουν διασταυρώσεις των ιστών, ακόμη και κυτταρικών μεμβρανών, όπου μπορούν να προκαλέσουν διαρθρωτικές βλάβες στα μιτοχόνδρια [14,15] ή να εισβάλλουν στον πυρήνα, να προκαλέσουν σοβαρές μεταλλάξεις του DNA [16] και να ακολουθήσει κυτταρικός θάνατος [17].

Οι παράγοντες που αναφέρονται παραπάνω μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε πέντε χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων, τα οποία είναι: το μέγεθος, η επιφάνεια, το ηλεκτροστατικό φορτίο της επιφάνειας, η μορφολογία και η κατάσταση της συσσωμάτωσης. Οι ερευνητές έχουν κάνει μια σημαντική προσπάθεια για την ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των νανοϋλικών και των βιολογικών ιστών. Επίσης έχουν διερευνήσει τα είδη των επικαλύψεων των επιφανειών αλλά και τις τροποποιήσεις που αυξάνουν την ασφάλεια των νανοσωματιδίων στους ζώντες οργανισμούς. Ωστόσο, αυτές οι επικαλύψεις επιφανειών είναι προστατευτικές για περιορισμένο χρόνο, επειδή καταστρέφονται από περιβαλλοντικές

αλληλεπιδράσεις, όπως η έκθεση στον αέρα ή την υπεριώδη ακτινοβολία, σε χρονικό διάστημα ενός έως τεσσάρων ωρών [18,19]. Για να ξεπεραστεί αυτή η αδυναμία, έχουν διεξαχθεί αρκετές σχετικές μελέτες, οι οποίες απέδειξαν ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της μακροχρόνιας επίστρωσης των νανοσωματιδίων και της σημαντικής μείωσης της κυτταροτοξικότητας [20].

Μερικοί λένε ότι τα τοξικολογικά δεδομένα για τα νανοσωματίδια είναι ανεπαρκή λόγω της μικρής ιστορίας της Νανοτεχνολογίας στον τομέα της Υγείας. Ωστόσο, άλλοι επιμένουν ότι τα νανοϋλικά είναι ασφαλή να χρησιμοποιηθούν στην υγειονομική περίθαλψη [21,22]. Για το διακανονισμό της συζήτησης, είναι αναγκαίο να διευκρινιστούν οι φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων που σχετίζονται με την τοξικότητα. Σε αυτή την ανασκόπηση, θα συζητηθούν οι πρόσφατες τάσεις σχετικά με το ρόλο των φυσικοχημικών ιδιοτήτων στα νανοσωματίδια οξειδίων μετάλλων, από την άποψη των *in vitro* και *in vivo* τοξικολογικών αποτελεσμάτων.



Εικόνα 1. Ιδιότητες της επιφάνειας των νανοσωματιδίων που οδηγούν σε παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS). Οι δεσμοί σθένους και αγωγιμότητας των ημιαγώγιμων νανοϋλικών μπορούν να δημιουργήσουν ηλεκτρονικές καταστάσεις οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό του $O_2^{\cdot-}$, το οποίο μέσω της αυτοξειδοαναγωγής μπορεί να δημιουργήσει πρόσθετα αντιδραστικά είδη οξυγόνου. Επίσης, η φωτοενεργοποίηση του TiO_2 μπορεί να δημιουργήσει ζεύγη οπών ηλεκτρονίων που παράγουν ρίζες $O_2^{\cdot-}$ και OH^{\cdot} . Μεταβατικά μέταλλα και ο κύκλος οξειδοαναγωγής των οργανικών χημικών ουσιών στην επιφάνεια του σωματιδίου μπορεί επίσης να παράγει ROS. Διάλυση της επιφάνειας των σωματιδίων με απελευθέρωση μεταλλικών ιόντων θα μπορούσε να σχετίζεται ιδιαίτερα με π.χ. ZnO τοξικότητα των νανοσωματιδίων. Αυτά τα χαρακτηριστικά της διαλυτότητας μπορούν να μεταβάλλονται με την ελεύθερη επιφανειακή ενέργεια των σωματιδίων, καθώς και το pH του περιβάλλοντος ή του κυττάρου [23].

2. Φυσικοχημικές ιδιότητες νανοσωματιδίων οξειδίων μετάλλων και Τοξικότητα

2.1 Επίδραση μεγέθους

Οι διαστάσεις των σωματιδίων αναγνωρίζονται ως θεμελιώδεις για την τοξικότητά τους. Όσο πιο μικρό είναι το μέγεθος των νανοσωματιδίων, δηλαδή όσο μεγαλύτερη είναι η επιφάνειά τους, τόσο πιο δραστική είναι και τόσο μαζικότερες είναι οι οξειδωτικές ικανότητές τους, οι οποίες δύνανται να οδηγήσουν ακόμη και σε οξείδωση του γενετικού υλικού, προκαλώντας βλάβη στο DNA των κυττάρων και οξείδωση των κυτταρικών μεμβρανών με αποτέλεσμα την καταστροφή τους. Η κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από τα νανοϋλικά προκύπτει από την αλληλεπίδραση μεταξύ των νανοσωματιδίων της επιφάνειας και των κυτταρικών συστατικών. Καθώς η διάμετρος μειώνεται, το εμβαδόν της επιφάνειας των σωματιδίων αυξάνεται εκθετικά. Έτσι, ακόμη και όταν τα σωματίδια έχουν την ίδια σύνθεση, μπορεί να έχουν σημαντικά διαφορετικά επίπεδα κυτταροτοξικότητας ανάλογα με το μέγεθος των σωματιδίων και τη δραστικότητα της επιφάνειας. Παράλληλα, το μέγεθος των σωματιδίων προκαλεί σημαντικές διαφοροποιήσεις στο μηχανισμό της κυτταρικής διοχέτευσης και της κατανομής της στο βιολογικό περιβάλλον (in vivo).

Για την πρόκληση κυτταροτοξικότητας και φλεγμονώδους απόκρισης σε ζωικά μοντέλα, είναι σημαντικό τα νανοσωματίδια να μετακινούνται κατά μήκος του επιθηλιακού φραγμού. Γι' αυτό το λόγο το μέγεθος των νανοσωματιδίων διαδραματίζει κείμερο ρόλο στην επαγωγή της τοξικότητας [24,25]. Στην περίπτωση της εισπνοής νανοσωματιδίων, τα νανοσωματίδια διεισδύουν βαθιά μέσα στο πνευμονικό παρέγχυμα και διαφορετικού μεγέθους νανοσωματίδια παρουσιάζουν διαφορετικά μοτίβα κατανομής στην αναπνευστική οδό. Η κατανομή τους επηρεάζεται επίσης από τους αριθμούς Stokes και Reynolds. Αρχικά, τα σωματίδια είναι καλά κατανεμημένα στην αέρια φάση, αλλά μετά την εισπνοή μετατοπίζονται στην υγρή φάση στα αναπνευστικά υγρά [26,27].

Πρόσφατα, αξιολογήθηκε η κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από εισπνεόμενα νανοσωματίδια αργύρου διαφορετικού μεγέθους [28]. Αρouraίοι εκτέθηκαν σε νανοσωματίδια αργύρου μεγέθους 18, 34, 60, και 160 nm και αφού θανατώθηκαν, μετρήθηκε η ποσότητα των νανοσωματιδίων στους πνεύμονές τους. Βρέθηκε ότι τα νανοσωματίδια με μεγέθη 18 και 34 nm προκαλούσαν έκφραση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH), η οποία αποτελεί δείκτη της βλάβης των κυττάρων, με δόσοεξαρτώμενο τρόπο μετά από 24 ώρες. Παρόλα αυτά, δεν υπήρχε δόσοεξαρτώμενη βλάβη των κυττάρων όταν χρησιμοποιήθηκαν νανοσωματίδια 60 και 160 nm. Στους πνεύμονες μετρήθηκε μεγαλύτερη ποσότητα νανοσωματιδίων μεγέθους 60 και 160 nm συνολικά, ενώ τα πιο πολλά νανοσωματίδια μεγέθους 18 και 34 nm βρέθηκαν στις κυψελίδες. Συνεπώς φαίνεται ότι το αυξημένο εμβαδόν της επιφάνειας των σωματιδίων στη

νανο-κλίμακα είναι ο πιο πιθανός παράγοντας που συμβάλλει στην τοξικότητα των νανοσωματιδίων αργύρου.

Από την άποψη της κυτταρικής αλληλεπίδρασης, ο μηχανισμός πρόσληψης των νανοσωματιδίων και η αποτελεσματικότητα αποτελούν βασικούς παράγοντες για τη νανοτοξικότητα των κυττάρων. Ο μηχανισμός της κυτταρικής πρόσληψης καθορίζεται ως επί το πλείστον από το μέγεθος των νανοσωματιδίων. Τα νανοσωματίδια είναι εσωτερικευμένα στο κύτταρο μέσω διαφόρων οδών, όπως η φαγοκυττάρωση και η πινοκυττάρωση ανάλογα με το μέγεθος και τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας. Αρκετά μονοπάτια εσωτερικευσης εξαρτώνται από το μέγεθος. Το εύρος που έχει θεωρηθεί καταλληλότερο για πρόσληψη είναι από 10 έως 500 nm με ανώτερο όριο τα 5 nm και ιδανικότερο τα 50 nm. Μεγάλα σωματίδια είναι πιο πιθανό να καταρροφηθούν μέσω της μακροπινοκυττάρωσης.

Η κατανομή ενός φαρμάκου ή των νανοσωματιδίων *in vivo*, ή η φαρμακοκινητική, είναι επίσης σημαντικοί παράγοντες που είναι σκόπιμο να λαμβάνονται υπόψιν κατά την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας. Πολλές έρευνες έχουν διεξαχθεί για την μελέτη της *in vivo* κατανομής των νανοϋλικών [29]. Τα νανοσωματίδια με διάμετρο μικρότερη από 6 nm αποβάλλονται από τους νεφρούς ενώ τα μεγαλύτερα νανοσωματίδια συσσωρεύονται στον μυελό των οστών και το στομάχι (30-150 nm) και άλλα (150-300 nm) στο ήπαρ και τη σπλήνα, μέχρι την εκκαθάριση που πραγματοποιείται με την βοήθεια των μονοπύρηνων του φαγοκυτταρικού συστήματος [30]. Τα περισσότερα νανοσωματίδια που συσσωρεύονται στο ήπαρ και τη σπλήνα προκαλούν σοβαρές παρενέργειες. Για παράδειγμα, οι κβαντικές τελείες του σεληνιούχου καδμίου (CdSe) παραμένουν στον ιστό για έως και οκτώ μήνες και προκαλούν ηπατοτοξικότητα [31]. Αυτό το φαρμακοκινητικό χαρακτηριστικό των νανοσωματιδίων εξαρτάται από το μέγεθος και τη χημεία της επιφάνειας των σωματιδίων.

Γενικά το μέγεθος είναι η ιδιότητα που έχει διερευνηθεί περισσότερο κι αυτό επειδή επηρεάζει τη διανομή, την πρόσληψη, την απομάκρυνσή των νανοσωματιδίων από την κυκλοφορία του αίματος, την αλληλεπίδρασή τους με τα κύτταρα και κατά συνέπεια την επιφανειακή τάση στις κυτταρικές μεμβράνες και τις δυνάμεις προσκόλλησης.

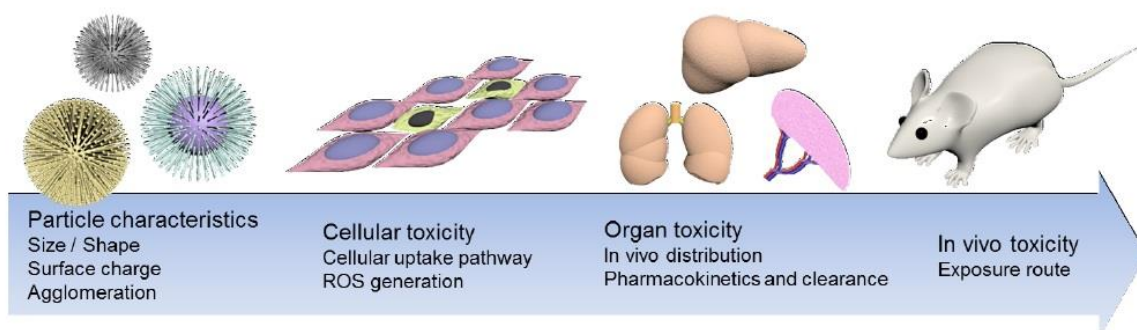
2.1 Τοξικότητα νανοσωματιδίων χρυσού εξαρτώμενη από το μέγεθος

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν παραδείγματα τοξικότητας η οποία εξαρτάται συγκεκριμένα από το μέγεθος νανοσωματιδίων χρυσού. Οι Tsolí και συν. (2005) [32] παρατήρησαν ισχυρή τοξικότητα για νανοσωματίδια χρυσού, μεγέθους 1,4 nm (Au₅₅ clusters) σε διάφορες ανθρώπινες καρκινικές σειρές αλλά και υγιή κύτταρα. Ο λόγος για την υψηλή τοξικότητα φαίνεται να σχετίζεται με την τέλεια εφαρμογή τους στη μεγάλη αύλακα του DNA.

Ο Pan και η ερευνητική του ομάδα [33] μελέτησαν περαιτέρω το μέγεθος που εξαρτάται από την τοξικότητα των νανοσωματιδίων χρυσού χρησιμοποιώντας τέσσερις κυτταρικές σειρές. Μελετήθηκαν νανοσωματίδια χρυσού με μεγέθη 0,8 nm (8 άτομα χρυσού), 1.2 nm (35 άτομα χρυσού), 1.4 nm (55 άτομα χρυσού), και 1,8 nm (150 άτομα χρυσού), καθώς και 15 nm (όλα σταθεροποιημένα με παράγωγα τριφαινυλοφωσφίνης) και με τη χρήση της δοκιμασίας MTT, παρατηρήθηκε ότι συστάδες μεγέθους 1,4 nm ήταν οι πιο κυτταροτοξικές. Τα νανοσωματίδια 15 nm δεν παρουσίασαν κυτταροτοξικότητα ακόμη και σε συγκεντρώσεις 100 φορές υψηλότερη από την IC 50 για τα μικρά συμπλέγματα. Με ενδιαφέρον, η επιστημονική ομάδα διαπίστωσε ότι τα νανοσωματίδια μεγέθους 1.4 nm οδήγησαν σε νέκρωση των κυττάρων μετά από 12 ώρες επώασης, ενώ συσσωματώματα μεγέθους 1.2 nm οδήγησαν σε απόπτωση [33].

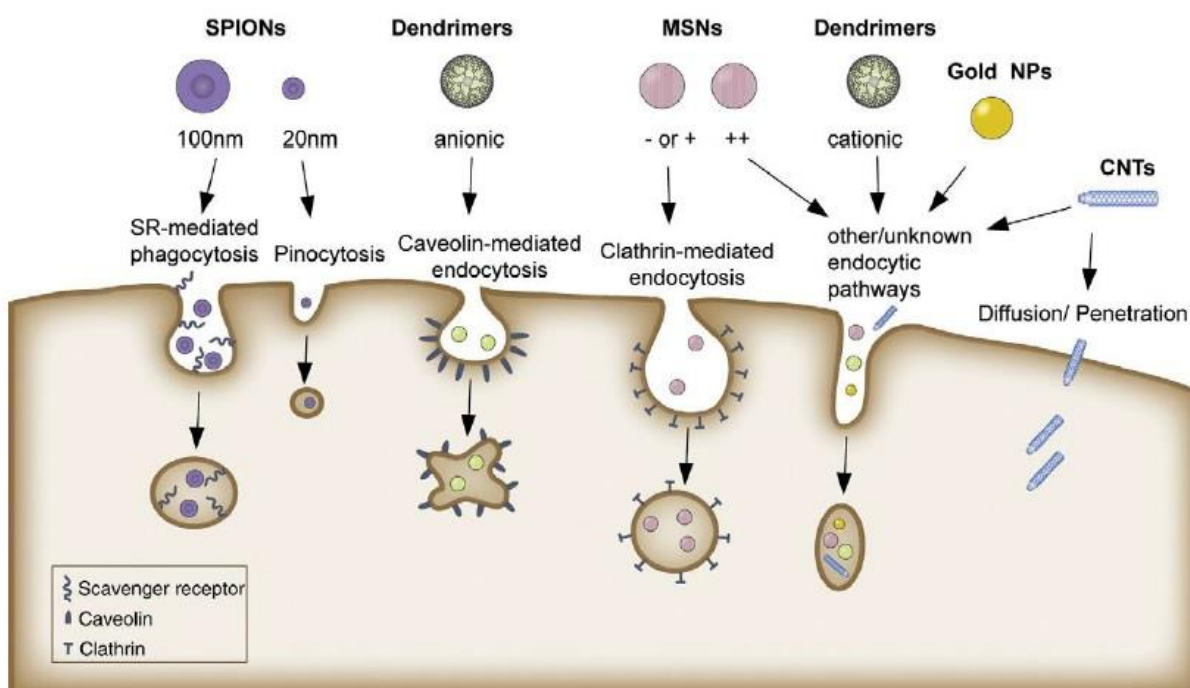
Άλλες μελέτες αναφέρουν ότι τα νανοσωματίδια χρυσού μπορούν να επηρεάσουν την αυτοφαγία, ένα αποικοδομητικό μονοπάτι βασιζόμενο στα λυσοσώματα, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης [34]. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, τα ενδοκυτταρικά περιεχόμενα καταρροφήθηκαν από κυστίδια διπλής μεμβράνης που ονομάζονται αυτοφαγοσώματα. Τα νανοσωματίδια χρυσού επάγουν την συσσώρευση των αυτοφαγοσωμάτων στα κύτταρα, ως αποτέλεσμα της παρεμπόδισης της ροής των αυτοφάγων και όχι της επαγωγής τους [35].

Σε μια άλλη έρευνα, μετά από ενδοφλέβια διοχέτευση νανοσωματιδίων χρυσού σε αρουραίους εκτιμήθηκε η *in vivo* κατανομή τους σύμφωνα με το μέγεθος. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι νανοσωματίδια με μέγεθος 10 nm κατανεμήθηκαν με διαφορετικό τρόπο από ότι τα μεγαλύτερα ομόλογά τους, ενώ εντοπίστηκαν σε όλα σχεδόν τα όργανα, συμπεριλαμβανομένου του αίματος, του ήπατος, της σπλήνας, των νεφρών, των όρχεων, του θύμου, της καρδιάς, των πνευμόνων και του εγκεφάλου. Νανοσωματίδια που ήταν μεγαλύτερα από 50 nm ανιχνεύθηκαν επί το πλείστον μόνο στο αίμα, το ήπαρ και τη σπλήνα [36].



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση των νανοσωματιδίων που προκαλούν κυτταροτοξικότητα. Εγγενή χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων, όπως το μέγεθος, το επιφανειακό φορτίο και η συσσωμάτωση, μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την κυτταροτοξικότητα, σε επίπεδο κυττάρου, οργάνου ακόμη και σε συστήματα *in vivo* [37].

Τα νανοσωματίδια χρυσού, όταν επωάζονται με κύτταρα σχηματίζουν επιφάνεια επικαλυμμένη με πρωτεΐνες ορού και επάγουν την ενδοκύτωση με υποδοχέα, η οποία εξαρτάται από το μέγεθος των σωματιδίων. Διαφορές στην απόδοση της ενδοκύτωσης επηρεάζουν σημαντικά την κυτταρική τοξικότητα [38]. Γενικά εσωτερικευμένα νανοσωματίδια μετατοπίζουν τα ενδοσωματικά ή λυσοσωματικά κυστίδια για περαιτέρω εξάλειψη [33]. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, συμβαίνει ενδοσωματική διαφυγή των εσωτερικευμένων νανοσωματιδίων, καταλήγοντας σε τοξικότητα μέσω της παραγωγής ROS και άμεση μιτοχονδριακή βλάβη [39].



Εικόνα 3. Διαφορετικοί τρόποι πρόσληψης νανοσωματιδίων και νανοδομών (δενδριμερή, CNTs: νανοσωλήνες άνθρακα, MSN: μεσοπορώδη νανοσωματίδια πυριτίου, SPION: υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου) με βάση το μέγεθος, τις ιδιότητες της επιφάνειας, τη φύση τους καθώς και την κατάσταση ενεργοποίησης του κυττάρου στο οποίο εισέρχονται (μακροφάγο, ενδοθηλιακό κύτταρο, κ.α.) [40]

Μπορεί να εξαχθεί συνεπώς το συμπέρασμα ότι με την μείωση του μεγέθους των σωματιδίων, η βιολογική δραστηριότητα αυξάνεται ουσιαστικά. Μικρότερα σωματίδια καταλαμβάνουν μικρότερο όγκο, έτσι ώστε ένας μεγαλύτερος αριθμός σωματιδίων μπορεί να καταλάβει μια μονάδα επιφανείας, με αποτέλεσμα την αύξηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών τοξικότητας, για παράδειγμα το οξειδωτικό στρες, παραγωγή ROS και μιτοχονδριακή διαταραχή [41]. Θεωρείται ότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων και μόνο δεν μπορεί να είναι

υπεύθυνο για την τοξικότητα, διότι οι φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων δεν είναι ανεξάρτητες αλλά επηρεάζουν η μία την άλλη.

2.2 Επίδραση της χημικής σύστασης

Το μέγεθος των σωματιδίων μπορεί να είναι μια κρίσιμη παράμετρος για τη βιοδραστικότητα των νανοϋλικών, αλλά είναι δύσκολο να εξακριβωθεί ποιά παράμετρος διαδραματίζει σημαντικότερο ρόλο στις βιολογικές επιδράσεις που αφορούν διάφορα είδη νανοσωματιδίων με διαφορετικά σχήματα και χημική σύνθεση [42].

Τα νανοσωματίδια μπορούν να έχουν πολύ διαφορετική σύσταση, από τελείως ανόργανη έως τελείως οργανική, ενώ η παρουσία μεταλλικών προσμίξεων επηρεάζει την έκφραση της τοξικότητας [42]. Οι ομάδες επιφανείας μπορούν να κάνουν τα νανοσωματίδια υδρόφιλα ή υδρόφοβα, λιπόφιλα ή λιπόφοβα, καταλυτικά ενεργά ή παθητικά. Η έκταση αυτών των αλλαγών και η σημασία τους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη χημική σύνθεση του υλικού [43].

Με ένα σύνολο *in vitro* πειραματικών πρωτοκόλλων μελετήθηκαν τέσσερα διαφορετικά κοινά νανοϋλικά που χαρακτηρίζονται από το μέγεθος, το σχήμα και τη χημική σύνθεση των σωματιδίων: (I) αιθάλη (carbon black), (i) νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος, (iii) νανοσωματίδια διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2) και (iv) νανοσωματίδια οξειδίου του ψευδαργύρου (ZnO). Οι στόχοι ήταν να διερευνηθεί η σχέση μεταξύ των συγκρίσιμων ιδιοτήτων με την απόκριση της βιωσιμότητας των πρωτογενών ινοβλαστών εμβρύου ποντικού (PMEF) εξετάζοντάς τα *in vitro* με διαφορετικά νανοσωματίδια και να προσδιοριστεί κατά πόσον οι ιδιότητες των σωματιδίων έχουν επιπτώσεις στην κυτταροτοξικότητα μέσω των μεταβολών των ενδοκυτταρικών οξειδωτικών συνθηκών και να συγκριθεί η γονοτοξικότητα που προκαλείται από διάφορα νανοϋλικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις χορήγησης [43]. Βασικό εύρημα της μελέτης αυτής ήταν ότι τα νανοσωματίδια ZnO , προκαλούν σημαντικά μεγαλύτερη μείωση της βιωσιμότητας και οξειδωτική βλάβη από ότι η αιθάλη, οι νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος και τα νανοσωματίδια διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2). Από τη στιγμή που το SiO_2 και ZnO είχαν παρόμοιο σχήμα κρυστάλλων και μέγεθος σωματιδίων, η ποικιλομορφία στην τοξικότητα μεταξύ τους μπορεί να αποδοθεί στη χημική τους σύνθεση. Επιπροσθέτως, η αιθάλη παρουσίασε πολύ χαμηλότερη κυτταροτοξικότητα και οξειδωτική δράση από ότι τα ZnO νανοσωματίδια αν και είχε μικρότερο μέγεθος σωματιδίων. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η επίδραση των μετάλλων στα νανοϋλικά μπορεί να είναι πιο σημαντική από το μέγεθος των σωματιδίων, η οποία θεωρείται η βασική παράμετρος στην τοξικολογική απόκριση των νανοσωματιδίων [43]. Μια εξήγηση για το πώς οι επιφανειακές ιδιότητες μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετική κυτταροτοξικότητα είναι η αλληλεπίδραση των ενεργών θέσεων του δότη ή δέκτη ηλεκτρονίων με το

μοριακό δι-οξυγόνο (O_2). Για παράδειγμα, αφού το ZnO είναι περισσότερο χημικά ενεργό στη φύση από ότι το SiO_2 , η περίσσεια των ηλεκτρονίων στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων ZnO μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερο ρυθμό σχηματισμού του υπεροξειδίου ριζικά ($O_2 \cdot -$), το οποίο κορυφώνεται με τη συσσώρευση του ROS και του οξειδωτικού στρες [44].

Σε γενικές γραμμές, είναι λογικό να πιστεύεται ότι η χημική σύνθεση παίζει κύριο ρόλο στις τοξικολογικές επιπτώσεις των διαφόρων νανοϋλικών. Μάλιστα, μια πρόσφατη μελέτη αποδεικνύει ότι η πιθανή απελευθέρωση των δραστικών μεταλλικών ειδών από αρκετά νανοσωματίδια οξειδίων μετάλλων συμπεριλαμβανομένου του ZnO δεν συμβάλλει σημαντικά στην τοξικότητα των HAECs (Human aortic endothelial cells) [45]. Παράλληλα επιβεβαιώνεται η ιδέα ότι ο αντίκτυπος των ελεύθερων μεταλλικών ιόντων που απελευθερώνονται από τα ZnO νανοσωματίδια στο οξειδωτικό στρες είναι ελάχιστη.

Έρευνες έχουν δείξει ότι τα αντηλιακά που περιέχουν TiO_2 και ZnO μπορούν να καταλύσουν την οξειδωτική βλάβη του DNA σε καλλιέργειες ανθρωπίνων ινοβλαστών πράγμα το οποίο έχει μετρηθεί με τη δοκιμή Comet [46] αλλά και με τον προσδιορισμό της 8-υδροξυ-δεοξυγουανοσίνης (8OHdG), που είναι ένας καλός δείκτης οξειδωτικής βλάβης του DNA [47,48]. Τα ZnO νανοσωματίδια προκάλεσαν σε μεγαλύτερο βαθμό την οξειδωτική βλάβη και την τοξικότητα των κυττάρων, παρά βλάβες στο DNA. Παρόλο που ορισμένα σφαιρικά νανοσωματίδια όπως το διοξείδιο του τιτανίου ή το διοξείδιο του πυριτίου μπορούν επίσης να εισέλθουν στον πυρήνα η γονοτοξικότητα διαφορετικών νανοσωματιδίων δύναται να οφείλεται κατά κύριο λόγο στο σχήμα των σωματιδίων και δευτερευόντως στη χημική σύνθεση [49, 50].

Συμπερασματικά, από τις διάφορες έρευνες προκύπτει ότι οι ιδιότητες της επιφάνειας των σωματιδίων που προσδιορίζονται από τη χημική σύνθεση παίζουν κρίσιμο ρόλο στην παραγωγή ROS που σήμερα είναι το καλύτερα ανεπτυγμένο πρότυπο για την τοξικότητα των νανοσωματιδίων. Ωστόσο, η τοξικότητα των νανοσωματιδίων σε χαμηλότερες δόσεις έκθεσης μπορεί να οφείλεται κυρίως στο σχήμα του σωματιδίου.

2.3 Επίδραση επιφάνειας

Εκτός από το μέγεθος και τη χημική σύσταση άλλος ένας παράγοντας που διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην τοξική επίδραση στον οργανισμό είναι η ίδια η επιφάνεια των νανοϋλικών. Όταν αναφερόμαστε στην επιφάνεια, χαρακτηριστικά της όπως η αντιδραστικότητα της επιφάνειας, η επικάλυψη, η χημεία, το φορτίο, η μορφολογία, η τραχύτητα ακόμα και η επιμόλυνση της επιφάνειας [51], πρέπει να λαμβάνονται υπόψη καθώς επηρεάζουν τη σταθερότητα των νανοσωματιδίων, τον χρόνο κυκλοφορίας τους στο αίμα και τη δέσμευσή τους από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος [52]. Ακόμα επηρεάζονται ιδιότητες όπως η διασπορά, οι οπτικές ιδιότητες και η καταλυτική

συμπεριφορά των υλικών. Με βάση την χημεία της επιφάνειας και τις φυσικοχημικές και μαγνητικές τους ιδιότητες, τα νανοσωματίδια μπορούν να υφίστανται ως διεσπαρμένα αερολύματα, όπως εναιωρήματα ή κολλοειδή, ή ως συσσωματώματα.

2.3.1 Επίδραση του μεγέθους της επιφάνειας και αντιδραστικότητα

Τα διακριτά χαρακτηριστικά των νανοϋλικών προέρχονται κυρίως από την περιοχή της επιφάνειάς τους και την ποσότητα της μάζας τους και η διάρκεια ζωής τους βασίζεται στις βιολογικές κυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Μερικά από αυτά είναι ασταθή στην επιφάνεια, παρουσιάζοντας ασυνήθιστη επικοινωνία με τους βιολογικούς τους γείτονες. Πολλές πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι αυτή η αστάθεια θα μπορούσε να ελαχιστοποιηθεί με διαμόρφωση κάποιων φυσικοχημικών ιδιοτήτων.

Οι μεταβολές στο ενεργειακό χάσμα, το μειωμένο σημείο τήξης, και η υψηλότερη αντιδραστικότητα που έχουν προκληθεί από μία μεγάλη επιφάνεια [53-55] προκαλούν συχνά σοβαρές επιπτώσεις, όπως φλεγμονή στους πνεύμονες και τοξικότητα των κυττάρων. Μεγαλύτερη επιφάνεια οδηγεί σε υψηλότερη αντιδραστικότητα κι αυτό έχει ως αποτέλεσμα πιθανές επιβλαβείς επιδράσεις, οι οποίες θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν όταν χρησιμοποιούνται σε υλικά πληρώσεως, καλλυντικά ή ως φορείς φαρμάκων [45].

Δεδομένου ότι τα νανοσωματίδια διαθέτουν διαφορετικές λειτουργικές ομάδες στην επιφάνειά τους (π.χ., θείο, ομάδες θειόλης, ομάδες καρβοξυλίου και καρβονυλίου, SDS, DMSO, και τασιενεργές ουσίες), άλλα υλικά είναι λιγότερο κι άλλα περισσότερο τοξικά για τα κύτταρα, ανάλογα με την αντιδραστικότητα της λειτουργικής ομάδας της επιφάνειάς τους. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητη η λεπτομερής στοιχειακή ανάλυση επί της επιφάνειας των σωματιδίων για τον καθορισμό των λειτουργιών που θα μπορούσε να κάνει το υλικό τοξικό όπως επίσης κρίσιμος κρίνεται και ο περαιτέρω χαρακτηρισμός της αντιδραστικότητας των νανοσωματιδίων που πρώτα έχουν εσωτερικευθεί, για την κατανόηση της σχέσης τους με την τοξικότητα [56].

Για να κατανοηθεί επαρκώς η σχέση μεταξύ της επιφάνειας ενός νανοσωματιδίου και της βιολογικής τοξικότητάς του, μια ομάδα ερευνητών ερεύνησε την οξεία φλεγμονή των πνευμόνων που προκύπτει από διαφορετικές περιοχές της επιφάνειας των νανοσωματιδίων και την εκάστοτε αντιδραστικότητα [57]. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφοροποιήσεις όσον αφορά τις τοξικότητες με βάση το μέγεθος, ωστόσο, η συνολική επιφάνεια διαδραμάτισε σπουδαίο ρόλο στην πρόκληση φλεγμονής.

Έχει επιβεβαιωθεί ότι η πνευμονική τοξικότητα, μετά από θεραπεία με διάφορα σωματίδια συμπεριλαμβανομένου του carbon black και του διοξειδίου του τιτανίου, μπορεί να προκληθεί από υπέρλεπτα και λεπτά υλικά (ultrafine and fine materials) τα οποία έχουν μεγάλες επιφάνειες [58-60]. Η αντιδραστικότητα

των επιφανειακών σωματιδίων, η οποία χαρακτηρίζεται από το πόσο εύκολα μεμονωμένα σωματίδια συσσωματώνονται, μπορεί επίσης να διαδραματίσει σπουδαίο ρόλο στην κυτοτοξικότητα [61-64].

2.3.2 Επίδραση της χημείας της επιφάνειας

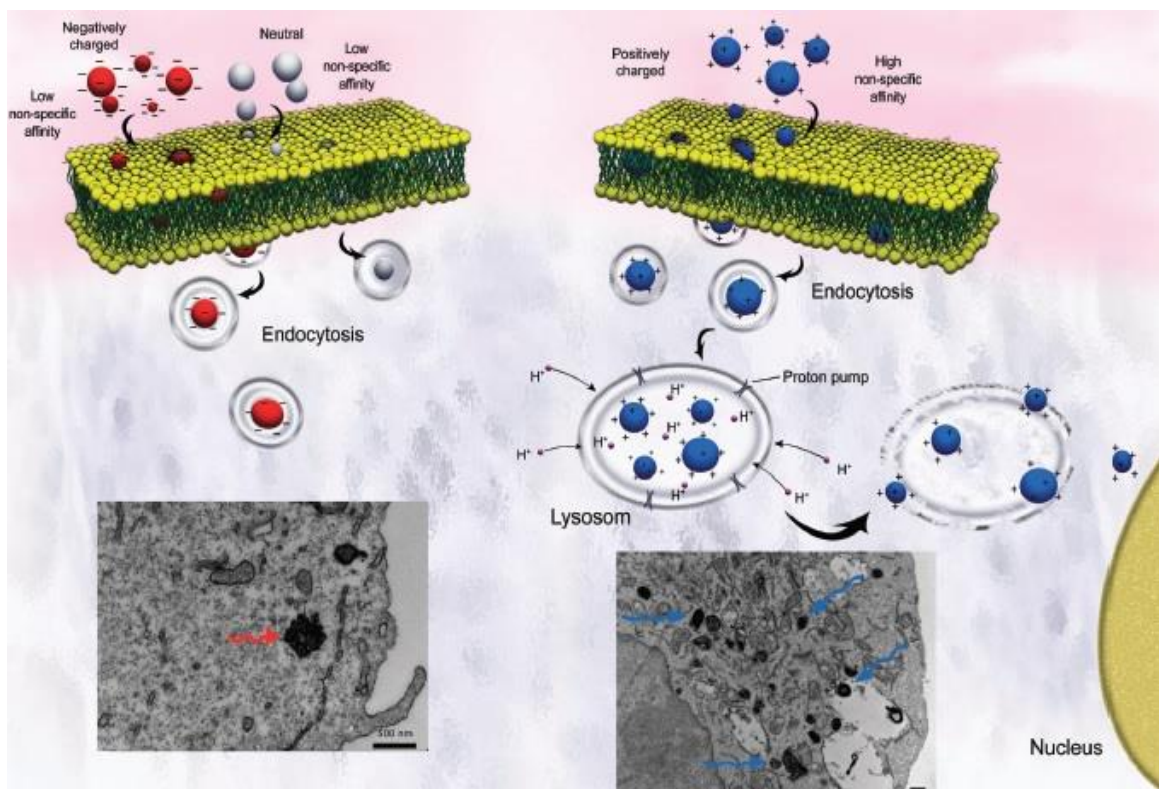
Σε μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε από τους Wagner και συν. [65], εξετάστηκε η κυτταρική αλληλεπίδραση οξειδίου του αργιλίου και νανοσωματιδίων αλουμινίου, καθώς και η επίδρασή τους στη βιωσιμότητα και την φαγοκυττάρωση των κυττάρων από κυψελιδικά μακροφάγα, ως συνάρτηση του μεγέθους και της χημικής σύνθεσης των σωματιδίων. Οι μελέτες της κυτταρικής βιωσιμότητας έδειξαν ότι υπάρχει μικρή επίδραση στη βιωσιμότητα των μακροφάγων έπειτα από έκθεση σε Al_2O_3 , αντίθετα το Al που παράχθηκε, μείωσε σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Επιπλέον, παρόλο που παρεμποδίστηκε σημαντικά η λειτουργία των μακροφάγων μετά από έκθεση σε 50, 80, ή 120 nm νανοσωματιδίων Al, δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση στη φαγοκυττάρωση με τα Al_2O_3 , νανοσωματίδια. Συνοπτικά, τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα Al νανοσωματίδια παρουσίασαν μεγαλύτερη τοξικότητα και μείωσαν πιο δραστικά τη φαγοκυτταρική ικανότητα των μακροφάγων μετά από 24 ώρες έκθεσης σε σύγκριση με τα Al_2O_3 , νανοσωματίδια, υποδηλώνοντας έτσι ότι η χημεία της επιφάνειας των νανοσωματιδίων παίζει ρόλο στην τοξικότητα τους.

Μεταβάλλοντας τη χημεία της επιφάνειας νανοσωματιδίων με έκπλυση με SDS, το οποίο είναι ένα ανιονικό τασιενεργό υλικό και Tween, μια εναλλακτική επιφανειοδραστική ουσία, πριν την παρασκευή σταθερών αιωρημάτων έχει διερευνηθεί ως πιθανή μέθοδος μείωσης της συσώρευσης. Παρά το γεγονός ότι το διάλυμα SDS αυξάνει την ομοιογένεια των νανοσωματιδίων στο διάλυμα, διαπιστώθηκε σε μελέτη με TiO_2 , ύστερα από MTT δοκιμή ότι είναι τοξικό για τα κύτταρα ενώ για το Tween τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0,05 και 0,1 % δεν μειώνει σημαντικά την κυτταρική βιωσιμότητα ($p < 0,05$) και ενισχύει σημαντικά τις διασπορές [66].

Σε μια μελέτη που διεξήχθη από τον Dick και συν. [67] φάνηκε ότι σε σύγκριση σε άλλα νανοσωματίδια όπως του νικελίου, κοβαλτίου ή της αιθάλης, τα νανοσωματίδια οξειδίου του τιτανίου ήταν λιγότερο ικανά να επάγουν μια φλεγμονώδη απόκριση μέσα στον πνεύμονα, παρά την ομοιότητα τους στην περιοχή της επιφάνειας. Αυτό θεωρήθηκε ότι σχετίζεται με τη μικρότερη ικανότητα να δημιουργεί ελεύθερες ρίζες, και ως εκ τούτου ίσως η σύνθεση των νανοσωματιδίων και η χημεία της επιφάνειας συμβάλλουν επίσης σημαντικά σε τοξικές αντιδράσεις.

2.3.3 Ηλεκτροστατική κατάσταση της επιφάνειας

Τα νανοσωματίδια δύνανται να φέρουν θετικό ή αρνητικό φορτίο στην επιφάνειά τους, το οποίο εξαρτάται από τη φύση των σωματιδίων του περιβάλλοντος μέσου, όταν αυτά διασπείρονται σε κάποιο υδατικό μέσο. Το ηλεκτροστατικό φορτίο αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες που επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά της διασποράς τους, την απορρόφηση των ιόντων και γενικά τον τρόπο με τον οποίο θα αλληλεπιδράσουν με τα κύτταρα του οργανισμού. Επίσης επηρεάζουν την βιολογική απόκριση δηλαδή τη γονοτοξικότητα, τη φαγοκύτωση, την παραγωγή φλεγμονής [68], τη μη συγκεκριμένη κυτταρική προσκόλληση καθώς και τη σύνδεσή τους με τις πρωτεΐνες ορού [69]. Γενικά οι κατιονικές επιφάνειες να είναι πιο τοξικές από ότι οι ανιονικές, και οι ουδέτερες επιφάνειες είναι πιο βιοσυμβατές [70]. Παράλληλα το ηλεκτροστατικό φορτίο της επιφάνειας είναι ικανό να επηρεάσει την τοξικότητα των νανοσωματιδίων αφού επηρεάζει άμεσα τις αλληλεπιδράσεις τους με τα κύτταρα [71]. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην συνάφεια των κατιονικών σωματιδίων στην αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη. Ως εκ τούτου, η προσθήκη μιας επίστρωσης που κάνει το νανοσωματίδιο περισσότερο κατιονικό θα μπορούσε επίσης να το κάνει να εμφανίζεται πιο τοξικό από ότι εγγενώς είναι [72].



Εικόνα 4. Το επιφανειακό φορτίο ως παράγοντας κυτταρικής πρόσληψης (κύτταρα HeLa) [73].

Στην εικόνα 4 φαίνεται η σημασία του επιφανειακού φορτίου στην απόδοση της κυτταρικής πρόσληψης. Θετικά φορτισμένα νανοσωματίδια παρουσιάζουν σημαντική κυτταρική πρόσληψη, σε σύγκριση με τα αρνητικά και τα ουδέτερα νανοσωματίδια, λόγω των ελκτικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με την κυτταρική μεμβράνη. Επιπλέον, θετικά φορτισμένα νανοσωματίδια είναι ικανά να δρουν ως "σφουγγάρια πρωτονίων" που διαταράσσουν τα λυσοσώματα για να ενισχύσουν την κυτταροπλασματική κατανομή και την επαγωγή του κυτταρικού θανάτου. Στο κάτω αριστερά και δεξιά πάνελ εμφανίζονται εικόνες TEM των κυττάρων HeLa τα οποία έχουν εκτεθεί σε αρνητικά και θετικά φορτισμένα νανοσωματίδια υπερπαραμαγνητικού οξειδίου του σιδήρου (SPIONs), αντίστοιχα [73].

Εξαιτίας του μικρού μεγέθους τους, τα νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται συνήθως ως φορείς φαρμάκων μέσω είτε παθητικής είτε ενεργητικής μεταφοράς. Η αποτελεσματική κυτταρική τους ενσωμάτωση εξαρτάται από τη βιοσυμβατότητα [74]. Ειδικότερα, οι ιδιότητες της ηλεκτρονικής κατάστασης της εξωτερικής επιφάνειας είναι κρίσιμες για την κυτταρική πρόσληψη και μπορεί επίσης να συμμετέχουν στην κυτταροτοξικότητα. Υψηλότερη ικανότητα πρόσληψης σε ένα κύτταρο επιτυγχάνεται με την αντικατάσταση του λειτουργικού τμήματος της επιφάνειας, επάγοντας ξαφνικές αλλαγές στο φορτίο της επιφάνειας των σωματιδίων [75,76]. Αλλαγές στο επιφανειακό φορτίο έχουν ως αποτέλεσμα σημαντικές αλλαγές στην in vivo βιοκατανομή των νανοσωματιδίων.

Τα νανοσωματίδια χρυσού αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα, αφού αρνητικά φορτισμένα νανοσωματίδια χρυσού παρουσιάζουν πολύ ασθενέστερη τοξικότητα σε σύγκριση με τα θετικά φορτισμένα [77]. Τα θετικά φορτισμένα σωματίδια έλκονται ισχυρά από το αρνητικό φορτίο της εξωκυτταρικής μεμβράνης σε αντίθεση με τα αρνητικά ή τα ουδέτερα φορτισμένα νανοσωματίδια τα οποία δεν αλληλεπιδρούν τόσο ισχυρά με την κυτταρική μεμβράνη αλλά παρόλα αυτά γίνεται πρόσληψή τους στο εσωτερικό του κυττάρου [78] καθώς έχουν μεγαλύτερη τάση να αλληλεπιδρούν με βιολογικά συστήματα, είναι περισσότερο ασταθή και ενσωματώνονται ταχύτερα στα κύτταρα, φαινόμενο το οποίο εξηγείται από το συνολικά καθαρό αρνητικό φορτίο των κυτταρικών επιφανειών. Βεβαία όσον αφορά την μεμβράνη του πλάσματος, τα αρνητικά νανοσωματίδια αλληλεπιδρούν ισχυρά και όχι συγκεκριμένα με αυτή σε αντίθεση με τα θετικά φορτισμένα νανοσωματίδια [79], τα οποία προσδένονται σε αρνητικά φορτισμένες ομάδες στην κυτταρική επιφάνεια [80] και είναι ικανά να διέρχονται μέσω αυτής. Συνεπώς μειώνοντας τον αριθμό των θετικών φορτίων επιτυγχάνεται αποτελεσματικότερη κυτταρική πρόσληψη ενώ ταυτόχρονα ελαττώνεται και η τοξικότητα. Επιπλέον τα κατιονικά νανοσωματίδια ακολουθούν διαφορετικά ενδοκυτταρικά μονοπάτια κάτι που ίσως επηρεάζει επιπρόσθετα την διαφορετική συμπεριφορά της τοξικότητας τους [80].

Παρόλα αυτά είναι σημαντικό να βρεθεί η κατάλληλη ισορροπία διότι με την ελάττωση του φορτίου δεν ελαττώνεται μόνο η τοξικότητα αλλά και το ποσοστό πρόσληψής τους αφού επηρεάζεται η ενδοκύττωση, κάτι που είναι

ανεπιθύμητο σε ιατρικές εφαρμογές . Επίσης το φορτίο από μόνο του έχει μεγάλη σημασία για τον καθορισμό της σταθερότητας των κολλοειδών των νανοσωματιδίων για την αποφυγή της συσσωμάτωσης [81].

Χαρακτηριστικό παράδειγμα τοξικότητας εξαρτώμενη από το φορτίο των νανοσωματιδίων, αποτελούν τα κατιονικά δένδριμερή πολυαμιδοαμίνης τα οποία έχουν αποδειχθεί ότι είναι πιο κυτταροτοξικά από τα ανιονικά αντίστοιχά τους [82]. Όταν τα σωματίδια εισπνέονται, καλύπτονται με μια "κορώνα" πρωτεϊνών / λιπιδίων, συγκαλύπτοντας με αυτόν τον τρόπο "το αληθινό" ζήτη δυναμικό τους. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεϊνική κορώνα τείνει να δώσει στα νανοσωματίδια ένα ζήτη δυναμικό από -10 mV έως -20 mV ασχέτως της χημείας του υλικού [84]. Αυτή η «ομαλοποίηση» του ζήτη δυναμικού σχετίζεται με το γεγονός ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες του πλάσματος φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο σε φυσιολογικό pH.

Συμπερασματικά, παρόλο που μερικά νανοσωματίδια, συμπεριλαμβανομένων των πολυμερικών νανοσυγκροτημάτων και των χρυσών νανοσφαιρών, έχουν το ίδιο φάσμα μεταβολών μεγέθους, διαφορετικά επιφανειακά φορτία απέδωσαν αξιοσημείωτες αποκλίσεις τόσο στη κατανομή όσο και στην ικανότητα πρόσληψης [78-81].

2.3.4 Επίδραση της τροποποίησης της επιφάνειας

Η επιφάνεια των νανοσωματιδίων μπορεί να τροποποιηθεί μέσω της προσάρτησης τμημάτων επιφάνειας, μια διαδικασία η οποία ονομάζεται λειτουργικοποίηση σωματιδίων (functionalization). Η επιφάνεια των TiO_2 νανοσωματιδίων, συγκεκριμένα, μπορεί να τροποποιηθεί μέσω της επίστρωσης με οξειδίο του αργιλίου, ή διοξειδίο του πυριτίου, το οποίο έχει γενικά συμπεριληφθεί στα αντηλιακά για την ενίσχυση της προστασίας από την ακτινοβολία UV [91]. Οι ιδιότητες της επιφάνειας του TiO_2 είναι σε θέση να επηρεάζουν την τοξικότητά του.

Αυτό αποδείχθηκε από τον Warheit [91] και τους συνεργάτες του όταν ερεύνησαν τις επιπτώσεις της επιφανειακής επεξεργασίας στην τοξικότητα του TiO_2 , μέσα στον πνεύμονα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα νανοσωματίδια που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη τοξικότητα, ήταν αυτά που περιείχαν την υψηλότερη συγκέντρωση οξειδίου του αργιλίου και / ή διοξειδίου του πυριτίου επί της επιφάνειας του σωματιδίου. Ωστόσο, συνολικά παρατηρήθηκε ότι σωματίδια TiO_2 προκάλεσαν χαμηλή πνευμονική τοξικότητα, παρά την ικανότητα των επιφανειακών επικαλύψεων να το επηρεάζουν αυτό.

Τα μη τροποποιημένα νανοσωματίδια (υδρόφιλα) προκάλεσαν μικρότερη απόκριση από ότι τα επικαλυμμένα με σιλάνιο ομόλογά τους (υδροφόβα), σε σχέση με τη φλεγμονώδη δραστηριότητα μέσα στους πνεύμονες αρουραίων (500 μg / ζώου, για 24 ώρες) μετά από ενδοτραχειακή έκθεση σε TiO_2 (20 nm) [92]. Όλες οι μορφές του TiO_2 ήταν σε θέση να διεγείρουν μια μέτρια αύξηση των ουδετερόφιλων και των μακροφάγων εντός των πνευμόνων την τρίτη ημέρα,

αλλά αυτό δεν ήταν επίμονο και δεν συσχετίστηκε με την παραγωγή TNF α (παράγοντας νέκρωσης όγκου). Γενικά, όσο πιο ουδέτερη και υδρόφιλη είναι η επιφάνεια των νανοσωματιδίων, τόσο αυξάνεται ο χρόνος κυκλοφορίας τους στο αίμα, χωρίς να παρεμποδίζονται από το πλάσμα.

Μια άλλη έρευνα αποκάλυψε ότι τα σωματίδια Ag επικαλυμμένα με πολυσακχαρίτη μείωσαν τα τοξικά αποτελέσματα του αργύρου, υποδεικνύοντας ότι η επικάλυψη και η επιφανειακή χημεία παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόκληση δυσμενών αποτελεσμάτων [52].

Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι τα επικαλυμμένα μέσω μεθυλίωσης (υδρόφοβα) νανοσωματίδια τείνουν να διεγείρουν την πρόσληψη ουδετερόφιλων σε μικρότερο βαθμό από ότι τα σωματίδια χωρίς επικάλυψη (υδρόφιλα) [93]. Η επίδραση του μεγέθους των νανοσωματιδίων TiO $_2$, της τροποποίησης της επιφάνειας (χρησιμοποιώντας μεθυλίωση, για να γίνουν τα σωματίδια περισσότερο υδρόφοβα) και της δυνατότητας πρόσληψης αλλά και τοξικότητας στο εσωτερικό των κυττάρων A549 του επιθηλίου του πνεύμονα προσδιορίστηκαν από τον Singh και την ερευνητική του ομάδα [26]. Τα TiO $_2$ νανοσωματίδια, ανεξάρτητα από το μέγεθος ή την μεθυλίωσή τους ήταν φαγοκυτταρωμένα ως συστάδες σωματιδίων και το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η νανοτοξικότητα καθορίζεται κυρίως από την επιφάνειά τους, αφού ακόμα και σε αυτή τη μορφή, ως συσσωματώματα, τα νανοσωματίδια TiO $_2$ επάγουν την τοξικότητα.

Ο Thevenot και η ερευνητική του ομάδα [94] προσδιόρισαν τον αντίκτυπο των TiO $_2$ νανοσωματιδίων με διάφορες τροποποιήσεις της επιφάνειας (-COOH, -OH ή -NH $_2$ λειτουργικές ομάδες), στην επιβίωση μιας ποικιλίας καρκινικών κυτταρικών γραμμών. Οι καρκινικές κυτταρικές γραμμές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν B16P10 και BF16F1 μελάνωμα, καρκίνωμα πνεύμονα Lewis, JHU καρκίνο του προστάτη, και κυτταρικές σειρές ινοβλαστών 3T3. Οι διαφορετικές κυτταρικές σειρές έδειξαν διαφορετικές ευαισθησίες ως προς την κυτταροτοξικότητα. 3T3, B16P10 και BF16F1 κύτταρα δεν ανταποκρίθηκαν σε κανένα τύπο του TiO $_2$, αλλά στα JHU και LLC μειώθηκε η βιωσιμότητα με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Σε γενικές γραμμές, νανοσωματίδια οξειδίου τιτανίου με NH $_2$, και OH τροποποιημένη επιφάνεια παρουσίασαν μεγαλύτερη τοξικότητα από αυτά που είχαν COOH τροποποιημένη επιφάνεια. Φαίνεται, επομένως, ότι η τοξικότητα TiO $_2$ εξαρτάται κατά πολύ από τον τύπο κυττάρου, τη χημεία της επιφάνειας των TiO $_2$ νανοσωματιδίων, και τη συγκέντρωση των σωματιδίων που χρησιμοποιείται.

Σε μια άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν νανοσωματίδια χρυσού μεγέθους 18-nm και η επιφάνεια τροποποιήθηκε με αρκετές επιφανειοδραστικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων του κιτρικού, της βιοτίνης, και του εξαδεκυλοτριμεθυλαμμώνιου βρωμιδίου (CTAB) [95]. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν τοξικότητα των σωματιδίων που είχαν τροποποιηθεί με κιτρικά και βιοτίνη όταν χρησιμοποιήθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις (250 mM), ενώ τα CTAB-επικαλυμμένα σωματίδια ήταν τοξικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ακόμα σε 0,05 mM. Ωστόσο, τα σωματίδια έχασαν τις τοξικές ιδιότητές τους, όταν το CTAB απομακρύνθηκε με έκπλυση, δείχνοντας ότι η τοξικότητα οφειλόταν στην

παρουσία CTAB στην επιφάνεια του σωματιδίου. Αρκετές μελέτες που διερευνούν χρυσούς νανοράβδους παρατήρησαν επίσης την ίδια μείωση στην τοξικότητα όταν αφαιρέθηκε το CTAB [96].

Πρωτογενείς ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες εκτέθηκαν σε TiO_2 ρουτιλίου χωρίς επικάλυψη (15 nm), TiO_2 ρουτιλίου επικαλυμμένα με πολυμερές ή TiO_2 ανατάσης μη επικαλυμμένα (200 nm) νανοσωματίδια για 11 ημέρες, σε συγκεντρώσεις έως και 0,8 mg / ml. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα μη επικαλυμμένα νανοσωματίδια TiO_2 ρουτιλίου προκάλεσαν μεταβολές στην κυτταρική μορφολογία, έτσι ώστε τα κύτταρα είχαν μικρότερη κυτταρική έκταση, έγιναν επιμήκη, αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια της καλλιέργειας, προκάλεσαν αργό ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων, εσωτερικεύθηκαν από τα αυτά, και εγκαταστάθηκαν στα κυτταροπλασματικά κυστίδια, αλλά δεν είχαν επίδραση στην κυτταρική βιωσιμότητα. Τα TiO_2 ανατάσης προκάλεσαν μεγαλύτερη σε μέγεθος βλάβη στα κύτταρα και παρατηρήθηκαν σοβαρές μορφολογικές αλλαγές συμπεριλαμβανομένης της θραύσης των νημάτων της ακτίνης και τη ρήξη της μεμβράνης πλάσματος των εκτεθειμένων κυττάρων, εσωτερικεύθηκαν από τα κύτταρα, και μπορούσαν να έχουν πρόσβαση στον πυρήνα. Η παραγωγή H_2O_2 από τα κύτταρα και κατά συνέπεια η ικανότητά τους να παράγουν ROS ήταν μεγαλύτερη με νανοσωματίδια ανατάσης. Επομένως τα σωματίδια ανατάσης ήταν πιο ισχυρά από ότι τα σωματίδια ρουτιλίου στην επαγωγή βλαβών των κυττάρων. Στη συνέχεια σωματίδια ρουτιλίου επικαλύφθηκαν με σκοπό την πρόληψη έναντι προσκόλλησης των σωματιδίων στη μεμβράνη του πλάσματος, και κατά συνέπεια τον περιορισμό του δυναμικού τους για την εσωτερίκευση. Τα επικαλυμμένα σωματίδια δεν ήταν εμφανή πάνω στην κυτταρική επιφάνεια, ή μέσα στο εσωτερικό των κυττάρων. Συνεπώς, επικάλυψη πολυμερούς καταργεί την τοξικότητα των σωματιδίων, η οποία ίσως προέρχεται από την έλλειψη προσκόλλησης του σωματιδίου στην επιφάνεια του κυττάρου, και ως εκ τούτου στην περιορισμένη εσωτερίκευση, έτσι ώστε δεν είναι σε θέση να επηρεάσει την κανονική κυτταρική λειτουργία.

Συμπερασματικά, οι μελέτες αποδεικνύουν ότι τα επιχρίσματα των σωματιδίων, και κατά συνέπεια η χημεία της επιφάνειας, είναι σε θέση να τροποποιήσουν την τοξικότητα των σωματιδίων. Ωστόσο, αυτό απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση, και μπορεί να εξαρτάται από την επιφανειακή επικάλυψη και τον τύπο των κυττάρων αυτών [96].

2.4 Επίδραση του σχήματος και της μορφολογίας

Τα νανοσωματίδια μπορεί να είναι σφαιρικά, βελονοειδή, ρομβοειδή, πεταλοειδή και σωληνοειδή. Το σχήμα τους επηρεάζει το χρόνο κυκλοφορίας στο κυκλοφορικό σύστημα και την διάχυσή τους. Συγκεκριμένα, υψηλής αναλογίας διαστάσεων νανοσωματίδια παρουσιάζουν μεγαλύτερους χρόνους κυκλοφορίας στο αίμα σε σχέση με τα σφαιρικά νανοσωματίδια. Τα ανισότροπα σχήματα

παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα να ρέουν μέσα από τα τριχοειδή αγγεία και να κολλάνε στα τοιχώματά τους.

Οι ίνες νανοκλίμακας (π.χ. νανοσωλήνες άνθρακα), όπως και άλλες εισπνεύσιμες ίνες (π.χ.αμίαντος), αποτελούν σοβαρό κίνδυνο πρόκλησης φλεγμονής στον πνεύμονα και η παρατεταμένη έκθεση μπορεί να προκαλέσει διάφορους τύπους καρκίνου [97-99]. Είναι δύσκολο να προσδιοριστεί εάν υπάρχει κάποια τοξική επίδραση μεμονομένων νανοσωλήνων ή του συνόλου τέτοιων σωλήνων. Μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι νανοσωλήνες άνθρακα είναι περισσότερο τοξικοί από ότι το carbon black ή οι σκόνες πυριτίου. Οι περισσότεροι εργαζόμενοι που εκτέθηκαν σε μονού τοιχώματος νανοσωλήνες άνθρακα (SWCNTs) πέρα από το τρέχον επιτρεπτό όριο έκθεσης (PEL) ανέπτυξαν πνευμονικές βλάβες [100]. Είναι ενδιαφέρον, ότι τα CNTs έχουν αποδειχθεί ότι προκαλούν το θάνατο στοχευμένων κύτταρων των νεφρών μέσω αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης που προκαλείται από μειωμένη κυτταρική συγκολλητικότητα [101]. Η ανθρώπινη έκθεση στο φουλερένιο είχε ως αποτέλεσμα σοβαρή βλάβη των πνευμόνων [102,103] καθώς επίσης και την καταστροφή του εγκεφάλου των ψαριών και το θάνατο των ψύλλων του νερού, όπως έδειξε σχετική έρευνα [104-107].

Όχι μόνο το μέγεθος αλλά και το σχήμα των σωματιδίων παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη και τοξικότητα. Οι Champion and Mitragotri [108] χρησιμοποιώντας σφαιρίδια πολυστυρενίου ($> 0,5 \mu\text{m}$) και κυτταρικές σειρές μακροφάγων, παρατήρησαν ότι το σχήμα καθορίζει το αν θα ξεκινήσει η φαγοκυττάρωση, ενώ το μέγεθος των σωματιδίων έχει κυρίως επιπτώσεις στην ολοκλήρωση της φαγοκυττάρωσης. Πιο πρόσφατα, σε μελέτη μίας σειράς κατιονικών νανοσωματιδίων με βάση την πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) διαφόρων μεγεθών και σχημάτων με σταθερή χημική σύνθεση, οι Gratton και συν. [109] βρήκαν ότι ραβδόμορφα νανοσωματίδια παρουσίασαν σημαντικό πλεονέκτημα στον ρυθμό εσωτερίκευσης των κυττάρων και διαπίστωσαν ότι αυτό θυμίζει τη συμπεριφορά πολλών ραβδοειδών βακτηρίων. Σε αντίθεση, μελέτες που ερεύνησαν νανοσωματίδια χρυσού επικαλυμμένα με πρωτεΐνες έδειξαν ότι ραβδοειδή νανοσωματίδια επικαλυμμένα με τρανσφερίνη προσλαμβάνονταν λιγότερο αποτελεσματικά από την κυτταρική σειρά HeLa από ότι τα σφαιρικά νανοσωματίδια που ήταν επικαλυμμένα με τρανσφερίνη [110]. Είναι πιθανό ότι η θέση της πρωτεΐνης τρανσφερίνης στην επιφάνεια των νανοράβδων έναντι των νανοσφαιρών μπορεί να διαφέρει, και αυτό θα μπορούσε να επηρεάσει την επακόλουθη αλληλεπίδραση των νανοδομών με τα κύτταρα. Αυτές οι μελέτες δείχνουν τη σημασία του μεγέθους των σωματιδίων, του σχήματος και της επιφανειακής υποκατάστασης με πρωτεΐνες ή άλλων συνδετών στην αντιμετώπιση βιολογικών επιδράσεων των νανοϋλικών. Τα CNTs υποστηρίζεται ότι ασκούν τοξικότητα λόγω του σχήματος βελόνας που έχουν, δηλαδή η υψηλή αναλογία, επιτρέπει σε αυτά τα υλικά να "τρυπήσουν" τις κυτταρικές μεμβράνες. Αυτό μπορεί να ενδεικνυται για ορισμένα MWCNTs με μεγάλο πλάτος και, ως εκ τούτου, υψηλή ακαμψία .

Παρόλα αυτά δεν είναι ξεκάθαρο ακόμα με ποιόν τρόπο ακριβώς επηρεάζεται η τοξικότητα από το σχήμα των νανοσωματιδίων ή ποιό σχήμα συμβάλλει περισσότερο στην ενδοκύττωση και για το λόγο αυτό είναι αναγκαία περαιτέρω διερεύνηση.

2.5 Επίδραση της συσσωμάτωσης

Ανεξάρτητα από τυχόν φυσικοχημικές ιδιοότητες των νανοσωματιδίων, που έχουν αποδειχθεί ότι σχετίζονται με τη νανοτοξικότητα όπως η χημική σύνθεση, η συσσωμάτωση ως ιδιότητα θα μπορούσε να είναι επίσης ένας ισχυρός επαγωγέας της φλεγμονώδους βλάβης των πνευμόνων σε ανθρώπους [111,112]. Για συγκεκριμένους τύπους χημικών ουσιών, η έκθεση σε υψηλότερα επίπεδα έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε σοβαρές χρόνιες ασθένειες, όπως η ίνωση και ο καρκίνος [113]. Μερικοί συγγραφείς έχουν προτείνει ότι η συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων και η συσσώρευση αποτελούν ξεχωριστά φαινόμενα και δεν θα πρέπει να συγχέονται. Συνεπώς η συσσωμάτωση αναφέρεται στα συσσωματώματα που σχηματίζονται από συστάδες σωματιδίων τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, ενώ η συσσώρευση σε αυτά που σχηματίζονται από ομοιοπολικά συντηγμένα ή πυροσυσσωματωμένα σωματίδια που δεν είναι εύκολο να διαχωριστούν [114].

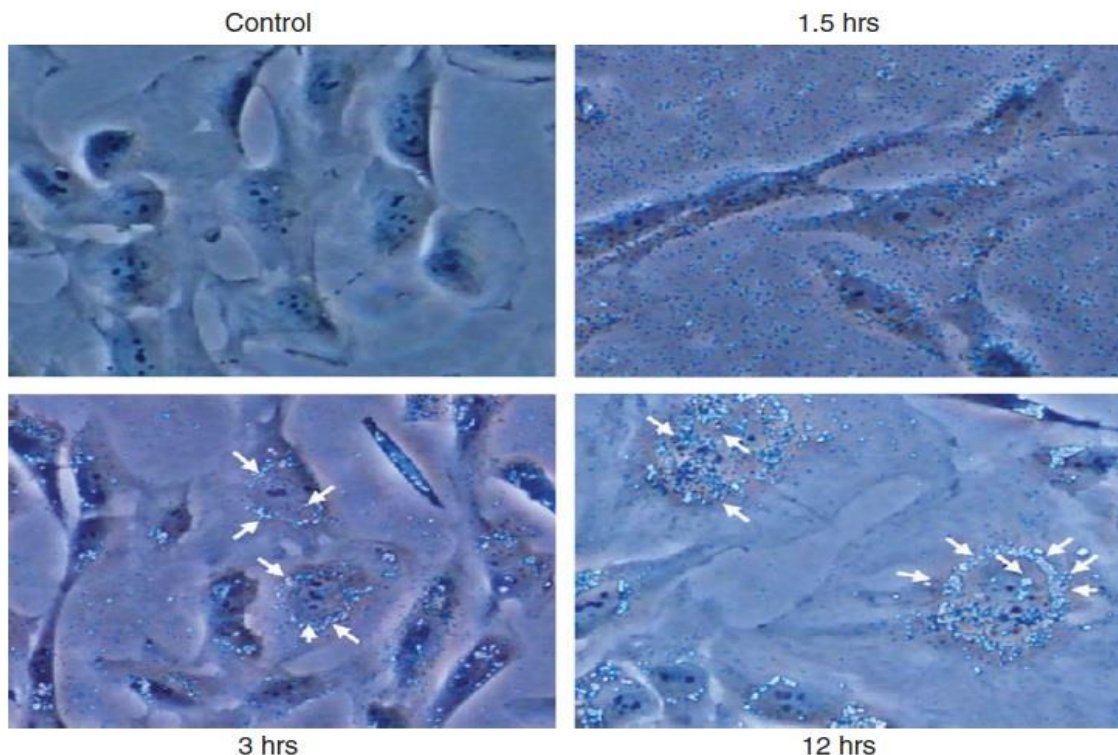
Η εξωκυττάρια συσσώρευση νανοσωματιδίων, ή η συσσώρευση που συμβαίνει πριν ή κατά τη διάρκεια της έκθεσης σε *in vitro* δοκιμές τοξικότητας, έχουν σημαντικό αντίκτυπο στις παρατηρούμενες τοξικολογικές επιδράσεις. Το κυτταρικό μέσο ανάπτυξης (για *in vitro* μελέτες) περιέχει πρωτεΐνες ορού, απαραίτητα αμινοξέα, βιταμίνες, ηλεκτρολύτες, και άλλες χημικές ουσίες (αντιβιοτικά, ιχνοστοιχεία, κ.λπ.). Αυτά τα διάφορα στοιχεία δύνανται να αλληλεπιδρούν με τα νανοσωματίδια και να αλλάζουν τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, όπως το μέγεθος, την συσσωμάτωση, το επιφανειακό φορτίο, και τη χημεία της επιφάνειας. Τα νανοσωματίδια, ειδικά αν είναι κατασκευασμένα σε υδατικό διάλυμα, έχουν ένα επιφανειακό φορτίο για την σταθεροποίησή τους κατά τη συσσωμάτωση μέσω της ηλεκτροστατικής άπωσης. Η παρουσία των ηλεκτρολυτών και της υψηλής ιοντικής ισχύος του βιολογικού μέσου μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση των νανοσωματιδίων μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων [115].

Οι Bermudez και συν. [116] εξέθεσαν αρουραίους σε TiO_2 νανοσωματίδια μέσω της εισπνοής, για διερεύνηση της τοξικότητας του πνεύμονά τους. Παρά το γεγονός ότι τα νανοσωματίδια είχαν βασικό μέγεθος σωματιδίου 20 nm, το αερόλυμα που δημιουργήθηκε περιείχε συσσωματώματα σωματιδίων (1,37 μm). Αυτό είναι ένα σύνηθες αποτέλεσμα κατά την έκθεση των ζώων ή των κυτταρικών μοντέλων καλλιέργειας στα νανοϋλικά, και είναι πιθανό να προκύψει και στο πλαίσιο της έκθεσης του ανθρώπου. Ωστόσο, παρά το σχηματισμό συσσωματωμάτων, τα νανοσωματίδια εξακολουθούσαν να ασκούν τοξικότητα.

Ομοίως, συσσωματώματα TiO_2 νανοσωματιδίων ($1,44 \mu\text{m}$) έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο τοξικά από παρομοίου μεγέθους συσσωματώματα των αντίστοιχων μακροσκοπικών τους. Ωστόσο, οι Grassian, και συν. [117] έδειξαν ότι οι ιδιότητες των συσσωματωμάτων των σωματιδίων που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της δημιουργίας αερολύματος εξαρτώνται από το βασικό μέγεθος των σωματιδίων. Πιο συγκεκριμένα, συσσωματώματα που αποτελούνται από νανοσωματίδια μεγέθους 20 nm ήταν λιγότερο πυκνά από ότι τα αντίστοιχα των 5 nm, των οποίων τα συσσωματώματα περιείχαν σωματίδια που ήταν περισσότερο ισχυρά δεμένα μεταξύ τους. Επιπλέον βρέθηκε ότι νανοσωματίδια TiO_2 μεγέθους 20 nm ήταν περισσότερο τοξικά από ότι αυτά των 5 nm μετά από έκθεση με εισπνοή και ενστάλαξη. Επομένως η κατάσταση συσσωμάτωσης των σωματιδίων, θεωρείται ότι καθορίζεται από το τοξικό δυναμικό τους. Παρόλο που τα 20 nm σωματίδια ήταν μεγαλύτερα σε μέγεθος, αναμένεται ότι θα σχηματίσουν συσσωματώματα που θα απόσυσσωματωθούν ευκολότερα λόγω των ασθενέστερων αλληλεπιδράσεων. Έτσι, σωματίδια μεγέθους 20 nm θα είναι διαθέσιμα ως μικρότερες δομές για την πρόκληση μιας ενισχυμένης τοξικά απόκρισης. Τέλος, τα συσσωματώματα που σχηματίστηκαν ήταν μεγαλύτερα στα παρασκευάσματα εισπνοής από ότι στο ενδοτραχειακό εναιώρημα, και αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί στην ενδοτραχειακή έκθεση παρατηρήθηκε μεγαλύτερη τοξική απόκριση [118].

Η συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων θα μπορούσε να επηρεάσει την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν ή να εισέρχονται στα κύτταρα και έτσι να προστίθεται πολυπλοκότητα στο σύστημα. Όταν δεν μελετάται η *in situ* κατάσταση συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων, προκύπτουν δυσκολίες στην ερμηνεία των δεδομένων για τη βιοκατανομή ή την πρόσληψη των νανοσωματιδίων [119].

Πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες του πλάσματος προσροφώνται στα νανοσωματίδια αυθόρμητα, και η χημεία της επιφάνειας των νανοσωματιδίων στο μέσο ανάπτυξης δεν είναι η ίδια όπως των αρχικά συντιθέμενων υλικών. Αντ' αυτού, τα νανοσωματίδια υιοθετούν τις φυσικοχημικές ιδιότητες της προσροφημένης πρωτεϊνικής κορώνας, όπως αποδεικνύεται [120]. Διαφορετικά υποστρώματα, με διαφορετική πρωτεϊνική σύνθεση θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε διαφορετική τοξικότητα και πρόσληψη. Αυτό είναι σημαντικό κατά τη σύγκριση αποτελεσμάτων από διαφορετικές μελέτες που αφορούν την τοξικότητα και την πρόσληψη των νανοσωματιδίων και χρησιμοποιούν διαφορετικές μεθοδολογίες. Αναμένουμε ότι οι ιδιότητες του νανοσωματιδίου θα αλλάξουν μέσα στο αίμα στις *in vivo* μελέτες σε ζώα, διότι το αίμα περιέχει πρωτεΐνες και ηλεκτρολύτες που μπορεί να μεταβάλλουν το πραγματικό επιφανειακό φορτίο των νανοσωματιδίων και την κατάσταση της συσσωμάτωσής τους. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι θετικά φορτισμένοι νανοράβδοι χρυσού συσσωματώθηκαν κατά την ανάμιξη με αίμα ποντικού για τέσσερις ώρες. Ωστόσο, τροποποιώντας τις ράβδους με PEG, για την πρόληψη της μη ειδικής προσρόφησης των πρωτεϊνών, μπορεί να αποφευχθεί αυτή η συσσωμάτωση [121].



Εικόνα 4. Μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων που εκτέθηκαν σε νανοσωματίδια οξειδίου του δημητρίου. Συσσωματώματα νανοσωματιδίων οξειδίου του δημητρίου του πυρήνα. Τα βέλη δείχνουν τα συσσωματώματα των νανοσωματιδίων οξειδίου του δημητρίου στα κύτταρα, τα οποία εντοπίστηκαν στην περιπυρηνική περιοχή [122].

Η συσσώρευση των νανοσωματιδίων κάτω από διαφορετικές συνθήκες διασποράς, όπως DI H₂O έναντι κυτταρικών μέσων μελετήθηκε και διαπιστώθηκε ότι η συσσωμάτωση μπορεί να αλλάξει δραστικά την τοξικότητά τους. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η προσθήκη ορού στο κυτταρικό μέσο συνέβαλε στην άμβλυνση του μεγέθους της συσσώρευσης των νανοσωματιδίων στο νερό [123].

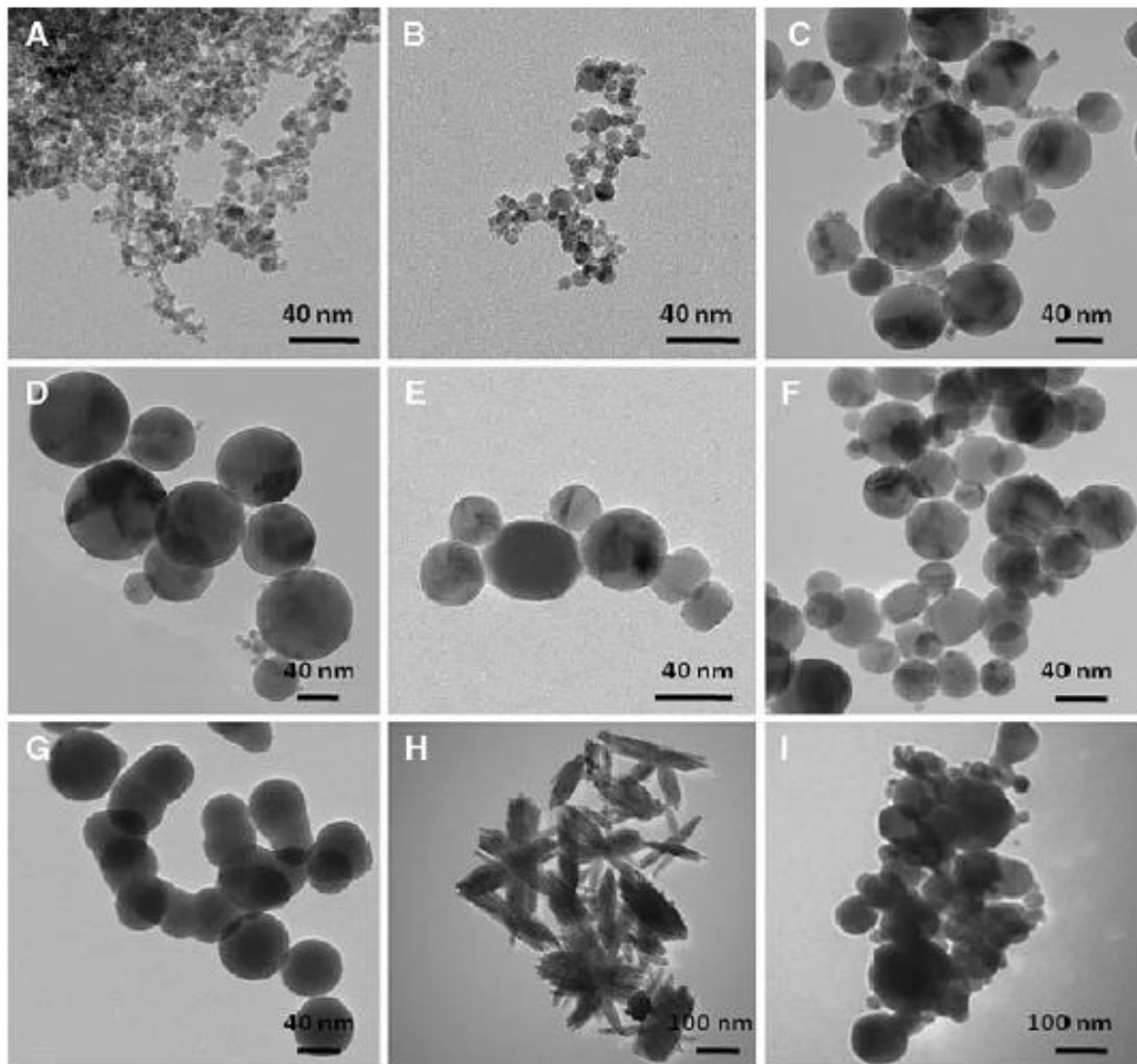
Παράλληλα, η δημιουργία συσσωματωμάτων βρέθηκε να συνδέεται με τη μεμβράνη των κυττάρων, υποδηλώνοντας ότι η συσσωμάτωση είναι πιθανότερο να μειώσει την εσωτερίκευση μεμονωμένων νανοσωματιδίων. Δεν είναι ακόμη γνωστό αν τα σωματίδια συναθροίζονται πριν ή μετά την είσοδο τους στα κύτταρα, αλλά είναι σημαντικό να τονιστεί ότι ορισμένοι τύποι νανοσωματιδίων τείνουν να συσσωματώνονται περισσότερο εύκολα λόγω των ισχυρών Van der Waals αλληλεπιδράσεων.

Κατά συνέπεια, αν και το βασικό μέγεθος των νανοσωματιδίων ορίζεται από τους ερευνητές, τα κύτταρα και τα ζώα δεν εκτίθενται στα σωματίδια σε αυτή τη μορφή. Ωστόσο, παρατηρείται συχνά ότι συναθροίσεις/ συσσωματώματα νανοσωματιδίων είναι πιο τοξικά από παρομοίου μεγέθους συναθροίσεις/ συσσωματώματα των μεγαλύτερων ομολόγων τους. Ως εκ τούτου, η τάση των σωματιδίων να συσσωματώνονται ώθησε τους ερευνητές να προλαμβάνουν την

εμφάνισή τους με τη χρήση υπερήχων, ή την προσθήκη μέσων διασποράς [124-127].

2.5 Επίδραση της κρυσταλλικότητας

Η κρυσταλλική φάση στην οποία βρίσκονται τα νανοσωματίδια θεωρείται ότι έχει καθοριστική επιρροή στην τοξική δραστηριότητα τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα νανοσωματίδια οξειδίου του τιτανίου, τα οποία υφίστανται σε δύο κύριες κρυσταλλικές φάσεις, γνωστές ως ρουτίλιο κι ανατάση [128]. Αυτές οι μορφές του TiO_2 παρουσιάζουν την ίδια χημική σύνθεση, αλλά η διαφορετική κρυσταλλική δομή προκαλεί διαφορετικά επίπεδα τοξικότητας. Παράλληλα ο μηχανισμός θανάτου των κυττάρων ποικίλλει ανάλογα με την κρυσταλλική δομή των νανοσωματιδίων. Η ανατάση είναι η πιο τοξική μορφή του TiO_2 , παρουσιάζει μεγαλύτερη φωτοκαταλυτική και βιολογική δραστηριότητα, πράγμα που είναι πιθανό να προέρχεται από την σημαντικά διαφορετική χημεία της επιφάνειάς της και οδηγεί σε νέκρωση των κυττάρων σε αντίθεση με την κρυσταλλική δομή του ρουτιλίου που προκαλεί απόπτωση [129]. Η φωτοδραστηριότητα του TiO_2 καθορίζεται επίσης από την κρυσταλλική φάση, και ως εκ τούτου, από τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας των σωματιδίων με την ανατάση να έχει μεγαλύτερη ικανότητα παραγωγής ROS κατά την έκθεση τους στο φως.



Εικόνα 5 Εικόνες TEM νανοσωματιδίων οξειδίου τιτανίου. α) TiO_2 6.3 nm, β) TiO_2 10 nm, γ) TiO_2 50 nm, δ) TiO_2 100 nm, ε) TiO_2 39 nm, 40% ανατάση, ς) TiO_2 39 nm, 61% ανατάση, ζ) TiO_2 40 nm, amorphous. η) TiO_2 51 nm, 100% ρουτίλιο, θ) TiO_2 40 nm [130].

Ο Sayes και οι συνεργάτες του [131] σε μια μελέτη που διενήργησαν, αξιολόγησαν την *in vitro* τοξικότητα της ανατάσης (10 nm), του ρουτιλίου (5 nm) και του μίγματός τους (3 nm) δειγμάτων TiO_2 με επιθηλιακά κύτταρα A549 και ινοβλάστες HDF, σε συγκεντρώσεις που κυμαινόταν από 3 $\mu\text{g} / \text{ml}$ έως 30 mg / ml , για έως και 48 ώρες. Το επίπεδο της κυτταροτοξικότητας που προκλήθηκε από τους διαφορετικούς τύπους σωματιδίων ήταν μεταβλητό. Τα σωματίδια ανατάσης ήταν πιο κυτταροτοξικά, ενώ τα σωματίδια ρουτιλίου TiO_2 λιγότερο. Αυτή η απόκριση ήταν παράλληλη της απελευθέρωσης του IL-8 από τα κύτταρα. Παράλληλα η παραγωγή ROS ενεργοποιήθηκε από τα σωματίδια TiO_2 ενώ η φωτοδραστικότητα υπολογίστηκε μεγαλύτερη για τα καθαρά δείγματα

ανατάσης. Τα αποτελέσματα συνεπάγονται ότι τα δείγματα ανατάσης είχαν τη μεγαλύτερη τοξική δραστηριότητα. Ως αποτέλεσμα, οι συγγραφείς συμπέραναν ότι η κρυσταλλική φάση του TiO_2 αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι για το τοξικό δυναμικό του. Έτσι, παρά τη σχετικά μεγάλη επιφάνεια των νανοσωματιδίων TiO_2 ρουτιλίου ($112 \text{ m}^2 / \text{g}$), η χημεία της επιφάνειάς τους φαίνεται να είναι λιγότερο αντιδραστική από εκείνη των δειγμάτων ανατάσης (που είχαν μεγαλύτερο εμβαδό επιφάνειας $153 \text{ m}^2 / \text{g}$), και έτσι τα σωματίδια ρουτιλίου είναι λιγότερο τοξικά. Τα ευρήματα έδειξαν επίσης ότι η ικανότητα των σωματιδίων TiO_2 για παραγωγή ROS, καθορίζει την κυτταροτοξικότητά τους και το φλεγμονώδες δυναμικό, το οποίο υπαγορεύεται από την κρυσταλλική δομή του TiO_2 , και ως εκ τούτου η τοξικότητα δεν καθορίζεται αποκλειστικά και μόνο με βάση την έκταση και το μέγεθος. Τέλος, τα νανοσωματίδια ρουτιλίου παρατηρήθηκαν να συσσωματώνονται σε μεγαλύτερο βαθμό, κι αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί αυτός ο τύπος σωματιδίων είναι λιγότερο τοξικός.

Η σημασία της κρυσταλλικότητας, στην τοξικότητα των σωματιδίων έχει επίσης αποδειχθεί για το διοξείδιο του πυριτίου [132]. Επιπλέον, η ικανότητα της UVA ακτινοβολίας ή του ορατού φωτός για αύξηση της τοξικής δραστηριότητας των σωματιδίων TiO_2 , μέσω της αύξησης της παραγωγή ROS, υπήρξε το επίκεντρο ενός αριθμού μελετών που έχουν συζητηθεί πολύ [133-134], αλλά δεν αποδεικνύεται πάντα [135-136]. Το φαινόμενο αυτό αναμένεται να αξιοποιηθεί, ιδίως στο πλαίσιο της θεραπείας του καρκίνου [135]. Η κρυσταλλική μορφή του TiO_2 πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για την πρόκληση της φωτοδραστηριότητας και τοξικότητας των νανοσωματιδίων, λόγω της ιδιαιτερότητας των επιφανειακών ιδιοτήτων τους [137].

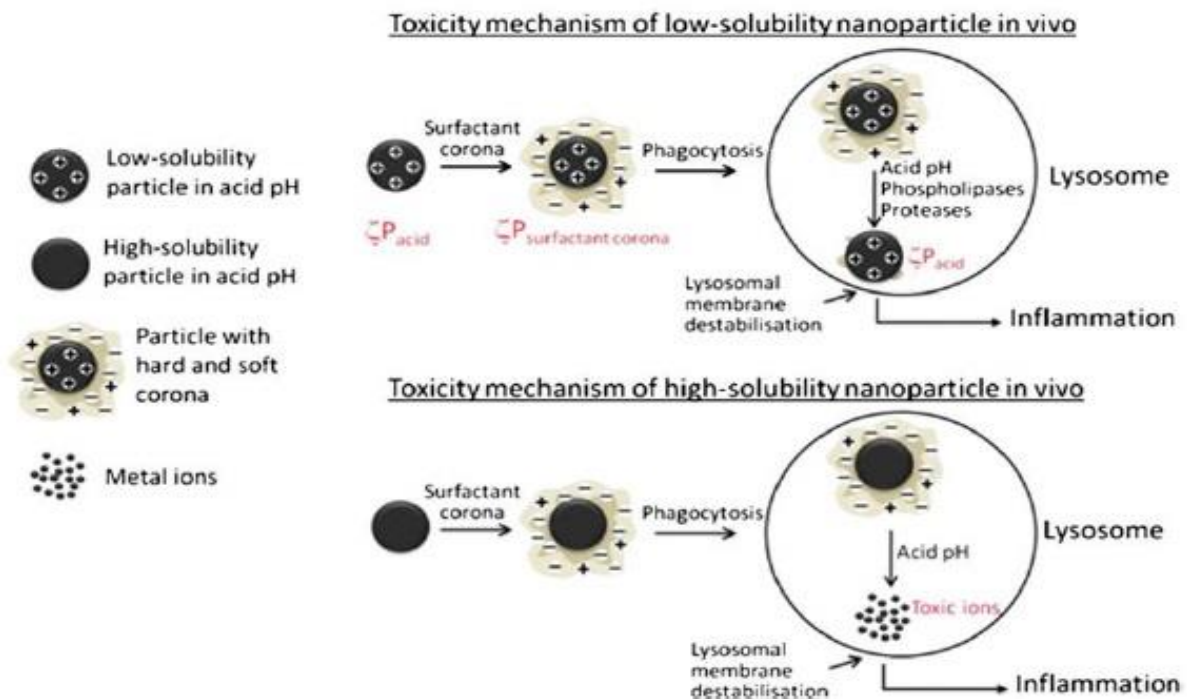
2.6 Επίδραση της διαλυτότητας και της απελευθέρωσης μεταλλικών ιόντων

Η διαλυτότητα των νανοσωματιδίων εξαρτάται από φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, όπως είναι το μέγεθος και το σχήμα. Ισχύει γενικά ότι όσο πιο δυσδιάλυτο είναι το νανοσωματίδιο τόσο πιο τοξικό είναι. Τα ευδιάλυτα νανοσωματίδια όταν εισέρχονται στο εσωτερικό των κυττάρων μπορούν εύκολα να διασπαστούν με διάφορους μηχανισμούς και να απομακρυνθούν από αυτό κι έτσι δεν προκαλούν βλάβη στο κύτταρο, σε αντίθεση με τα δυσδιάλυτα νανοσωματίδια.

Πολλά νανοσωματίδια οξειδίων μετάλλων μπορούν να υποβληθούν σε διάλυση μέσα σε όξινα τμήματα στο κύτταρο, πράγμα το οποίο δύναται να οδηγήσει σε τοξικότητα. Το φαινόμενο αυτό, είναι ένας μηχανισμός πρόσληψης που συχνά αναφέρεται με τον όρο 'Δούρειος Ίππος' επειδή παρακάμπτεται το φράγμα του πλάσματος της μεμβράνης και επιτρέπει τοξικά ιόντα να "γλιστρήσουν" μέσα στα κύτταρα, όπως για παράδειγμα έχει παρατηρηθεί, για τα νανοσωματίδια οξειδίου του κοβαλτίου, σιδήρου, μαγγανίου και ψευδαργύρου [138].

Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το φαινόμενο αυτό για τα CuO και NiO νανοσωματίδια, τα οποία είναι εξαιρετικά τοξικά και η κυτταρική τους πρόσληψη φαίνεται να εξαρτάται έντονα από τη στερεά δομή των σωματιδίων. Οι Cho και συν. [139] αξιολόγησαν την παραγωγή πνευμονικής φλεγμονής δεκαπέντε διαφορετικών μετάλλων / νανοσωματιδίων οξειδίων μετάλλων και παρατήρησαν ότι η τοξικότητα συσχετιζόταν σημαντικά με μία από τις δύο φυσικοχημικές παραμέτρους: το ζήτα δυναμικό υπό όξινες συνθήκες για χαμηλής διαλυτότητας νανοσωματίδια και το βαθμό διάλυσης για υψηλής διαλυτότητας νανοσωματίδια.

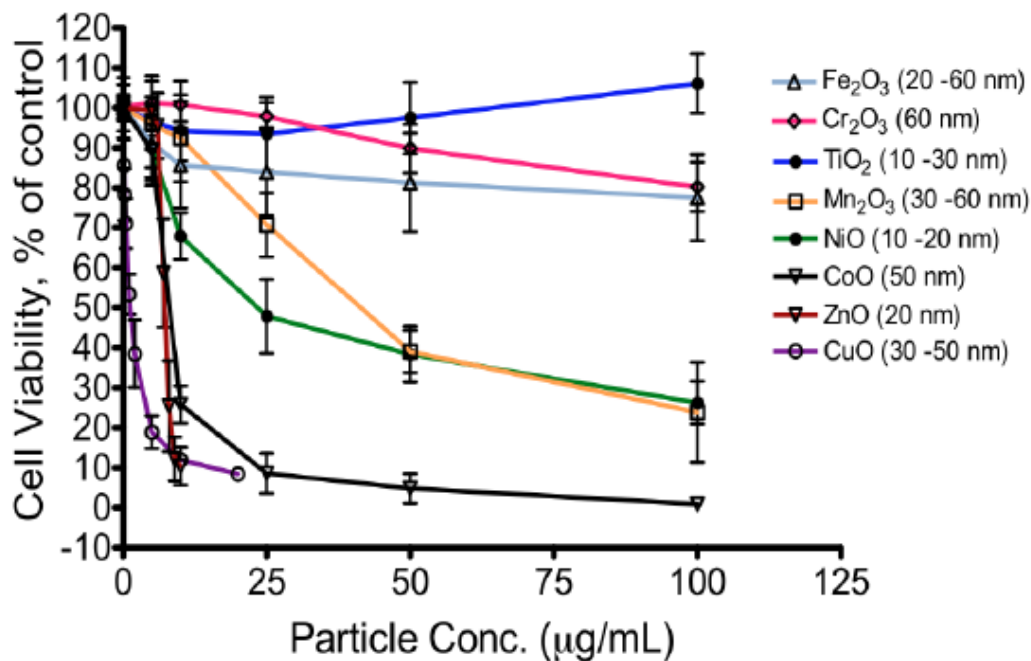
Έτσι, στην περίπτωση των νανοσωματιδίων υψηλής διαλυτότητας, η παραγωγή φλεγμονής εξαρτάται από τα ιόντα που παράγονται κατά τη διάρκεια της διάλυσης των νανοσωματιδίων εντός των όξινων φαγολυσσοσωματωμάτων και εάν τα ιόντα είναι τοξικά (όπως τα ιόντα των Cu και Zn), τότε τα φαγολυσσοσώματα αποσταθεροποιούνται και προάγουν τη φλεγμονή. Για τα σωματίδια χαμηλής διαλυτότητας, υπάρχει συσχετισμός μεταξύ του ζήτα δυναμικού τους σε όξινο περιβάλλον και της δυνατότητά τους για παραγωγή πνευμονικής φλεγμονής. Όταν τα νανοσωματίδια έχουν φαγοκυτταρωθεί ή ενδοκυτταρωθεί μέσα στα κύτταρα και καταλήγουν στα λυσοσώματα, τα πρωτεολυτικά ένζυμα και το όξινο pH θα αφαιρέσουν την πρωτεϊνική κορώνα και θα αποκαλυφθεί η γυμνή επιφάνεια του σωματιδίου. Αν η επιφάνεια σε αυτή την κατάσταση είναι ιδιαίτερα θετική, τότε μπορεί να αποσταθεροποιηθεί η λυσοσωμική μεμβράνη και να υπάρξει φλεγμονή (εικόνα 6).



Εικόνα 6. Διάγραμμα του μηχανισμού της φλεγμονής των πνευμόνων που προκαλείται από νανοσωματίδια οξειδίων μετάλλων. Θετικά φορτισμένα νανοσωματίδια είναι πιθανό να δεσμεύουν μακρομόρια στο υγρό των πνευμόνων, δημιουργώντας μια 'κορώνα'. Αναμένεται ότι το όξινο pH και τα λυσοσωμικά ένζυμα στα λυσοσώματα θα αφομοιώσουν αυτήν την κορώνα αποκαλύπτοντας το ζήτη δυναμικό των νανοσωματιδίων, που είναι ικανό να αποσταθεροποιήσει τα λυσοσώματα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία φλεγμονής. Νανοσωματίδια υψηλής διαλυτότητας στο όξινο λυσοσωματικό περιβάλλον προκαλούν λυσοσωμική αποσταθεροποίηση, η οποία εξαρτάται από την τοξικότητα των ιόντων [139].

Η τοξικότητα ενός συνόλου 11 νανοσωματιδίων οξειδίων μετάλλων (Al_2O_3 , Co_3O_4 , CuO , Fe_3O_4 , MgO , Mn_3O_4 , Sb_2O_3 , SiO_2 , ZnO , TiO_2 , WO_3) μελετήθηκε σε τρεις κυτταρικές σειρές θηλαστικών με τη δοκιμή Neutral Red Uptake. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόνο πέντε νανοσωματίδια (CuO , ZnO , Sb_2O_3 , Mn_3O_4 , Co_3O_4) ήταν τοξικά σε ονομαστικές συγκεντρώσεις κάτω από $100 \mu g / mL$ και οι 24-h IC_{50} τιμές αυτών των νανοσωματιδίων κυμαινόταν από 10 έως $100 \mu g / mL$. Σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση του συστήματος Globally Harmonized Hazard Categorization, μόνο τα νανοσωματίδια οξειδίου του χαλκού και του ψευδαργύρου θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως «Τοξικό σε περίπτωση κατάποσης». Τα άλλα τρία νανοσωματίδια ταξινομήθηκαν ως «Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης» και ανήκουν στην κατηγορία κινδύνου 4. Το γεγονός ότι τόσο τα τοξικά όσο και τα μη τοξικά νανοσωματίδια που μελετήθηκαν είχαν συγκρίσιμο αρχικό μέγεθος και τα περισσότερα από τα σωματίδια παρουσίασαν παρόμοιο υδροδυναμικό μέγεθος οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το μικρό μέγεθος των νανοσωματιδίων ή το μοτίβο της συσσωμάτωσής τους κατά πάσα πιθανότητα δεν είναι η κύρια κινητήρια δύναμη των τοξικών επιδράσεων των υπό μελέτη νανοσωματιδίων οξειδίων μετάλλων.

Παράλληλη τοξικολογική αξιολόγηση των $MeOx$ νανοσωματιδίων και των διαλυτών αλάτων αυτών έδειξε ότι μόνο αυτά τα πέντε οξείδια με μέγεθος $<100 \mu g / mL$ που αποδείχθηκαν τοξικά ήταν επίσης τοξικά ως διαλυτά άλατα. Αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και υποδεικνύει ότι τα μεταλλικά ιόντα που απελευθερώνονται από τα σωματίδια συνέβαλαν στην κυτταροτοξικότητα των $MeOx$ νανοσωματιδίων. Η συμβολή των μεταλλικών ιόντων που απελευθερώθηκαν ήταν ιδιαίτερα εμφανής στην περίπτωση του CuO και ZnO , αλλά και του Sb_2O_3 . Αν και τα απελευθερωμένα ιόντα μετάλλου θα μπορούσαν να παίζουν κάποιο ρόλο στις τοξικές επιδράσεις του Mn_3O_4 και Co_3O_4 , η παραγωγή των ROS είναι ίσως η βασική κινητήρια δύναμη της τοξικότητας αυτών των $MeOx$ με δεδομένη την αξιοσημείωτη συσσώρευση αυτών των $MeOx$ στα κύτταρα. Η έλλειψη τοξικών επιδράσεων των υπόλοιπων νανοσωματιδίων $MeOx$ (Al_2O_3 , Fe_3O_4 , MgO , SiO_2 , TiO_2 , WO_3) δείχνει ότι θα μπορούσαν να είναι καλοί υποψήφιοι για νανοτεχνολογικές εφαρμογές όπου δεν μπορεί να γίνουν ανεκτές οι τοξικές παρενέργειες [140].



Εικόνα 7. Κυτταροτοξικότητα οκτώ οξειδίων μετάλλων μετάπτωσης που εκτέθηκαν για 24 ώρες σε BEAS-2B κύτταρα

Επίλογος-Συμπεράσματα

Η έρευνα για τις τοξικές ιδιότητες των νανοϋλικών έχει κάνει πολλά σπουδαία βήματα τα τελευταία δέκα χρόνια. Η γνώση έχει διευρυνθεί, και η κατανόησή μας για το θέμα έχει εμβαθύνει αλλά εξακολουθεί να είναι μακρύς ακόμα ο δρόμος για την πλήρη αποσαφήνιση της βιοδιεργασίας των νανοϋλικών. Οι πρώιμες in vivo μελέτες επικεντρώθηκαν κυρίως στον αντίκτυπο που έχουν τα εισπνεόμενα νανοσωματίδια σε ιστούς θηλαστικών, όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα, το αναπνευστικό, το καρδιαγγειακό σύστημα και ούτω καθεξής. Στη συνέχεια, το πεδίο εφαρμογής επεκτάθηκε σε τεχνητά νανοσωματίδια που χρησιμοποιούνταν ως πρόσθετα τροφίμων και φαρμάκων, καθώς και στην επιρροή τους στο πεπτικό και το αναπαραγωγικό σύστημα.

Οι in vitro μελέτες είναι απαραίτητες για να αποκαλύψουν τους μηχανισμούς πίσω από το μακροσκοπικό φαινόμενο. Η ενδοκυτταρική συσσώρευση των νανοσωματιδίων, η μετάθεση και η δυναμική αλληλεπίδρασή τους με πολλαπλά είδη βιομορίων καθορίζει την πορεία τους στον οργανισμό και κατά συνέπεια επηρεάζει το μικροπεριβάλλον, στο οποίο αυτά εγκαθίστανται. Κατά τη διάρκεια της πορείας της έρευνας, προέκυψαν πολλά νέα εργαλεία τα οποία παρέχουν είτε έναν πιο οπτικοποιημένο τρόπο για την παρατήρηση της βιοδιεργασίας των νανοσωματιδίων, ή την ευκαιρία να μιμηθούν τη διαδικασία. Ωστόσο, η βιοδραστικότητα των νανοσωματιδίων χαρακτηρίζεται συχνά ως δίκωπο μαχαίρι. Παρόλο που η βιοδραστικότητα των νανοσωματιδίων

παρουσιάζει κάποια ανεπιθύμητα αποτελέσματα σε υγιή όργανα και κύτταρα, μπορούμε να επωφεληθούμε από τα χαρακτηριστικά τους με προσοχή ώστε να καταπολεμηθούν ορισμένα δυσλειτουργικά κύτταρα και ιστοί, όπως τα καρκινικά κύτταρα [142]. Έτσι, ο στόχος για τη μελέτη ναυτοξικολογίας, από τη μια μεριά, είναι να αποφευχθεί η ο δυνητικός κίνδυνος της σκόπιμης έκθεσης του ανθρώπου στα ναοσωματίδια κατά την εφαρμογή τους στην καθημερινότητα, κι από την άλλη η εκμετάλλευση κι αξιοποίηση των θετικών επιδράσεών τους.

Πριν από την ευρεία εισαγωγή των ναουλικών στην Ιατρική, θα πρέπει να διερευνηθεί σε βάθος η ασφάλειά τους σε βιολογικά συστήματα. Όλες οι φυσικοχημικές ιδιότητες των ναοσωματιδίων πρέπει να αξιολογούνται, προκειμένου να αποσαφηνιστεί η αλληλεπίδρασή τους με υποκυτταρικά οργανίδια, κύτταρα, ιστούς και οργανισμούς. Τέτοιες έρευνες θα προσφέρουν στρατηγικές για να κατασκευαστούν νέες γενιές μη τοξικών προϊόντων που περιέχουν ναοσωματίδια και θα συμβάλλουν στη δημιουργία κριτηρίων για την έξυπνη σχεδίαση των ναοσωματιδίων που θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια από τον άνθρωπο.

Βιβλιογραφία

1. Maskos, M.; Stauber, R.H. 3.319 - Characterization of nanoparticles in biological environments. In *Comprehensive Biomaterials*, Ducheyne, P., Ed.; Elsevier: Oxford, UK, 2011; pp. 329–339.
2. Solanki P. R., Kaushik A., Agrawal V. V., Malhotra B. D., *NPG Asia Mater* 3, 17 (2011).
3. Sauvage F, Nazeeruddin M K., Grätzel M, *Functional Metal Oxides* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013, pp. 339.
4. Lewinski, N.; Colvin, V.; Drezek, R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 2008, 4, 26–49.
5. Favi, P.M.; Gao, M.; Sepúlveda Arango J, L.; Ospina, S.P.; Morales, M.; Pavon, J.J.; Webster, T.J. Shape and surface effects on the cytotoxicity of nanoparticles: Gold nanospheres versus gold nanostars. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2015, doi:10.1002/jbm.a.35491.
6. Pan, Y.; Neuss, S.; Leifert, A.; Fischler, M.; Wen, F.; Simon, U.; Schmid, G.; Brandau, W.; Jähnen-Dechent, W. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 2007, 3, 1941–1949.
7. Napierska, D.; Thomassen, L.C.; Rabolli, V.; Lison, D.; Gonzalez, L.; Kirsch-Volders, M.; Martens, J.A.; Hoet, P.H. Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells. *Small* 2009, 5, 846–853.
8. Carlson, C.; Hussain, S.M.; Schrand, A.M.; K. Braydich-Stolle, L.; Hess, K.L.; Jones, R.L.; Schlager, J.J. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Phys. Chem. B* 2008, 112, 13608–13619.
9. Oberdörster, G.; Oberdörster, E.; Oberdörster, J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 2005, 113, 823–839.
10. Handy, R.D.; Owen, R.; Valsami-Jones, E. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: Current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology* 2008, 17, 315–325.
11. Hussain, S.; Hess, K.; Gearhart, J.; Geiss, K.; Schlager, J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. Vitro.* 2005, 19, 975–983.
12. Brown, J.S.; Zeman, K.L.; Bennett, W.D. Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002, 166, 1240–1247.
13. Holsapple, M.P.; Farland, W.H.; Landry, T.D.; Monteiro-Riviere, N.A.; Carter, J.M.; Walker, N.J.; Thomas, K.V. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part ii: Toxicological and safety evaluation of nanomaterials, current challenges and data needs. *Toxicol. Sci.* 2005, 88, 12–17.
14. Hoshino, A.; Fujioka, K.; Oku, T.; Nakamura, S.; Suga, M.; Yamaguchi, Y.; Suzuki, K.; Yasuhara, M.; Yamamoto, K. Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells. *Microbiol. Immunol.* 2004, 48, 985–994.
15. Salnikov, V.; Lukyanenko, Y.; Frederick, C.; Lederer, W.; Lukyanenko, V. Probing the outer mitochondrial membrane in cardiac mitochondria with nanoparticles. *Biophys. J.* 2007, 92, 1058–1071.
16. Donaldson, K.; Stone, V. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann. Ist. Super. Sanita* 2002, 39, 405–410.
17. Wilson, R.F. Nanotechnology: The challenge of regulating known unknowns. *J. Law Med. Ethics* 2006, 34, 704–713.
18. Wichmann, H.-E.; Spix, C.; Tuch, T.; Wölke, G.; Peters, A.; Heinrich, J.; Kreyling, W.G.; Heyder, J. Daily Mortality and Fine and Ultrafine Particles in Erfurt, Germany. Part I: Role Of Particle Number And Particle Mass; Research Report 98; Health Effects Institute: Boston, MA, USA, 2000.
19. Derfus, A.M.; Chan, W.C.; Bhatia, S.N. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett.* 2004, 4, 11–18.

20. Gupta, A.K.; Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 2005, 26, 3995–4021.
21. De Jong, W.H.; Borm, P.J. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int. J. Nanomed.* 2008, 3, 133.
22. Alkilany, A.M.; Murphy, C.J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: What we have learned so far? *J. Nanoparticle Res.* 2010, 12, 2313–2333.
23. Xia T, Li N, Nel AE, Potential health impact of nanoparticles. *Annu Rev Public Health.* 2009;30:137-50.
24. Lefebvre, D.E.; Venema, K.; Gombau, L.; Valerio Jr, L.G.; Raju, J.; Bondy, G.S.; Bouwmeester, H.; Singh, R.P.; Clippinger, A.J.; Collnot, E.-M. Utility of models of the gastrointestinal tract for assessment of the digestion and absorption of engineered nanomaterials released from food matrices. *Nanotoxicology* 2015, 9, 523–542.
25. Bellmann, S.; Carlander, D.; Fasano, A.; Momcilovic, D.; Scimeca, J.A.; Waldman, W.J.; Gombau, L.; Tsytsikova, L.; Canady, R.; Pereira, D.I. Mammalian gastrointestinal tract parameters modulating the integrity, surface properties, and absorption of food-relevant nanomaterials. *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* 2015, 7, 609–622.
26. Gliga, A.R.; Skoglund, S.; Wallinder, I.O.; Fadeel, B.; Karlsson, H.L. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: The role of cellular uptake, agglomeration and ag release. *Part. Fibre Toxicol.* 2014,11, 11.
27. Qiao, H.; Liu, W.; Gu, H.; Wang, D.; Wang, Y. The transport and deposition of nanoparticles in respiratory system by inhalation. *J. Nanomater.* 2015, 2015, 394507.
28. Braakhuis, H.M.; Cassee, F.R.; Fokkens, P.H.; de la Fonteyne, L.J.; Oomen, A.G.; Krystek, P.; de Jong, W.H.; van Loveren, H.; Park, M.V. Identification of the appropriate dose metric for pulmonary inflammation of silver nanoparticles in an inhalation toxicity study. *Nanotoxicology* 2015,doi:10.3109/17435390.2015.1012184.
29. Varna, M.; Ratajczak, P.; Ferreira, I.; Leboeuf, C.; Bousquet, G.; Janin, A. In vivo distribution of inorganic nanoparticles in preclinical models. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* 2012, 3, 18986.
30. Albanese, A.; Tang, P.S.; Chan, W.C. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2012, 14, 1–16.
31. Ballou, B.; Lagerholm, B.C.; Ernst, L.A.; Bruchez, M.P.; Waggoner, A.S. Noninvasive imaging of quantum dots in mice. *Bioconjug. Chem.* 2004, 15, 79–86.
32. Tsoli, M., Kuhn, H., Brandau, W., Cellular uptake and toxicity of Au55 clusters, *Small.* 2005 Aug;1(8-9):841-4.
33. Pan Y1, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W, Jahnen-Dechent W, Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small.* 2007 Nov;3(11):1941-9.
34. Andon FT, Fadeel B. Programmed cell death: molecular mechanisms and implications for safety assessment of nanomaterials. *Acc Chem Res.* 2013;46(3):733–42
35. Ma C, Chhikara S, Xing B, Musante C, White JC, et al. (2013) Physiological and molecular response of *Arabidopsis thaliana* (L.) to nanoparticle cerium and indium oxide exposure. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 1: 768–778.
36. De Jong, W.H.; Hagens, W.I.; Krystek, P.; Burger, M.C.; Sips, A.J.; Geertsma, R.E. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* 2008, 29, 1912–1919.
37. Shin S. W. , Song I.H., and Um S. H. ,Role of Physicochemical Properties in Nanoparticle Toxicity, *Nanomaterials* 2015, 5, 1351-1365
38. Chithrani, B.D.; Ghazani, A.A.; Chan, W.C. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* 2006, 6, 662–668.
39. Wichmann, H.-E.; Spix, C.; Tuch, T.; Wölke, G.; Peters, A.; Heinrich, J.;Kreyling, W.G.; Heyder, J. Daily Mortality and Fine and Ultrafine Particles in Erfurt, Germany. Part I: Role Of Particle Number And Particle Mass; Research Report 98; Health Effects Institute: Boston, MA, USA, 2000.

40. Kunzmann A, Andersson B, Thurnherr T, Krug H, Scheynius A, Fadeel B, Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1810, 2011, 361-373.
41. Oberdorster, G.; Maynard, A.; Donaldson, K.; Castranova, V.; Fitzpatrick, J.; Ausman, K.; Carter, J.; Karn, B.; Kreyling, W.; Lai, D.; et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: Elements of a screening strategy. Part. *Fibre Toxicol.* 2005, 2, 8–43.
42. Veranth JM, Kaser EG, Veranth MM, Koch M, Yost GS. Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. Part *Fibre Toxicol.* 2007.
43. Nel A, Xia T, Madler L, Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311: 622–627
44. Yang H, Liu C, Yang D, Zhanga H and Xia Z Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition *J. Appl. Toxicol.* 2009; 29: 69–78
45. Gojova A, Guo B, Kota RS, Rutledge JC, Kennedy IM, Barakat AI. 2007, Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environ. Hlth Perspect.* 115: 403–409
46. Dunford R, Salinaro A, Cai L, Serpone N, Horikoshi S, Hidaka H, Knowland J. 1997. Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. *FEBS Lett* 418: 87–90.
47. Shi H, Hudson LG, Liu KJ. 2004. Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 37: 582–593.
- Stearns RC, Paulauskis JD, Godleski JJ. 2001. Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 108–115.
48. Papageorgiou I, Brown C, Schins R, Singh S, Newson R, Davis S, Fisher J, Ingham E, Case CP. 2007. The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 28: 2946–2958.
49. Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schurch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P. 2005. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ. Hlth Perspect.* 113: 1555–1560.
50. Chen M, von Mikecz A. 2005. Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. *Exp Cell Res* 305: 51–62
51. Gregory Morose, The 5 principles of Design for Safer Nanotechnology, *Journal of Cleaner Production*, 18, 2010, 285–289.
52. Pavan P. Adisheshaiah, Jennifer B. Hall, Scott E. McNeil, Nanomaterial standards for efficacy and toxicity assessment, *Nanomed Nanobiotechnol*, Vol. 2, 2009.
53. Klabunde, K.J.; Stark, J.; Koper, O.; Mohs, C.; Park, D.G.; Decker, S.; Jiang, Y.; Lagadic, I.; Zhang, D. Nanocrystals as stoichiometric reagents with unique surface chemistry. *J. Phys. Chem.* 1996, 100, 12142–12153.
54. Campbell, C.T.; Parker, S.C.; Starr, D.E. The effect of size-dependent nanoparticle energetics on catalyst sintering. *Science* 2002, 298, 811–814.
55. Suttiponparnit, K.; Jiang, J.; Sahu, M.; Suvachittanont, S.; Charinpanitkul, T.; Biswas, P. Role of surface area, primary particle size, and crystal phase on titanium dioxide nanoparticle dispersion properties. *Nanoscale Res. Lett.* 2011, 6, 27.
56. Klabunde, K.J.; Stark, J.; Koper, O.; Mohs, C.; Park, D.G.; Decker, S.; Jiang, Y.; Lagadic, I.; Zhang, D. Nanocrystals as stoichiometric reagents with unique surface chemistry. *J. Phys. Chem*
57. Campbell, C.T.; Parker, S.C.; Starr, D.E. The effect of size-dependent nanoparticle energetics on catalyst sintering. *Science* 2002, 298, 811–814.
58. Suttiponparnit, K.; Jiang, J.; Sahu, M.; Suvachittanont, S.; Charinpanitkul, T.; Biswas, P. Role of surface area, primary particle size, and crystal phase on titanium dioxide nanoparticle dispersion properties. *Nanoscale Res. Lett.* 2011, 6, 27.

- Nel, A.; Xia, T.; Madler, L.; Li, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006, 311, 622–627.
60. Oberdorster, G.; Maynard, A.; Donaldson, K.; Castranova, V.; Fitzpatrick, J.; Ausman, K.; Carter, J.; Karn, B.; Kreyling, W.; Lai, D.; *et al.* Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: Elements of a screening strategy. *Part. Fibre Toxicol.* 2005, 2, 8–43.
61. Duffine, R.; Tran, C.L.; Clouter, A.; Brown, D.M.; MacNee, W.; Stone, V.; Donaldson, K. The importance of surface area and specific reactivity in the acute pulmonary inflammatory response to particles. *Ann. Occup. Hyg.* 2002, 46, 242–245.
62. Stoeger, T.; Reinhard, C.; Takenaka, S.; Schroepel, A.; Karg, E.; Ritter, B.; Heyder, J.; Schulz, H. Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice. *Environm. Health Perspect.* 2005, 114, 328–333.
63. Sager, T.M.; Kommineni, C.; Castranova, V. Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: Role of particle surface area. *Part. Fibre Toxicol.* 2008, 5, 17–32.
64. Sager, T.M.; Castranova, V. Surface area of particle administered versus mass in determining the pulmonary toxicity of ultrafine and fine carbon black: Comparison to ultrafine titanium dioxide. *Part. Fibre Toxicol.* 2009, 6, 15–46.
65. A. J. Wagner, C. A. Bleckmann, R. C. Murdock, A. M. Schrand, J. J. Schlager, S. M. Hussain, *J. Phys. Chem. B* 2007, 111, 7353.
66. Sager, T.M.; Castranova, V. Surface area of particle administered versus mass in determining the pulmonary toxicity of ultrafine and fine carbon black: Comparison to ultrafine titanium dioxide. *Part. Fibre Toxicol.* 2009, 6, 15–46.
67. Dick CA, Brown DM, Donaldson K, Stone V: The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol* 2003, 15:39-52.
68. Harush-Frenkel O., Rozentur E, Benita S., Altschuler Y., Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells, *Biomacromolecules*, 2008, 9, 435-443.
69. Chacko AM, Hood ED, Zern BJ, Muzykantov VR., Targeted Nanocarriers for Imaging and Therapy of Vascular Inflammation, *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 16(3), 2011, 215–227.
70. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation, *NanoToday*, 6, 2011, 446-465.
71. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation, *NanoToday*, 6, 2011, 446-465
72. C. Goodman, C. McCusker, T. Yilmaz, V. Rotello, *Bioconjugate. Chem.* 2004, 15, 897–900.
73. Sharifi S, Behzadi S, Laurent S. M. Forrest L, Stroevee P , Mahmoudi M , Toxicity of nanomaterials
74. Verma, A.; Stellacci, F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* 2010,6, 12–21.
75. He, C.; Hu, Y.; Yin, L.; Tang, C.; Yin, C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 2010, 31, 3657–3666.
76. Hirn, S.; Semmler-Behnke, M.; Schleh, C.; Wenk, A.; Lipka, J.; Schaffler, M.; Takenaka, S.; Moller, W.; Schmid, G.; Simon, U.; *et al.* Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011, 77, 407–416.
77. Amanda M. Schrand, Mohammad F. Rahman, Saber M. Hussain, John J. Schlager, David A. Smith, Ali F. Syed, Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, Vol.2, 2010, 544-568.

78. Yoo J, Doshi N, Mitragotri S, Adaptive micro and nanoparticles: Temporal control over carrier properties to facilitate drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63,2011, 1247–1256.
79. Catherine J. Murphy, Anand M. Gole, John W. Stone, Patrick N. Sisco, Alaaldin M. Alkilany, Edie C. Goldsmith, Sarah C. Baxter, Gold nanoparticles in biology: Beyond toxicity to cellular imaging, *Accounts of chemical research*, 41, No 12, 2008, 1721-1730
80. A. Verma, F. Stellacci, Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions, *small* 2010, 6, No. 1, 12–21
81. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation, *NanoToday*, 6, 2011, 446-465.
82. Electrochemical Characterization of Shape-Controlled Pt Nanoparticles in Different Supporting Electrolytes Vidal-Iglesias F. J., Arán-Ais R.M., Herrero J., Feliu J M., 2012 *ACS Catal.*, 2 (5), pp 901–910
83. Carl D. Walkey Jonathan B. Olsen Hongbo Guo†§, Andrew Emili†§, and Warren C. W. Chan Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134 (4), pp 2139–2147
84. Jiang, J.; Oberdörster, G.; Biswas, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J. Nanopart. Res.* 2008, 11, 77–89.
85. Asati, A.; Santra, S.; Kaittanis, C.; Perez, J.M. Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles. *ACS Nano* 2010, 4, 5321–5331.
86. Frohlich, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* 2012, 7, 5577–5591.
87. Schaeublin, N.M.; Braydich-Stolle, L.K.; Schrand, A.M.; Miller, J.M.; Hutchison, J.; Schlager, J.J.; Hussain, S.M. Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. *Nanoscale* 2011, 3, 410–420.
89. 1 Chompoosor, A.; Saha, K.; Ghosh, P. S.; Macarthy, D. J.; Miranda, O. R.; Zhu, Z. J.; Arcaro, K. F.; Rotello, V. M. The role of surface functionality on acute cytotoxicity, ROS generation and DNA damage by cationic gold nanoparticles. *Small* 2010, 6, 2246–2249.
90. The Role of Surface Functionality in Determining Nanoparticle Cytotoxicity Kim S.T., Saha K., Kim C., Rotello V M , *Accounts of chemical Research* , 2013 ' Vol. 46, No. 3, 681–691
91. Warheit DB, Brock WJ, Lee KP, Webb TR, Reed KL: Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO₂ particle formulations: impact of surface treatments on particle toxicity. *Toxicol Sci* 2005, 88:514-524.
92. Rehn B, Seiler F, Rehn S, Bruch J, Maier M: Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated. *TAAP* 2003, 189:84-95.
93. Hohl D, Steinfartz Y, Schins RP, Knaapen AM, Martra G, Fubini B, Borm PJ: The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after instillation of fine and ultrafine TiO₂ in the rat. *Int J Hyg Environ Health* 2002, 205:239-244.
94. Thevenot P, Cho J, Wavhal D, Timmons RB, Tang L: Surface chemistry influences cancer killing effect of TiO₂ nanoparticles. *Nanomed* 2008, 4:226-236.
95. Connor, E.E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C.J., Wyatt, M.D., 2005. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* 1, 325–327
96. Pan Z, Lee W, Slutsky L, Clark RA, Pernodet N, Rafailovich MH: Adverse effects of titanium dioxide nanoparticles on human dermal fibroblasts and how to protect cells. *Small* 2009
97. Cha, K.E.; Myung, H. Cytotoxic effects of nanoparticles assessed in vitro and in vivo. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 17, 1573–1578.

98. Huczko, A.; Lange, H.; Calko, E.; Grubek-Jaworska, H.; Droszcz, P. Physiological testing of carbon nanotubes: Are they asbestos-like? Fuller. Sci. Technol. 2001, 9, 251–254.
99. Firme, C.P.; Bandaru, P.R. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med. 2010, 6, 245–256.
100. Chalupa, D.C.; Morrow, P.E.; Oberdörster, G.; Utell, M.J.; Frampton, M.W. Ultrafine particle deposition in subjects with asthma. Environ. Health Perspect. 2004, 112, 879–882.
101. Handy, R.D.; Henry, T.B.; Scown, T.M.; Johnston, B.D.; Tyler, C.R. Manufactured nanoparticles: Their uptake and effects on fish—A mechanistic analysis. Ecotoxicology 2008, 17, 396–409.
102. Baker, G.L.; Gupta, A.; Clark, M.L.; Valenzuela, B.R.; Staska, L.M.; Harbo, S.J.; Pierce, J.T.; Dill, J.A. Inhalation toxicity and lung toxicokinetics of C60 fullerene nanoparticles and microparticles. Toxicol. Sci. 2008, 101, 122–131.
103. Elder, A.C.P.; Gelein, R.; Finkelstein, J.N.; Cox, C.; Oberdorster, G. Pulmonary inflammatory response to inhaled ultrafine particles is modified by age, ozone exposure, and bacterial toxin. Inhal. Toxicol. 2000, 12, 227–246.
104. Oberdörster, E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. Environ. Health Perspect. 2004, 112, 1058–1062.
105. Lovern, S.B.; Klaper, R. Daphnia magna mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. Environ. Toxicol. Chem. 2006, 25, 1132–1137.
106. Lyon, D.Y.; Adams, L.K.; Falkner, J.C.; Alvarez, P.J.J. Antibacterial activity of fullerene water suspensions: Effects of preparation method and particle size. Environ. Sci. Technol. 2006, 40, 4360–4366.
107. Lyon, D.Y.; Fortner, J.D.; Sayes, C.M.; Colvin, V.L.; Hughes, J.B. Bacterial cell association and antimicrobial activity of a c60 water suspension. Environ. Toxicol. Chem. 2005, 24, 2757–2762.
108. Champion JA, Mitragotri S., Role of target geometry in phagocytosis. 103 (13): 4930.
109. Stephanie E. A. Gratton, Patricia A. Ropp, Patrick D. Pohlhaus, J. Christopher Luft, Victoria J. Madden, Mary E. Napier, Joseph M. DeSimone, The effect of particle design on cellular internalization pathways, Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Aug 19; 105(33): 11613–11618.
110. Chithrani BD, Chan WC, Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. 2007, Nano Lett. 2007 Jun;7(6):1542-50
111. Li, Z.; Hulderman, T.; Salmen, R.; Chapman, R.; Leonard, S.S.; Young, S.H.; Shvedova, A.; Luster, M.I.; Simeonova, P.P. Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes. Environ. Health Perspect. 2007, 115, 377–382.
- 112.. Bantz, C.; Koshkina, O.; Lang, T.; Galla, H.-J.; Kirkpatrick, C.J.; Stauber, R.H.; Maskos, M. The surface properties of nanoparticles determine the agglomeration state and the size of the particles under physiological conditions. Beilstein J. Nanotechnol. 2014, 5, 1774–1786.
113. Donaldson, K.; Aitken, R.; Tran, L.; Stone, V.; Duffin, R.; Forrest, G.; Alexander, A. Carbon nanotubes: A review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. Toxicol. Sci. 2006, 92, 5–22.
114. Oberdorster G, Stone V, Donaldson K: Toxicology of nanoparticles: a historical perspective. Nanotoxicology 2007, 1:2-25
115. Vesaratchanon S, Nikolov A, Wasan DT. Sedimentation in nano-colloidal dispersions: effects of collective interactions and particle charge. Adv Colloid Interface Sci. 2007;134–35:268–278.

116. Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, Asgharian B, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI: Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* 2004, 77:347-357.
117. Ferin J, Oberdorster G, Penney DP: Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992
118. Grassian VH, Adamcaková-Dodd A, Pettibone JM, O'Shaughnessy PT, Thorne PS. Inflammatory response of mice to manufactured titanium dioxide nanoparticles: comparison of size effects through different exposure routes. *Nanotoxicology*. 2007a;1(3):211–226.
119. Cedervall T, Lynch I, Foy M et al (2007) Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Angew Chem Int Ed* 46:5754–5756.
120. Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422:37–44.
121. Eghtedari M, Liopo AV, Copland JA, Oraevsly AA, Motamedi M (2009) Engineering of hetero-functional gold nanorods for the in vivo molecular targeting of breast cancer cells. *Nano Lett* 9:287–291.
122. EJ, Choi J, Park YK, Park K. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology* 2008, 245:90–100.
123. R. C. Murdock, L. Braydich-Stolle, A. M. Schrand, J. J. Schlager, S. M. Hussain, *Toxicol. Sci.* 2008, 101, 239.
124. Jin CY, Zhu BS, Wang XF, Lu QH: Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chemical Research in Toxicology* 2008, 21:1871-1877.
125. Rehn B, Seiler F, Rehn S, Bruch J, Maier M: Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated. *TAAP* 2003, 189:84-95.
126. Pan Z, Lee W, Slutsky L, Clark RA, Pernodet N, Rafailovich MH: Adverse effects of titanium dioxide nanoparticles on human dermal fibroblasts and how to protect cells. *Small* 2009, 5:511-520.
127. Long TC, Tajuba J, Sama P, Saleh N, Swartz C, Parker J, Hester S, Lowry GV, Veronesi B: Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro. *Environ Health Perspect* 2007, 115:1631-1637.
128. Suttiponparnit, K.; Jiang, J.; Sahu, M.; Suvachittanont, S.; Charinpanitkul, T.; Biswas, P. Role of surface area, primary particle size, and crystal phase on titanium dioxide nanoparticle dispersion properties. *Nanoscale Res. Lett.* 2011, 6, 27.
129. Shi L, Chen J, Feng Z, Chen T, Lian Y, Wang X, Li C: Photoluminescence characteristics of TiO₂ and their relationship to the photoassisted reaction of water/methanol mixture. *J Phys Chem* 2007, 111:693-699.
130. Laura K. Braydich-Stolle Z Nicole M. Schaeublin Z Richard C. Murdock Z Jingkun Jiang Z Pratim Biswas Z John J. Schlager Z Saber M, Hussain J, Crystal structure mediates mode of cell death in TiO₂ Nanotoxicity, *Nanopart Res* (2009) 11:1361–1374
131. Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB, Colvin VL: Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci* 2006, 92:174-185.
132. Kaewamatawong T, Shimada A, Okajima M, Inoue H, Morita T, Inoue K, Takano H: Acute and subacute pulmonary toxicity of low dose of ultrafine colloidal silica particles in mice after intratracheal instillation. *Toxicol Pathol* 2006, 34:958-965
133. Zhang AP, Sun YP: Photocatalytic killing effect of TiO₂ nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2004, 10:3191-3193
134. Lu N, Zhu Z, Zhao X, Tao R, Yang X, Gao Z: Nano titanium dioxide photocatalytic protein tyrosine nitration: a potential hazard of TiO₂ on skin. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, 370:675-680
135. 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

136. Theogaraj E, Riley S, Hughes L, Maier M, Kirkland D: An investigation of the photo-clastogenic potential of ultrafine titanium dioxide particles. *Mutat Res* 2007, 634:205-219.
137. Shi L, Chen J, Feng Z, Chen T, Lian Y, Wang X, Li C: Photoluminescence characteristics of TiO₂ and their relationship to the photoassisted reaction of water/methanol mixture. *J Phys Chem* 2007, 111:693-699.
138. Stark, W.J., 2011. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 50, 1242–1258. Stöber, W., Fink, A., Bohn, E., 1968. *J. Coll. Interf. Sci.* 26, 62–69.
139. Cho, W.S., Duffin, R., Thielbeer, F., et al., 2012a. *Toxicol. Sci.* 126 (2), 469–477.
140. Ivask A., Titma T., Visnapuu M., Vija H., Kakinen A., Sihtmae M, Pokhrel S, Madler L, Heinlaan M, Kisand V, Shimmo R and Kahru A .*Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2015, 15, 1914-1929 Toxicity of 11 Metal Oxide Nanoparticles to Three Mammalian Cell Types
141. Huang, C.C. Aronstam, R.S.; Chen, D.R.; Huang, Y.W. Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicol. in vitro* 2010, 24, 45-55.
142. Zhang M, Jin J, Chang Y, Chang X, Xing G, *Toxicological Properties of Nanomaterials, Journal of Nanoscience and Nanotechnology* Vol. 14, 717–729, 2014