

Nanomateriały a stres oksydacyjny

Maciej Gawlik

Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Adres do korespondencji: Maciej Gawlik, Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, e-mail: mfgawlik@cyf-kr.edu.pl

Wstęp

Intensywny rozwój nanotechnologii we współczesnym świecie wynika z korzyści, jakie oferuje zastosowanie nanocząstek (*Nanoparticles*, NPs) w różnorodnych dziedzinach życia – od działalności przemysłowej do biomedycyny. Niekiedy diametralne różnice w wykazywanych właściwościach fizykochemicznych przez struktury, których choć jeden wymiar nie przekracza 100 nm (10^{-7} m) w stosunku do materiałów konwencjonalnych, predysponuje nanomateriały (*Nanomaterials*, NMs) do zastępowania dotychczasowych tworzyw w produktach użyteczności badawczej, konsumpcyjnej i usługowej [1].

Jednym z istotniejszych czynników uprzywilejowujących NMs w stosunku do materiałów konwencjonalnych w zastosowaniach technologicznych i biotechnologicznych jest rozwinięcie powierzchni czynnej, wynikające z obniżenia wymiarów liniowych cząstek [2]. Ma to szczególne znaczenie w zastosowaniach kontaktowych, gdzie interakcja ze środowiskiem zewnętrznym zmierza do bezpośredniego oddziaływania z otaczającymi NM obiektami. Przykładem mogą być tutaj nanocząsteczkowe katalizatory palladowe stosowane w reakcjach tworzenia wiązań C-C [3] lub nanocząstki srebra (Ag-NPs) wykorzystywane jako czynniki antybakteryjne na drodze wiązania się z białkami powierzchniowymi drobnoustrojów [4].

Wynikające z małych rozmiarów i niespotykanej w świecie „makro” wysokiej proporcji atomów powierzchniowych i przypowierzchniowych w cząstkach, warunki reaktywności w układach biologicznych niosą zagrożenia toksykologiczne ze strony NMs. Internalizacja NPs do komórki, ale i ich zdolność przechodzenia przez błonę mitochondrialną na poziomie subkomórkowym, powodują ryzyko

Nanomaterials and oxidative stress · The development of nanotechnology brings many benefits in a variety of areas of life, from industry to nanomedicine. Unique features of shredded matter to dimensions below 100 nm determine this. In addition to the developed surface of active nanomaterials (NMs), the benefits are also found in the repetitive shapes of nanoparticles (NPs). For these reasons, NPs can penetrate deep into biological systems to the subcellular level. They can act as carriers for drug molecules or take part in modern anti-cancer therapies. Unfortunately, for the same reasons, they also carry toxicological hazards, the best known of which is oxidative stress (OS). This mechanism was recognized for metallic NPs participating in the Fenton reaction to form a hydroxyl radical (OH). Non-metallic NPs such as carbon nanotubes (CNTs) or crystalline silica nanoparticles (SiO₂-NPs) can initiate defensive signaling cascades that result in overproduction of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS), followed by inflammatory reactions resulting in apoptosis or necrosis. The paper presents the above issues preceded by the NMs and OS characteristics in the current approach.

Keywords: nanotoxicology, nanomaterials, mechanisms of toxicity, oxidative stress, carbon nanotubes.

© Farm Pol, 2018, 74(7): 427–432

uszkodzeń struktury i funkcji biomolekuł o podstawowym znaczeniu dla wewnątrzustrojowej homeostazy i integralności poszczególnych układów. Jednym z potencjalnych efektów pierwotnych wspomnianego oddziaływania jest zaburzenie wewnątrzkomórkowej równowagi pro-/antyoksydacyjnej ze względu na nadmierną produkcję reaktywnych form tlenu i azotu (ROS/RNS) [5, 6].

Rozwijający się stan stresu oksydacyjnego (*Oxidative Stress*, OS) jest w przypadku utrzymywania się długotrwałego, powtarzanego narażenia, okolicznością generującą uruchomienie procesów nekrotycznych i apoptotycznych. Feng i wsp.

wymienia OS obok apoptozy, autofagii, odpowiedzi zapalnej i zaburzeń szlaków sygnałowych jako wiążący mechanizm działania neurotoksycznego metalicznych NPs [7]. W przypadku niemetalicznych NPs, takich jak nanorurki węglowe (*carbon nanotubes*, CNT) czy SiO₂-NPs, o nasileniu OS decyduje oprócz stężenia substancji również charakterystyka kształtu [8].

W pracy przedstawiono aktualny pogląd na rolę OS w toksyczności NMs, proponowane w piśmiennictwie mechanizmy powstawania OS pod wpływem NPs oraz wpływ charakterystyki nanostruktur na powstawanie i rozwój OS w układach biologicznych. Zagadnienia te poprzedzono wprowadzeniem w podstawy wiedzy o NMs i powstawaniu OS w organizmach żywych.

Charakterystyka nanomaterialów

Bleeker i wsp. w swej krytycznej pracy dotyczącej definicji i regulacji prawnych w zakresie nanostruktur w Unii Europejskiej przywołuje rekomendację Komisji Europejskiej określającą NM jako materiał naturalny, powstały przypadkowo lub celowo wytworzony, w którym w rozkładzie wielkości cząstek w formie swobodnej, aglomeratów bądź agregatów, posiadających jeden lub więcej wymiarów w przedziale 1–100 nm, uzyskuje się wartość co najmniej 50% [9, 10]. W szczególnych przypadkach, uzasadnionych względami ochrony zdrowia lub środowiska, można zastąpić wskazaną wartość progową liczbą z zakresu 1–50%.

Jak widać, uwzględnienie źródła pochodzenia NM prowadzi do podstawowej klasyfikacji, istotnej również z punktu widzenia działania biologicznego nanostruktur i jego badań. O ile bowiem NMs pochodzenia naturalnego (*Natural Nanomaterials*, NNMs) oraz NMs powstające przypadkowo, np. jako produkty uboczne w procesach technologicznych (*Incidental Nanomaterials*, INMs) posiadają znacznie większe zróżnicowanie wymiarów liniowych ze względu na brak intencjonalnej kontroli w procesie tworzenia, o tyle produkowane przez człowieka NMs (*Engineered Nanomaterials*, ENMs) są znacznie bardziej jednorodne w zakresie parametrów wielkości i kształtu w obrębie danej partii czy serii produktu finalnego.

Dobłą ilustracją powyższych rozważań jest zestawienie cząstek występujących w powietrzu atmosferycznym, które jako frakcja PM (*Particulate Matter*), w ramach tzw. frakcji respirabilnej, zachowuje ciągłość rozkładu wymiaru liniowego, dzieląc się na gruboziarniste (*coarse*) (2,5–10 μm), drobne (*fine*) (<2,5 μm) i najdrobniejsze (*ultrafine*, UF) (<100 nm). Zgodnie z przedstawionym poglądem definiującym, tylko cząstki w tym ostatnim zakresie mogą być traktowane jako NM i stanowić

materiał porównawczy jako mieszanina NNMs i INMs z ENMs, np. w badaniach skutków narażenia drogą inhalacyjną [11].

Zróżnicowanie jakościowe NMs dotyczy w pierwszej kolejności natury chemicznej i fizykochemicznej. Często spotykany jest podział na nanostruktury metaliczne i niemetaliczne zarówno w układach jednopierwiastkowych (np. Al, Ag, Au, C, S, Si), jako związki chemiczne, najczęściej w postaci tlenków (np. Al₂O₃, TiO₂, ZnO, SiO₂), oraz w postaci kompozytów o bardzo szerokim składzie faz. Na tak określony profil elementarny nakładają się wyróżniki wymiarowości, morfologii, jednorodności i stanu aglomeracji [12]. Klasy 1D, 2D i 3D to NMs posiadające odpowiednio 1 wymiar liniowy w skali nano (1–100 nm), 2 wymiary i 3 wymiary w tej skali. Są to zatem kolejno nanostruktury o charakterze nanopowierzchni, np. jako nanofolie lub napyłony cienki film warstwy nano na płaszczyźnie nośnika (1D), nanorurki lub nanodruty swobodne lub przyłączone do powierzchni, ale również nanopory o średnicy nano (2D) i tzw. kropki kwantowe swobodne lub przyłączone do nośnika i również nanopory o trzech wymiarach w skali nano (3D).

Względy morfologiczne pozwalają pogrupować NPs na te o wysokim i niskim współczynniku proporcji (*high-*, *low-aspect ratio*). W grupie o wysokim współczynniku pojawiają się m.in. oprócz wspomnianych nanorurek i nanodrutów nanohelisy lub nanozygzaki, a w grupie o niskim współczynniku m.in. nanosfery, nanokostki czy nanopiramidy. Dodatkowo, NM może zawierać NPs o różnym stopniu jednorodności i o różnym poziomie zaglomerowania.

Zagrożenie zdrowotne stwarzają NPs uwalniające się do powietrza atmosferycznego, przechodzące przez bariery biologiczne podczas bezpośredniego kontaktu (np. ze skórą, dostające się do światła przewodu pokarmowego) oraz podawane intencjonalnie jako dokomórkowe nanotransportery leków lub substancji wskaźnikowych. Nie stwarzają zagrożenia NMs trwale związane z nośnikiem lub te zawierające nanopory [12, 13].

Zastosowanie NMs wiąże się ściśle z wykorzystaniem określonych właściwości fizykochemicznych ujawnionych w tych strukturach bądź zwielokrotnionych w postaci nano w stosunku do postaci konwencjonalnej. Raport Komisji Europejskiej dotyczący oceny bezpieczeństwa w środowisku w związku ze stosowaniem NMs wytwarzanych przez człowieka z 2017 r. wymienia dla siedmiu najczęściej używanych NMs czterdzieści przykładowych zastosowań [14]. Wśród nich są powszechnie znane zastosowania fulerenów jako niezwykle wytrzymałych i bardzo lekkich elementów konstrukcyjnych sprzętu sportowego (np. w kijach

golfowych, rakietach tenisowych i badmintonowych), ditlenku tytanu (TiO_2) lub tlenku cynku (ZnO) jako skutecznych filtrów przeciwsłonecznych dzięki rozwiniętej powierzchni w postaci nano w składzie preparatów kosmetycznych czy Ag-NPs stosowanych jako czynniki antybakteryjne w produktach medycznych (np. opatrunki, bandaże, plastry), w opakowaniach do żywności i jako dodatki konserwujące.

W tym samym Raporcie Komisja Europejska podaje za Thomas i wsp. najczęściej spotykane przypadki uwalniania NPs stwarzające warunki do bezpośredniego narażenia organizmów żywych w środowisku [15]. Oprócz wspomnianej wcześniej bezpośredniej ekspozycji skóry na TiO_2 -NPs, ZnO -NPs czy Ag-NPs podczas używania preparatów kosmetycznych czy wyposażonych w aseptyczne warstwy ubrań, pojawiają się przypadki emisji CNT na składowiskach odpadów elektronicznych, emisja NPs tlenku ceru (CeO_2 -NPs) w spalinach samochodowych (dodawanych jako wskaźnik do katalizatorów), emisje NPs w procesach spalania oraz podczas produkcji NMs.

Warunki bezpośredniego narażenia tkanek stwarzają zamierzone ekspozycje na NPs w zastosowaniach medycznych. Z bardziej spektakularnych wymienić można stosowanie nanostopów tytanowo-niklowych z tzw. pamięcią kształtu w stomatologii, ortopedii i angiologii, hipertermiczne metody terapii nowotworów z użyciem NPs złota (Au-NPs), czy użycie grafenu (monoatomowa warstwa węgla wiązane w sześciokąty) jako nośnika leków w onkologicznej terapii fotodynamicznej i genowej [16].

Stres oksydacyjny (OS)

Utrwalone zaburzenie równowagi pro-/antyoksydacyjnej w układach biologicznych prowadzi do nasilenia procesów utleniania, rozwijając się w niekontrolowany stan OS. Szczegółowa analiza bezpośredniej przyczyny powstania warunków do zaistnienia OS za podstawę przyjmuje wzajemne możliwe relacje pomiędzy ilością powstających ROS/RNS a pojemnością wewnątrzkomórkowej bariery antyoksydacyjnej [17]. Spośród hipotetycznych pięciu przypadków wspomnianej relacji, dwa z nich odpowiadają sytuacji zrównoważonej, gdy nawet wzrost poziomu ROS/RNS jest bilansowany mobilizacją bariery. Trzy przypadki skutkują OS i dwa spośród nich dotyczą osłabienia bariery (przy stabilnym i wzrastającym poziomie ROS/RNS), a trzeci wynika z niewydolności nieosłabionej bariery w stosunku do nadmiernej ilości generowanych ROS/RNS.

Do głównych biologicznych źródeł ROS/RNS należą mitochondrialny i mikrosomalny łańcuch transportu elektronów, układy enzymatyczne

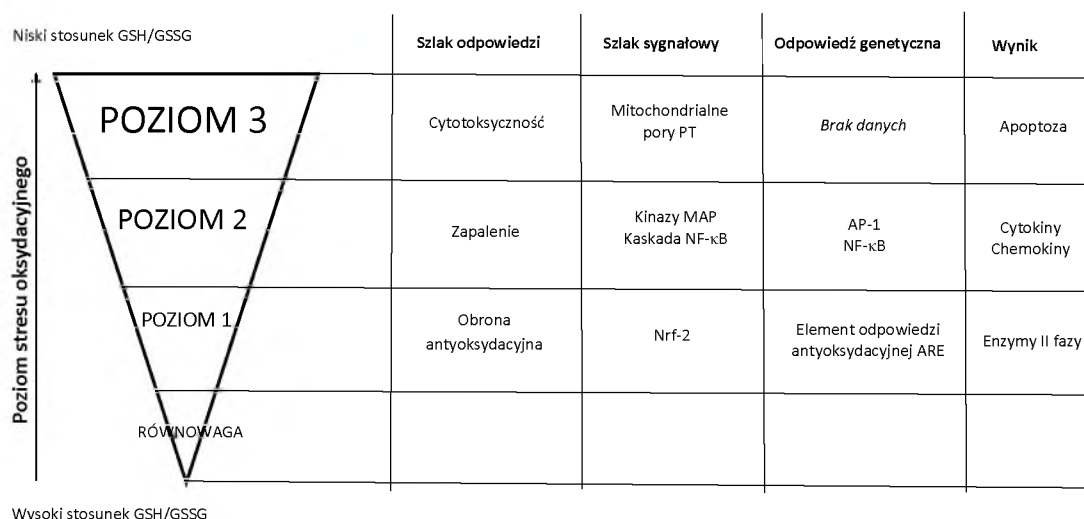
oksydaz NADPH zależnych komórek fagocytujących i nefagocytujących oraz liczne procesy jednolektronowego utleniania i redukcji występujące na szlakach przemian metabolicznych substancji endogennych i egzogennych [18]. W większości wymienionych źródeł w zróżnicowanych proporcjach pojawiają się cząsteczki anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^-), nadtlenku wodoru (H_2O_2) oraz najbardziej reaktywnego rodnika hydroksylowego ($\cdot\text{OH}$). W grupie RNS występuje tlenek azotu ($\text{NO}\cdot$) oraz anion nadtlenoazotynowy (ONOO^-) powstający w reakcji anionorodnika ponadtlenkowego z tlenkiem azotu.

W stanie zrównoważonym ROS/RNS odgrywają istotną rolę fizjologiczną na szlakach sygnałowych związanych z procesami wzrostu komórek, apoptozy, aktywności proteaz i ekspresji genów. Biorą udział w odpowiedzi komórek na czynniki stresowe, w regulacji funkcji mitochondriów oraz w kontroli poziomów antyoksydantów. ROS/RNS specyficznie aktywują inflamasomy NLRP3 oraz uczestniczą w tworzeniu długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (*Long-term potentiation*, LTP) [19]. W rozwijającym się OS destrukcyjny wpływ ROS/RNS dotyczy lipidów, białek, węglowodanów i kwasów nukleinowych, co przekłada się bezpośrednio na uszkodzenia struktury i funkcji poszczególnych układów. Reaktywność chemiczna decyduje w tym przypadku o dwóch parametrach: o intensywności oddziaływania, a zatem i stopniu uszkodzenia biomolekuł oraz o lokalizacji uszkodzeń w stosunku do miejsca powstawania ROS/RNS. $\cdot\text{OH}$ jest najaktywniejszą ze znanych ROS (stała szybkości reakcji z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi o 11 rzędów wielkości większa od O_2^-), toteż przyjmuje się, że działa bezpośrednio w miejscu powstania [17]. Jest to szczególnie istotne w kontekście OS indukowanego przez niektóre metaliczne NMs. Jony żelaza, miedzi, ale też kobaltu, niklu, manganu i chromu mają zdolność katalizowania reakcji Fentona, w której w obecności H_2O_2 i O_2^- powstaje właśnie $\cdot\text{OH}$ [18].

Jako próbę usystematyzowania mechanizmów oddziaływania OS na homeostazę komórkową, został zaproponowany tzw. hierarchiczny model OS (**rycina 1**) [20].

Obrazuje on jakościowe zmiany na szlakach przekazywania sygnałowego, począwszy od odpowiedzi genetycznej, poprzez reakcje obronne i aktywację wtórnych przekazywników, na ostatecznym efekcie patologicznym kończąc. W słabo nasilonym OS (POZIOM 1, **rycina 1**) dochodzi do indukcji enzymów bariery antyoksydacyjnej II fazy za pośrednictwem ARE (*Antioxidant Response Element*) aktywowanym przez czynnik transkrypcyjny Nrf-2, dzięki czemu układ próbuje przywrócić równowagę pro-/antyoksydacyjną. W umiarkowanym stadium

Rycina 1.
Hierarchiczny model stresu oksydacyjnego (OS) (wg [20]) (opis w tekście)



OS (POZIOM 2, **rycina 1**) aktywacja kaskady MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) i czynnika transkrypcyjnego NF-κB indukuje odpowiedź prozapalną. Wysoki poziom OS (POZIOM 3, **rycina 1**) skutkuje wzrostem przepuszczalności błony mitochondrialnej w wyniku formowania się mPTP (*mitochondrial Permeability Transition Pore*) i zaburzeniami w łańcuchu transportu elektronów, co prowadzi do apoptozy lub nekrozy.

Stres oksydacyjny indukowany przez nanomateriały

Jak już wspomniano, OS jest wskazywany jako główny, pierwotny efekt działania toksycznego NMs [21, 22]. Wynika to ze zdolności NPs do generowania ROS/RNS zarówno w warunkach abiotycznych, jak i w obrębie układów biologicznych. W pierwszym przybliżeniu można przyjąć, że nadprodukcja ROS/RNS jest powodowana zwiększoną reaktywnością NPs wymuszoną dużym rozwinięciem powierzchni cząstek o rozmiarach w skali nano. W przypadku metalicznych NPs wzrastać będzie zatem skala oddziaływań jednoelektronowych, wprost przekładająca się na procesy utleniania i redukcji w obecności tlenu cząsteczkowego i wody. Powstający w wyniku jednoelektronowej redukcji O₂ anionorodnik ponadtlenkowy jest inicjatorem szeregu procesów wolnorodnikowych, z których dobrze poznano i opisano łańcuchowy proces peroksydacji lipidów, leżący u podstaw wielu schorzeń cywilizacyjnych (m.in. arterioskleroza naczyń wieńcowych, choroby neurodegeneracyjne) [23].

W sposób mniej bezpośredni, ale również ze względu na mały rozmiar i kształt cząstek, na tworzenie ROS/RNS oddziałują CNT. Są one zdolne do internalizacji w mitochondrium i wywierania wpływu na proces oddychania. Ten mechanizm jest

najbardziej prawdopodobny w przypadku toksycznego oddziaływania na płuca, gdzie dodatkowych ilości ROS/RNS mogą przysparzać niecałkowita fagocytoza CNT oraz obecność jonów metali na rozwiniętej powierzchni cząstek. Metale takie jak Fe, Cu czy Ni mogą towarzyszyć tym ENMs jako zanieczyszczenia na etapie wytwarzania [24]. Rozwijający się w tych warunkach OS osiąga poziom 2 i 3 (por. **rycina 1**) i nasila odpowiedź prozapalną prowadząc nawet do apoptozy. Uaktywnieniu ulegają szlaki sygnałowe MAPK i NF-κB, które są odpowiedzialne m.in. za proces zwłóknienia płuc. Taki mechanizm wykazano w badaniach *in vitro* w stosunku do powstającego pod wpływem jednościennych (*single-walled*, SW) SW CNT rodnika hydroksyloвого inicjującego proliferację komórek i progresję nowotworową [25].

Badania nad OS w płucach wywoływanych przez frakcję UF w powietrzu atmosferycznym wskazują na odmienny mechanizm. Na komórkach śródłonka mikronaczyniowego płuc myszy potwierdzono aktywujący wpływ UFPs na NADPH oksydazę wykazując obniżony poziom ROS/RNS po użyciu DPI (*diphenyleneiodonium*), specyficznego inhibitora dla tego enzymu. Zastosowanie inhibitora dla mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów nie wpłynęło w tych warunkach na produkcję ROS/RNS [26]. Na rozwijający się w płucach proces zapalny pod wpływem UFPs wskazuje obserwowane pod ich wpływem zwiększone wydzielanie prozapalnego czynnika TNF-α (*Tumor Necrosis Factor-alpha*) oraz prozapalnej cytokiny IL-6 [20].

Oprócz wpływu rozmiaru liniowego NPs na poziom stresu oksydacyjnego, co wykazano np. dla NPs krzemu (SiNPs) w mózgu szczurów, gdzie stwierdzano silniejsze działanie cząstek o wymiarze 10 nm w stosunku do 80 nm *in vivo*, prowadzono badania w celu oceny wpływu kształtu i właściwości

chemicznych powierzchni czynnej NPs na wielkość indukowanego OS [27]. M.in. Tarantola i wsp. stwierdzili większą produkcję ROS/RNS w linii komórkowej psich nerek MDCK II eksponowanych na sferyczne NPs złota (*Gold Nanoparticles*, GNPs) o średnicy 43 nm w stosunku do ekspozycji w tych samych warunkach na nanopręty złota (*Gold Nanorods*, GNR) o wymiarach 38 nm × 17 nm [28]. Podobnie, stosowany w terapii fotodynamicznej nanotlenek itru (Y_2O_3) wykazuje większe prooksydacyjne działanie w postaci sferycznej niż w postaci nanoprętów [29]. Można przypuszczać, że ma to związek z łatwiejszą internalizacją cząstek o kształcie sferycznym, niż sztywnych, podłużnych, przypadkowo ułożonych względem komórki, nanoprętów.

Zmianę oddziaływania NPs na układy biologiczne, a co za tym idzie, na rozwój OS ze względu na właściwości chemiczne powierzchni czynnej, uchwycili w swoich badaniach Wan i wsp. [30]. Oceniając wpływ GNR pokrytych bromkiem cetyltrimetyloamoniowym (CTAB) na produkcję ROS w linii komórek ludzkiego raka HCT116, stwierdzili istotną różnicę w przypadku zastosowania dodatkowej modyfikacji chemicznej powierzchni przez dowiązanie cząsteczek chlorowodoru polialililoaminy (PAH). Dodatek ten praktycznie hamował cytotoksyczne działanie CTAB-GNRs u myszy.

Podsumowanie

Stosowanie NMs przez człowieka niesie bardzo wiele korzyści, ale i nierozpoznanych do końca zagrożeń toksykologicznych. Badania wskazują na niebezpieczny kierunek oddziaływania NPs na układy biologiczne promujący OS. Jest to stan inicjujący szereg poważnych schorzeń, w tym o zasięgu cywilizacyjnym, takich jak: miażdżyca naczyń, nowotwory złośliwe, choroby neurodegeneracyjne, cukrzyca typu II czy nadmierne starzenie się organizmu. We wszystkich tych przypadkach efekty są często odległe w czasie od momentu wystąpienia skutecznego narażenia na czynniki patogene. Rozwój nanotechnologii jest stosunkowo młodym zjawiskiem i aktualny obraz kliniczny skutków narażenia na NMs może nie odzwierciedlać faktycznego ryzyka z tym związanego. Tym istotniejsze staje się rozpoznanie skutków toksykologicznych ekspozycji na NMs, uwzględniające precyzyjne poznanie mechanizmów działania, co umożliwi przeciwdziałanie rozwojowi uszkodzeń nieodwracalnych. OS jest dobrze poznanym zaburzeniem, który może być obserwowany już na poziomie toksykogenomiki (faza ekspresji genów) i przypisywany dość ściśle do określonych czynników sprawczych na poziomie molekularnym. Wartość badań prowadzonych w tym kierunku

w przypadku NMs tkwi w możliwości kontrolowania procesu ich wytwarzania i eliminowania tych produktów, które wykazują nasiloną aktywność oksydacyjną i prooksydacyjną. Ze względów strukturalnych, w niektórych przypadkach wystarcza jedynie modyfikacja chemiczna rozwiniętej powierzchni NPs, co przy zachowanych korzystnych właściwościach mobilności cząstek (np. w procesie transportu leków do tkanek i komórek) może znacznie ograniczyć lub nawet całkowicie wyeliminować efekty toksyczne, w tym wystąpienie OS pod ich wpływem.

otrzymano: 2018.06.15 · zaakceptowano: 2018.07.10

Piśmiennictwo

1. Heiligtag F.J., Niederberger M.: The fascinating world of nanoparticle research. *Materials today* 2013, 16(7–8): 262–271.
2. Runowski M.: Nanotechnologia – nanomateriały, nanocząstki i wielofunkcyjne nanostruktury typu rdzeń/powłoka. *Chemik*. 2014, 68(9): 766–770.
3. Trzeciak A.M., Ziółkowski J.J.: Nanocząsteczkowe katalizatory palladowe w reakcjach tworzenia wiązań C–C. *Wiad Chem.* 2009, 63(1–2): 1–15.
4. Krajezewski J., Kudelski A.: Fotochemiczna synteza nanocząstek srebra i złota. *Wiad Chem.* 2015, 69(3–4): 171–195.
5. Fu P.P., Xia Q., Hwang H.M., Ray P.C., Yu H.: Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *J Food Drug Anal.* 2014, 22(1): 64–75.
6. Solarska-Ściuk K., Gajewska A., Skolimowski J., Mitura K., Bartosz G.: Stimulation of production of reactive oxygen and nitrogen species in endothelial cells by unmodified and Fenton-modified ultradisperse detonation diamond. *Biotechnol Appl Biochem.* 2013, 60(2): 259–265.
7. Feng X., Chen A., Zhang Y., Wang J., Shao L., Wei L.: Central nervous system toxicity of metallic nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2015, 10(1): 4321–4340.
8. Vlastou E., Gazouli M., Ploussi A., Platoni K., Efstathopoulos E.P.: Nanoparticles: nanotoxicity aspects. *J Phys Conf Ser.* 2017, 931(1): 012020.
9. Bleeker E.A.J., de Jong W.H., Geertsma R.E. et al.: Considerations on the EU definition of a nanomaterial: Science to support policy making. *Reg Tox Pharm.* 2013, 65(1): 119–125.
10. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial (2011/696/EU). *Official Journal L* 275: 38–40.
11. Stone V., Miller M.R., Clift M.J.D., Elder A. et al.: Nanomaterials Versus Ambient Ultrafine Particles: An Opportunity to Exchange Toxicology Knowledge. *Environ Health Perspect.* 2017, 125(10): 106002–1–106002–12.
12. Buzea C., Pacheco I.: Nanomaterials and their Classification. W: Shukla A. (ed.) *EMR/ESR/EPR Spectroscopy for Characterization of Nanomaterials*. *Advanced Structured Materials*, vol 62. Edition 1st. New Delhi: Springer, 2017.
13. Buzea C., Pacheco II, Robbie K.: Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases.* 2007, 2(4): MR17–71.
14. Science for Environment Policy Assessing the environmental safety of manufactured nanomaterials. W: In-depth Report 14 produced for the European Commission, DG Environment by the Science Communication Unit, UWE, Bristol, 2017. Dostępny: <http://ec.europa.eu/science-environment-policy> (stan z 15.05.2018).
15. Thomas S.P., Al-Mutairi E.M., De S.K.: Impact of Nanomaterials on Health and Environment. *Arab J Sci Eng.* 2013, 38(3): 457–477.
16. Dębek P., Feliczak-Guzik A., Nowak I.: Nanostruktury – ogólne informacje. Zastosowanie nanoobjektów w medycynie i kosmetologii. *Postepy Hig Med Dosw (online)*. 2017, 71: 1055–1062.
17. Moniczewski A., Gawlik M., Smaga I., Niedzielska E., Krzek J., Przegaliński E., Pera J., Filip M.: Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 1. Chemical aspects and biological sources of oxidative stress in the brain. *Pharmacol Rep.* 2015, 67(3): 560–568.
18. Meo S.Di., Reed T.T., Venditti P., Victor V.M.: Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2016, ID 1245049: 44.

19. Zuo L., Zhou T., Pannell B.K., Ziegler A.C., Best T.M.: Biological and physiological role of reactive oxygen species--the good, the bad and the ugly. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015, Tom 214(3): 329–348.
20. Sun H., Yan G., Zhou H.: Nanoparticles-Induced Oxidative Stress. W: Yan B., Zhou H., Gardea-Torresdey J. (eds) *Bioactivity of Engineered Nanoparticles. Nanomedicine and Nanotoxicology*. Edition 1st, Springer, Singapore 2017.
21. Reipa V., Atha D.H.: *Nanomaterials and Oxidative stress. Challenges*. 2018, 9(1): 17.
22. Ee B.W.S., Khanna P., Teng N.C., Hun B.G. Et al.: *Nanotoxicology: Toxicity Evaluation, Risk Assessment and Management*. Edition: 1st, CRC Press, Florida, USA 2018.
23. Huang YW., Wu C.H., Aronstam R.S.: Toxicity of Transition Metal Oxide Nanoparticles: Recent Insights from *in vitro* Studies. *Materials (Basel)*. 2010, 3(10): 4842–4859.
24. Manke A., Wang L., Rojanasakul Y.: Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *BioMed Res Inter*, 2013, 15.
25. Pacurari M., Yin X.J., Zhao J., Ding M. et al.: Raw single-wall carbon nanotubes induce oxidative stress and activate MAPKs, AP-1, NF-kappaB, and Akt in normal and malignant human mesothelial cells. *Environ Health Perspect*. 2008, 116(9): 1211–1217.
26. Mo Y, Wan R., Chien S., Tollerud D.J., Zhang Q.: Activation of endothelial cells after exposure to ambient ultrafine particles: the role of NADPH oxidase. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009, 236(2): 183–93.
27. Parveen A., Rizvi S.H.M. et al.: Intranasal exposure to silica nanoparticles induces alterations in pro-inflammatory environment of rat brain: Involvement of oxidative stress. *Toxicol Industrial Health*. 2017, 33(2): 119–132.
28. Tarantola M., Pietuch A., Schneider D., Rother J., Sunnick E. et al.: Toxicity of gold-nanoparticles: synergistic effects of shape and surface functionalization on micromotility of epithelial cells. *Nanotoxicology* 2011, 5(2): 254–268.
29. Andelman T., Gordonov S., Busto G. Moghe P.V, Riman R.E.: Synthesis and cytotoxicity of Y₂O₃ nanoparticles of various morphologies. *Nanoscale Res Lett*. 2010, 5(2): 263–273.
30. Wan J., Wang J.H., Liu T., Xie Z., Yu X.F., Li W: Surface chemistry but not aspect ratio mediates the biological toxicity of gold nanorods *in vitro* and *in vivo*. *Sci Rep*. 2015, 5(11398): 1–16.