

INSTYTUT MEDYCyny DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ  
IM. M. MOSSAKOWSKIEGO PAN

ZAKŁAD NEUROCHEMII  
PRACOWNIA PATONEUROCHEMII

**JOANNA SKALSKA**

**BADANIE PROOKSYDACYJNEGO POTENCJAŁU  
NANOCZĄSTEK SREBROWYCH W MÓZGU  
SZCZURA W MODELU PRZEWLEKŁEGO  
NARAŻENIA**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem:  
dr hab. n. med. Lidii Strużyńskiej, prof. IMDiK

Warszawa 2017



Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie zostały częściowo opublikowane w pracach:

- **Joanna Skalska**, Beata Dąbrowska-Bouta, Lidia Strużyńska (2016); Oxidative stress in rat brain but not in liver following oral administration of a low dose of nanoparticulate silver. *Food and Chemical Toxicology* 97: 307-315 (IF: 3,440)
- **Joanna Skalska**, Małgorzata Frontczak-Baniewicz, Lidia Strużyńska (2015); Synaptic degeneration in rat brain after prolonged oral exposure to silver nanoparticles. *Neurotoxicology* 46; 145-154 (IF: 3,123)

Badania, których wyniki umieszczono w niniejszej pracy doktorskiej zostały wykonane częściowo w ramach funduszy pochodzących z projektu badawczego finansowanego przez: MNiSW grant nr: NN401619938 oraz funduszy statutowych przyznanych przez MNiSW dla IMDiK PAN.

# Spis treści

Spis treści.....	4
Wykaz skrótów .....	7
Streszczenie .....	11
Abstract .....	14
1. Wstęp .....	17
1.1. Wprowadzenie .....	17
1.2. Srebro jonowe a nanocząstki srebra .....	18
1.2.1. Zastosowanie i toksyczność srebra jonowego.....	18
1.2.2. Aktualne i potencjalne zastosowania nanocząstek srebra w medycynie i życiu codziennym .....	20
1.3. Drogi narażenia i biodystrybucja AgNPs w organizmach ssaków.....	23
1.4. Toksyczność AgNPs w świetle dotychczasowych badań .....	26
1.4.1. Toksyczność względem mikroorganizmów .....	26
1.4.2. Toksyczność AgNPs dla ssaków .....	28
1.5. Mechanizmy toksyczności AgNPs w świetle badań <i>in vitro</i> oraz <i>in vivo</i> .....	29
1.5.1. Parametry fizykochemiczne wpływające na toksyczność AgNPs .....	30
1.5.1.1. Wielkość i typ pokrycia.....	30
1.5.1.2. Uwalnianie jonów Ag <sup>+</sup> z powierzchni .....	32
1.5.2. Stres oksydacyjny i zaburzenia funkcji mitochondriów indukowane przez AgNPs .....	33
1.5.3. Indukcja stanu zapalnego i śmierć komórki pod wpływem AgNPs .....	38
1.6. Neurotoksyczność AgNPs w świetle dotychczasowych badań <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> .....	41
1.6.1. Wpływ na funkcjonowanie bariery krew-mózg.....	41
1.6.2. Toksyczność komórkowa.....	44
2. Założenia i cel pracy.....	49
3. Materiały i metody .....	50
3.1. Nanocząstki srebra i ich charakterystyka .....	50
3.2. Zwierzęta doświadczalne.....	50
3.3. Grupy doświadczalne i model narażenia na niską dawkę AgNPs.....	50
3.4. Przygotowanie materiału do badań .....	51
3.4.1. Izolacja narządów i przygotowanie homogenatów do poszczególnych oznaczeń biochemicznych .....	51

3.4.2. Preparatyka homogenatów mózgowych i wątrobowych do oznaczeń techniką Western blot .....	52
3.5. Oznaczenie zawartości srebra w surowicy i narządach zwierząt z użyciem spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie wzbudzonej (ICP- MS) .....	53
3.6. Analiza obecności srebra w mózgu z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) oraz analiza zmian ultrastrukturalnych w mózgu szczurów eksponowanych na AgNPs/Ag <sup>+</sup> .....	53
3.7. Oznaczenia biochemiczne .....	54
3.7.1. Oznaczenie stężenia białka w homogenatach metodą Lowry'ego .....	54
3.7.2. Oznaczenie poziomu reaktywnych form tlenu w homogenatach przy użyciu sondy fluorescencyjnej DCF .....	54
3.7.3. Oznaczenie peroksydacji lipidów błon komórkowych .....	55
3.7.4. Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) .....	55
3.7.5. Oznaczenie aktywności katalazy (CAT) .....	56
3.7.6. Oznaczenie stężenia glutationu zredukowanego i całkowitego .....	57
3.7.7. Oznaczenie aktywności peroksydazy glutationowej (GPx) .....	58
3.7.8. Oznaczenie aktywności reduktazy glutationowej (GR) .....	58
3.8. Elektroforeza białka i immunodetekcja metodą Western blot .....	58
3.8.1. Rozdział elektroforetyczny białek .....	58
3.8.2. Elektrotransfer białek .....	59
3.8.3. Immunodetekcja białek .....	59
3.9. Oznaczanie mitochondrialnego potencjału błonowego .....	61
3.10. Analiza statystyczna .....	62
4. Wyniki .....	63
4. 1. Charakterystyka badanych nanocząstek srebra .....	63
4.2. Zawartość srebra w surowicy i narządach zwierząt eksponowanych na AgNPs lub jony srebra .....	65
4.3. Potwierdzenie obecności srebra w mózgu zwierząt eksponowanych na AgNPs oraz analiza zmian ultrastrukturalnych w obrębie kory mózgowej i hipokampa zwierząt z wykorzystaniem TEM .....	66
4.4. Analiza zmian wywołanych przez AgNPs i jony srebra w obrębie synaps .....	70
4.4.1. Zmiany ultrastrukturalne .....	70
4.4.2. Poziom białek presynaptycznych i postsynaptycznych w homogenatach mózgowych .....	76
4.5. Ocena zdolności nanocząstek srebra i jonów srebra do wywoływania stresu oksydacyjnego. Porównanie wybranych markerów stresu oksydacyjnego oraz aktywności enzymatycznych i nieenzymatycznych układów antyoksydacyjnych w mózgu i wątrobie .....	79
4.5.1. Wpływ AgNPs i jonów srebra na poziom reaktywnych form tlenu oraz poziom peroksydacji lipidów w mózgu i wątrobie szczurów eksponowanych .....	79

4.5.2. Wpływ AgNPs i jonów srebra na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i katalazy (CAT) w mózgu i wątrobie szczurów eksponowanych.....	82
4.5.3. Wpływ AgNPs i jonów srebra na poziom glutationu całkowitego (tGSH) oraz stosunek glutationu zredukowanego do utlenionego (GSH/GSSG) w mózgu i wątrobie szczurów eksponowanych.....	85
4.5.4. Wpływ AgNPs i jonów srebra na aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) i reduktazy glutationowej (GR) w mózgu i wątrobie szczurów eksponowanych.....	87
4.6. Ocena zdolności nanocząstek srebra i jonów srebra do indukcji cytokin prozapalnych oraz śmierci komórkowej w mózgu i wątrobie na podstawie wybranych markerów apoptozy i autofagii. ....	90
4.6.1. Wpływ AgNPs i jonów srebra na poziom interleukiny 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) i interleukiny 6 (IL-6) w mózgu i wątrobie szczurów eksponowanych .....	90
4.6.2. Wpływ nanocząstek srebra i jonów srebra na mitochondrialny potencjał błonowy w mózgu i wątrobie zwierząt eksponowanych .....	93
4.6.3. Poziom wybranych markerów autofagii (bekliny 1, białka MAP LC3-II) w warunkach ekspozycji na AgNPs/Ag <sup>+</sup> w mózgu i wątrobie .....	95
4.6.4. Poziom białka antyapoptotycznego (Bcl-2) i białka proapoptotycznego (Bax) w warunkach ekspozycji na AgNPs/Ag <sup>+</sup> w mózgu i wątrobie .....	98
5. Dyskusja.....	102
5.1. Zasadność użycia modelu .....	103
5.2. Wpływ AgNPs i jonów srebra na zakończenia synaptyczne i ultrastrukturę neuropilu .....	106
5.3. AgNPs a stres oksydacyjny, stan zapalny i śmierć komórkowa.....	112
6. Podsumowanie wyników.....	122
7. Wnioski .....	123
8. Bibliografia.....	124

## Wykaz skrótów

ADP -	- adenozydodifosforan (ang. <i>adenosine diphosphate</i> )
AgNPs	- nanocząstki srebra, nanosrebro (ang. <i>silver nanoparticles</i> )
ANOVA	- analiza wariancji (ang. <i>analysis of variance</i> )
ATP	- adenozyntroójfosforan (ang. <i>adenosine triphosphate</i> )
Bax	- białko proapoptotyczne (ang. <i>Bcl-2-associated X protein</i> )
BBB	- bariera krew-mózg (ang. <i>blood-brain barrier</i> )
Bcl-2	- białko antyapoptotyczne (ang. <i>B-cell lymphoma 2</i> )
BSA	- albumina surowicy bydłowej (ang. <i>bovine serum albumin</i> )
CAT	- katalaza (ang. <i>catalase</i> )
CNP-aza	- 2'3'-cykliczna nukleotydowa fosfodiesteraza (ang. <i>2'3'-cyclic nucleotide phosphodiesterase</i> )
DCF	- 2',7'-dichlorofluoresceina (ang. <i>2',7'-dichlorofluorescein</i> )
DLS	- metoda dynamicznego rozpraszania światła (ang. <i>dynamic light scattering</i> )
DTNB	- kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy) [ang. <i>5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)</i> ]
DTT	- ditiotreitol (ang. <i>dithiothreitol</i> )
EC	- komórki endotelialne (ang. <i>endothelial cells</i> )
EDTA	- kwas wersenowy, kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EGTA	- kwas etylenoglikol-OO'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N'-tetraoctowy [ang. <i>ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether) tetraacetic acid</i> ]
GAPDH	- dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> )
GPx	- peroksydaza glutationowa (ang. <i>glutathione peroxidase</i> )
GR	- reduktaza glutationowa (ang. <i>glutathione reductase</i> )
GSH	- glutation, zredukowany glutation (ang. <i>glutathione, reduced glutathione</i> )
GSSG	- disiarczek glutationu, utleniony glutation (ang. <i>glutathione disulfide, oxidized glutathione</i> )
GST	- S-transferaza glutationowa (ang. <i>glutathione S-transferase</i> )

H <sub>2</sub> DCF-DA	- dwuoctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny
HEPES	- kwas 2-(4-(2-hydroksyetylo)piperazyno-1-ylo)etanolo-sulfonowy [ang. <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> ]
HIV-1	- ludzki wirus niedoboru odporności typu 1 (ang. <i>human immunodeficiency virus</i> )
HO-1	- oksigenaza hemowa-1 (ang. <i>heme oxygenase-1</i> )
HSP	- białka szoku cieplnego (ang. <i>heat shock proteins</i> )
ICP-MS	- spektrometria mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie wzbudzonej (ang. <i>inductively coupled plasma – mass spectrometry</i> )
IL	- interleukina (ang. <i>interleukin</i> )
Ig	- immunoglobulina (ang. <i>immunoglobulin</i> )
INT	- 2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenol)-5-chlorek fenyltetrazoliny
JNK	- kinaza domeny N-końcowej białka Jun (ang. <i>c-Jun N-terminal kinases</i> )
LDL	- lipoproteina niskiej gęstości (ang. <i>low-density lipoprotein</i> )
LTP	- długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. <i>long-term potentiation</i> )
MAG	- glikoproteina związana z mieliną (ang. <i>myelin associated glycoprotein</i> )
MAP1 LC3	- białko związane z mikrotubulami (ang. <i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i> )
MAP LC3-I	- forma cytozolowa MAP1 LC3
MAP LC3-II	- forma MAP1 LC3 związana z wewnętrzną błoną autofagosomu
MCP-1	- białko chemotaktyczne monocytów (ang. <i>monocyte chemotactic protein 1</i> )
MDA	- dwualdehyd malonylowy (ang. <i>malondialdehyde</i> )
MIP-2	- białko hamujące makrofagi 2 (ang. <i>macrophage inhibitory protein 2</i> )
MOG	- glikoproteina mieliny i oligodendrocytów (ang. <i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i> )
MT	- metalotioneina (ang. <i>metallothionein</i> )



NADPH	- zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego (ang. <i>reduced form nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> )
NMDAR	- receptor glutaminergiczny dla kwasu N-metylo-D-asparaginowego, receptor NMDA (ang. <i>N-methyl-D-aspartate receptor</i> )
NOAEL	- poziom substancji niewywołujący dających się zaobserwować szkodliwych skutków (ang. <i>no observable adverse effect level</i> )
NOS	- syntaza tlenu azotu (ang. <i>nitric oxide synthase</i> )
NPs	- nanocząstki (ang. <i>nanoparticles</i> )
OEL	- dopuszczalna wartość narażenia zawodowego (ang. <i>occupational exposure limit</i> )
OUN	- ośrodkowy układ nerwowy
PMSF	- fluorek fenylometylosulfonylu (ang. <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> )
PON1	- paraoksonaza 1 (ang. <i>paraoxonase 1</i> )
PBS	- roztwór soli fizjologicznej w buforze fosforanowym (ang. <i>phosphate buffered saline</i> )
PSD-95	- białko 95 gęstości postsynaptycznej (ang. <i>postsynaptic density protein 95</i> )
PVP	- poliwinylpirolidon (ang. <i>polyvinylpyrrolidone</i> )
ROS	- reaktywne formy tlenu, wolne rodniki tlenowe (ang. <i>reactive oxygen species</i> )
SDS	- dodecylosiarczan sodu (ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	- elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z dodecylosiarczanem sodu (ang. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SOD	- dysmutaza ponadtlenkowa (ang. <i>superoxide dismutase</i> )
TBARS	- substancje reagujące z kwasem 2-tiobarbiturowym (ang. <i>2-thiobarbituric acid reactive substances</i> )
TEM	- transmisyjny mikroskop elektronowy (ang. <i>transmission electron microscope</i> )
TGF- $\beta$	- transformujący czynnik wzrostu beta (ang. <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> )

tGSH	- glutation całkowity (ang. <i>total glutathione</i> )
TNB	- kwas 5-tio-2-nitrobenzoesowy (ang. <i>5-thio-2-nitrobenzoic acid</i> )
TNF- $\alpha$	- czynnik martwicy nowotworu (ang. <i>tumour necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
TRX	- układ tioredoksyny (ang. <i>thioredoxin</i> )
XOD	- oksydaza ksantynowa (ang. <i>xanthine oxidase/dehydrogenase</i> )
ZO	- grupa białek połączeń ścisłych (łac. <i>zonula occludens</i> )

## Streszczenie

W ciągu ostatniej dekady wzrosło zainteresowanie nanocząstkami srebra (AgNPs) ze względu na wyjątkowe właściwości, które pozwalają na ich zastosowanie w licznych produktach używanych w medycynie, jak również w różnych gałęziach przemysłu (inżynieria, przemysł spożywczy i odzieżowy). Są one również obecne w wielu przedmiotach codziennego użytku (m.in. bielizna o właściwościach antyzapachowych, ręczniki, środki higieny, pasty do zębów, kosmetyki, butelki do karmienia dla dzieci oraz filtry do wody i powietrza) ze względu na ich silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe.

W medycynie stosuje się je w materiałach opatrunkowych w celu przyspieszenia gojenia się ran oraz w rosnącej liczbie narzędzi i wyrobów medycznych (m.in. narzędzia chirurgiczne, protezy kości, stenty, implanty układu sercowo-naczyniowego, rurki intubacyjne, cewniki żyłne i urologiczne), w celu zmniejszenia ryzyka zakażenia podczas zabiegów i ograniczenia tworzenia się biofilmu bakteryjnego. Uważa się, że AgNPs mogą stać się rozwiązaniem alternatywnym wobec obecnie stosowanych leków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, co pomoże ograniczyć problem wielolekooporności wśród bakterii. Oprócz działania przeciwbakteryjnego, przeciwgrzybiczego i przeciwwirusowego AgNPs posiadają także inne cechy, takie jak: stabilna struktura, duża powierzchnia w porównaniu do objętości, wysoka reaktywność w stosunku do układów biologicznych, zdolność przenikania przez bariery biologiczne, specyficzne właściwości optyczne (głównie rozproszenie i wzrost absorpcji promieniowania elektromagnetycznego), właściwości fototermiczne oraz łatwość modyfikacji ich powierzchni. Dzięki temu mogą one także znaleźć zastosowanie w diagnostyce, obrazowaniu, leczeniu nowotworów oraz jako nośniki leków (zwłaszcza w terapii nowotworów i chorób ośrodkowego układu nerwowego).

AgNPs budzą wielkie nadzieje związane z potencjalnymi korzyściami płynącymi z ich stosowania, ale stwarzają także trudne do przewidzenia ryzyko ich interakcji z układami biologicznymi. Zwiększająca się z każdym rokiem liczba dostępnych produktów codziennego użytku, może mieć negatywny wpływ na zdrowie człowieka oraz środowisko, ponieważ AgNPs są uwalniane z tych produktów do ekosystemów lądowych i wodnych.

Dotychczas przeprowadzono liczne badania mechanistyczne z użyciem linii komórkowych oraz badania mające na celu określenie wpływu AgNPs na środowisko i organizmy wodne, wciąż jednak niewiele wiadomo o ich wpływie na organizmy wyższe. Wykazano, że mogą one bezpośrednio lub pośrednio (na skutek uwalniania z nanoproduktów) przedostawać się do krążenia ogólnego, podane drogą pokarmową, wziewną, przez skórę lub

dożylnie. Badania biodystrybucji AgNPs potwierdziły ich obecność w mózgu zwierząt eksponowanych, niezależnie od drogi podania, oraz ich zdolność do kumulowania się w parenchymie mózgowej. Ze względu na wymienione wcześniej powody oraz potwierdzoną w badaniach *in vitro* toksyczność AgNPs, konieczne jest zbadanie ich neurotoksyczności z zastosowaniem modeli zwierzęcych.

Dlatego celem niniejszej rozprawy było zbadanie potencjalnej zdolności stabilizowanych cytrynianem AgNPs ( $10 \pm 4$  nm) do indukcji stresu oksydacyjnego, jako mechanizmu ich neurotoksycznego działania, u dorosłych samców szczurów szczepu Wistar. Zwierzętom podawano AgNPs drogą pokarmową przez 14 kolejnych dni w niskiej dawce 0,2 mg/kg m.c. imitującej narażenie środowiskowe. Wyniki porównano z wynikami uzyskanymi w grupie eksponowanej na taką samą dawkę jonów srebra (cytrynian srebra) oraz w grupie kontrolnej, która otrzymywała sól fizjologiczną.

W pierwszym etapie badań wykazano, że zastosowane AgNPs są wchłaniane z przewodu pokarmowego do układu krwionośnego. W tym celu oznaczono poziom srebra w surowicy zwierząt 3h, 5h i 8h po jednorazowym podaniu AgNPs z użyciem spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie wzbudzonej (ICP-MS). Zdolność przechodzenia AgNPs do parenchymy mózgowej szczurów po 14-dniowej ekspozycji została potwierdzona przy użyciu metody transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Obecność nanogranul stwierdzono pomiędzy blaszkami osłonek mielinowych aksonu, w lizosomach i mitochondriach komórek nerwowych oraz w lizosomach komórek endotelialnych mikronaczyń mózgowych.

Ponadto u zwierząt eksponowanych na AgNPs oraz w mniejszym stopniu – na jony srebra wykryto zmiany ultrastrukturalne w obrębie neuronów korowych i hipokampalnych w postaci obrzękniętych mitochondriów z fragmentacją grzebieni mitochondrialnych, nadreaktywności aparatu Golgiego oraz zaburzeń cytoszkieletu jądrowego. Zbadano również wpływ AgNPs na ultrastrukturę synaps w korze mózgowej i hipokampie szczurów eksponowanych oraz na ekspresję wybranych białek synaptycznych. Analiza elektronogramów wykazała liczne zmiany ultrastrukturalne, takie jak obrzęk zakończeń synaptycznych, rozmytą strukturę szczelin synaptycznych, zwiększoną gęstość pęcherzyków synaptycznych, w części presynaptycznej luźne skupiska pęcherzyków synaptycznych w neuropilu oraz obecność ciał mielinopodobnych i ciał wielopęcherzykowych. Stwierdzono, że AgNPs są silniejszym czynnikiem uszkadzającym synapsy niż jony srebra, a bardziej podatny na uszkodzenia jest hipokamp. Ponadto wykazano, że niektóre zmiany (luźne skupiska pęcherzyków synaptycznych w neuropilu i ciała mielinopodobne) są charakterystyczne wyłącznie dla nanocząstek. W obydwu grupach eksponowanych zmianom ultrastrukturalnym towarzyszyły

istotne statystycznie obniżenie poziomu ekspresji białek presynaptycznych (synapiny I i synaptofizyny), jak również białka PSD-95, będącego składnikiem zagęszczeń postsynaptycznych.

W kolejnym etapie badań oceniono zdolność AgNPs do generowania stresu oksydacyjnego w mózgu i w wątrobie zwierząt eksponowanych. Analiza markerów stresu oksydacyjnego i aktywności układów antyoksydacyjnych wykazała, że ekspozycja na AgNPs powoduje istotne statystycznie podwyższenie poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) w obu narządach, jak również peroksydację lipidów (wyrażoną jako poziom MDA) oraz istotny statystycznie wzrost aktywności peroksydazy glutationowej (GPx) i reduktazy glutationowej (GR) w mózgu zwierząt eksponowanych w porównaniu do zwierząt kontrolnych otrzymujących sól fizjologiczną. Z kolei, w grupie eksponowanej na cytrynian srebra obserwowano istotne statystycznie podwyższenie poziomu ROS i MDA w obu narządach w porównaniu do grupy kontrolnej. Aktywność GPx i GR w mózgu oraz aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i katalazy (CAT) w wątrobie zwierząt eksponowanych również istotnie statystycznie wzrastała. Równoległe, zarówno AgNPs jak i jony srebra wywoływały istotne statystycznie obniżenie stosunku glutationu zredukowanego do utlenionego (GSH/GSSG) w mózgu zwierząt eksponowanych.

Dodatkowo, zbadano wpływ obu form srebra na indukcję cytokin prozapalnych (w oparciu o poziom ekspresji IL-1 $\beta$  i IL-6) oraz procesu śmierci komórkowej (w oparciu o poziom markerów autofagii – bekliny 1 i MAP LC3-II oraz apoptozy – Bcl-2 i Bax). Nie wykazano zmian w poziomie cytokin prozapalnych w żadnej z eksponowanych grup. Stwierdzono natomiast, że ekspozycja na AgNPs wywołuje wzrost poziomu bekliny 1 i MAP LC3-II w mózgu oraz istotne statystycznie podwyższenie poziomu Bcl-2 i Bax w obu badanych narządach. Z kolei w grupie eksponowanej na jony srebra stwierdzono spadek poziomu Bcl-2 w mózgu, wzrost poziomu Bax w mózgu i w wątrobie oraz wzrost poziomu Bcl-2 w wątrobie szczurów.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują, że ekspozycja na niską dawkę AgNPs wywołuje umiarkowany stres oksydacyjny w mózgu szczurów eksponowanych, któremu towarzyszą zmiany ultrastrukturalne w neuronach i zakończeniach synaptycznych. Dawka ta nie wywołuje odpowiedzi zapalnej ani śmierci komórek w mózgu, może jednak aktywować proces autofagii.

## Abstract

Over the last decade, silver nanoparticles (AgNPs) have attracted much attention because of their unique properties which endorse them for a wide spectrum of applications in medicine and related fields (engineering, food and textiles industry). They are also utilized in many consumer products (e.g. underwear, towels, cleansers, toothpaste, cosmetics, nursing bottles, and water and air filters), above all because of their strong antimicrobial agents.

In medicine they are used in wound dressings to enhance wound healing and in increased number of medical devices (e.g. surgical instruments, bone prostheses, stents, cardiovascular implants, endotracheal tubes, central venous and bladder catheters) to minimize the risk of infections during surgery and prevent formation of biofilm. It is also believed that AgNPs can become a promising alternative to conventional antimicrobials and help us to reduce the problem of multidrug-resistant bacteria. Apart from antimicrobial activity against bacteria, fungi and viruses, AgNPs also possess a series of features like: stable morphology, high surface to volume ratio, high reactivity with biological systems, ability to cell penetration and unique optical (mainly light scattering and absorption), photothermal and facile surface chemical properties which allow to utilize them in some other medical fields such as biodiagnosis, imaging, cancer therapy and drug delivery systems (especially in the treatment of cancer and brain disorders).

AgNPs have led a great excitement about potential benefits of using them, but they have also created a risk of undesirable hazardous interaction with biological systems. The presence of AgNPs in an increasing number of commercially available products can have a negative influence on human health and the environment, because AgNPs are released from nanoproducts to terrestrial and aquatic ecosystems.

A number of studies with using cell lines have been undertaken to better understand the mechanisms of their toxicity and the their impact on the environment and aquatic organisms was also assessed, but little is known about their toxicity in organisms. It was shown that they can directly or indirectly (via nanoparticle's dissolution from nanoproducts) access to systemic circulation by oral administration, inhalation, through the skin or intravenous exposure. The biodistribution research has revealed that AgNPs can reach the brain of exposed animals regardless of the route of exposure and accumulate in brain structures. Because of these reasons and evidence of their toxicity from mainly *in vitro* studies, it is crucial to investigate the possible neurotoxic effects of them with using animal models.

Because of that the aim of the present doctoral thesis was to investigate the ability of citrate-stabilized silver nanoparticles ( $10 \pm 4$ nm in diameter) to induction of oxidative stress, which is almost one of the mechanisms of their neurotoxicity, in adult male Wistar rats after repeated oral exposure for 14 consecutive days, using a low dose of 0.2 mg AgNPs/kg b.w., which simulates environmental exposure. We compared these results with the results caused by the same dose of ionic silver (silver citrate) and with results from a negative control group, which was exposed to saline.

In the initial phase of this study, we showed that AgNPs were absorbed from gastrointestinal tract to systemic circulation. We determined the concentration of silver in plasma of rats at 3h, 5h and 8h after single administration by using inductively coupled plasma – mass spectrometry (ICP-MS). The ability of AgNPs to cross the blood-brain barrier of rats after 14 days of administration was confirmed with using transmission electron microscopy (TEM). The nanosized granules were located mainly between lamellae of myelin sheaths of axons, inside the lysosomes and mitochondria of neurons and inside the lysosomes of endothelial cells of brain microvessels.

Then, we found the ultrastructural changes in cortical and hippocampal neurons (swollen mitochondria with fragmentation of cristae surface, hyper- reactive Golgi apparatus, and tubular structures in cell nucleus) of AgNP-exposed animals and to a lesser extent in silver ion-exposed animals. Moreover, we examined the effect of AgNPs on ultrastructure of synapses in forebrain cortex and hippocampus of rats, and the level of specific synaptic proteins. TEM analysis revealed multiple ultrastructural changes including swelling of nerve endings, blurred structure of synaptic cleft, enhanced density of synaptic vesicles in the presynaptic part, disturbed synaptic membrane with free synaptic vesicles, myelin-like bodies and multi-vesicular bodies. It was also shown that AgNPs caused more severe changes in synapses than silver ions, mainly in in the hippocampus region. Additionally, several features were found to be specific for nanoparticle' form (disturbed synaptic membrane with free synaptic vesicles and myelin-like bodies). In both of silver groups the ultrastructural changes are support by statistically significant decreased levels of the presynaptic proteins (synapsin I and synaptophysin), as well as PSD-95 protein which is an indicator of postsynaptic densities.

In the second part we assessed the ability of AgNPs to trigger oxidative stress in brain and liver of exposed rodents. The analysis of markers of oxidative stress and activities of antioxidant systems revealed that in AgNP-exposed animals, the level of reactive oxygen species (ROS) in both organs, as well as lipid peroxidation (measured as a concentration of MDA), glutathione peroxidase (GPx) activity and glutathione reductase (GR) activity in brain

were found to be significantly higher in comparison to the control group receiving saline. Then, in group exposed to silver citrate we also observed increased ROS and MDA levels in both organs relative to the control group. Activities of GPx and GR in brain so as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in liver of exposed animals were also elevated. Besides, AgNPs and silver ions were both found to trigger statistically significant decrease in the reduced-to-oxidized glutathione ratio (GSH/GSSG) in brain of exposed rats.

Moreover, we examined the influence of AgNPs and silver ions on induction of proinflammatory cytokines (based on IL-1 $\beta$  and IL-6 protein expression) and cell death (based on autophagy markers – beclin 1 and MAP LC3-II protein expression; and apoptotic markers – Bcl-2 and Bax protein expression). We observed no changes in the levels of proinflammatory cytokines in both of silver groups. However, exposure to AgNPs caused increased the levels of beclin 1 and MAP LC3-II proteins in brain and increased the levels of Bcl-2 and Bax protein expression in both of tissues. In group of animals exposed to silver ions we observed decreased Bcl-2 level in brain and increased Bax levels in both of organs as well as increased Bcl-2 level in liver.

The results show that exposure to a very low dose of particulate silver triggers mild oxidative stress in the brain of exposed rats, which leads to ultrastructural changes in neurons and synapses. This dose did not cause the inflammatory response or cell death in brain, but triggered the activation of autophagy.



# 1. Wstęp

## 1.1. Wprowadzenie

Rozwój cywilizacji, poza pożytecznymi i przełomowymi osiągnięciami w wielu dziedzinach życia, prowadzi również do niebezpiecznej ingerencji człowieka w środowisko naturalne. Wywołane w nim zmiany mogą być groźne dla życia biologicznego, m.in. z powodu odprowadzania do atmosfery, akwenów i gleby substancji toksycznych. Rozwój nowych gałęzi przemysłu, szczególnie nanotechnologii – interdyscyplinarnej dziedziny nauki zajmującej się wytwarzaniem nanocząstek – może mieć trudne do przewidzenia skutki. W związku z tym, że nanomateriały wykorzystuje się w wielu branżach przemysłowych, m.in. w przemyśle chemicznym, elektronicznym, zbrojeniowym, samochodowym, odzieżowym, obuwniczym, spożywczym, kosmetycznym, farmaceutycznym oraz w medycynie i diagnostyce, nasuwają się pytania odnośnie ich toksyczności dla organizmów, wpływu na środowisko naturalne oraz konieczności wprowadzenia norm środowiskowego i zawodowego narażenia (Glenn, 2006; Mody i wsp., 2010; Raj i wsp., 2012; Ijaz, 2013; Chellaram, 2014; Hussein, 2015; Sun i wsp., 2015).

Nanocząstki (NPs) to struktury o rozmiarach nanometrycznych, których przynajmniej jeden z wymiarów nie przekracza 100 nm. Posiadają one unikatowe właściwości chemiczne, fizyczne i biologiczne, inne niż substancje, z których zostały wykonane. Mogą charakteryzować się zmienioną stabilnością termodynamiczną oraz odmiennymi właściwościami optycznymi, elektrycznymi i magnetycznymi w porównaniu do materiałów w skali makro (Kelsall, 2008; Reier, 2012). Kolejną, bardzo ważną ich cechą, jest wysoki stosunek powierzchni do masy, co prowadzi do zwiększenia ich aktywności chemicznej oraz do zmiany ich właściwości biologicznych w stosunku do „większych” struktur. Ponadto powierzchnię NPs można modyfikować poprzez wprowadzanie dodatkowych grup chemicznych, co umożliwia przyłączanie różnych ligandów, w tym również leków i przeciwciał (SCENIHR, 2009; Mody i wsp., 2010; Cronholm i wsp., 2013).

Nanocząstki stanowią naturalny składnik biosfery, gdyż są emitowane do atmosfery na skutek erozji, rozkładu i utleniania minerałów. Również erupcje wulkanów i pożary obszarów leśnych mogą być źródłem tymczasowego zwiększenia ich emisji do atmosfery. Jednak obecnie coraz większy odsetek nanocząstek w atmosferze stanowią NPs pochodzenia antropogenicznego. Są one obecne w sadzy powstającej w wyniku niecałkowitego spalania różnych materiałów, m.in. paliw i produktów pochodzenia roślinnego. Ponadto ich źródłem są przede wszystkim procesy nanotechnologiczne (Slezakova, 2013).

W ciągu ostatnich kilku dekad szczególne uznanie wśród nanomateriałów zyskały nanocząstki metali szlachetnych, a zwłaszcza nanocząstki srebra. Szacuje się, że ich roczna produkcja wynosi 5,5-550 ton (Piccinno, 2012), a nawet 7,2-716 ton (Massarsky i wsp., 2014b). Oprócz licznych medycznych i przemysłowych zastosowań, AgNPs są również intensywnie wykorzystywane w komercyjnie dostępnych produktach. Według wykazu produktów konsumenckich opartych na nanotechnologii (The Woodrow Wilson Inventory), stanowią one około 30% wszystkich nanoproduktów dostępnych na rynku (Rejeski, 2011).

Coraz częstsza ich obecność w życiu codziennym oraz brak gruntownej wiedzy na temat ich działań toksycznych mogą stanowić zagrożenie. Jest ono na tyle poważne, że nie tylko naukowcy, ale również agencje rządowe i prywatne organizacje zajmujące się ochroną zdrowia, podejmują działania w celu oceny toksyczności AgNPs (Tang i wsp., 2015).

## **1.2. Srebro jonowe a nanocząstki srebra**

### **1.2.1. Zastosowanie i toksyczność srebra jonowego**

Srebro (Ag) jest pierwiastkiem chemicznym z grupy metali przejściowych, znanym już od czasów starożytnych. Ze względu na to, że srebro należy do metali szlachetnych, znalazło ono zastosowanie jako waluta oraz surowiec do produkcji biżuterii, sztuców i naczyń. Nasi przodkowie wykorzystywali go również do konserwacji żywności, wody i mleka oraz do leczenia zakażonych ran i oparzeń, ponieważ Ag wykazuje silne właściwości przeciwbakteryjne. Ponadto stosowano je jako środek zapobiegawczy i leczniczy w infekcjach bakteryjnych (Klasen, 2000).

Wykazano, że Ag posiada szeroki zakres działania zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Mechanizm działania jonów srebra polega przede wszystkim na ich wiązaniu z grupami tiolowymi (-SH) aminokwasu cysteiny, który wchodzi w skład bakteryjnych białek strukturalnych i enzymatycznych. Konsekwencją tego oddziaływania jest zaburzenie funkcji błon biologicznych oraz zahamowanie aktywności enzymów, w tym także enzymów łańcucha oddechowego (Clement i wsp., 1994; Liau i wsp., 1997; Feng i wsp., 2000). Stwierdzono ponadto, że jony srebra mogą oddziaływać z DNA bakteryjnym, co zaburza replikację (Clement i wsp., 1994; Feng i wsp., 2000). Istnieją również doniesienia, że obecność srebra wewnątrz komórek bakteryjnych może nasilać produkcję reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*), powodujących oksydacyjne uszkodzenia białek, lipidów i DNA (Matsumura i wsp., 2003).

Na podstawie obserwacji przeprowadzonych w szpitalach, w których sole srebra (głównie azotan srebra i sól srebrowa sulfadiazyny) są często stosowane jako środki antyseptyczne przypuszcza się, że ryzyko rozwoju oporności na jony srebra wśród bakterii jest niewielkie (Silver, 2003).

Pomimo tego, że odkrycie antybiotyków i chemioterapeutyków w XX wieku przyczyniło się do ograniczenia znaczenia związków srebra w lecznictwie, to w pewnych dziedzinach medycyny są one wciąż nieocenione. Najszerzej wykorzystuje się ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe do leczenia poważnych ran oparzeniowych, gdzie stosuje się kremy i opatrunki zawierające ten pierwiastek. Ponadto pokryte srebrem opatrunki są używane w celu przyspieszenia gojenia się owrzodzeń, w tym także będących powikłaniem cukrzycy oraz ran pourazowych. Srebrem impregnuje się również sprzęt medyczny, m.in. cewniki i sztuczne zastawki serca, w celu zapobiegania tworzeniu się biofilmu bakteryjnego na ich powierzchni. Jest ono również obecne w amalgamacie stomatologicznym stosowanym do wypełniania ubytków oraz w kroplach do oczu używanych do leczenia ostrego, bakteryjnego zapalenia spojówek (Silver, 2003). Również filtry uzdatniające wodę są często wyposażone we wkłady srebrne (Clement i wsp., 1994).

Srebro jest także stosowane do produkcji filmów fotograficznych, styków elektrycznych, narzędzi chirurgicznych i spoiwa lutowniczego. Wykorzystuje się je również do produkcji sprzętu elektrycznego i elektronicznego, a największą zaletą tych urządzeń jest bardzo dobra przewodność elektryczna. Pierwiastek ten jest również używany jako katalizator reakcji utleniania, np. etylenu do tlenku etylenu, który służy jako półprodukt do produkcji poliestru.

Srebro jest uważane za dość bezpieczne dla człowieka, aczkolwiek długotrwałe doustne stosowanie form srebra rozpuszczalnych w wodzie (zwłaszcza srebra koloidalnego) lub przewlekłe narażenie na pyły mogą prowadzić do argyrii (srebrzycy). Objawia się ona nieodwracalną zmianą koloru skóry i błon śluzowych na siny lub niebieskoszary, szczególnie w miejscach eksponowanych na promienie słoneczne. W obrębie tych obszarów dochodzi do redukcji srebra jonowego do srebra metalicznego lub strącania się siarczku srebra. Akumulacja złogów srebra może nastąpić również w obrębie oczu. Srebrzyca dotyka głównie osoby pracujące w kopalniach srebra lub w fabrykach stosujących srebro w procesach produkcyjnych (Nordberg, 1988; ATSDR, 1990; Drake i wsp., 2005).

Stwierdzono również, że przyjęcie bardzo dużych dawek jonów srebra prowadzi do zatrucia ostrego, objawiającego się uszkodzeniami przewodu pokarmowego, silnymi bólami brzucha, biegunką oraz drgawkami (RAIS, 1992).

Badania na zwierzętach ujawniły natomiast, że przewlekła ekspozycja na niewielkie dawki jonów srebra prowadzi do przerostu mięśnia sercowego, niedokrwistości oraz patologicznych zmian w obrębie wątroby i nerek (RAIS, 1992; Drake i wsp., 2005).

### **1.2.2. Aktualne i potencjalne zastosowania nanocząstek srebra w medycynie i życiu codziennym**

Od kilkunastu lat stale rośnie zainteresowanie nanosrebrem ze względu na jego silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe (dos Santos i wsp., 2014). Przyczynił się do tego przede wszystkim szybki rozwój nanotechnologii wytwarzających znaczne ilości różnorodnych form nanosrebra oraz postępująca wśród bakterii antybiotykooporność.

Obecnie prowadzone są intensywne badania nad skutecznością różnych typów AgNPs w leczeniu zakażeń konkretnymi szczepami bakterii. Takie parametry jak wielkość (Morones i wsp., 2005; Lok i wsp., 2007; Ivask i wsp., 2014) i typ pokrycia nanocząstek (dos Santos i wsp., 2014) mogą mieć bowiem kluczowe znaczenie dla ich właściwości. Wskazuje się również możliwość zastosowania AgNPs w przypadku zakażeń grzybiczych (Gajbhiye i wsp., 2009; Ge i wsp., 2014) i wirusowych (Galdiero i wsp., 2011).

Szczególnych korzyści upatruje się w ich zastosowaniu w medycynie, choć są one również wykorzystywane w produktach stosowanych w życiu codziennym. Obecnie produkuje się narzędzia chirurgiczne (Eby i wsp., 2009) i rękawiczki pokryte AgNPs [<http://www.nanosilver.com.my/images/silversol/Silver1Sol-Coated-Glove.jpg>], które mają ograniczyć ryzyko zakażeń. Prowadzi się również badania nad impregnowanymi nanosrebrem protezami kości (Chen i wsp., 2008), rurkami intubacyjnymi (Loo i wsp., 2014), cewnikami urologicznymi (Samuel i wsp., 2004), cewnikami żylnymi i stentami (Ge i wsp., 2014). Takie rozwiązanie minimalizuje ryzyko infekcji w czasie zabiegu (Ge i wsp., 2014) oraz ogranicza odpowiedź zapalną (Chaloupka i wsp., 2010; Ge i wsp., 2014). Próbuje się pokrywać nimi również prezerwatywy w celu ograniczenia ryzyka przenoszenia wirusów drogą płciową (Mohammed Fayaz i wsp., 2012).

Również w ortopedii poszukuje się korzyści z zastosowania AgNPs, m.in. jako środka ograniczającego adhezję bakterii do implantów oraz pobudzającego aktywność osteoblastów (Bosetti i wsp., 2002; Qureshi i wsp., 2014). Zastępuje się także „tradycyjną” postać srebra w opatrunkach i żelach stosowanych do leczenia ran oparzeniowych jego formą „nano” (Wu i

wsp., 2014). Dodatek AgNPs skraca bowiem czas gojenia się owrzodzeń i oparzeń (Chaloupka i wsp., 2010). Na rynku są już dostępne opatrunki tego typu, przeznaczone do leczenia nie tylko ran oparzeniowych pierwszego i drugiego stopnia, ale również wrzodów czy pęcherzycy (Ge i wsp., 2014).

Ponadto trwają badania nad wykorzystaniem AgNPs w stomatologii, m.in. jako dodatku do implantów dentystycznych czy materiałów wypełniających ubytki zębów (Garcia-Contreras i wsp., 2011). Próbuje się je również stosować w medycynie regeneracyjnej jako komponent implantów i skaffoldów (Ge i wsp., 2014).

Kolejnym potencjalnym obszarem zastosowania AgNPs jest onkologia. Wykorzystuje się tutaj ich właściwości optyczne i fototermiczne. Wykazano, że AgNPs mają zdolność zamykania fotonów w swoim wnętrzu, co powoduje rozproszenie i wzrost absorpcji promieniowania elektromagnetycznego (Jain i wsp., 2008; Austin i wsp., 2014). Taka ich właściwość może zostać wykorzystana do wykrywania oraz niszczenia komórek nowotworowych, m.in. na skutek zwiększenia ich wrażliwości na radioterapię (Xu i wsp., 2009; Dreaden i wsp., 2012). Ich właściwości fototermiczne, tzn. zdolność do przekształcania energii fotonów w energię cieplną, mogą zostać wykorzystane w fototermicznej terapii nowotworowej (ang. *plasmonic photothermal therapy*), która bazuje na wrażliwości komórek nowotworowych na hipertermię (Jiang i wsp., 2015a). Ponadto, nanocząstki mogą zostać wykorzystane w terapii celowanej nowotworów, gdyż anatomiczne i fizjologiczne różnice między tkanką prawidłową a nowotworową sprzyjają akumulacji NPs wewnątrz patologicznych struktur (Liu i wsp., 2012a).

AgNPs są testowane również jako nanonośniki leków. Łatwość modyfikacji ich powierzchni umożliwia przyłączenie substancji leczniczych, przeciwciał skierowanych przeciwko specyficznym białkom komórkowym oraz systemów kontrolujących uwalnianie substancji leczniczych. Dzięki temu, jak również właściwościom fototermicznym, mogą przyczynić się do zwiększenia skuteczności farmakoterapii i równocześnie zmniejszyć toksyczność stosowanych substancji leczniczych (Parveen i wsp., 2012; Austin i wsp., 2014). Możliwość zastosowania takich wielofunkcyjnych nośników byłaby szczególnie pożądana w terapii nowotworów, dlatego też przeprowadzane są już pierwsze takie próby (Locatelli i wsp., 2014; Noh i wsp., 2015). Sprawdza się także ich skuteczność w leczeniu infekcji, m.in. przeprowadzono próby wykorzystania nośników opartych na Au-Ag NPs w modelu wirusowego zapalenia wątroby typu C (Jang i wsp., 2015).

Próbuje się je również wykorzystać w diagnostyce do monitorowania rozwoju choroby i wykrywania biologicznych układów biorących udział w patomechanizmie danej jednostki

chorobowej, ponieważ ich właściwości optyczne są zależne od otaczającego środowiska (Petryayeva i wsp., 2011). Wykazano ich potencjalną przydatność w diagnostyce choroby Alzheimera (Haes, 2004), jak również w wykrywaniu neuroprzekazników (Cincotto i wsp., 2014). Podjęto również próby wytworzenia biosensorów opartych na AgNPs, m.in. biosensorów DNA (Ting i wsp., 2009).

Prawdziwym wyzwaniem dla współczesnej medycyny jest znalezienie skutecznych i bezpiecznych strategii leczenia chorób ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Nieskuteczność istniejących terapii jest często związana z niemożnością przetransportowania substancji leczniczych przez barierę krew-mózg (BBB, ang. *blood-brain barrier*). Jest możliwe, że nanotechnologia dostarczy użytecznych narzędzi do tego celu, gdyż wiele typów NPs, w tym AgNPs, ma zdolność przenikania przez BBB. Dotychczas wykazano, że biokompatybilne i biodegradowalne polimerowe NPs mogą być użyte do leczenia takich infekcji OUN jak meningokokowe zapalenie opon mózgowych (Leite i wsp., 2015).

Kolejną gałęzią medycyny, która może zostać rozwinięta dzięki nanotechnologii, jest teragnostyka. Teragnostyka to połączenie nowoczesnej diagnostyki z terapią, co może być szczególnie użyteczne w leczeniu nowotworów. Zastosowanie wielofunkcyjnych nanoosników pozwoli na wczesne wykrywanie chorób, dostarczanie cytostatyków bezpośrednio do tkanek zajętych chorobą, zmniejszenie toksyczności cytostatyków oraz umożliwi szybką modyfikację terapii w przypadku jej nieskuteczności (Leite i wsp., 2015). Podjęto już próby stworzenia takich nanoteragnostycznych aplikacji bazujących na AgNPs, które nie tylko umożliwią transport substancji leczniczych i obrazowanie, ale także będą posiadać właściwości przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe (Locatelli i wsp., 2014; Mukherjee i wsp., 2014).

Medyczne zastosowania AgNPs, ale przede wszystkim coraz szerszy kontakt społeczeństwa z zawierającymi je nanoproductami codziennego użytku, wzbudzają obawy co do bezpieczeństwa ich stosowania. Ich potencjalny, długofalowy wpływ na środowisko wodne i lądowe oraz na ludzkie zdrowie wciąż nie jest jednoznacznie określony (Lee i wsp., 2010; Likus i wsp., 2013). Ponadto, w przypadku większości wyrobów producent nie podaje informacji o zawartości i wielkości cząstek nanokomponentów.

Wiadomo już, że AgNPs obecne m.in. w ubraniach, bieliźnie, skarpetach czy ręcznikach, są z nich stopniowo wypłukiwane podczas prania. Również nanocząstki występujące w środkach czystości, kosmetykach i środkach do codziennej pielęgnacji mogą łatwo przedostawać się do środowiska wodnego i kumulować się w nim (Benn i wsp., 2008; Benn i wsp., 2010), niekorzystnie wpływając na żyjące w nim organizmy (Volker i wsp., 2013;

Massarsky i wsp., 2014b; Ribeiro i wsp., 2014). Wraz ze wzrastającą produkcją nanomateriałów, rośnie również prawdopodobieństwo narażenia zawodowego na AgNPs, które w szczególności może dotyczyć osób ekspozowanych na nie drogą wziewną (Christensen i wsp., 2010).

Niektóre produkty codziennego użytku bazujące na AgNPs zostały wymienione w Tabeli 1.

**Tabela 1.** Wybrane produkty codziennego użytku zawierające AgNPs

-ubrania codziennego użytku	-smoczki i butelki dla dzieci
-odzież ochronna i robocza	-zabawki
-bielizna, skarpetki	-suplementy diety
-pościel	-farby
-ręczniki	-tapety
-żele pod prysznic, mydła	-filtry do wody
-dezodoranty	-filtry oczyszczające powietrze
-pasty i szczoteczki do zębów	-lodówki, zamrażarki i zmywarki
-kremy (gł. do cery trądzikowej)	-opakowania na żywność
-środki do higieny intymnej	-środki do dezynfekcji powierzchni
-detergenty do zmywania i środki piorące	-komputery i akcesoria komputerowe
<b>Tabela została sporządzona w oparciu o:</b>	
<a href="http://www.nanotechproject.org/process/assets/files/7039/silver_database_fauss_sept2_final.pdf">http://www.nanotechproject.org/process/assets/files/7039/silver_database_fauss_sept2_final.pdf</a>	

### 1.3. Drogi narażenia i biodystrybucja AgNPs w organizmach ssaków

Zwiększająca się z każdym kolejnym rokiem dostępność produktów zawierających AgNPs, podwyższa ryzyko ich przenikania do organizmu człowieka. Może ono zachodzić drogą pokarmową, wziewną, przez skórę lub w wyniku dożylnego podania (zastosowanie produktów medycznych).

Możliwość wnikania AgNPs do organizmu drogą wziewną (na skutek inhalacji kurzu lub pyłów je zawierających) lub też kontaktową dotyczy głównie pracowników zatrudnionych przy wytwarzaniu nanocząstek oraz produktów je zawierających. Z tego powodu pojawiają się pierwsze wytyczne dotyczące dopuszczalnych wartości narażenia na nanocząstki srebra w miejscu pracy (OEL, ang. *occupational exposure limit*). W danych literaturowych wskazano, że

OEL dla AgNPs w przypadku subchronicznego narażenia drogą wziewną powinien wynosić 0,19  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (Weldon i wsp., 2016).

Również osoby cierpiące na atopowe zapalenie skóry, łuszczycę lub mające uszkodzoną skórę mogą być narażone na przedostawanie się do krążenia AgNPs obecnych w kosmetykach, ubraniach czy bieliźnie (Monteiro-Riviere, 2014).

Droga pokarmowa jest jedną z najczęstszych dróg narażenia na nanosrebro. AgNPs mogą być celowo przyjmowane w postaci suplementów diety albo dostawać się do przewodu pokarmowego przypadkowo. AgNPs obecne w opakowaniach mogą być częściowo uwalniane do żywności, przy czym najczęściej ulegają przy tym modyfikacjom (utlenienie, agregacja), wpływającym na ich właściwości i toksyczność. Dotychczasowe badania wykazują, że proces uwalniania nie jest szczególnie wydajny, ale podwyższona temperatura i dłuższy czas kontaktu AgNPs z żywnością nasilają to zjawisko (Quadros i wsp., 2013; von Goetz i wsp., 2013; Artiaga i wsp., 2015). Podobnie jest w przypadku nanostruktur, które są składnikami past czy szczoteczek do zębów (Mackevica i wsp., 2016). Ponadto, wzrastające zanieczyszczenie środowiska nanocząstkami może doprowadzić do zwiększonego przyjmowania AgNPs wraz z wodą pitną lub zakontaminowanymi organizmami wodnymi. Jest zatem konieczne poznanie farmakokinetyki nanocząstek srebra, żeby zapobiec ewentualnej, nadmiernej ich kumulacji w organizmie człowieka.

Dotychczasowe informacje dotyczące wchłaniania AgNPs z przewodu pokarmowego są nieliczne. Park i wsp. (2011a) obserwowali, że biodostępność AgNPs o wielkości 7,9 nm po podaniu ich szczurom drogą pokarmową wynosi tylko kilka % (1,2% - 4,2% w zależności od dawki), przy czym nie jest pewne w jakiej postaci są one wchłaniane (Park i wsp., 2011a). Po przeniknięciu do układu krążenia, AgNPs są transportowane głównie do wątroby i śledziony (Xue i wsp., 2012; Lee i wsp., 2013c). Jednak ich obecność stwierdzono również w innych narządach i tkankach, m.in. we krwi, płucach, nerkach, sercu, mózgu i narządach rozrodczych (Sung i wsp., 2009; Kim i wsp., 2010; Loeschner i wsp., 2011; Park i wsp., 2011a; Xue i wsp., 2012; Lee i wsp., 2013a; Lee i wsp., 2013c). Badania nad farmakokinetyką AgNPs wykazały również, że większość tkanek i narządów jest zdolna do ich usunięcia po ustaniu ekspozycji, z wyjątkiem narządów rozrodczych i mózgu, które wykazują zwiększoną ich retencję (van der Zande i wsp., 2012; Lee i wsp., 2013a).

Liczne badania potwierdzają obecność AgNPs w mózgu zwierząt eksponowanych, niezależnie od drogi ich podania. Obserwowano je w mózgu i innych narządach (wątroba, nerki, śledziona, płuca, jądra i grasica) królików 28 dnia po jednorazowym dożylnym podaniu AgNPs o wielkości 7,9 nm (Lee i wsp., 2013c), jak również w narządach szczurów (wątroba, śledziona,



nerki, płuca i mózg) eksponowanych tą samą drogą na AgNPs o wielkości 20 nm (Dziendzikowska i wsp., 2012). Podobne obserwacje poczyniono także po dootrzewnowym, jednorazowym podaniu szczurom AgNPs (2 nm) (Garza-Ocanas i wsp., 2010). Obecność nanogranul w mózgu szczurów eksponowanych stwierdzono nawet po 24 tygodniach od jednorazowego podskórnego podania AgNPs (50 – 100 nm) w dawce 62,8 mg/kg m.c. (Tang, 2008).

Przewlekłe narażenie na AgNPs drogą wziewną także prowadzi do ich obecności w układzie krążenia. Wykazano, że u szczurów eksponowanych tą drogą na AgNPs o wielkości 18 – 19 nm (6 godz. dziennie przez 5 dni w tygodniu, przez 13 tygodni), gromadzą się one głównie w płucach i wątrobie, a w mniejszym stopniu w nerkach, opuszce wężowej, mózgu i we krwi (Sung i wsp., 2009). Zaobserwowano również, że jednorazowe donosowe podanie myszom dużej dawki (100 lub 500 mg/kg m.c.) AgNPs o wielkości 25 nm skutkuje gromadzeniem się nanogranul w jamie nosowej, płucach, śledzionie, nerkach i mózgu (Genter i wsp., 2012).

Podobnie w badaniach, w których zastosowano model narażenia na AgNPs drogą pokarmową, wykazano, że ulegają one biodystrybucji do licznych narządów, w tym mózgu. Podawanie szczurom dużych dawek AgNPs o wielkości 56 nm przez 90 dni skutkowało ich obecnością we krwi, wątrobie, nerkach, płucach, jądrach i mózgu badanych zwierząt (Kim i wsp., 2010). Po 28-dniowej ekspozycji szczurów na stabilizowane poliwinylpyrrolidonem (PVP, ang. *polyvinylpyrrolidone*) AgNPs o wielkości  $14 \pm 4$  nm (dawka 9 mg/kg m.c.) stwierdzono ich obecność w osoczu, wątrobie, nerkach, żołądku, płucach, mięśniach, mózgu i jelicie cienkim (Loeschner i wsp., 2011). Również podawanie AgNPs (o wielkości 22, 42 lub 71 nm) myszom przez 14 dni w dawce 1 mg/kg m.c. prowadziło do ich biodystrybucji w wątrobie, nerkach, płucach, mózgu i jądrach (Park i wsp., 2010a).

Tak więc, przedłużona ekspozycja szczurów na AgNPs o różnej wielkości i w różnej dawce prowadzi do gromadzenia się srebra we krwi i w większości narządów (wątroba, nerki, śledziona, mózg, jądra, jajniki). Ponadto pomiar stężenia Ag, wykonany 4 miesiące po zaprzestaniu podawania AgNPs wykazał, że jedynie w mózgu i narządach rozrodczych nie zmniejszyło się ono w porównaniu do wcześniejszych punktów czasowych (Lee i wsp., 2013a).

Porównanie biodystrybucji AgNPs niestabilizowanych (< 20 nm) i stabilizowanych PVP (< 15 nm) wykazało podobny profil lokalizacji u szczurów, tzn. ich obecność stwierdzono w wątrobie, nerkach, płucach, sercu, śledzionie, mózgu, pęcherzu moczowym, jądrach, jelicie, żołądku oraz we krwi; przy czym poziom srebra w mózgu i jądrach nie zmieniał się w ciągu 8 tygodni od podania (van der Zande i wsp., 2012).

Sposób wydalania nanocząstek z organizmu został również zbadany. Stwierdzono, że AgNPs są usuwane z organizmu głównie z kałem, a w niewielkim stopniu z moczem. Oznacza to, że AgNPs są przede wszystkim wydalane wraz z żółcią do światła jelita (Park i wsp., 2011a; Lee i wsp., 2013c; Jimenez-Lamana i wsp., 2014).

## **1.4. Toksyczność AgNPs w świetle dotychczasowych badań**

Istotnym aspektem i zarazem wyzwaniem dla nanotechnologii jest wykorzystanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych AgNPs. Badania ich wpływu na bakterie, wirusy i grzyby pokazują liczne korzyści z ich stosowania, które jednakże nie powinny przysłaniać możliwych zagrożeń, będących skutkiem masowego użycia AgNPs. Naukowcy ostrzegają, że wzrastająca ilość odpadów zawierających nanocząstki może spowodować ich przedostawanie się do środowiska naturalnego i oddziaływanie na żyjące w nim organizmy, zarówno bakterie glebowe jak i ssaki (Eckelman i wsp., 2007).

### **1.4.1. Toksyczność względem mikroorganizmów**

Trwające od lat poszukiwania nowych substancji przeciwdrobnoustrojowych, które mogłyby zastąpić stosowane obecnie antybiotyki i chemioterapeutyki, objęły również AgNPs. Przypuszczano, że srebro w skali „nano” będzie jeszcze skuteczniejszym środkiem przeciwbakteryjnym niż stosowane dotychczas związki srebra.

Wykazano, że AgNPs mogą być stosowane zarówno w zakażeniach spowodowanych przez bakterie Gram-ujemne, jak i Gram-dodatnie, np. w zakażeniach *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* (Sondi i wsp., 2004; Morones i wsp., 2005; Tamboli i wsp., 2013). Szczególnie intensywnie bada się ich skuteczność względem szczepów bakterii wielolekoopornych (Allahverdiyev i wsp., 2011; Ge i wsp., 2014) oraz próbuje się je stosować jako środek niszczący biofilm bakteryjny lub zapobiegający jego powstawaniu (Kalishwaralal i wsp., 2010; Palanisamy i wsp., 2014).

Biofilm bakteryjny jest wysoce inwazyjną wielokomórkową strukturą złożoną z bakterii, wykazującą adhezję do powierzchni biologicznych i abiotycznych oraz odznaczającą się wysoką opornością na antybiotyki i środki odkażające. Jest to naturalna strategia mikroorganizmów, takich jak *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus epidermidis*, umożliwiająca im zasiedlenie organizmu gospodarza i wywołanie przewlekłej infekcji.

Sam mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego AgNPs nie został jednoznacznie określony. Niektórzy badacze uważają, że jest on ściśle związany z jonami srebra uwolnionymi

wewnątrz komórek mikroorganizmów (Lok i wsp., 2007; Hachicho i wsp., 2014), aczkolwiek pojawiają się również opinie, że same nanocząstki oddziałują bezpośrednio na mikroorganizmy (Joshi i wsp., 2015).

Dotychczas najlepiej poznano mechanizmy działania przeciwbakteryjnego nanocząstek srebra. AgNPs bezpośrednio lub za pośrednictwem uwolnionych z ich powierzchni  $Ag^+$  powodują uszkodzenia błon biologicznych. Srebro przylega do ściany komórkowej bakterii, powodując następnie zmiany strukturalne w białkach błony komórkowej, skutkujące ich inaktywacją i uwalnianiem, oraz izomeryzacją cis-trans nienasyconych kwasów tłuszczowych. Wymienione procesy prowadzą do zwiększenia przepuszczalności błony komórkowej bakterii, a tym samym komórka staje się bardziej podatna na środowiskowe czynniki uszkodzające (Sondi i wsp., 2004; Hachicho i wsp., 2014).

Uważa się, że szczególnie wrażliwe na działanie AgNPs lub  $Ag^+$  są białka strukturalne i enzymy bakteryjne zawierające liczne grupy tiolowe (Shrivastava, 2007). Wykazano, że w wyniku oddziaływania srebra z grupami  $-SH$  enzymów *Staphylococcus epidermidis* dochodzi do zaburzenia funkcji niektórych z nich (Gordon i wsp., 2010). Ponadto obie formy srebra mogą oddziaływać na bakteryjne DNA, co prowadzi do zaburzenia procesu replikacji, a tym samym zahamowania podziału komórki (Feng i wsp., 2000; Shrivastava, 2007). Uważa się także, że zdolność generowania wolnych rodników pod wpływem AgNPs, może być również istotnym elementem ich działania przeciwbakteryjnego (Lee i wsp., 2014a; Joshi i wsp., 2015).

Oprócz działania przeciwbakteryjnego, AgNPs wykazują także działanie przeciwgrzybicze i przeciwwirusowe. Wykazano ich skuteczność względem *Cladosporium cladosporoides*, *Aspergillus niger* (Pulit i wsp., 2013), *Trichophyton rubrum* (Pereira i wsp., 2014) i *Candida sp.* (Monteiro i wsp., 2015). Szczególnie wysokiej skuteczności oczekuje się przy równoczesnym stosowaniu AgNPs i leków przeciwgrzybiczych, np. flukonazolu (Gajbhiye i wsp., 2009).

Badania nad ich działaniem przeciwwirusowym wykazały, że AgNPs są skuteczne w zwalczaniu takich wirusów jak: HIV-1 (Lara i wsp., 2010), wirus zapalenia wątroby typu B (Lu i wsp., 2008), wirus opryszczki typu 1 (Baram-Pinto i wsp., 2009) i typu 2 (Orlowski i wsp., 2014) oraz wirus grypy (Xiang i wsp., 2013). Mechanizm ich działania przeciwwirusowego jest wciąż badany. Uważa się, że AgNPs oddziałują z receptorami glikoproteinowymi wirusa (Lara i wsp., 2010), jego otoczką (Xiang i wsp., 2013) lub nicią DNA/RNA (Lu i wsp., 2008), co w konsekwencji hamuje replikację materiału genetycznego wirusa i uniemożliwia wiązanie się z komórkami gospodarza.

#### 1.4.2. Toksyczność AgNPs dla ssaków

Po wnikięciu do układu krążenia, AgNPs przenikają do narządów i tkanek, gdzie mogą wywołać działanie toksyczne. Uzyskane dotychczas dane pokazują, że systematyczne, długotrwałe podawanie AgNPs prowadzi do rozwoju stanu zapalnego i efektów cytotoksycznych w obrębie wielu narządów. Zaobserwowano, że przedłużone narażenie na nie drogą wziewną prowadzi do pneumotoksyczności, m.in. stwierdzono znaczący spadek objętości oddechowej u eksponowanych szczurów oraz zmiany histopatologiczne w tkance płuc (Sung i wsp., 2008). Działanie hepatotoksyczne zaobserwowano u zwierząt, którym AgNPs podawano drogą pokarmową (Kim i wsp., 2010; Ebabe Elle i wsp., 2013; Patlolla i wsp., 2015), dożylnie (De Jong i wsp., 2013) lub dootrzewnowo (El Mahdy i wsp., 2015) przez dłuższy czas. Pojawiają się również doniesienia o działaniu nefrotoksycznym AgNPs, gdyż u zwierząt doświadczalnych zaobserwowano histopatologiczne zmiany w obrębie nerek oraz podwyższenie stężenia kreatyniny i mocznika we krwi (Feng i wsp., 2014; Sarhan i wsp., 2014). Ponadto wykazano, że u szczurów, którym podano dożylnie AgNPs ( $21 \pm 8$  nm) w dawce 10 mg/kg m.c., dochodzi do gromadzenia się glikoaminoglikanów, głównie kwasu hialuronowego, w błonie podstawnej nerek, co prowadzi do upośledzenia czynności nerek (Feng i wsp., 2014). Sugeruje się również, że AgNPs mogą upośledzać proces spermatogenezy (Sleiman i wsp., 2013) oraz wywoływać zmiany histopatologiczne w śledzionie i węzłach chłonnych (De Jong i wsp., 2013).

Szczególnie intensywnie bada się wpływ AgNPs na wątrobę, która ze względu na swoją funkcję detoksykacyjną narażona jest na największe stężenie nanocząstek. W wątrobie gryzoni eksponowanych na AgNPs zaobserwowano szereg zaburzeń, m.in. zmiany histopatologiczne w postaci wakuolizacji cytoplazmy hepatocytów, hiperplazji nabłonka przewodów żółciowych i obrzęku wokół naczyń krwionośnych oraz zmiany nekrotyczne i zapalne (Kim i wsp., 2010; Lee i wsp., 2013b; Al Gurabi i wsp., 2015; El Mahdy i wsp., 2015; Patlolla i wsp., 2015). Wykazano wzrost aktywności enzymów wątrobowych, takich jak fosfataza alkaliczna, aminotransferaza alaninowa i asparaginianowa (Park i wsp., 2010a; Al Gurabi i wsp., 2015; Heydrnejad i wsp., 2015) oraz dyslipidemię, wyrażoną przez podwyższenie poziomu cholesterolu całkowitego i poziomu frakcji LDL (Kim i wsp., 2010; Ebabe Elle i wsp., 2013). Ponadto, podawanie AgNPs gryzoniom spowodowało nadprodukcję wolnych rodników (Ebabe Elle i wsp., 2013; Patlolla i wsp., 2015) i odpowiedź zapalną w tym narządzie (Park i wsp., 2010a; De Jong i wsp., 2013). Pojawiają się również doniesienia, że procesy autofagii i apoptozy pełnią ważną rolę w mechanizmach hepatotoksyczności tych nanocząstek (Lee i wsp., 2013b).

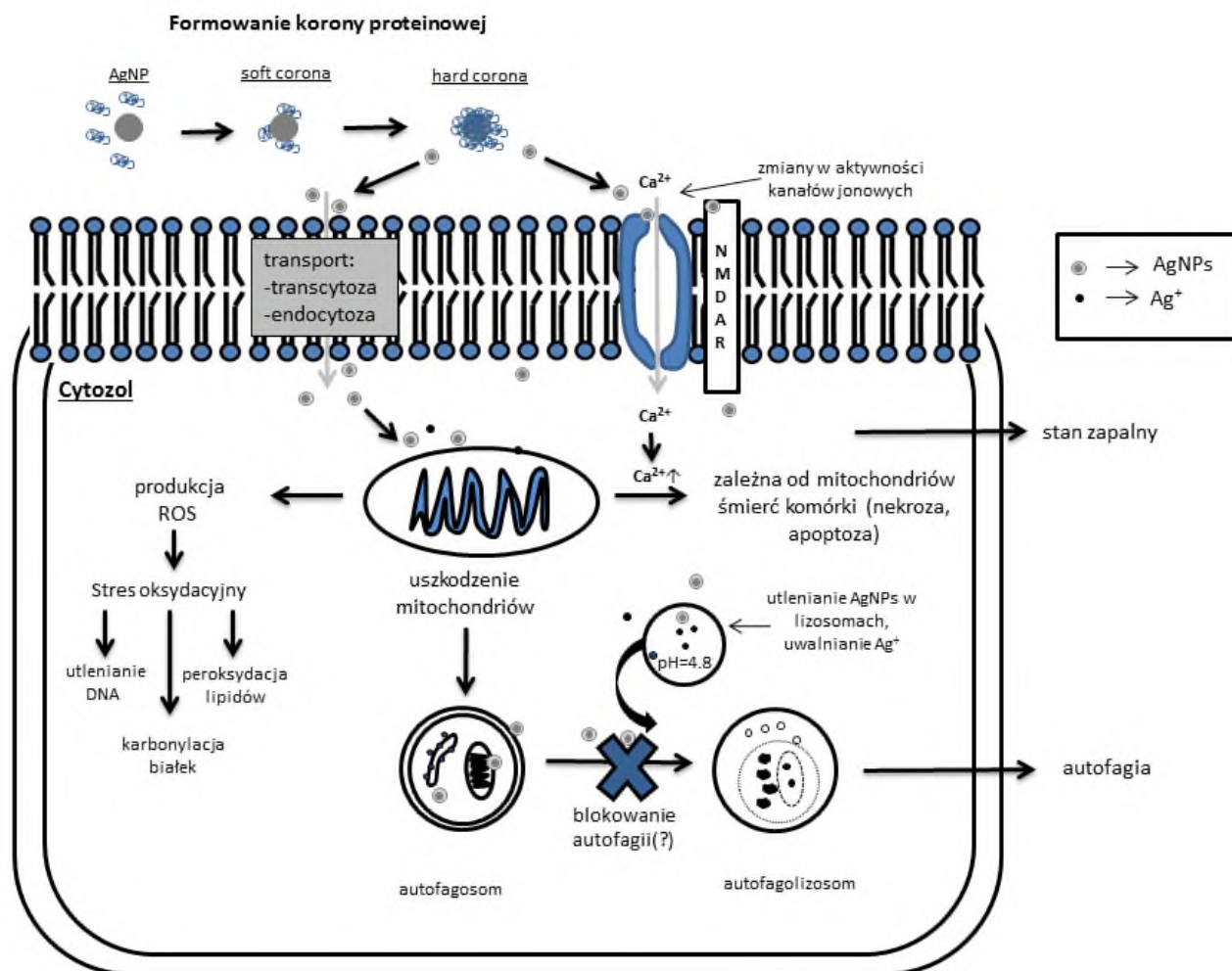
Pewną trudność w usystematyzowaniu wiedzy na temat efektów toksycznych wywołanych przez AgNPs u ssaków sprawia różnorodność nanocząstek zastosowanych w poszczególnych badaniach. Nie tylko dawka, czas i droga narażenia mają znaczenie, ale również wielkość nanocząstki czy typ jej pokrycia.

### **1.5. Mechanizmy toksyczności AgNPs w świetle badań *in vitro* oraz *in vivo***

Wiedza o mechanizmach toksyczności AgNPs wciąż jest niepełna i wymaga dalszej weryfikacji, a zwłaszcza wskazane są badania nad ich toksycznością z zastosowaniem modeli *in vivo*. Badacze wciąż mają wątpliwości, czy obserwowane efekty są wynikiem bezpośredniej interakcji AgNPs z układami biologicznymi, czy też są skutkiem działania jonów uwolnionych z powierzchni nanocząstek wewnątrz komórki. Pomimo tych niejasności, dotychczasowe badania *in vitro* i *in vivo* dostarczają dowodów na związek pomiędzy zależną od AgNPs produkcją ROS, stresem oksydacyjnym, uszkodzeniami DNA a rozwojem stanu zapalnego i śmiercią komórki.

Zdolność AgNPs do nasilania produkcji ROS jest najprawdopodobniej związana z ich fizycznymi i chemicznymi właściwościami, które sprzyjają powstawaniu prooksydacyjnego środowiska wewnątrz komórek. W takich warunkach równowaga zależnego od potencjału oksydoredukcyjnego wewnątrzkomórkowego układu energetycznego zostaje zachwiana, co w konsekwencji zapoczątkowuje odpowiedź zapalną i śmierć komórki. Najnowsze doniesienia wskazują jednak, że mechanizmy ich toksyczności, szczególnie w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, mogą być bardziej złożone (Ziemska i wsp., 2014).

Bazując na dostępnych danych literaturowych, przedstawiono schematycznie możliwe mechanizmy komórkowej toksyczności nanocząstek srebra (Ryc. 1).



**Rycina 1.** Schemat mechanizmu toksyczności AgNPs [modyfikacja własna wg (Duran i wsp., 2015; Skalska i wsp., 2015b; Mao i wsp., 2016)].

### 1.5.1. Parametry fizykochemiczne wpływające na toksyczność AgNPs

#### 1.5.1.1. Wielkość i typ pokrycia

Dostępne dane literaturowe pokazują, że wielkość nanocząstek ma decydujący wpływ na ich toksyczność, przy czym im mniejsza nanocząstka, tym jest ona bardziej toksyczna. Zależność tą wykazano głównie dzięki ekspozycji różnych linii komórek ssaczych na AgNPs o różnej średnicy. Inkubacja linii komórkowej L929 fibroblastów z AgNPs o wielkości 20, 80 i 113 nm wykazała, że nanocząstki 20 nm są bardziej cytotoksyczne, genotoksyczne i prozapalne niż pozostałe (Park i wsp., 2011b). Z kolei AgNPs o wielkości 10 nm stabilizowane cytrynianem są bardziej cytotoksyczne dla ludzkich komórek płuc linii BEAS-2B, niż nanocząstki tego samego typu o wielkości 40 i 75 nm (Gliga i wsp., 2014). Podobne wnioski uzyskano również po inkubacji makrofagów pęcherzyków płucnych z AgNPs o wielkości 15, 30 i 55 nm. Najmniejsze AgNPs powodowały największy spadek przeżywalności komórek,

nasilały produkcję ROS oraz uwalnianie mediatorów stanu zapalnego (Carlson i wsp., 2008). Liu i wsp. (2010) porównali wpływ AgNPs o wielkości 5, 20 i 50 nm na morfologię różnych typów komórek ludzkich (np. linii komórkowej nowotworu wątrobowo-komórkowego HepG2, linii komórkowej A549 niedrobnokomórkowego raka płuc), ich przeżywalność, integralność błon komórkowych czy indukcję stresu oksydacyjnego. Wykazali, że mniejsze nanocząstki łatwiej przenikają do wnętrza komórki niż większe, a w związku z tym wywołują również silniejsze efekty cytotoksyczne (Liu i wsp., 2010).

Kolejnym czynnikiem, który może wpływać na toksyczność nanocząstek srebra, jest typ pokrycia. Ich powierzchnia jest często modyfikowana poprzez wprowadzanie różnych grup funkcyjnych w celu zwiększenia ich stabilności w środowisku oraz zapobiegania tworzenia agregatów. Wykazano m.in., że stabilizowanie AgNPs polisacharydem hamuje proces ich agregacji w porównaniu do AgNPs niczym nie pokrytych (Ahamed i wsp., 2008). Ponadto, w zależności od typu pokrycia, uzyskuje się różną stabilność nanocząstek, np. AgNPs stabilizowane PVP i rozproszone w wodzie są stabilne przez ponad 1 tydzień w tym środowisku. Podobnego efektu nie uzyskuje się dla AgNPs stabilizowanych cytrynianem (Topuz i wsp., 2014).

Najpopularniejsze związki stosowane do stabilizowania AgNPs to cytrynian, chitosan, PVP, polisacharydy, peptydy i związki węgla. Ich wprowadzenie na powierzchnię nanocząstki może wpływać na sposób jej zachowania w rozpuszczalnikach (Kim i wsp., 2013) oraz płynach fizjologicznych (Braydich-Stolle i wsp., 2014), a w konsekwencji również na właściwości przeciwdrobnoustrojowe i toksyczność.

Nieliczne badania mające na celu porównanie toksyczności AgNPs w zależności od typu pokrycia sugerują, że ten parametr odgrywa dość istotną rolę. Stwierdzono m.in., że AgNPs pokryte związkami węgla nie wpływają tak znacząco na ograniczenie przeżywalności komórek, jak pozbawione grup funkcyjnych AgNPs o podobnej wielkości (Nishanth i wsp., 2011). Z kolei AgNPs stabilizowane polisacharydami okazały się być bardziej toksyczne niż nanocząstki bez pokrycia (Ahamed i wsp., 2008). W kolejnych doniesieniach pokazano, że nanocząstki srebra pokryte PVP (Kim i wsp., 2013) lub peptydami (Haase i wsp., 2011) są bardziej toksyczne od AgNPs stabilizowanych cytrynianem, które z kolei przewyższają toksycznością nanocząstki stabilizowane glikolem polietylenowym (Bastos i wsp., 2016).

Od niedawna podkreśla się także udział w toksyczności nanocząstek tzw. „*protein corona*”, formowanej przez białka na ich powierzchni. Jej powstawanie polega na adsorpcji białek (w tym także białek występujących w organizmach żywych) na powierzchni NPs, a o

tym które białko zostanie przyłączone decyduje stopień jego powinowactwa (Duran i wsp., 2015). Uważa się, że oddziaływanie nanocząstka-białko jest procesem dynamicznym, tzn. białka są przyłączane do powierzchni i odłączane od niej w jednostce czasu. Stwierdzono, że jeśli białko ma duże powinowactwo do powierzchni AgNPs, to proces jego wymiany zachodzi powoli i formuje się tzw. „*hard corona*”, czyli wewnętrzna warstwa utworzona przez ściśle związane z powierzchnią białka. W przypadku małego powinowactwa białka do powierzchni, proces ich przyłączania i odłączania jest nasilony, a wokół nanocząstki formuje się „*soft corona*”, czyli zewnętrzna warstwa utworzona z luźno związanych z powierzchnią białek (Miclaus i wsp., 2014; Duran i wsp., 2015). Stwierdzono, że w zależności od składu „*protein corona*” AgNPs mogą wykazywać odmienną odpowiedź biologiczną, m.in. obserwuje się różnice w sile działania przeciwbakteryjnego AgNPs (Gnanadhas i wsp., 2013) oraz w ich cytotoksyczności (Kennedy i wsp., 2014).

#### **1.5.1.2. Uwalnianie jonów $Ag^+$ z powierzchni**

Część naukowców uważa, że za toksyczność AgNPs odpowiadają wyłącznie jony srebra uwolnione z ich powierzchni wewnątrz komórki. Ten mechanizm działania określono jako „*Trojan horse's effect*” (Park i wsp., 2010b; Haase i wsp., 2011; Singh i wsp., 2012). Co więcej udowodniono, że ilość uwalnianych jonów jest odwrotnie proporcjonalna do wielkości nanocząstek (Gliga i wsp., 2014). Uwalnianie  $Ag^+$  jest związane z reakcją utleniania zachodzącą na powierzchni AgNPs, przy czym proces ten zachodzi z około 50-krotnie większą wydajnością wewnątrz komórek, niż w czystej wodzie (Singh i wsp., 2012). Najkorzystniejsze warunki do utleniania AgNPs występują wewnątrz lizosomów, ze względu na występujące tam niskie pH wynoszące około 4,8 (Setyawati i wsp., 2014; De Matteis i wsp., 2015).

Z drugiej strony pojawiają się również doniesienia, że za toksyczność AgNPs odpowiadają zarówno jony uwolnione z ich powierzchni, jak i same nanocząstki (Chae i wsp., 2009; Powers i wsp., 2011; Garcia-Reyero i wsp., 2014). Garcia-Reyero i wsp. (2014) porównali toksyczność AgNPs stabilizowanych PVP oraz jonów srebra w modelu narażenia ryb. Obydwie formy srebra prowadziły do powstania stresu oksydacyjnego i zaburzenia homeostazy jonów sodowych, potasowych i wodorowych. Niekorzystne skutki AgNPs były związane z aktywacją kilku receptorów jądrowych i zablokowaniem wiązania ligandów do receptorów dopaminergicznych, a u ryb narażonych na jony srebra zaobserwowano zablokowanie wiązania ligandów do receptorów adrenergicznych typu  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  oraz do receptora kannabinoidowego CB1. Wykazano ponadto, że kwas askorbinowy skutecznie chroni neuronalne komórki PC12 przed stresem oksydacyjnym indukowanym przez jony srebra, ale



jest nieskutecznym antyoksydantem w przypadku narażenia tych komórek na AgNPs (Powers i wsp., 2011). Z kolei Chae i wsp. (2009) zaobserwowali, że profil ekspresji genów związanych ze stresem oksydacyjnym, w wątrobie ryb z gatunku ryżanka japońska (ang. *Japanese Medaka*), jest inny dla Ag<sup>+</sup> i AgNPs. Jony srebra nasilały głównie ekspresję genów związanych ze stanem zapalnym, podczas gdy ekspozycja ryb na formę „nano” spowodowała wzmożoną ekspresję genów związanych z uszkodzeniami DNA, kancerogenezą i stresem oksydacyjnym. Również badania naszego zespołu wykazały, że nadaktywacja receptora glutaminergicznego dla kwasu N-metylo-D-asparaginowego (NMDAR, ang. *N-methyl-D-aspartate receptor*) w warunkach hodowli komórek ziarnistych mózdzku jest mechanizmem charakterystycznym dla formy „nano” (Zieminska i wsp., 2014).

### **1.5.2. Stres oksydacyjny i zaburzenia funkcji mitochondriów indukowane przez AgNPs**

Wolne rodniki tlenowe są wysoce reaktywnymi molekułami, które szybko wchodzi w reakcje z białkami, lipidami, węglowodanami i kwasami nukleinowymi obecnymi w komórkach, co powoduje powstawanie kolejnych produktów wolnorodnikowych.

ROS są wytwarzane w organizmach żywych podczas takich podstawowych procesów biochemicznych jak oddychanie tlenowe, gdzie powstają w mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów, metabolizm nukleotydów purynowych oraz reakcje katalizowane przez oksydoreduktazy. Produktami tych reakcji są głównie anionorodnik ponadtlenkowy [O<sub>2</sub><sup>•-</sup>], rodnik hydroksylowy [OH<sup>•</sup>] i nadtlenek wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Boveris, 1998).

W warunkach homeostazy ROS odgrywają rolę regulatorów i mediatorów metabolizmu. Są przekaźnikami w procesie wzrostu i różnicowania się komórek oraz indukują apoptozę. Pobudzają szlaki sygnałowe komórki, dzięki czemu wpływają na przekazywanie sygnałów do komórek i wewnątrz komórek. Mają wpływ na aktywację enzymów mikrosomalnych oraz transport tlenu przez hemoglobinę (Gonet, 1996; Hancock i wsp., 2001). Ponadto biorą udział w procesach obronnych organizmu, gdyż są produkowane przez komórki fagocytarne, m.in. makrofagi. Podczas fagocytozy drobnoustrojów wolne rodniki, uwalniane w postaci reaktywnych form tlenu i azotu, utleniają nienasycone kwasy tłuszczowe błon komórkowych bakterii, powodując utratę ich integralności (Segal, 2005; Rada i wsp., 2008).

Nadmierna produkcja ROS, której towarzyszy wyczerpanie komórkowych układów antyoksydacyjnych, skutkuje stresem oksydacyjnym. Prowadzi on do utleniania białek, co modyfikuje ich budowę przestrzenną, a w konsekwencji powoduje inaktywację enzymów i zaburzenia struktury cytoszkieletu. Dochodzi również do utlenienia nienasyconych kwasów tłuszczowych, wchodzących w skład lipidów (zwłaszcza fosfolipidów) błon biologicznych, co

może prowadzić do ich rozszczelnienia. Ponadto ROS mogą powodować pęknięcia nici DNA, uszkodzenie chromosomów, powstawanie mutacji prowadzących do zmian nowotworowych oraz zaburzenia wewnątrzkomórkowej homeostazy wapnia. Duże uszkodzenia, niemożliwe do naprawienia przez wewnątrzkomórkowe mechanizmy naprawcze, prowadzą do śmierci komórki (Betteridge, 2000; Franco i wsp., 2009). Uważa się, że ROS są zaangażowane w rozwój stanu zapalnego, który odgrywa istotną rolę w patomechanizmie wielu chorób, m.in. chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera (Pohanka, 2014) i choroba Parkinsona (Gaki i wsp., 2014).

Przed toksycznym działaniem ROS chronią komórkowe mechanizmy obronne. W warunkach homeostazy ich nadmiar jest likwidowany przez enzymatyczne i nieenzymatyczne układy antyoksydacyjne. Wśród enzymów antyoksydacyjnych największe znaczenie mają:

- dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, ang. *superoxide dismutase*),
- katalaza (CAT, ang. *catalase*),
- peroksydaza glutationowa (GPx, ang. *glutathione peroxidase*),
- reduktaza glutationowa (GR, ang. *glutathione reductase*),
- S-transferaza glutationowa (GST, ang. *glutathione S-transferase*),
- układ tioredoksyny (TRX, ang. *thioredoxin*),
- ceruloplazmina,
- paraoksonaza 1 (PON1, ang. *paraoxonase 1*).

Z kolei wśród nieenzymatycznych układów antyoksydacyjnych, które reagują z wolnymi rodnikami tlenowymi, w wyniku czego powstają mało reaktywne formy, niezdolne do utleniania innych składników komórki, wyróżnia się:

- zredukowany glutation (GSH, ang. *glutathione*),
- witaminę C,
- witaminę E,
- karotenoidy i witaminę A,
- zredukowany koenzym Q<sub>10</sub>,
- cysteinę,
- albuminy.

To, które mechanizmy antyoksydacyjne zostaną uruchomione do obrony organizmu przed ROS, zależy od miejsca powstania i właściwości ROS (Czajka, 2006; Łuszczewski, 2007).

System obrony antyoksydacyjnej przebiega w 3 etapach. W pierwszym etapie układy antyoksydacyjne hamują nadmierne powstawanie wolnych rodników tlenowych. W drugim

etapie następuje przerwanie łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych, dzięki obecności układów reagujących z ROS, zaś w trzecim etapie dochodzi do odtwarzania prawidłowych struktur cząsteczek uszkodzonych przez ROS (Czajka, 2006; Łuszczewski, 2007).

Pierwszą linię obrony organizmu przed reaktywnymi formami tlenu stanowią SOD, CAT i GPx, które zapobiegają powstawaniu najbardziej reaktywnego rodnika wodorotlenowego, zwanego też rodnikiem hydroksylowym [OH<sup>\*</sup>]. SOD katalizuje reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do tlenu cząsteczkowego i nadtlenu wodoru, który jest z kolei rozkładany do wody w reakcjach katalizowanych przez CAT i GPx. Rozkład H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jest o tyle ważny dla przeżycia komórki, że biorą w nim udział aż dwa enzymy, przy czym GPx odpowiada za katabolizm większości tego związku w komórkach, a CAT włącza się w ten proces przy jego dużych stężeniach. Dzięki temu nie dochodzi do reakcji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> z jonami metali (jony żelaza i miedzi) i powstania wspomnianego rodnika hydroksylowego (Halliwell i wsp., 1995).

SOD należy do metaloenzymów, przy czym w przyrodzie występuje kilka jego izoform. U człowieka stwierdzono obecność izoform: cytoplazmatycznej Cu,Zn-SOD (SOD-1), mitochondrialnej Mn-SOD (SOD-2) i zewnątrzkomórkowej Ec-Cu,Zn-SOD (SOD-3). Obecność odpowiedniej ilości aktywnego enzymu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej i wewnątrzkomórkowej odgrywa kluczową rolę w zapobieganiu rozwojowi chorób związanych ze stresem oksydacyjnym. Mutacje w genach kodujących SOD stwierdzono m.in. u chorych na chorobę Alzheimera, chorobę Parkinsona czy chorobę Huntingtona (Jeeva i wsp., 2015; Ruszkiewicz i wsp., 2015).

Peroksydaza glutationowa katalizuje reakcję redukcji nadtlenu organicznych i nadtlenu wodoru, przy czym donorem protonów jest zredukowany glutation. Centrum aktywne tego enzymu zawiera selenowy analog cysteiny (selenocysteinę). Obecność selenocysteiny umożliwia utlenianie glutationu do disiarczku glutationu (GSSG, ang. *glutathione disulfide, oxidized glutathione*), czemu towarzyszy redukcja nadtlenu. Następnie GSSG jest przekształcany z powrotem do formy zredukowanej w reakcji katalizowanej przez GR, a czynnikiem redukującym jest NADPH (Brigelius-Flohe, 1999; Jeeva i wsp., 2015).

Katalaza jest enzymem obecnym przede wszystkim w peroksyzomach komórek ssaków, wykazującym dwie aktywności: katalazową i peroksydazową. Przy dużym stężeniu nadtlenu wodoru przeważa aktywność katalazowa enzymu prowadząca do jego rozkładu do wody i tlenu. Z kolei przy małym stężeniu tego związku dominuje aktywność peroksydazowa CAT, a związkami dostarczającymi protony są głównie etanol, metanol, fenol i inne alkohole.

Największą aktywność katalazy stwierdzono w wątrobie, nerkach i erytrocytach (Ścibior D., 2006).

Ze względu na to, że GPx wymaga do swojej aktywności GSH, układ glutationu jest również traktowany jako pierwsza linia obrony organizmu przed ROS. Glutation ( $\gamma$ -glutamylcysteinylglicyna) jest ważnym wewnątrzkomórkowym trójpeptydem, występującym zarówno w formie zredukowanej (GSH), jak i utlenionej (GSSG). Prawie 90% GSH jest zlokalizowane w cytozolu komórki, a pozostała część w mitochondriach i siateczce śródplazmatycznej. Stosunek GSH do GSSG wynosi 10:1. Jest on syntetyzowany w największych ilościach w wątrobie (skąd jest uwalniany do krwi i żółci), a szybkość jego syntezy zależy przede wszystkim od dostępności jego prekursorów (cysteiny i metioniny) oraz aktywności enzymów biorących udział w tym procesie (m.in. syntetazy  $\gamma$ -glutamylcysteinowej i cystationazy).

GSH jest nie tylko donorem protonów w reakcji redukcji nadtlenu katalizowanej przez GPx, ale także może reagować bezpośrednio z anionorodnikiem ponadtlenkowym i rodnikiem hydroksylowym. Ponadto może wiązać się spontanicznie lub w reakcji katalizowanej przez glutationowe S-transferazy z ksenobiotykami (np. z aromatycznymi i alifatycznymi epoksydami, aromatycznymi węglowodorami), co zmniejsza ich toksyczność. Glutation utrzymuje również zredukowany stan grup sulfhydrylowych większości białek w procesie zwanym glutationylacją. Ostry stres oksydacyjny może prowadzić do obniżenia puli wewnątrzkomórkowego GSH, aczkolwiek sugeruje się, że jest możliwy również wzrost jego puli na skutek indukcji syntetazy  $\gamma$ -glutamylcysteinowej i tym samym nasilenia syntezy glutationu (Łukaszewicz-Hussain, 2003; Ruszkiewicz i wsp., 2015).

Niemale znaczenie dla obrony komórek przed ROS mają również tzw. antyoksydanty prewencyjne (m.in. ceruloplazmina, ferrytyna i transferyna), które hamują proces wytwarzania nowych ROS, a także zapobiegają peroksydacji lipidów. Wymienione białka są zlokalizowane w osoczu krwi, gdzie wiążą się z jonami metali przejściowych (m.in. miedzi i żelaza) i tym samym ograniczają reakcję przekształcania nadtlenu wodoru do rodnika hydroksylowego (Czajka, 2006; Łuszczewski, 2007).

Drugą linię obrony przed ROS stanowią głównie reagujące z nimi egzogenne nieenzymatyczne układy antyoksydacyjne (witamina C, E i A, karotenoidy i koenzym Q<sub>10</sub>), w wyniku czego powstają mało reaktywne produkty. W ten sposób zostaje przerwana łańcuchowa reakcja wolnorodnikowa utleniania kolejnych związków biologicznie czynnych.

Wykazano, że witamina C neutralizuje wolne rodniki rozpuszczalne w wodzie. Z kolei witamina E chroni lipidy zawarte w błonach komórkowych oraz lipoproteiny przed

utlenieniem, przy czym wykazano, że przede wszystkim jest skuteczna w przypadku wolnych rodników organicznych i tlenu singletowego. Koenzym Q<sub>10</sub> ma zdolność regenerowania witaminy E i zwiększania jej wydajności antyoksydacyjnej. Karotenoidy (m.in.  $\beta$ -karoten, luteina, zeaksantyna, likopen) i witamina A mają zdolność usuwania tlenu singletowego i nadtlenków lipidów (Czajka, 2006; Łuszczewski, 2007).

Trzecią linię obrony antyoksydacyjnej stanowią mechanizmy naprawcze, których zadaniem jest usuwanie skutków reakcji ROS ze składnikami komórek. Do tej linii obrony należą głównie enzymy antyoksydacyjne o aktywności oksydoreduktaz, takie jak paraoksonaza 1 czy tioredoksyna. PON1 ma zdolność redukcji produktów peroksydacji lipidów, zaś TRX redukuje mostki disiarczkowe powstałe w wyniku utleniania grup tiolowych w cząsteczkach DNA czy białkach. W podobny sposób działa również GPx, ale proces redukcji katalizowany przez ten enzym przebiega znacznie wolniej niż w przypadku TRX (Czajka, 2006; Łuszczewski, 2007).

Prawdopodobnie, zależna od AgNPs produkcja wolnych rodników tlenowych jest związana z wewnątrzkomórkowym utlenianiem AgNPs do jonów srebra. Wskazany proces chemiczny prowadzi do powstania prooksydacyjnego środowiska, co zaburza funkcje mitochondriów i prowadzi do nadprodukcji ROS w łańcuchu oddechowym, a w konsekwencji dochodzi do uszkodzeń tych organelli (Singh i wsp., 2012). Szkodliwy wpływ AgNPs na funkcje mitochondrialne został zaobserwowany w badaniach *in vitro*, w których linię szczurzych komórek wątrobowych BRL 3A (Hussain i wsp., 2005), linię ludzkich komórek wątrobowych (Piao i wsp., 2011; Song i wsp., 2012) oraz linię komórkową raka jelita grubego (Sanpui i wsp., 2011) inkubowano z nanosrebrem. Stwierdzono, że AgNPs zmniejszają aktywność I, II, III i IV mitochondrialnego kompleksu białkowego łańcucha oddechowego, co upośledza produkcję ATP, a nasila produkcję wolnych rodników tlenowych (AshaRani i wsp., 2009; Costa i wsp., 2010).

Nie jest to jedyny proponowany mechanizm upośledzenia czynności mitochondriów przez AgNPs. Przypuszcza się, że nanocząstki bezpośrednio lub za pośrednictwem Ag<sup>+</sup> uwolnionych z ich powierzchni oddziałują z grupami tiolowymi aminokwasów, wchodzących w skład mitochondrialnych białek strukturalnych oraz enzymów mitochondrialnych, co uszkadza błony mitochondrialne i/lub zaburza funkcje enzymów (Jiang i wsp., 2015b). Dla porównania, zaobserwowano, że jony srebra oddziałują z grupami tiolowymi białek błony wewnętrznej tych organelli, co sprzyja zwiększeniu jej przepuszczalności (Almofti i wsp., 2003). Ten mechanizm toksyczności AgNPs potwierdzają również doniesienia, że słabe

antyoksydanty posiadające grupę –SH, np. 2,3-ditiopropanol (De Matteis i wsp., 2015) i N-acetylocysteina (Jiang i wsp., 2015b), są skuteczniejszymi środkami zapobiegającymi cytotoksyczności AgNPs, niż silniejsze antyoksydanty, ale pozbawione tych grup (np. rozpuszczalna w wodzie pochodna witaminy E – troloks, tempol) (Singh i wsp., 2012).

Udział stresu oksydacyjnego w mechanizmie toksyczności AgNPs potwierdziły głównie badania *in vitro* i w mniejszym stopniu – *in vivo*. Nadprodukcję ROS obserwowano w licznych liniach komórkowych inkubowanych z AgNPs (Carlson i wsp., 2008; Liu i wsp., 2010; Vrcek i wsp., 2014; De Matteis i wsp., 2015; Bastos i wsp., 2016). Zmniejszenie puli zredukowanego glutationu pod ich wpływem stwierdzono m.in. w ludzkich komórkach raka skóry (Arora i wsp., 2008), szczurzych komórkach wątrobowych (Hussain i wsp., 2005), mysich makrofagach (Park i wsp., 2010b), ludzkich komórkach wątrobowych (Piao i wsp., 2011; Vrcek i wsp., 2014) i mysich zarodkowych fibroblastach (Lee i wsp., 2014b). Niekiedy towarzyszyła temu peroksydacja lipidów (Arora i wsp., 2008; Piao i wsp., 2011). Obniżenie poziomu GSH obserwowano również u organizmów wodnych eksponowanych na AgNPs (Gagne i wsp., 2013; Ali, 2014; Massarsky i wsp., 2014a). Badano także w warunkach *in vitro* wpływ AgNPs na aktywność niektórych enzymów antyoksydacyjnych, takich jak SOD, CAT czy GPx. Wyniki tych badań nie były jednoznaczne, gdyż obserwowano zarówno spadki (Arora i wsp., 2008; Song i wsp., 2012), jak i wzrosty aktywności tych enzymów (Vrcek i wsp., 2014; Negahdary i wsp., 2015).

Nadmiar ROS powoduje również utlenianie białek oraz uszkodzenia DNA. Karbonylację białek obserwowano w pierwotnych korowych komórkach neuralnych inkubowanych z AgNPs (Haase i wsp., 2012). Wzrost poziomu fragmentacji DNA lub aberracje chromosomowe stwierdzono w ludzkich komórkach nabłonka pęcherzyków płucnych (Foldbjerg i wsp., 2011), ludzkich komórkach wątrobowych (Piao i wsp., 2011), ludzkich zarodkowych komórkach nabłonka (Rinna i wsp., 2015), jak również w narządach gryzoni (Al Gurabi i wsp., 2015; El Mahdy i wsp., 2015; Patlolla i wsp., 2015) i organizmach wodnych (Gagne i wsp., 2013; Ali, 2014) eksponowanych na AgNPs.

### **1.5.3. Indukcja stanu zapalnego i śmierć komórki pod wpływem AgNPs**

W badaniach *in vitro* potwierdzono, że istnieje związek między nadprodukcją ROS wywołaną przez AgNPs a zwiększonym uwalnianiem mediatorów stanu zapalnego, takich jak interleukina-6 (IL-6, ang. *interleukin 6*), czynnik martwicy nowotworu (TNF- $\alpha$ , ang. *tumour necrosis factor  $\alpha$* ) (Nishanth i wsp., 2011), interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , ang. *interleukin 1 $\beta$* ) i białko

hamujące makrofagi 2 (MIP-2, ang. *macrophage inhibitory protein 2*) (Carlson i wsp., 2008). Również w badaniach *in vivo* stwierdzono prozapalne działanie AgNPs. Wykazano, że przewlekłe podawanie szczurom drogą pokarmową dużych dawek AgNPs prowadzi do nasilonego wydzielania IL-6 i TNF- $\alpha$  w wątrobie (Ebabe Elle i wsp., 2013). Obserwowano również tworzenie się nacieków zapalnych w tym narządzie po ekspozycji na AgNPs drogą pokarmową (Kim i wsp., 2010), wziewną (Sung i wsp., 2008) i po podaniu dożylnym (Lee i wsp., 2013b).

Jak zostało wspomniane wcześniej, AgNPs mogą powodować upośledzenie funkcji mitochondriów, prowadząc do zmniejszenia produkcji ATP, a to z kolei może aktywować proces autofagii.

Autofagia jest konstytutywnym, wewnątrzkomórkowym procesem degradacyjnym występującym w każdej żywej komórce. Jej zadaniem jest pozyskiwanie alternatywnych źródeł energii na drodze trawienia nieprawidłowo pofałdowanych białek lub uszkodzonych i niepotrzebnych składników komórkowych. Dzięki temu ochronnemu procesowi komórka może utrzymywać swój metabolizm przez dłuższy czas na podstawowym poziomie, pomimo że nie są jej dostarczane substancje odżywcze z zewnątrz. Przedłużający się stan autofagii może indukować śmierć komórki na drodze autolizy lub apoptozy (Mizushima, 2007; Glick i wsp., 2010). Ponadto proces autofagii ulega nasileniu pod wpływem czynników wywołujących stres komórkowy, takich jak zakażenia drobnoustrojami, hipoksja, nadmiar ROS czy leki cytostatyczne (Gozuacik i wsp., 2004).

Najpowszechniejszym rodzajem autofagii jest makroautofagia. Proces degradacji rozpoczyna się od wyodrębnienia fragmentu aparatu Golgiego lub siateczki śródplazmatycznej w postaci fagoforu o podwójnej błonie. Fagofor otacza organellum komórkowe lub fragment cytoplazmy zawierający białka przeznaczone do degradacji. Po połączeniu się końcowych części fagoforu powstaje autofagosom (wczesna wakuola autofagowa), w którego wnętrzu są uwięzione struktury przeznaczone do strawienia. Następnie autofagosom łączy się z późnym endosomem lub z lizosomem i tworzy ostatecznie autofagolizosom (późna wakuola autofagowa), wewnątrz którego jest trawiony materiał komórkowy z udziałem hydrolaz lizosomalnych (Todde i wsp., 2009; Nixon, 2013).

W formowaniu autofagosomu biorą udział kompleksy białkowe zawierające m.in. beklinę 1 (Atg 6), podjednostki kinazy fosfatydyloinozytolu klasy III oraz liczne białka z rodziny Atg (ang. *autophagy related proteins*). Ponadto, dalsze wydłużanie fagoforu jest zależne od przekształcenia białka związanego z mikrotubulami (MAP1 LC3, ang. *microtubule-associated protein 1 light chain 3*) z jego formy cytozolowej (MAP LC3-I) do formy związanej

z wewnętrzną błoną autofagosomu (MAP LC3-II). Należy również pamiętać, że procesy autofagii i apoptozy są ze sobą powiązane, bowiem w wielu przypadkach białka kluczowe dla apoptozy (np. Bcl-2, Bcl-XL, kaspaza-3, Bad) pełnią także rolę w regulacji autofagii (Nixon, 2013).

Przypuszcza się, że AgNPs mogą indukować autofagię. Zaobserwowano, że w wątrobie szczurów, którym podano jednorazowo dootrzewnowo AgNPs (10-30 nm) w dawce 500 mg/kg m.c., obniżeniu uległ poziom ATP, czemu towarzyszyła indukcja autofagii oraz apoptozy (Lee i wsp., 2013b). Ponadto zaobserwowano występowanie zależności pomiędzy stresem oksydacyjnym, autofagią i apoptozą w mysich zarodkowych fibroblastach z AgNPs (Lee i wsp., 2014b).

Indukcja apoptozy pod wpływem nanocząstek srebra została zaobserwowana przede wszystkim w badaniach *in vitro*, w których inkubowano różne linie komórek ssaczych z AgNPs, m.in. monocytu THP-1 (Foldbjerg i wsp., 2009), linię ludzkiego raka płuc (Foldbjerg i wsp., 2011), ludzkie komórki wątrobowe (Piao i wsp., 2011), linię ludzkich komórek raka okrężnicy (Gopinath i wsp., 2010; Sanpui i wsp., 2011), mysie zarodkowe fibroblasty (Hsin i wsp., 2008; Lee i wsp., 2014b), linię komórek HeLa (linia komórkowa wywodząca się z raka szyjki macicy), linię komórkową A549 (De Matteis i wsp., 2015), ludzkie keratynocyty (Bastos i wsp., 2016), fibroblasty pochodzące z nerek chomika (BHK21) (Gopinath i wsp., 2010). Wykryto, że AgNPs mogą indukować apoptozę zależną od ROS i kinazy domeny N-końcowej białka Jun (JNK, ang. *c-Jun N-terminal kinases*) (Hsin i wsp., 2008). Ponadto stwierdzono aktywację białka p53 (Gopinath i wsp., 2010), obniżenie poziomu antyapoptotycznego białka Bcl-2, podwyższenie poziomu białka proapoptotycznego Bax (Gopinath i wsp., 2010; Piao i wsp., 2011), aktywację kaspazy-3 (Gopinath i wsp., 2010; Piao i wsp., 2011; Sanpui i wsp., 2011; Lee i wsp., 2014b), uwalnianie cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy i translokację Bax do mitochondriów (Hsin i wsp., 2008; Piao i wsp., 2011). Zaobserwowano również fragmentację DNA i tworzenie się adduktów objętościowych DNA (ang. *bulky adducts*), przy czym termin „addukty objętościowe” oznacza wiązania krzyżowe i pierścieniowe tworzone pomiędzy końcowymi produktami peroksydacji lipidów a cząsteczkami DNA (Foldbjerg i wsp., 2009; Foldbjerg i wsp., 2011; Sanpui i wsp., 2011; De Matteis i wsp., 2015).

W nielicznych dotychczas badaniach *in vivo* zaobserwowano indukcję apoptozy w wątrobie myszy, którym podano AgNPs ( $43,6 \pm 6,4$  nm) dootrzewnowo w dawce 78 mg/kg m.c. (Al Gurabi i wsp., 2015).



## 1.6. Neurotoksyczność AgNPs w świetle dotychczasowych badań *in vitro* i *in vivo*

Srebro zaabsorbowane z przewodu pokarmowego i płuc do krwi lub podane parenteralnie może przenikać do parenchymy mózgowej przez barierę krew-mózg (Skalska i wsp., 2015b). Wykazano m.in., że podanie szczurom drogą pokarmową stabilizowanych cytrynianem AgNPs (10 nm) w dawce 100-500 mg/kg m.c./dzień prowadzi do ich gromadzenia się w parenchymie mózgowej w postaci nanogranul. Co więcej, poziom srebra w mózgu zwierząt nie obniżał się długo po zaprzestaniu ekspozycji (Lee i wsp., 2013a). Inną możliwą drogą jest ich transport wzdłuż nerwu węchowego po podaniu donosowym lub wziewnym (Genter i wsp., 2012; Davenport i wsp., 2015).

Stwierdzono również, że okres półtrwania srebra w mózgu jest dłuższy po podaniu mniejszych dawek AgNPs niż większych, przy czym ta prawidłowość dotyczy głównie mniejszych nanocząstek. Oznacza to, że BBB utrudnia ich transfer z powrotem do układu krwionośnego (Yang i wsp., 2010b).

Konsekwencje gromadzenia się AgNPs w parenchymie mózgowej nie zostały w pełni poznane, aczkolwiek w literaturze pojawiają się już pewne dane, oparte głównie na badaniach *in vitro*, a w mniejszym stopniu na badaniach *in vivo*.

### 1.6.1. Wpływ na funkcjonowanie bariery krew-mózg

Bariera krew-mózg jest wysoce wyspecjalizowaną strukturą zlokalizowaną anatomicznie na poziomie mikronaczyń mózgowych. W jej skład wchodzi komórki endotelialne mikronaczyń (EC, ang. *endothelial cells*), błona podstawna (zbudowana z kolagenu, fibronektyny i lamininy), pericyty, astrocyty otaczające EC oraz przyległe neurony. Wymienione składowe tworzą razem jednostkę nerwowo-naczyniową (ang. *neurovascular unit*). W warunkach fizjologicznych przez BBB odbywa się tylko transport substancji niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego, podczas gdy wszystkie szkodliwe związki znajdujące się w układzie krążenia, zostają przez nią zatrzymane (Persidsky i wsp., 2006; Serlin i wsp., 2015).

Kluczowym elementem BBB są komórki endotelialne mikronaczyń, gdyż wraz z błoną podstawną tworzą one główną anatomiczną barierę pomiędzy krwią a OUN. Pomiędzy tymi komórkami występują tzw. połączenia ścisłe (ang. *tight junctions*), zbudowane z szeregu specyficznych białek, które wymuszają przenikanie większości substancji do OUN za pośrednictwem systemu transportowego endotelium, gdyż charakteryzują się bardzo wysoką opornością elektryczną. EC mają liczne mitochondria dostarczające energię konieczną do

pełnienia funkcji transportowej oraz wysoką ekspresję enzymów wchodzących w skład bariery enzymatycznej odpowiedzialnej za rozkład substancji neuroaktywnych oraz niektórych leków. Za regulację proliferacji tych komórek, ich przeżycie, migrację i różnicowanie odpowiadają pericyty. Pericyty mają także swój udział w regulacji angiogenezy i krążenia mózgowego, gdyż mogą wpływać na średnicę mikronaczyń. Z kolei astrocyty, dzięki zdolności oddziaływania z pericytami i komórkami endotelialnymi, zapewniają integralność połączeń ścisłych oraz utrzymują homeostazę neuroprzekaźników, metabolitów, jonów i wody (Ballabh i wsp., 2004; Persidsky i wsp., 2006; Serlin i wsp., 2015).

W stanach patologicznych astrocyty, które pokrywają powierzchnię mikronaczyń, mogą modulować przepuszczalność BBB poprzez wydzielanie cytokin prozapalnych takich jak IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  czy transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- $\beta$ , ang. *transforming growth factor  $\beta$* ) (Schwaninger i wsp., 1999; Didier i wsp., 2003).

Transport substancji obecnych we krwi przez BBB jest ściśle regulowany dzięki występowaniu bariery fizycznej i biochemicznej. Bariere fizyczną tworzą połączenia ścisłe komórek endotelialnych. Są one zbudowane z białek transmembranowych: okludyn (ang. *occludins*), kładyn (ang. *claudins*) i białek adhezji komórkowej (ang. *junction adhesion molecules*), które łączą się z elementami cytoszkieletu za pomocą białek cytoplazmatycznych wchodzących w skład kompleksu białek połączeń ścisłych (ZO, łac. *zonula occludens*) (Ballabh i wsp., 2004; Persidsky i wsp., 2006). Bariere biochemiczną tworzą receptory, kanały jonowe i przENOŚniki białkowe obecne w EC. Ponadto, niektóre cząsteczki mogą być transportowane przez komórki endotelialne na drodze endocytozy i transcytozy (Ballabh i wsp., 2004; Serlin i wsp., 2015).

Uważa się, że NPs przenikają do OUN przez błonę komórek endotelialnych, nie powodując przy tym jej uszkodzeń, co wykazano m.in. dzięki ultrastrukturalnej analizie mózgu szczurów, którym podano AgNPs podskórnice. Wykluczono zaś ich przechodzenie przez szczeliny znajdujące się w połączeniach ścisłych ze względu na szerokość szczelin wynoszącą tylko 4-6 nm. (Tang, 2008). Dane literaturowe (oparte przede wszystkim na badaniach *in vitro*) pokazują, że różne typy nanocząstek mogą być transportowane przez EC na drodze endocytozy z udziałem dołków opłaszczonych klatryną (ang. *clathrin-mediated endocytosis*), makropinocytozy (ang. *macropinocytosis*) oraz transportu z udziałem kaweoli (ang. *caveolae-mediated endocytosis*) (Ye i wsp., 2013; Landgraf i wsp., 2015). Ponadto podkreśla się udział transcytozy w transporcie NPs do OUN (Ye i wsp., 2013). Wyniki badań pokazują także udział

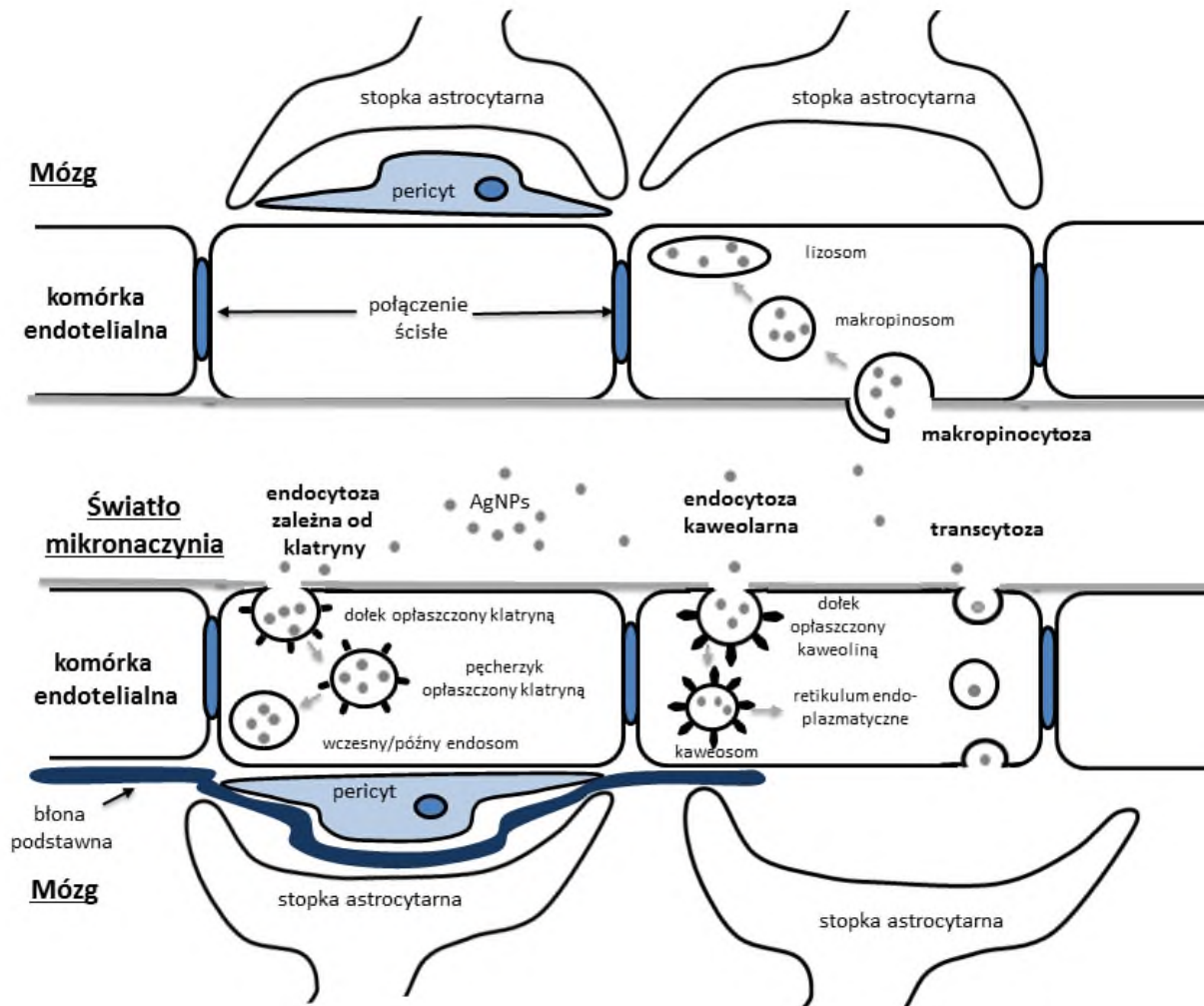
wielkości nanocząstek (mniejsze łatwiej przekraczają BBB niż większe), a także typu pokrycia w tym procesie (Hanada i wsp., 2014).

Dzięki zastosowaniu modelu *in vitro* bariery krew-mózg (ang. *coculture BBB model*), złożonego z pierwotnych szczurzych komórek endotelialnych mikronaczyń (ang. *primary rat brain microvessel endothelial cells*) i astrocytów, wykazano, że AgNPs są transportowane do OUN na drodze transcytozy przez komórki endotelialne mikronaczyń mózgowych, wewnątrz których dochodzi również do ich gromadzenia (głównie w lizosomach) (Tang i wsp., 2010). Obecność AgNPs wewnątrz komórek endotelialnych nasila uwalnianie mediatorów stanu zapalnego, takich jak IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i prostaglandyny PGE<sub>2</sub>, co w konsekwencji prowadzi do powstania odpowiedzi zapalnej i wzrostu przepuszczalności BBB (Trickler i wsp., 2010; Trickler i wsp., 2014).

Wykazano również, że AgNPs o wielkości  $7 \pm 2$  nm powodują zwiększenie przepuszczalności BBB w modelu *in vitro* na skutek obniżenia ekspresji białek wchodzących w skład połączeń ścisłych: ZO-1 i kładyny-5. Obserwowano obkurczanie się mitochondriów, wakuolizację cytoplazmy, rozrost siateczki śródplazmatycznej. Wykryto ponadto zmiany w ekspresji genów w astrocytach, m.in. genów związanych z procesami metabolicznymi, biosyntezą, śmiercią komórki czy procesami poznawczymi, a także negatywny wpływ AgNPs na komórkową obronę antyoksydacyjną przez zablokowanie układu tioredoksyny oraz indukcję stanu zapalnego i apoptozy (Xu i wsp., 2015a).

Podjęto także próby określenia, jak AgNPs oddziałują na BBB w warunkach *in vivo*. Tang i wsp. zaobserwowali, że u szczurów, którym podano podskórną AgNPs (50-100 nm) w dawce 62,8 mg/kg m.c., dochodziło do obrzęku astrocytów wokół mikronaczyń mózgowych oraz obecności pyknotycznych i nekrotycznych neuronów (Tang, 2008). Również po jednorazowym podaniu dożylnym (30 mg/kg m.c.), dootrzewnowym (50 mg/kg m.c.) i domózgowym AgNPs o wielkości ok. 50-60 nm zaobserwowano niekorzystne zmiany w obrębie mózgu gryzoni. Obejmowały one głównie zwiększenie przepuszczalności BBB prowadzące do obrzęków (Sharma i wsp., 2009; Sharma i wsp., 2010), wyraźne zmniejszenie mózgowego przepływu krwi, wzrost poziomu białek szoku cieplnego (HSP, ang. *heat shock proteins*), aktywację komórek glejowych oraz zanik otoczek mielinowych włókien nerwowych (Sharma i wsp., 2009). W badaniu, w którym podawano szczurom drogą pokarmową AgNPs w dawce 1 mg/kg m.c. przez 14 dni zaobserwowano zmiany ultrastrukturalne w obrębie neuronów

i astrocytów, nieznaczne podwyższenie poziomu mRNA dla kadheryny-1 i kładyny-1 oraz podwyższony poziom IL-4 (Xu i wsp., 2015b).



**Rycina 2.** Transport AgNPs przez barierę krew-mózg [zmodyfikowane wg (Ye i wsp., 2013)]

### 1.6.2. Toksyczność komórkowa

Wpływ AgNPs na neurony i komórki glejowe został przede wszystkim zbadany w warunkach *in vitro*. W wielu doświadczeniach wykazano, że AgNPs powodują spadek przeżywalności neuronów (Trickler i wsp., 2010; Haase i wsp., 2012; Hadrup i wsp., 2012; Xu i wsp., 2013; Yin i wsp., 2013; Coccini i wsp., 2014; Zieminska i wsp., 2014; Huang i wsp., 2015). Tę zależność stwierdzono zarówno dla niedojrzałych neuronów, jak też w pełni zróżnicowanych (Xu i wsp., 2013).

W przypadku badań nad przeżywalnością komórek glejowych ekspozowanych na AgNPs wyniki nie są tak jednoznaczne. W hodowlach komórkowych wzbogacanych w astrocyty inkubowanych z AgNPs stwierdzono zarówno brak zmian (Luther i wsp., 2012), jak

również wyraźny spadek przeżywalności tych komórek (Haase i wsp., 2012; Sun i wsp., 2016). W hodowli szczurzych astrocytów korowych inkubowanych przez 2-3 dni z AgNPs (20 nm) zaobserwowano spadek przeżywalności zarówno niedojrzałych, jak i dojrzałych komórek glejowych (Xu i wsp., 2013).

W badaniach z udziałem różnych typów komórek pochodzenia nerwowego stwierdzono, że ekspozycja na AgNPs powoduje dysfunkcję mitochondriów. Wykazano to zarówno w hodowli szczurzych neuronów korowych inkubowanych z AgNPs o wielkości 20 nm (Xu i wsp., 2013), jak i w hodowli neuronów ziarnistych mózdzku szczura inkubowanych z AgNPs o wielkości < 100 nm (Zieminska i wsp., 2014). Zaburzenia czynności mitochondriów mogą w konsekwencji prowadzić do indukcji apoptozy komórek nerwowych (Hadrup i wsp., 2012; Xu i wsp., 2013; Yin i wsp., 2013). Również badania nad toksycznością AgNPs z udziałem komórek nowotworowych wywodzących się z parenchymy mózgowej [m.in. nerwiaka zarodkowego, łac. *neuroblastoma* (SH-SY5Y) i gwiaździaka, łac. *astrocytoma* (D384)] wykazały zależne od dawki AgNPs i czasu inkubacji zaburzenia funkcjonowania mitochondriów oraz uszkodzenia błon komórkowych, prowadzące do spadku ich przeżywalności, a także spadek proliferacji, zwłaszcza po kilkudniowej inkubacji z nanocząstkami (Coccini i wsp., 2014).

Obniżenie tempa proliferacji zaobserwowano również w linii mysich mózgowych komórek neuralnych (ang. *mouse brain neural cells*) inkubowanych z AgNPs, a zwłaszcza w przypadku mysich astrocytów (ang. *murine brain astrocytes*) (Huang i wsp., 2015). Ponadto, AgNPs hamowały proces wydłużania się aksonów oraz rozgałęziania się szczurzych korowych komórek neuronalnych i glejowych, prawdopodobnie na skutek degradacji składników cytoszkieletu ( $\beta$ -tubuliny, F-aktyny) oraz powodowały obniżenie poziomów białek synaptycznych (synaptofizyny i PSD-95) (Xu i wsp., 2013).

Wspomniane wcześniej wyniki badań wskazują, że stres oksydacyjny odgrywa istotną rolę w mechanizmie toksyczności AgNPs. W pewnym stopniu potwierdzono to również w badaniach nad ich neurotoksycznością. Wykazano podwyższony poziom ROS w doświadczeniach, w których AgNPs inkubowano z pierwotną hodowlą korowych komórek neuralnych (Haase i wsp., 2012), mysimi komórkami hipokampa HT22 (Ma i wsp., 2015) oraz z hodowlą komórek ziarnistych mózdzku szczura (Yin i wsp., 2013; Zieminska i wsp., 2014). Równolegle obserwowano karbonylację białek, nasilenie syntezy oksygenazy hemowej-1 (HO-1, ang. *heme oxygenase-1*) (Haase i wsp., 2012) oraz obniżenie poziomu zredukowanego glutationu (Yin i wsp., 2013). W doświadczeniach przeprowadzonych przez Haase i wsp. (2012) oraz Yin i wsp. (2013) zastosowano AgNPs o wielkości ok. 20 nm, a zmiany zostały

zaobserwowane już po kilku godzinach inkubacji z nanocząstkami. Z kolei, ekspozycja hodowli komórkowych wzbogacanych w astrocyty na AgNPs nie spowodowała nadprodukcji ROS, ani zmian w poziomie glutationu całkowitego (tGSH, ang. *total glutathione*) czy stosunku GSSG/GSH (Luther i wsp., 2012). Trudno jednak jednoznacznie stwierdzić, czy astrocyty są mniej wrażliwe na AgNPs niż neurony, gdyż w doświadczeniu tym zastosowano większe nanocząstki ( $75 \pm 20$  nm) niż w innych wymienionych, a czas inkubacji wynosił tylko 4 godz. Zastosowanie mniejszych AgNPs (25 nm) i wydłużenie czasu inkubacji skutkowało bowiem zależnym od stężenia AgNPs wzrostem produkcji ROS w hodowli szczurzych astrocytów (Sun i wsp., 2016).

Wykazano również, że w czasie ekspozycji na AgNPs w astrocytach dochodzi do aktywacji mechanizmów protekcyjnych. Stwierdzono zwiększoną syntezę metalotionein (MT, ang. *metallothionein*). MT to białka zawierające liczne reszty cysteinowe, mające zdolność wiązania jonów metali, co umożliwia ochronę komórek przed toksycznymi jonami metali ciężkich. Ponadto biorą one udział w reakcji obronnej związanej ze stresem oksydacyjnym, gdyż MT mają właściwości przeciwutleniające (Luther i wsp., 2012).

AgNPs mogą mieć również wpływ na inne elementy układu antyoksydacyjnego w OUN, choć dostępne wyniki badań nie są jednoznaczne. Wykazano bowiem wzrost ekspresji genów dla syntetazy glutationowej w mysich komórkach mikrogleju (BV-2) i spadek ekspresji tego genu w mysich astrocytach po 24 godz. inkubacji z AgNPs o wielkości 3-5 nm (Huang i wsp., 2015).

Wydaje się jednak, że mechanizm neurotoksyczności AgNPs jest procesem bardziej złożonym. Niektóre badania *in vitro* pokazują, że AgNPs zaburzają wewnątrzkomórkową homeostazę wapnia, prowadząc do podwyższenia jego wewnątrzkomórkowego stężenia i w konsekwencji do śmierci neuronów (Haase i wsp., 2012; Ziemska i wsp., 2014). Zaburzenie gospodarki wapniowej może być skutkiem aktywacji receptora glutaminergicznego NMDA, gdyż zastosowanie antagonisty NMDAR (MK-801) hamuje pobieranie radioaktywnego wapnia przez komórki (Ziemska i wsp., 2014).

Wykazano również, że 24 godz. inkubacja mysich komórek mikrogleju (BV-2) z AgNPs (3-5 nm) w stężeniu  $12,5 \mu\text{g/ml}$  powoduje wzrost sekrecji IL- $1\beta$  (Huang i wsp., 2015). Z kolei, Sun i wsp. (2015) zaobserwowali, że 24 godz. inkubacja szczurzych astrocytów z AgNPs (25 nm) w stężeniu  $1 \mu\text{g/ml}$  powoduje wzrost sekrecji licznych cytokin, w tym działającej przeciwzapalnie IL-10 oraz fraktalkiny – odpowiedzialnej za regulację migracji leukocytów. Dodatkowo, na skutek działania AgNPs dochodzi do wzrostu ekspresji genu dla białka prekursorowego amyloidu (ang. *amyloid precursor protein*) i spadku ekspresji genu dla

receptora lipoprotein niskiej gęstości (ang. *low-density lipoprotein receptor*) w mysich komórkach neuralnych (Huang i wsp., 2015).

Kolejnym aspektem dotychczasowych badań nad neurotoksycznością AgNPs było określenie ich wpływu na potencjał czynnościowy komórek nerwowych. W skrawkach szczurzych hipokampów inkubowanych z AgNPs (stężenie NPs w zakresie  $10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$  lub  $10^{-5}$  g/ml) zaobserwowano spadek amplitudy napięciowozależnego prądu sodowego ( $I_{Na}$ ) w obszarze CA1 hipokampa (Liu i wsp., 2009). Zależny od dawki spadek amplitudy  $I_{Na}$  został również zaobserwowany w komórkach neuroendokrynych, które były inkubowane z AgNPs ( $5 \pm 2$  nm) pokrytymi glikolem polietylenowym (Busse i wsp., 2013).

Szczególne znaczenie w badaniach nad neurotoksycznością mają badania *in vivo*, gdyż potencjalne toksyny muszą przedostać się najpierw przez bariery biologiczne, w tym BBB, aby osiągnąć parenchymę mózgową. W modelach *in vitro* nie jest możliwe sprawdzenie, jak w układzie złożonym zachowują się nanocząstki, i czy rzeczywiście stanowią realne zagrożenie dla organizmów żywych.

Przeprowadzona analiza histopatologiczna mózdków nowonarodzonych szczurów, którym podawano donosowo AgNPs pokryte PVP (o wielkości 20 - 25 nm) w dawce 0,2 lub 1 mg/kg m.c. przez 21 dni, wykazała degenerację warstwy ziarnistej mózdku, polegającą na utracie prawidłowej struktury tej warstwy i występowaniu obrzękniętych lub martwiczych obszarów w jej obrębie. Komórki tej warstwy miały nieprawidłowy kształt oraz wykazywały pyknozę jądra komórkowego (Yin i wsp., 2013). Z kolei donosowe podawanie nowonarodzonym szczurom nanocząstek srebra stabilizowanych cytrynianem przez okres 14 tygodni (o wielkości 20 - 25 nm; zastosowane dawki to 0,1; 0,2; 0,5 lub 1 mg/kg m.c.) prowadziło do zniszczenia warstwy ziarnistej mózdków. Ponadto, wykazano zmniejszenie masy ciała gryzoni oraz aktywację astrocytów (Yin i wsp., 2015a).

Zmiany histopatologiczne zostały również wykryte w obrębie hipokampa szczurów eksponowanych donosowo na AgNPs (o wielkości 32,68-380,21 nm) w dawce 3 lub 30 mg/kg m.c. Stwierdzono obrzęk i pyknozę jąder komórkowych w hipokampie oraz wzrost produkcji wolnych rodników tlenowych. U zwierząt eksponowanych na większą dawkę AgNPs obserwowano upośledzenie procesów uczenia się (Liu i wsp., 2012b).

AgNPs mogą mieć również wpływ na uwalnianie neuroprzebieżników. Podawane szczurom (o wielkości 14 nm) przez 28 dni w dawce 9 mg/kg m.c. powodowały wzrost stężenia dopaminy i serotoniny (5-hydroksytryptaminy) w mózgu, nie wpływając na uwalnianie noradrenaliny (Hadrup i wsp., 2012).

Nieliczne badania nad neurotoksycznością AgNPs w modelach *in vivo* pokazują również istnienie związku pomiędzy AgNPs a stresem oksydacyjnym i śmiercią komórki w ośrodkowym układzie nerwowym. Stwierdzono, że nanocząstki srebra powodują pozytywną regulację genów związanych ze stresem oksydacyjnym w mózgu myszy (kora czołowa, hipokamp), którym podano jednorazowo bardzo wysokie dawki AgNPs (100, 500 lub 1000 mg/kg m.c.) (Rahman i wsp., 2009). Wykazano także wzrost produkcji wolnych rodników tlenowych w hipokampie szczurów (Liu i wsp., 2012b) oraz aktywację kaspazy-3 (Yin i wsp., 2015a). Z kolei, jednorazowe, donosowe podanie myszom AgNPs o wielkości około 25 nm powodowało wzrost poziomu ekspresji HO-1, co może świadczyć o niekorzystnym wpływie AgNPs na potencjał oksydoredukcyjny (Davenport i wsp., 2015).



## 2. Założenia i cel pracy

Dotychczasowe dane literaturowe pokazują, że stosowanie AgNPs może mieć negatywny wpływ na organizmy żywe. Badania *in vitro* wykazały, że powodują one liczne zmiany ultrastrukturalne i biochemiczne w obrębie komórek, prowadzące do spadku ich przeżywalności. Jak dotąd poświęcono wiele uwagi ocenie wpływu AgNPs na wątrobę, gdyż to właśnie w tym narządzie są one głównie gromadzone po podaniu drogą pokarmową, wziewną czy pozajelitową. Niewiele jednak wiadomo o skutkach i mechanizmach neurotoksycznego działania *in vivo*. Ze względu na to, że dostępne obecnie dane literaturowe na temat dystrybucji nanocząstek srebra wyraźnie wykazują, że gromadzą się one w parenchymie mózgowej, istnieje potrzeba oceny ryzyka zdrowotnego, jakie może nieść ze sobą tak szybko postępująca komercjalizacja nanoproductów, a co za tym idzie również wzrost ekspozycji na nie. Jest to tym bardziej istotne, że jak dotąd, wzrastającemu ekonomicznemu znaczeniu nanomateriałów zawierających AgNPs nie towarzyszą odpowiednie regulacje prawne dotyczące ich bezpiecznego użycia. Z tego względu istnieje szczególna potrzeba badań nad potencjalnym toksycznym wpływem niskich dawek AgNPs, realistycznie odpowiadających scenariuszowi narażenia środowiskowego.

Do momentu rozpoczęcia niniejszej pracy nie było w literaturze informacji dotyczących neurotoksyczności AgNPs u dorosłych szczurów przewlekłe narażonych na niskie dawki tego typu nanocząstek. Dlatego też, **celem niniejszej pracy było określenie potencjalnej zdolności nanocząstek srebra do indukcji stresu oksydacyjnego, jako mechanizmu ich neurotoksycznego działania, w modelu przewlekłego narażenia szczura.**

Cel ogólny był realizowany w oparciu o następujące cele szczegółowe:

- zbadanie zdolności AgNPs o wielkości  $10 \pm 4$  nm do absorpcji z przewodu pokarmowego i kumulowania się w mózgu,
- ocena zmian ultrastrukturalnych w mózgu zwierząt eksponowanych na AgNPs,
- zbadanie poziomu markerów stresu oksydacyjnego oraz wybranych składowych komórkowego mechanizmu antyoksydacyjnego w mózgu i dla porównania w wątrobie,
- zbadanie poziomu wybranych mediatorów stanu zapalnego oraz markerów apoptozy i autofagii w mózgu i dla porównania w wątrobie,
- porównanie toksycznego działania nanocząstek srebra i jonów srebrowych.

### **3. Materiały i metody**

#### **3.1. Nanocząstki srebra i ich charakterystyka**

W badaniach zastosowano komercyjnie dostępne nanocząstki srebra (Sigma-Aldrich, CAS No. 730785) o średnicy  $10 \pm 4$  nm i o stężeniu 0,02 mg AgNPs/ml, występujące w postaci koloidalnego roztworu stabilizowanego cytrynianem sodu, który zapobiega ich agregacji i sedymentacji. Dodatkowo oceniono stopień ich rozproszenia i średnią wielkość za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (JEM-1200EX, Jeol). W tym celu zastosowano standardową procedurę przygotowania niebiologicznych próbek, która jest również używana do analizy nanocząstek (Lee i wsp., 2013b). Niewielką ilość badanego roztworu przeniesiono na siatkę i wysuszono na powietrzu. Preparaty sfotografowano przy użyciu aparatu cyfrowego MORADA, a następnie oceniono rozkład wielkości AgNPs na podstawie 20 elektronogramów i obliczono średnią wielkość  $\pm$  SD nanocząstek w preparacie.

AgNPs zostały zmierzone i policzone za pomocą iTEM 1233 software (Olympus Soft Imaging, Solutions GmbH, Niemcy).

#### **3.2. Zwierzęta doświadczalne**

Doświadczenia zostały przeprowadzone na dorosłych samcach szczurów szczepu Wistar o masie ciała 180-210 g, pochodzących ze zwierzętarni IMDIK PAN. Zwierzęta umieszczano po dwa osobniki w klatce i przetrzymywano w standardowych warunkach, tzn. w stałej temperaturze (22°C) i wilgotności, przy stałym cyklu dobowym 12/12 godzin, z nieograniczonym dostępem do wody i standardowej paszy.

Na wszystkie procedury, w których były wykorzystywane zwierzęta, otrzymano zgodę IV Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (nr uchwały: 52/2009 i 16/2014).

#### **3.3. Grupy doświadczalne i model narażenia na niską dawkę AgNPs**

W doświadczeniach (w tym w doświadczeniach pilotażowych) użyto ogółem 140 szczury.

Zwierzęta zostały losowo podzielone na 4 grupy:

- grupę „AgNPs”, która otrzymywała roztwór nanocząstek srebra o stężeniu 0,02 mg AgNPs/ml (n=40);

- grupę „cytrynian srebra”, która otrzymywała roztwór cytrynianu srebra o stężeniu 0,02 mg Ag<sup>+</sup>/ml (n=32);
- grupę „supernatant”, której podawano supernatant otrzymany przez ultrawierwienie w.w. roztworu AgNPs (170 tys. x g, 4°C, 45 min), w celu oceny stopnia uwalniania jonów srebra z powierzchni nanocząstek do roztworu (n=28);
- negatywną kontrolę, która otrzymywała sól fizjologiczną (n=40).

Wymienione roztwory były podawane zwierzętom jednorazowo za pomocą sondy dożołądkowej w ilości 1 ml/100 g masy ciała na dobę przez okres 14 dni. Objętość roztworów nanocząstek srebra i cytrynianu srebra była tak dobrana, aby zwierzęta otrzymywały dawkę 0,2 mg/kg m.c./dzień, AgNPs lub jonów srebrnych. Pozostałe grupy otrzymywały po 1ml/100 g m.c. odpowiednio soli fizjologicznej lub supernatantu. 24 godz. po ostatnim podaniu szczury były uśmiercane poprzez dekapitację lub poddane perfuzji w celu pobrania materiału do dalszych badań.

W przebiegu dwutygodniowej ekspozycji nie zanotowano epizodów śmierci. Nie stwierdzono również zmian wyglądu i zachowania zwierząt eksponowanych na związki srebra w porównaniu do negatywnej kontroli.

Model ekspozycji opracowano samodzielnie, jako model imitujący możliwe narażenie środowiskowe. Dawka AgNPs/Ag<sup>+</sup> została wyliczona na podstawie literatury, w której teoretycznie oszacowano wysokość rocznej produkcji AgNPs w najbliższych latach oraz zaproponowano możliwy scenariusz zanieczyszczenia środowiskowego (Fabrega i wsp., 2011).

### **3.4. Przygotowanie materiału do badań**

#### **3.4.1. Izolacja narządów i przygotowanie homogenatów do poszczególnych oznaczeń biochemicznych**

Zwierzęta dekapitowano. Wyizolowane mózgi i wątroby, po opłukaniu w zimnym buforze fosforanowym (pH 7,4), homogenizowano w odpowiednich dla danego oznaczenia buforach w stosunku 1g tkanki na 5 ml buforu. Część homogenatów zamrażano, a część używano bezpośrednio po sporządzeniu do przeprowadzenia odpowiednich oznaczeń.

- W celu oznaczenia poziomu reaktywnych form tlenu, narządy były homogenizowane w zimnym buforze o składzie: 25 mM HEPES, 250 mM sacharoza (pH 7,4) i od razu wykorzystane do oznaczenia.

- W celu oznaczenia poziomu peroksydacji lipidów, narządy homogenizowano w buforze Krebsa-Ringera (140 mM NaCl; 5 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 1,4 mM MgSO<sub>4</sub>; 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 4), a następnie mrożono.

- W celu oznaczenia poziomu tGSH i GSH/GSSG, narządy były homogenizowane w zimnym 50 mM buforze fosforanowym o pH 6,8; z dodatkiem 1 mM EDTA (kwas wersetowy, ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*). Po odwirowaniu (10000 × g, 15 min, 4°C), supernatanty poddano deproteinizacji za pomocą 10% roztworu kwasu metafosforowego zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta, a następnie zamrożono.

- W celu oznaczenia aktywności peroksydazy glutationowej, narządy homogenizowano w 25 mM HEPES o pH 7,4 zawierającym 250 mM sacharozę, 5 mM EDTA i 1 mM DTT (ditiotreitól, ang. *dithiothreitol*). Następnie homogenaty wirowano (10000 × g, 15 min, 4°C), supernatanty zebrano do oznaczenia i zamrożono.

- W celu oznaczenia aktywności reduktazy glutationowej, narządy homogenizowano w 50 mM roztworze fosforanu potasu o pH 7,5 zawierającym 1 mM EDTA. Następnie homogenaty wirowano (10000 × g, 15 min, 4°C), supernatanty zebrano do oznaczenia i zamrożono.

- W celu oznaczenia aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, narządy homogenizowano w 25 mM HEPES o pH 7,4 zawierającym 250 mM sacharozę i 5 mM EDTA. Następnie homogenaty wirowano (1500 × g, 5 min, 4°C), supernatanty zebrano do oznaczenia i zamrożono.

- W celu oznaczenia aktywności katalazy, narządy homogenizowano w 25 mM HEPES o pH 7,4 zawierającym 250 mM sacharozę, 1 mM EDTA. Następnie homogenaty wirowano (10000 × g, 15 min, 4°C), supernatanty zebrano do oznaczenia i zamrożono.

### **3.4.2. Preparatyka homogenatów mózgowych i wątrobowych do oznaczeń techniką Western blot**

Wyizolowane narządy homogenizowano w 50 mM buforze fosforanowym (pH 7,4) zawierającym 10 mM EGTA (ang. *ethylene glycol tetraacetic acid*), 10 mM EDTA, 0,1 mM fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF, ang. *phenylmethylsulfonyl fluoride*) i 100 mM NaCl oraz mieszaninę inhibitorów proteaz. Homogenaty zamrażano, a następnie używano do analizy Western blot.

### **3.5. Oznaczenie zawartości srebra w surowicy i narządach zwierząt z użyciem spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie wzbudzonej (ICP- MS)**

Oznaczenie poziomu srebra wykonano w surowicy, mózgu i wątrobie zwierząt po czternastodniowej ekspozycji na nanocząstki lub jony srebrowe. Krew pobierano z tętnicy szyjnej w czasie dekapitacji zwierząt i następnie wirowano (1000  $\times$ g, 10 min, 4°C). Surowicę rozcieńczono za pomocą 1% roztworu Triton i następnie oznaczono w niej poziom srebra za pomocą ICP- MS (ang. *inductively coupled plasma – mass spectrometry*) (Elan 6100 DRC Sciex Perkin Elmer, Kanada). Granica wykrywalności srebra wynosiła 0,17  $\mu$ g/l.

W celu określenia poziomu srebra w narządach zwierząt eksponowanych na AgNPs/Ag<sup>+</sup>, narządy ważono, liofilizowano i następnie trawiono za pomocą stężonego kwasu azotowego (V). W uzyskanych roztworach oznaczano poziom Ag z zastosowaniem metody krzywej kalibrowania wzorcem zewnętrznym, który został przygotowany z wykorzystaniem wzorca srebra. Jako roztwór wewnętrzny zastosowano roztwór rodu o stężeniu 50  $\mu$ g/l. Granica wykrywalności srebra wynosiła 0,241  $\mu$ g/kg mokrej tkanki.

W celu określenia biodostępności AgNPs, zwierzętom podano pojedynczą dawkę opisanego wyżej roztworu, a następnie szczury dekapitowano po 3, 5 i 8 godzinach od chwili podania w celu pobrania krwi. Następnie badano poziom Ag, postępując wg opisanej wyżej procedury.

Tą samą metodą oznaczono stężenie Ag<sup>+</sup> w supernatancie, które wynosiło 0,005 mg/ml.

Badania wykonano w Laboratorium Pomiarowym ICP-MS Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

### **3.6. Analiza obecności srebra w mózgu z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) oraz analiza zmian ultrastrukturalnych w mózgu szczurów eksponowanych na AgNPs/Ag<sup>+</sup>**

Zwierzęta po czternastodniowej ekspozycji na związki srebra (lub sól fizjologiczną) były usypiane za pomocą Nembutalu podawanego dootrzewnowo (80 mg/kg m.c.) i poddawane perfuzji przy użyciu 0,9% roztworu NaCl w 0,01 M buforze fosforanowym o pH 7,4; a następnie przy użyciu środka utrwalającego o składzie: 2% roztwór paraformaldehydu i 2,5% roztwór glutaraldehydu w 0,1 M buforze kakodylowym o pH 7,4. Fragmenty kory mózgowej i hipokampa (obszar CA1) poddano wtórnemu utrwalaniu za pomocą 1% roztworu czterotlenku osmu. Po odwodnieniu preparatów w roztworach etanolu o wzrastającym stężeniu, zatopiono

je w żywicy epoksydowej (Epon 812). Ultracienkie skrawki (60 nm) poddano kontrastowaniu, stosując roztwory octanu uranylu i cytrynianu ołowiu, a następnie analizowano je pod kątem zmian ultrastrukturalnych za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (JEM-1200EX, Jeol, Japan). W celu potwierdzenia obecności nanocząstek w materiale etap kontrastowania pomijano podczas przygotowywania preparatów, aby wykluczyć obecność strąków innych metali (Pb, U).

### **3.7. Oznaczenia biochemiczne**

#### **3.7.1. Oznaczenie stężenia białka w homogenatach metodą Lowry'ego**

Narządy (mózg oraz wątroba) homogenizowano w odpowiednich dla danego oznaczenia buforach. Stężenie białka w homogenatach zostało oznaczone za pomocą metody Lowry'ego (Lowry i wsp., 1951). Do oznaczenia użyto 10  $\mu$ l (lub 5  $\mu$ l w przypadku bardzo stężonych homogenatów) homogenatu, który rozcieńczono w 990  $\mu$ l (lub odpowiednio 995  $\mu$ l) wody. Dodano 4 ml mieszaniny zawierającej odczynnik A (2% roztwór  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  w 0,1 N NaOH) i B (0,5% roztwór  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  w 1% roztworze cytrynianu sodu) w stosunku 50:1 i inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 0,5 ml odczynnika Folina i inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu inkubacji mierzono absorbancję przy długości fali 655 nm (spektrofotometr Amersham Bioscience, Ultrospec 2100pro). Stężenie białka obliczano w odniesieniu do próby nie zawierającej białka oraz względem próby wzorcowej o znanym stężeniu białka. Jako standard białkowy zastosowano albuminę surowicy bydlęcej (BSA, ang. *bovine serum albumin*).

#### **3.7.2. Oznaczenie poziomu reaktywnych form tlenu w homogenatach przy użyciu sondy fluorescencyjnej DCF**

Poziom ROS (głównie rodniki hydroksylowy i peroksyłowy oraz nadtlenek wodoru) w homogenatach mózgowych i wątrobowych został oznaczony w oparciu o reakcję wewnątrzkomórkowej deacetylacji dwuoctanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ) do 2',7'-dichlorofluorescyny (DCFH), a następnie utlenianiu DCFH do silnie fluorescencyjnego związku – 2',7'-dichlorofluoresceiny (DCF) pod wpływem ROS (Royall i wsp., 1993).

Homogenaty inkubowano na płycie 96-dołkowej z 25  $\mu$ M  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  (Sigma) przez 30 min w temp. 37°C. Zastosowano również pozytywną kontrolę ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), negatywną kontrolę (brak homogenatu) oraz potwierdzono, że w czasie tej reakcji nie powstają niespecyficzne

sygnały spowodowane przez oddziaływanie AgNPs lub  $\text{Ag}^+$  z zastosowanymi odczynnikami. Fluorescencję DCF mierzono przy użyciu spektrofлуorymetru FLUOstar Omega Microplate Reader, BMG LABTECH przy długości fali pobudzenia 488 nm i emisji 530 nm. Jednostki fluorescencji (RFU) były przeliczane na mg białka w homogenacie, a następnie wyrażone jako % negatywnej kontroli (sól fizjologiczna).

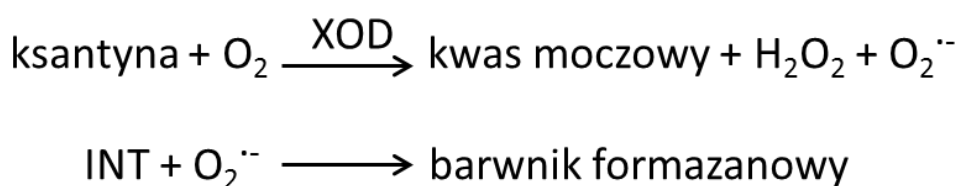
### 3.7.3. Oznaczenie peroksydacji lipidów błon komórkowych

Peroksydację lipidów w homogenatach mózgowych i wątrobowych mierzono poprzez określenie poziomu dwualdehydu malonylowego (MDA, ang. *malondialdehyde*) wg metody Wilbur i wsp. (Wilbur i wsp., 1949) zmodyfikowanej przez Asakawa i Matsushita (Asakawa, 1980). Produkty peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych tworzą barwne kompleksy z kwasem tiobarbiturowym (TBARS, ang. *2-thiobarbituric acid reactive substances*), przy czym powstaje przede wszystkim MDA.

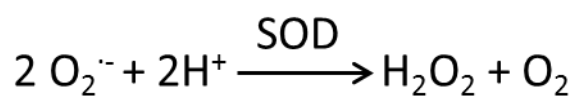
Pobierano odpowiednią objętość przygotowanych homogenatów i zawieszano je w buforze Krebsa-Ringera (pH 4). Ilość homogenatu była tak dobrana, aby stężenie białka w próbie wynosiło 0,5 mg/ml, a objętość próby wynosiła 0,95 ml. Do tak przygotowanej próby dodano 25  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$ , 800  $\mu\text{M}$  ADP i 200  $\mu\text{M}$  askorbinian sodu i inkubowano przez 15 min w łaźni wodnej w temp. 30°C. Następnie dodano 1 ml 30% roztworu kwasu trichlorooctowego; 0,1 ml 5 M roztworu kwasu solnego; 1ml 0,75% roztworu kwasu tiobarbiturowego i inkubowano przez 20 min w temp. 100°C. Równolegle inkubowano próby bez dodatku homogenatu (ślepa próba). Po odwirowaniu (4000  $\times$  g, 10 min, 4°C), przeprowadzono pomiar spektrofotometryczny (spektrofotometr Amersham Bioscience, Ultrospec 2100pro) przy długości fali 535 nm wobec ślepej próby. Do obliczeń stężenia MDA wykorzystano wartość jego molowego współczynnika ekstynkcji wynoszącą  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Wyniki przedstawiono jako % kontroli negatywnej (sól fizjologiczna).

### 3.7.4. Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)

Aktywność SOD oznaczono, stosując metodę, w której źródłem anionorodnika ponadtlenkowego [ $\text{O}_2^{\cdot-}$ ] jest reakcja utleniania ksantyny do kwasu moczowego katalizowana przez oksydazę ksantynową (XOD, ang. *xanthine oxidase/dehydrogenase*), a reakcją wskaźnikową – redukcją soli tetrazolowych [2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenol)-5-chlorek fenyltetrazoliny, INT] do czerwonego barwnika formazanowego pod wpływem  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Stężenie formazanu oznacza się spektrofotometrycznie.



Obecna w próbie badanej SOD konkuruje z INT o substrat (anionorodnik ponadtlenkowy), co prowadzi do osłabienia intensywności zabarwienia badanej próby, tym bardziej wyraźnego, im większa aktywność SOD.

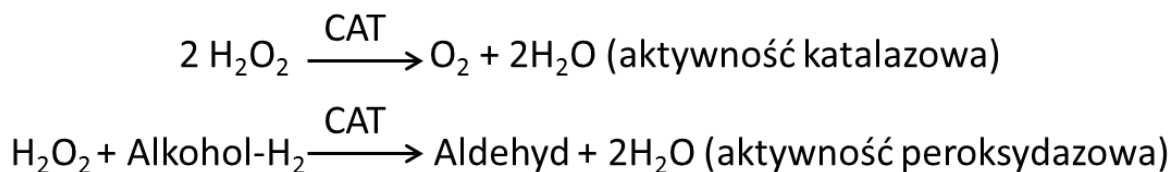


Jednostka aktywności SOD [U] jest definiowana jako ilość enzymu, która katalizuje dysmutację 50% ilości substratu.

Aktywność SOD (cytoplazmatycznej i mitochondrialnej łącznie) oznaczono w otrzymanym supernatancie za pomocą Dismutase Assay Kit (Cayman Chemical, USA), zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Wyniki wyrażono jako U/mg białka.

### 3.7.5. Oznaczenie aktywności katalazy (CAT)

Katalaza wykazuje dwie aktywności: katalazową i peroksydazową. Przy dużym stężeniu  $\text{H}_2\text{O}_2$  przeważa aktywność katalazowa enzymu polegająca na rozkładzie tego związku do wody i tlenu, a przy małym stężeniu  $\text{H}_2\text{O}_2$  dominuje aktywność peroksydazowa.



Aktywność peroksydazowa CAT została oznaczona w oparciu o jej reakcję z metanolem w obecności optymalnego stężenia  $\text{H}_2\text{O}_2$ . W wyniku tej reakcji powstaje formaldehyd, którego stężenie oznacza się metodą kolorymetryczną z użyciem chromogenu: 4-amino-3-hydrazyno-5-merkaptio-1,2,4-triazolu (Purpald). Purpald i formaldehyd tworzą barwny związek heterocykliczny, którego absorbancję oznacza się przy długości fali 540 nm.



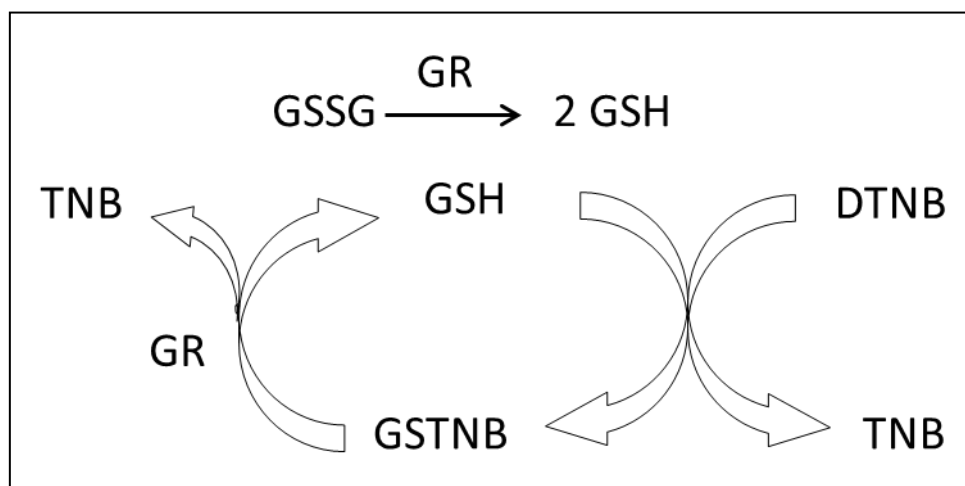
Aktywność CAT oznaczono w otrzymanym supernatancie za pomocą Catalase Assay Kit (Cayman Chemical, USA), zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Wyniki wyrażono jako nmol/min/mg białka (mózg) lub  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  białka (wątroba).

### 3.7.6. Oznaczenie stężenia glutationu zredukowanego i całkowitego

W celu oznaczenia poziomu glutationu całkowitego przeprowadzono redukcję GSSG w reakcji katalizowanej przez reduktazę glutationową, a następnie wykorzystano reakcję między grupami sulfhydrylowymi glutationu a kwasem 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowym) [DTNB, ang. *5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)*], w wyniku której powstaje kwas 5-tio-2-nitrobenzoesowy mający żółte zabarwienie (TNB, ang. *5-thio-2-nitrobenzoic acid*). Oprócz tego w reakcji powstaje produkt uboczny – disulfid GSTNB (GSH + TNB) – redukowany przez GR do GSH i TNB. Stężenie otrzymanego TNB jest proporcjonalne do stężenia glutationu w badanej próbce.

W celu oznaczenia poziomu GSSG najpierw inkubowano próbki z 2-winylopirydyną, aby zablokować grupy tiolowe w GSH, a tym samym zapobiec ich utlenieniu. Dzięki temu w dalszej reakcji bierze udział tylko wyjściowa pula GSSG.

Poziom GSH obliczono z różnicy poziomu glutationu całkowitego oraz utlenionego.

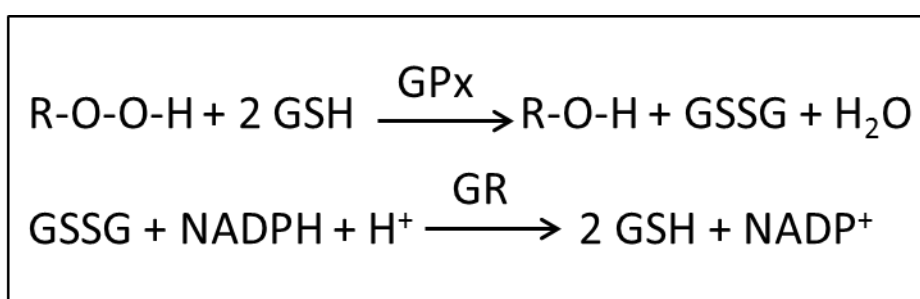


Poziom całkowitego glutationu (GSH + GSSG) wyrażony w nmolach/mg białka oraz stosunek glutationu zredukowanego do utlenionego (GSH/GSSG) oznaczono za pomocą Glutathione Assay Kit (Cayman Chemical, USA), zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta.

### 3.7.7. Oznaczenie aktywności peroksydazy glutationowej (GPx)

Peroksydaza glutationowa katalizuje reakcję redukcji nadtlenu organicznych i nadtlenu wodoru, przy czym donorem protonów jest zredukowany glutation. Następnie GSSG jest przekształcany z powrotem do formy zredukowanej w reakcji katalizowanej przez reduktazę glutationową, a czynnikiem redukującym jest NADPH (Brigelius-Flohe, 1999; Jeeva i wsp., 2015). Utlenianiu NADPH do  $\text{NADP}^+$  towarzyszy spadek absorbancji przy długości fali 340 nm, przy czym spadek poziomu absorbancji jest proporcjonalny do aktywności GPx w próbce.

Mechanizm redukcji nadtlenu katalizowanej przez GPx jest następujący:



Aktywność GPx oznaczono w otrzymanym supernatancie w sposób pośredni za pomocą Glutathione Peroxidase Assay Kit (Cayman Chemical, USA), zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Wyniki wyrażono w jednostkach nmol/min/mg białka.

### 3.7.8. Oznaczenie aktywności reduktazy glutationowej (GR)

Reduktaza glutationowa jest katalizatorem reakcji redukcji GSSG do GSH w obecności NADPH, wg mechanizmu opisanego w poprzednim podrozdziale.

Aktywność GR oznaczono w otrzymanym supernatancie za pomocą Glutathione Reductase Assay Kit (Cayman Chemical, USA), zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Wyniki wyrażono w jednostkach nmol/min/mg białka.

## 3.8. Elektroforeza białka i immunodetekcja metodą Western blot

### 3.8.1. Rozdział elektroforetyczny białek

Próbki badanego materiału (homogenaty mózgowy i wątrobowy) zostały poddane elektroforezie jednokierunkowej w żelu poliakrylamidowym z dodatkiem dodecylosiarczanu sodu (SDS-PAGE, ang. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Przed elektroforezą do próbek dodano bufor Laemmliego w stosunku 1:1 (zawierający 62,5 mM Tris-

HCl o pH 6,8; 10% glicerol; 2% SDS; 1,5%  $\beta$ -merkaptoetanol; 0,05% błękit bromofenolowy), a następnie denaturowano przez 5 min w temp. 100°C.

Elektroforezę przeprowadzono w żelu poliakrylamidowym (7%, 10% lub 15% żel rozdzielający w zależności od wielkości badanego białka; 4% żel zagęszczający) w buforze do elektroforezy (25 mM Tris; 192 mM glicyna; 0,5% SDS) przy użyciu aparatu do elektroforezy firmy BioRad. Na żel nakładano 50  $\mu$ g białka (w przypadku oznaczania poziomu synaptofizyny nałożono 20  $\mu$ g białka), rozdzielano przez 15 min przy napięciu prądu wynoszącym 90 V, a następnie przy napięciu 120 V aż do całkowitego rozwinięcia się elektroforezy. Względne masy analizowanych białek wyznaczono w oparciu o standardy białkowe „*Sharp Pre-Stained Protein Standard*” (Novex, ThermoFisher Scientific).

### 3.8.2. Elektrotransfer białek

W kolejnym etapie białka zostały przetransferowane na membranę nitrocelulozową 0,45  $\mu$ m Hybond-Extra C (Amersham) metodą elektroblottingu w zestawie do transferu firmy BioRad. W tym celu żel został umieszczony w kasecie razem z membraną oraz dociskającymi je bibułami Whatman 3 mm i porowatym materiałem. Całość została zanurzona w buforze do transferu (zawierającym 25 mM Tris-HCl o pH 8,3; 192 mM glicynę; 20% metanol). Transfer prowadzono przy stałym natężeniu prądu wynoszącym 50 mA przez całą noc. Wydajność transferu sprawdzano poprzez barwienie membran roztworem czerwieni Panceau (0,1% Panceau w 5% kwasie octowym w/v), a następnie trzykrotne (po 10 min) opłukiwanie błon w roztworze PBS.

### 3.8.3. Immunodetekcja białek

Immunodetekcję białek przeprowadzano poprzez inkubację membran nitrocelulozowych z przeciwciałami pierwszorzędowymi specyficznymi dla badanych białek (Tabela 2). Najpierw błony nitrocelulozowe były inkubowane przez 1 godz. z 5% odtłuszczonym mlekiem, aby zablokować niespecyficzne wiązanie przeciwciał. Następnie membrany inkubowano przez noc w temp. 4°C z przeciwciałami pierwszorzędowymi o stężeniach zalecanych przez producenta (Tabela 2), zawieszonymi w buforze PBST (zawierającym 80 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  o pH 7,5; 100 mM NaCl; 0,05% Tween 20) z 5% odtłuszczonym mlekiem. Nadmiar przeciwciał został usunięty z błon poprzez płukanie ich w buforze PBST (3  $\times$  10 min, temperatura pokojowa). Następnie membrany inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej z przeciwciałami drugorzędowymi skoniugowanymi z peroksydazą chrzanową (Tabela 3), skierowanymi przeciwko przeciwciałom

pierwszorzędowym. Przeciwciała drugorzędowe również zawieszano w buforze PBST z 5% mlekiem odtłuszczonym. Po inkubacji nadmiar przeciwciał został usunięty poprzez płukanie błon w buforze PBST (3 × 10 min, temperatura pokojowa). Specyficzność wiązania kontrolowano poprzez przeprowadzenie immunodetekcji z pominięciem przeciwciała pierwszorzędowego.

Lokalizację przeciwciał drugorzędowych uwidoczniło za pomocą komercyjnego zestawu ECL™ Western blotting detection reagent and analysis system (Amersham) i kliszy Hyperfilm™ ECL (Amersham). Następnie klisze skanowano za pomocą Image Scanner III (GE Healthcare) i densytometrowano z użyciem programu Image J 1,44p (Wayne Rasband, NIH, USA).

Jako standardu wewnętrznego użyto przeciwciała specyficznego dla aktyny lub dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH, ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) w zależności od badanego białka. Różnice w immunoreaktywności aktyny/GAPDH były uwzględniane w wynikach dla badanych białek.

**Tabela 2.** Przeciwciała pierwszorzędowe wykorzystane w badaniach Western blot

Specyficzność przeciwciała	Gospodarz	Gęstość żelu	Rozcieńczenie	Producent
Synaptofizyna	Mysz	10%	1:200	Sigma Aldrich
Synapsyna I	Królik	10%	1:1000	Sigma Aldrich
PSD-95	Mysz	7%	1:2000	ThermoFisher Scientific
Bax	Królik	15%	1:1000	Sigma Aldrich
Bcl-2	Mysz	15%	1:500	Sigma Aldrich
IL-1β	Mysz	15%	1:500	R&D Systems
IL-6	Mysz	15%	1:250	R&D Systems
Beklina 1	Mysz	10%	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
MAP LC3	Mysz	15%	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
GAPDH	Królik	-	1:500	Santa Cruz Biotechnology
Aktyna	Mysz	-	1:400	MP Biomedicals

**Tabela 3.** Przeciwciała drugorzędowe wykorzystane w badaniach Western blot

Specyficzność przeciwciała	Gospodarz	Rozcieńczenie	Producent
Anty-mysz	Koza	1:10000	Sigma Aldrich
Anty-królik	Koza	1:10000	Sigma Aldrich

### 3.9. Oznaczanie mitochondrialnego potencjału błonowego

W warunkach fizjologicznych, w poprzek wewnętrznej, wysoce nieprzepuszczalnej błony mitochondrium, tworzy się elektrochemiczny gradient protonów. Z tym gradientem jest związany potencjał transbłonowy mitochondrium. Spadek tego potencjału świadczy o utracie integralności wewnętrznej błony mitochondrialnej, co jest uznawane za wczesny etap apoptozy. Można go uwidocznić poprzez wykazanie zmniejszonej retencji lipofilnych, kationowych barwników, w tym barwnika JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazolokarbocyanianu jodku) – fluorescencyjnej sondy potencjału mitochondrialnego.

W żywych, nieuszkodzonych komórkach barwnik JC-1 ulega akumulacji w mitochondriach o wysokim potencjale błonowym w postaci agregatów dających intensywną fluorescencję barwy czerwonej, a spadek potencjału mitochondrialnego prowadzi do rozpadu tych agregatów do monomerów, co jest obserwowane jako zmiana fluorescencji na zieloną. Ponadto zmniejsza się przepuszczalność błony mitochondrialnej dla tego związku i nasila się jego gromadzenie w cytoplazmie. Na podstawie zmiany w emitowaniu fluorescencji pochodzącej od monomerów i/lub agregatów, stosowanie sondy JC-1 pozwala na szybką ocenę potencjału mitochondrialnego.

Narządy pobrano natychmiast po dekapitacji zwierząt, homogenizowano w zimnym buforze do ekstrakcji zawierającym 5 mM HEPES o pH 7,4; 225 mM mannitol; 75 mM sacharozę; 0,5 mM EGTA oraz albuminę w stężeniu 2 mg/ml, a następnie wirowano ( $600 \times g$ , 5 min,  $4^{\circ}C$ ). Użyto 10 ml buforu do ekstrakcji na 1 g tkanki. Otrzymany supernatant wirowano ponownie ( $11000 \times g$ , 10 min,  $4^{\circ}C$ ). Osad zawierający frakcję bogatą w mitochondria P2 zawieszono w buforze umożliwiającym przeżycie mitochondriów. Zawiera on 10 mM HEPES o pH 7,5; 225 mM sacharozę; 2 mM  $K_2HPO_4$ ; 1 mM ATP; 0,1 mM ADP; 5 mM bursztynian sodu oraz 1 mM DTT. Dodano 40  $\mu l$  buforu na 100 mg tkanki. Po oznaczeniu poziomu białka, zmierzono mitochondrialny potencjał błonowy z użyciem sondy JC-1. Zastosowano Isolated

Mitochondria Staining Kit (Sigma Aldrich, USA), a oznaczenie przeprowadzono zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Wyniki wyrażono jako % kontroli.

### **3.10. Analiza statystyczna**

Wyniki zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna wraz z odchyleniem standardowym (SD). Liczebność grup zwierząt w poszczególnych eksperymentach została podana w legendach rycin.

Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem wielokrotnych porównań Dunnetta. W poszczególnych eksperymentach przyjęto następujące poziomy istotności statystycznej:  $P < 0,001$  – \*\*\*;  $P < 0,01$  – \*\*;  $P < 0,05$  – \*. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu GraphPad Prism 5 (San Diego, USA).

Analiza TEM skrawków kory mózgowej i hipokampa została przeprowadzona pod kątem nieprawidłowych cech ultrastrukturalnych w obrębie synaps. Różnice w wybranych cechach zostały oszacowane na podstawie 20 elektronogramów otrzymanych z 4 zwierząt w obrębie każdej grupy (negatywna kontrola, supernatant, grupa AgNPs, grupa cytrynianu srebra). Grupy zostały porównane ze sobą za pomocą testu Fishera.

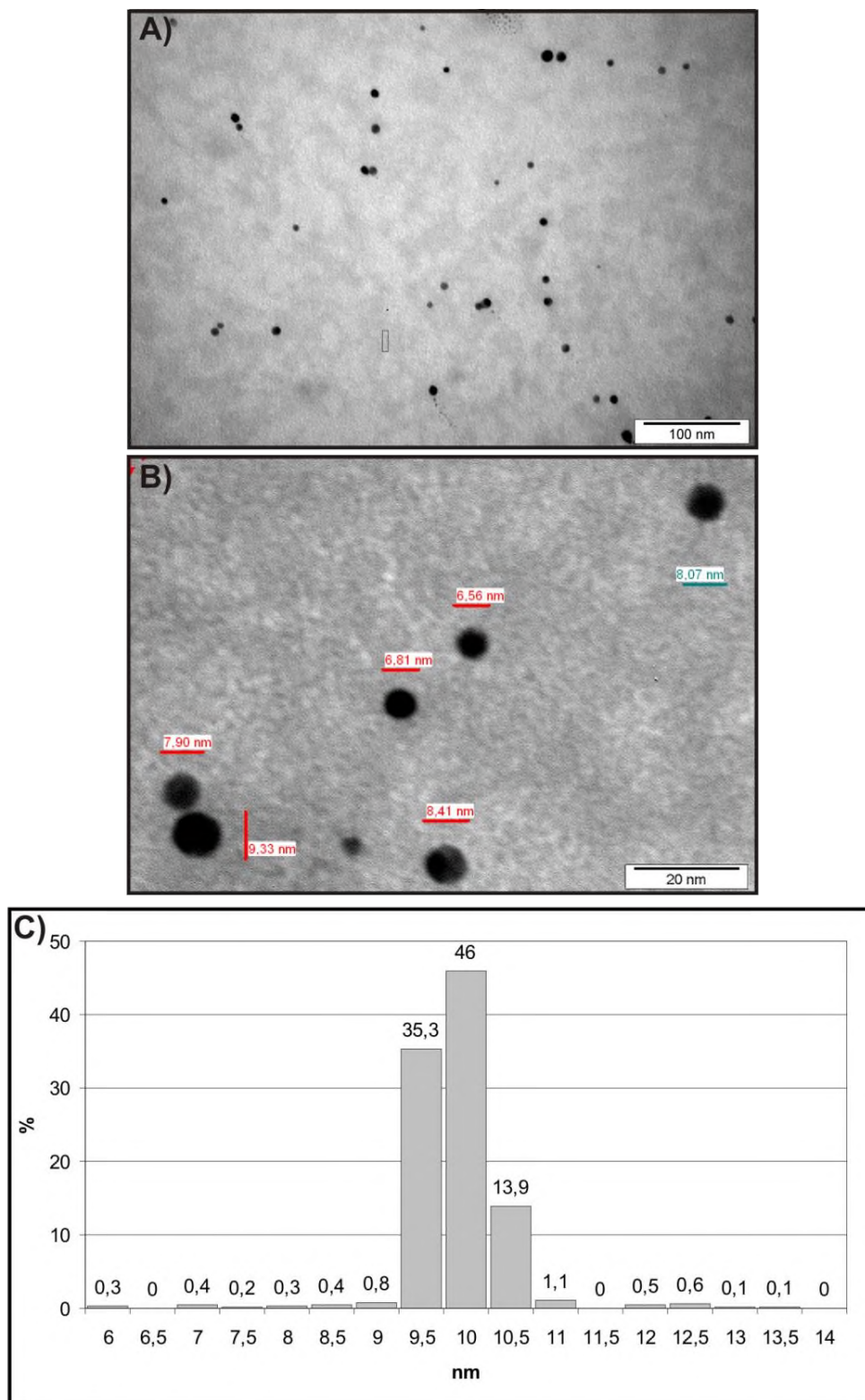
## 4. Wyniki

### 4. 1. Charakterystyka badanych nanocząstek srebra

W badaniach zastosowano komercyjnie dostępne AgNPs o średnicy  $10 \pm 4$  nm, występujące w postaci koloidalnego roztworu stabilizowanego cytrynianem sodu o stężeniu 0,02 mg AgNPs/ml. Producent przeprowadził ich charakterystykę z zastosowaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego, metody dynamicznego rozpraszania światła (DLS, ang. *dynamic light scattering*), pomiaru potencjału zeta oraz spektroskopii UV-VIS (ang. *ultraviolet-visible spectroscopy*) [<http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html>].

Rozkład wielkości, średnia wielkość oraz stopień rozproszenia nanocząstek w preparacie zostały dodatkowo ocenione za pomocą TEM. Analiza elektronogramów ujawniła, że AgNPs praktycznie nie tworzą agregatów we wspomnianym roztworze, mają sferyczny kształt i zbliżoną wielkość (Ryc. 3A i B).

Rozkład wielkości AgNPs został oceniony na podstawie 20 elektronowych mikrofotografii (liczba AgNPs na każdej mikrofotografii wynosiła 35-70). Więcej niż 95% AgNPs miało wielkość oscylującą wokół 10 nm. Mniej niż 5% nanocząstek miało średnice większe lub mniejsze niż 10 nm (Ryc. 3C).



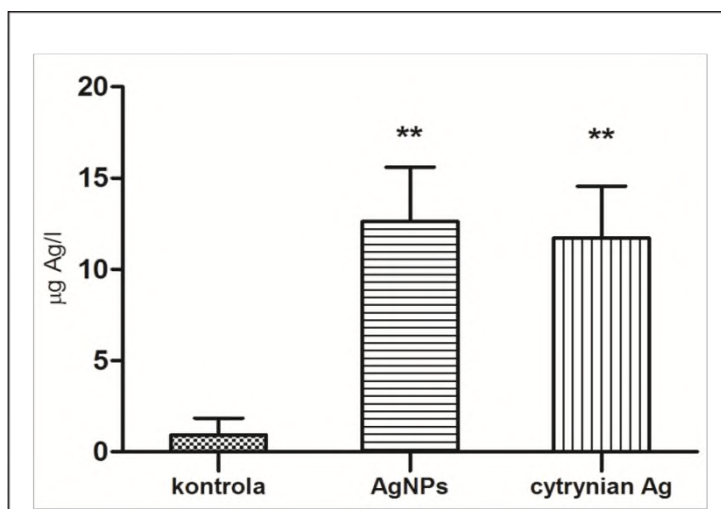
**Rycina 3.** Stopień rozproszenia i rozkład wielkości AgNPs występujących w postaci koloidalnego roztworu stabilizowanego cytrynianem sodu o stężeniu 0,02 mg AgNPs/ml. (A) Reprezentatywny elektronogram przedstawiający AgNPs. (B) Reprezentatywny elektronogram przedstawiający AgNPs z zaznaczoną wielkością poszczególnych nanocząstek. (C) Histogram wielkości AgNPs sporządzony na podstawie 20 elektronogramów.



## 4.2. Zawartość srebra w surowicy i narządach zwierząt eksponowanych na AgNPs lub jony srebra

Aby wykazać, że AgNPs są wchłaniane z przewodu pokarmowego do układu krwionośnego, szczurom podano jednorazowo roztwór badanych AgNPs w ilości 0,2 mg AgNPs/kg m.c., a następnie zwierzęta dekapitowano po 3, 5 i 8 godz. od chwili podania i określono stężenie srebra w surowicy. Stwierdzono, że jego stężenie utrzymuje się na zbliżonym poziomie przez kilka godzin od podania. Otrzymano następujące wartości: po 3 godz -  $43,36 \pm 26,49 \mu\text{g/l}$ ; po 5 godz. -  $53,76 \pm 32,81 \mu\text{g/l}$ ; a po 8 godz. -  $44,1 \pm 21,41 \mu\text{g/l}$  (n=3 dla każdego punktu czasowego).

Oznaczono również poziom srebra w surowicy, mózgu i wątrobie zwierząt po dwutygodniowej ekspozycji na AgNPs, jony srebra lub sól fizjologiczną. Materiał do analizy pobrano 24 godz. po ostatnim podaniu. W przypadku narządów oznaczany poziom srebra znajdował się poniżej granicy wykrywalności, która wynosiła  $0,241 \mu\text{g/kg}$  mokrej tkanki. Z kolei w surowicy zwierząt eksponowanych na AgNPs lub  $\text{Ag}^+$  stwierdzono istotny statystycznie wzrost stężenia srebra w porównaniu do grupy kontrolnej (sól fizjologiczna). Zawartość srebra w obu grupach wynosiła około  $12 \mu\text{g/l}$ .

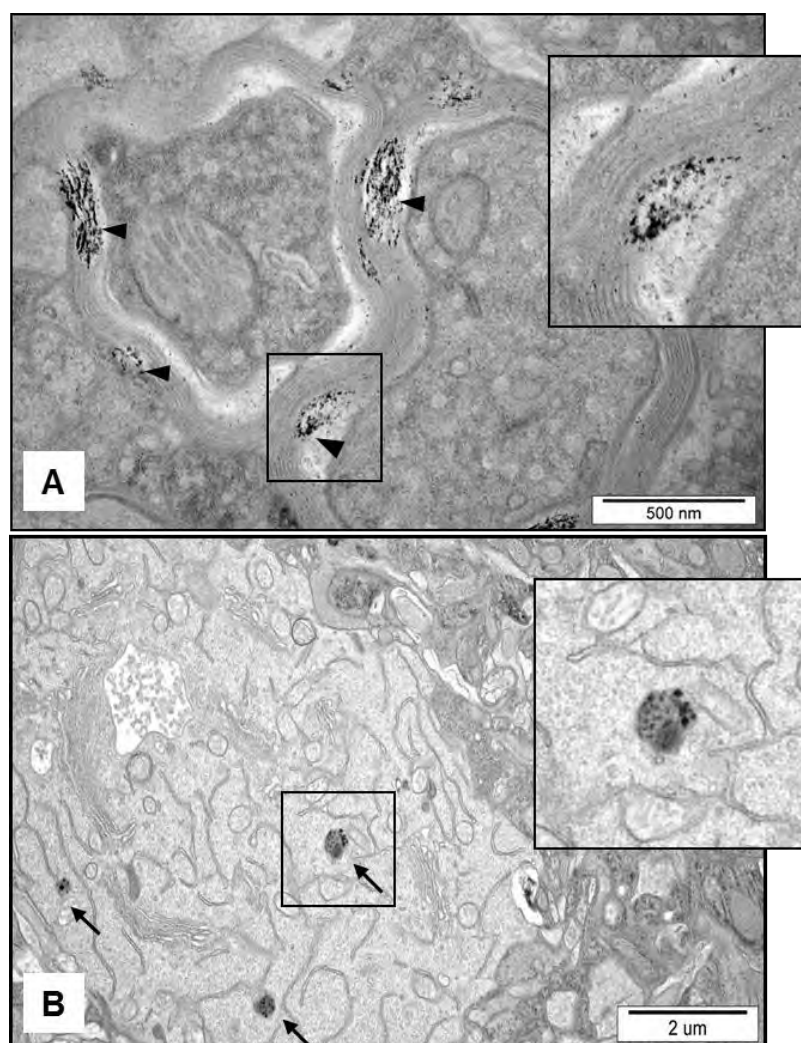


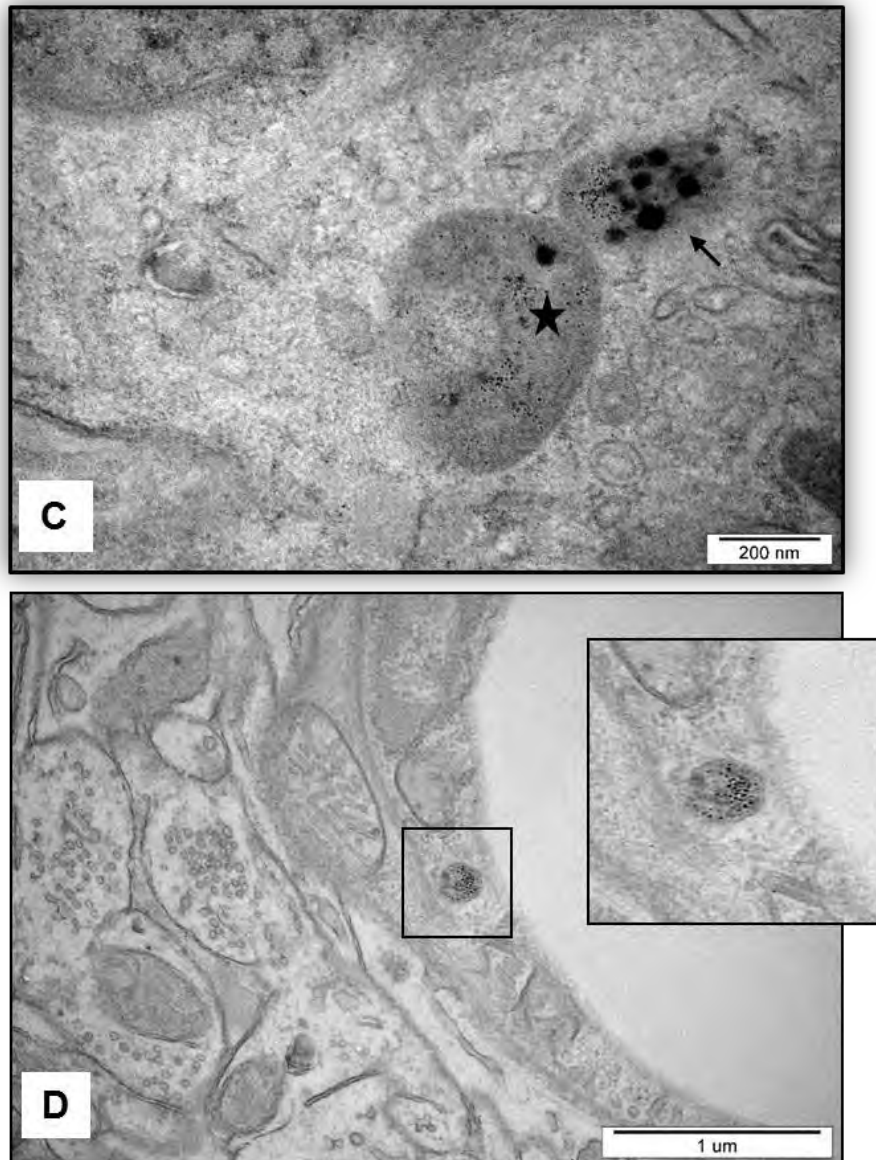
**Rycina 4.** Stężenie srebra w surowicy zwierząt eksponowanych przez 14 dni na sól fizjologiczną (kontrola), AgNPs lub cytrynian srebra i dekapitowanych 24 godz. po ostatnim podaniu. Stężenie srebra zostało oznaczone techniką ICP-MS. Wyniki wyrażono w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SD; n=3-4. Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Dunnetta; różnice istotne statystycznie \*\* -  $p < 0,01$  vs kontrola.

### 4.3. Potwierdzenie obecności srebra w mózgu zwierząt eksponowanych na AgNPs oraz analiza zmian ultrastrukturalnych w obrębie kory mózgowej i hipokampa zwierząt z wykorzystaniem TEM

Ze względu na zbyt małą dawkę AgNPs nie udało się potwierdzić obecności srebra w mózgu eksponowanych zwierząt z użyciem techniki ICP-MS. W tym celu zastosowano zmodyfikowaną technikę przygotowania próbek do oznaczenia TEM, która wyklucza użycie metali ciężkich. Dzięki zastosowaniu takiej metodologii zaobserwowano obecność ciemnych nanogranul o średnicy zbliżonej do badanych nanocząstek w parenchymie mózgowej zwierząt eksponowanych na AgNPs przez 14 kolejnych dni.

Nanogranule były obecne pomiędzy blaszkami osłonek mielinowych (Ryc. 5A), wewnątrz lizosomów (Ryc. 5B i C) i mitochondriów komórek nerwowych (Ryc. 5C) oraz w lizosomach zlokalizowanych w mikronaczyniach mózgowych (Ryc. 5D).

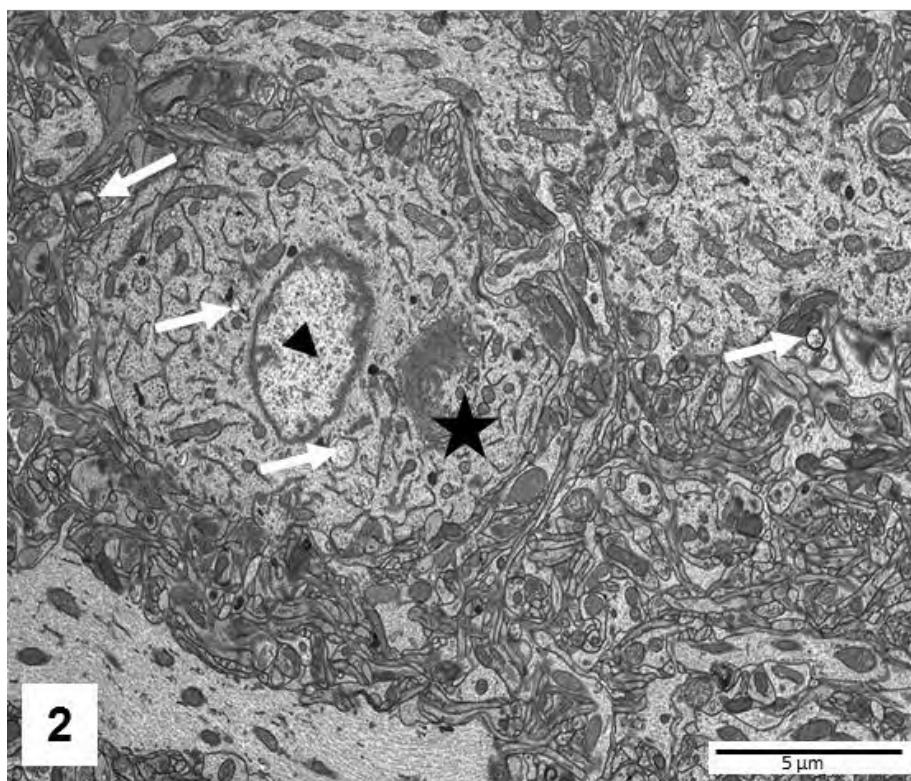
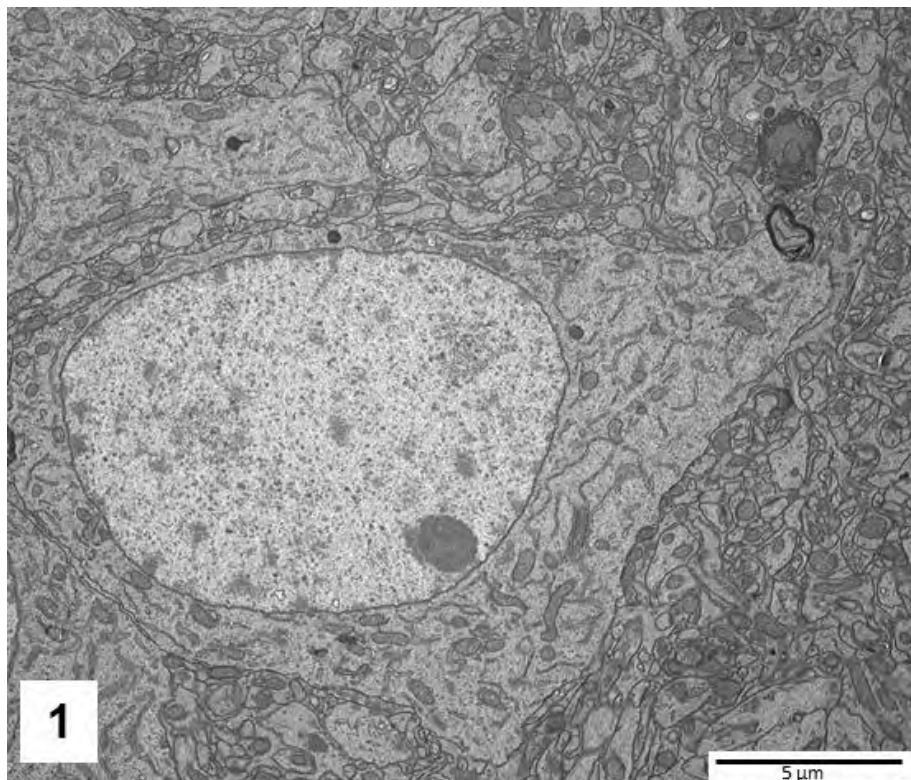


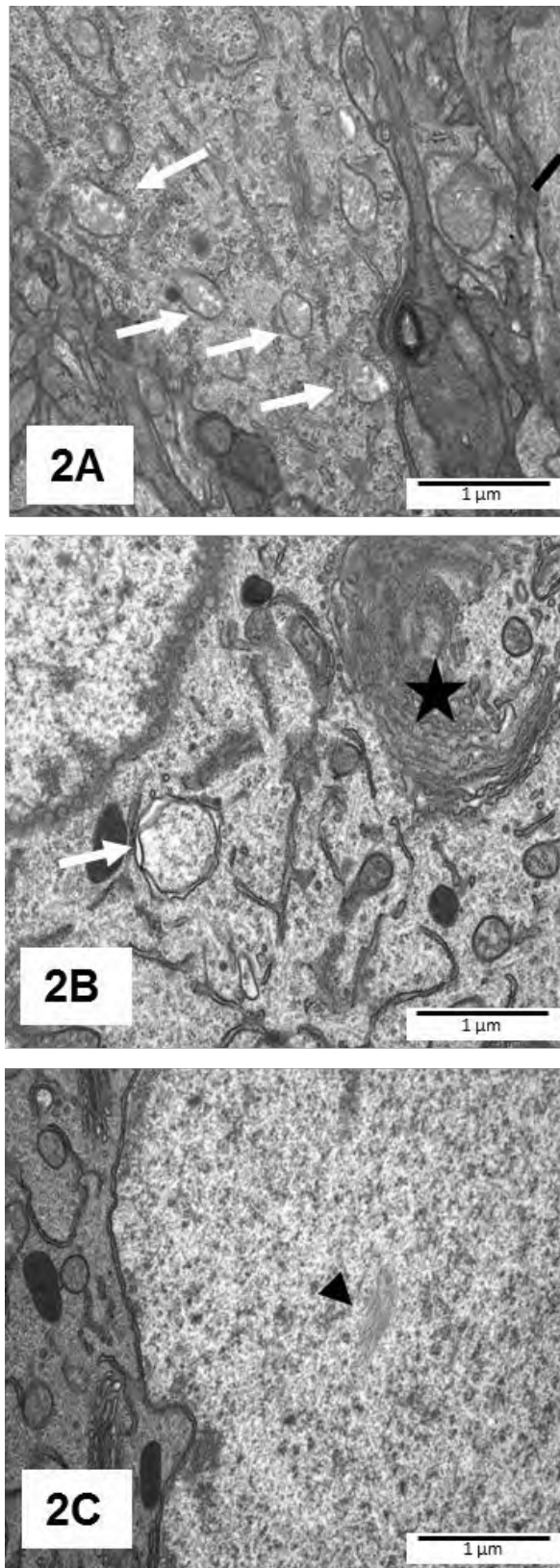


**Rycina 5.** Reprezentatywne elektronogramy przedstawiające obecność nanogranul w parenchymie mózgowej zwierząt eksponowanych na AgNPs. Ultracienkie skrawki hipokampa (B) i kory mózgowej (A, C, D) przygotowano techniką bez użycia metali ciężkich (octan uranylu, cytrynian ołowiu), żeby potwierdzić obecność AgNPs w parenchymie. Nanogranule były zlokalizowane: (A) pomiędzy blaszkami osłonek mielinowych aksonów (trójkąt), (B) wewnątrz lizosomów zlokalizowanych w cytoplazmie neuronów (strzałka), (C) wewnątrz lizosomów (strzałka) i mitochondriów (gwiazdka) zlokalizowanych w cytoplazmie neuronu oraz (D) wewnątrz lizosomów zlokalizowanych w komórkach endotelialnych mikronaczyń kory mózgowej. W ramach przedstawiono fragmenty obrazu w 3-4-krotnym powiększeniu.

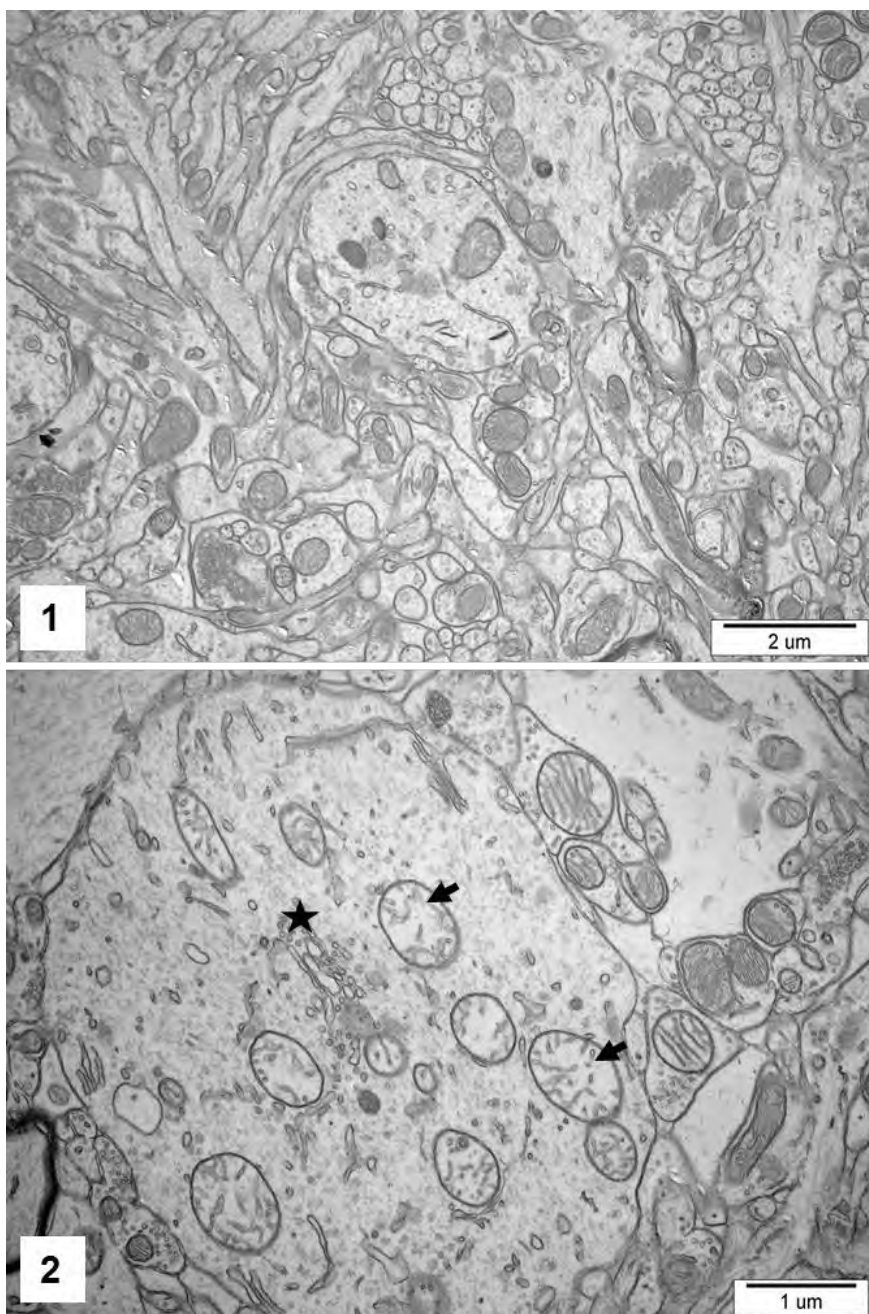
Zmiany ultrastrukturalne w obrębie organelli komórkowych zostały zaobserwowane głównie w neuronach korowych i hipokampalnych. Przejawiały się one obrzękniętymi mitochondriami z fragmentacją grzebieni mitochondrialnych, nadreaktywnością aparatu Golgiego oraz zaburzeniami cytoszkieletu jądrowego (Ryc. 6 i 7). Podobne zmiany, choć

znacznie słabiej wyrażone, obserwowano w mózгах zwierząt eksponowanych na jonową formę srebra.





**Rycina 6.** Neurony korowe mózgow zwierząt kontrolnych (1) i ekspozowanych na AgNPs (2). Reprezentatywne elektronogramy przedstawiające zmiany ultrastrukturalne w neuronach widoczne w postaci: (2A) obrzękniętych mitochondriów z fragmentacją grzebieni mitochondrialnych (strzałki); (2B) nadreaktywnego aparatu Golgiego (gwiazdka) oraz (2C) zmian cytoszkieletu jądrowego (trójkąt). Skrawki przygotowano wg standardowej procedury.



**Rycina 7.** Neurony hipokampalne mózgow zwierząt kontrolnych (1) i eksponowanych na AgNPs (2). Reprezentatywny elektronogram (2) przedstawia zmiany ultrastrukturalne w neuronach widoczne w postaci obrzękniętych mitochondriów z fragmentacją grzebieni mitochondrialnych (strzałki) oraz nadreaktywnego aparatu Golgiego (gwiazdka). Skrawki przygotowano wg standardowej procedury.

#### **4.4. Analiza zmian wywołanych przez AgNPs i jony srebra w obrębie synaps**

##### **4.4.1. Zmiany ultrastrukturalne**

Analiza ultracienkich skrawków uzyskanych z mózgu zwierząt kontrolnych wykazała, że synapsy, pęcherzyki synaptyczne, mitochondria i inne struktury komórkowe zlokalizowane w obrębie neuropilu mają prawidłową strukturę. Synapsy widoczne na elektronogramach



posiadają wyraźną i nieuszkodzoną błonę cytoplazmatyczną oraz charakteryzują się obecnością typowego zagęszczenia postsynaptycznego (ang. *postsynaptic density*), czyli pasma gęstego elektronowo amorficznego materiału przylegającego do błony postsynaptycznej od strony wnętrza komórki i zawierającego białka łączące błonę komórkową z cytoszkieletem oraz białka związane z receptorami błony postsynaptycznej. Pęcherzyki synaptyczne są równomiernie rozmieszczone w obrębie cytoplazmy zakończeń synaptycznych, a szczeliny synaptyczne są wyraźnie zarysowane w neuropilu (Ryc. 8).

Ocena elektronogramów uzyskanych z mózgu zwierząt eksponowanych na AgNPs lub cytrynian srebra wykazała zmiany patologiczne zarówno w obrębie kory mózgowej jak i hipokampa, przy czym zmiany te były nierównomiernie rozmieszczone. Analiza ilościowa zmian ultrastrukturalnych w obrębie synaps wykazała, że hipokamp jest bardziej podatny na uszkodzenia niż kora mózgowa, a silniejszym czynnikiem uszkadzającym są AgNPs (Tabela 4). Profil zmian ultrastrukturalnych wywołanych przez AgNPs i formę jonową srebra był podobny. Jednakże niektóre ze zmian, t.j. luźne skupiska pęcherzyków synaptycznych w neuropilu i ciała mielinopodobne (ang. *myelin-like bodies*), były charakterystyczne wyłącznie dla AgNPs (Ryc. 9C, D i F).

W neuropilu zwierząt eksponowanych na obie formy srebra stwierdzono obrzęk zakończeń synaptycznych oraz zwiększoną gęstość pęcherzyków synaptycznych (Ryc. 9A oraz 10A i B), przy czym takich zmian nie stwierdzono w grupie kontrolnej (Ryc. 8B i C). Ponadto liczne szczeliny synaptyczne były pogrubione i miały „rozmytą” strukturę (Ryc. 9B i 10B-D). W korze mózgowej i hipokampie zwierząt eksponowanych na AgNPs stwierdzono także uszkodzenia błon synaptycznych i uwolnione skupiska pęcherzyków synaptycznych w neuropilu (Ryc. 9B-D). Ponadto zaobserwowano, głównie w hipokampie, obecność struktur świadczących o degeneracji komórek, takich jak ciała mielinopodobne (Ryc. 9D i F), których występowanie jest łączone przez niektórych badaczy ze zjawiskiem autofagii (Kelekar, 2005) oraz ciała wielopęcherzykowe (ang. *multivesicular bodies*) (Ryc. 9E).

U zwierząt eksponowanych na supernatant występowały nieliczne zmiany, podobne do tych jakie obserwowano w grupie eksponowanej na jonową formę srebra. W żadnej z badanych grup nie stwierdzono obecności neuronów z cechami śmierci komórkowej.

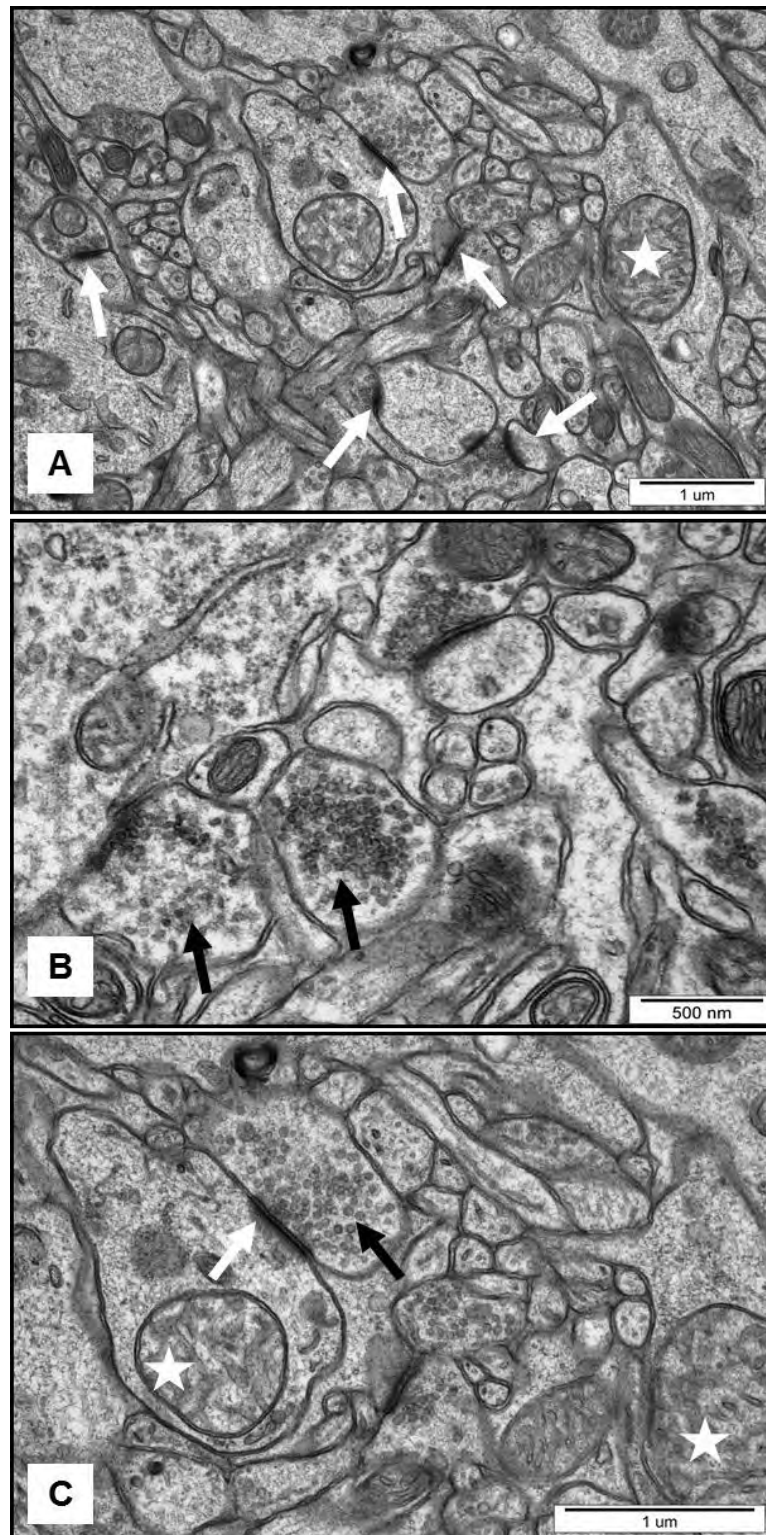
**Tabela 4.** Półilościowa analiza zmian ultrastrukturalnych w obrębie synaps zlokalizowanych w korze mózgowej i hipokampie szczurów eksponowanych na AgNPs lub cytrynian srebra.

Cechy ultrastrukturalne	AgNPs		Cytrynian srebra	
	Kora mózgowa	Hipokamp	Kora mózgowa	Hipokamp
Obrzęk zakończeń synaptycznych	+	+++	+	++
Zwiększona gęstość pęcherzyków synaptycznych	+	+++ <sup>a</sup>	+	++
Rozmyta struktura szczelin synaptycznych	+	++	+	++
Skupiska pęcherzyków synaptycznych w neuropilu	++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>	-	-
Ciała mielinopodobne	-	++ <sup>a</sup>	-	-
Ciała wielopęcherzykowe	-	+	-	+

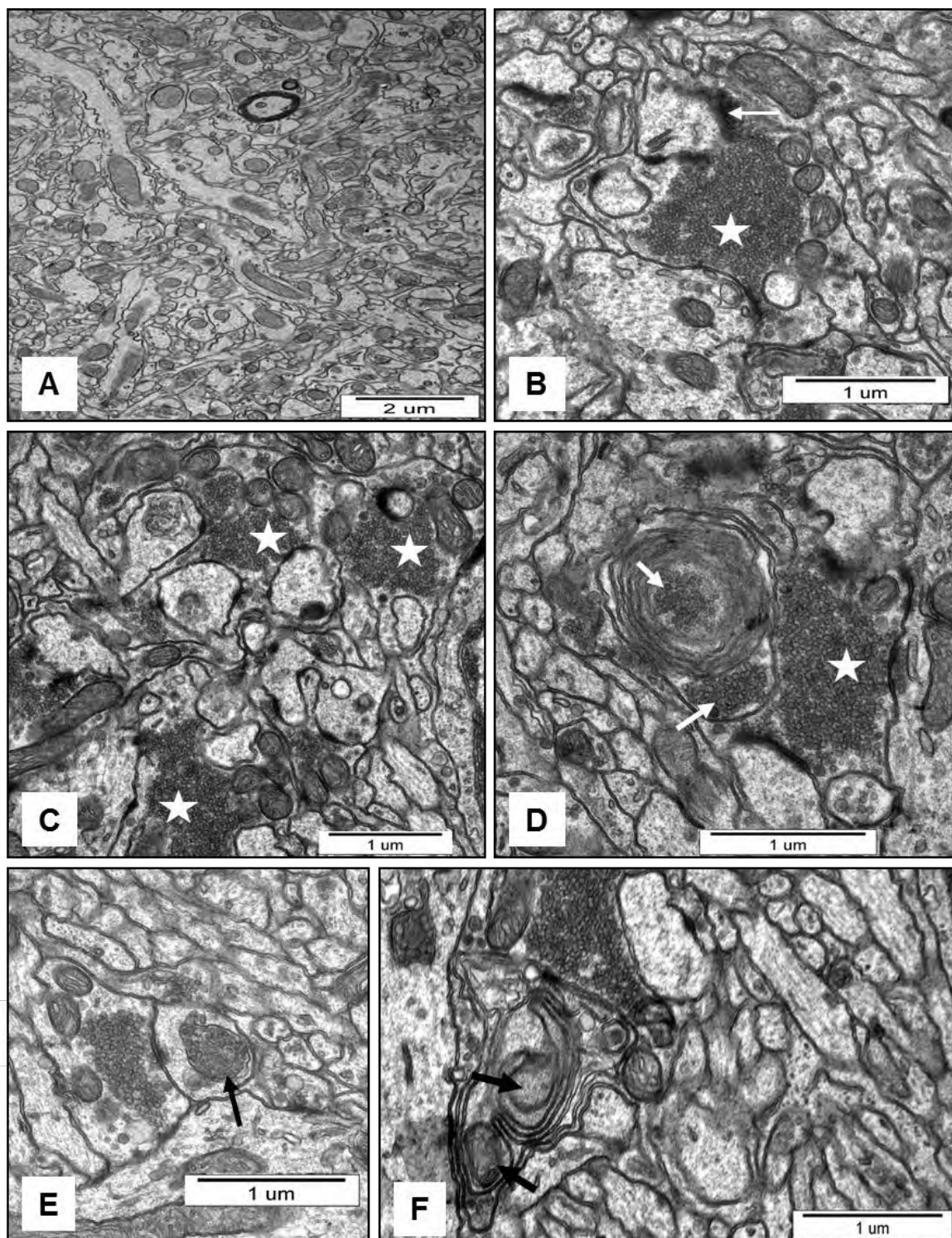
Liczba synaps wykazujących daną cechę: +++ > 50%; ++ < 50% i > 25%; + < 10%; - 0%. Do analizy wzięto po 20 elektronogramów z każdej grupy (n=4). Grupy zostały porównane ze sobą za pomocą testu Fishera (F<sub>0,05\_19\_19</sub>).

<sup>a</sup> – Istotne statystycznie różnice pomiędzy grupą eksponowaną na AgNPs a grupą otrzymującą cytrynian srebra.

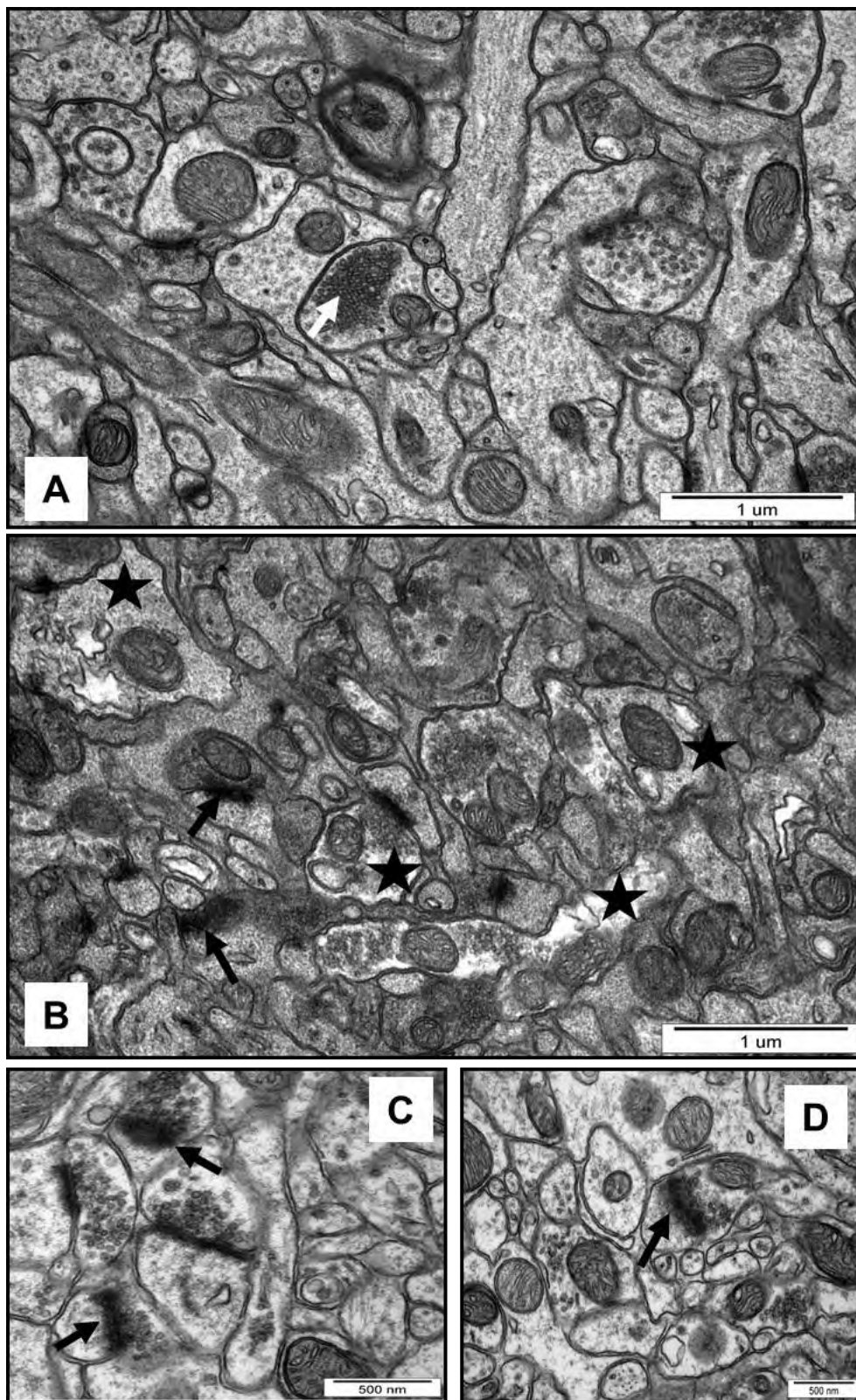




**Rycina 8.** Reprezentatywne elektronogramy przedstawiające prawidłową ultrastrukturę synaps w hipokampie zwierząt z grupy kontrolnej otrzymującej sól fizjologiczną. (A) struktura neuropilu z widocznymi, prawidłowymi szczelinami synaptycznymi (biała strzałka) i mitochondriami (biała gwiazdka); (B) prawidłowa struktura synaps i rozmieszczenie pęcherzyków synaptycznych w cytoplazmie aksonu (czarna strzałka); (C) prawidłowa struktura synapsy: mitochondrium występujące w części postsynaptycznej (biała gwiazdka), szczelina synaptyczna (biała strzałka) i prawidłowo rozmieszczone pęcherzyki synaptyczne (czarna strzałka).



**Rycina 9.** Reprezentatywne elektronogramy przedstawiające zmiany ultrastrukturalne w obrębie synaps zlokalizowanych w korze mózgowej (A,E) i hipokampie (B-D, F) zwierząt eksponowanych na AgNPs. (A) neuropil z lokalnymi obrzękami zakończeń synaptycznych widocznymi jako przejaśnienia w cytoplazmie; (B) rozmyta i „pogrubiona” struktura szczeliny synaptycznej, bez wyraźnej błony presynaptycznej i postsynaptycznej (biała strzałka) oraz skupiska pęcherzyków synaptycznych w neuropilu (biała gwiazdka); (C) nie ograniczone przez błony presynaptyczne skupiska pęcherzyków synaptycznych w neuropilu (biała gwiazdka); (D) ciało mielinopodobne z pęcherzykami synaptycznymi wewnątrz (biała strzałka); (E) ciało wielopęcherzykowe (czarna strzałka); (F) ciało mielinopodobne z nieprawidłowym mitochondrium wewnątrz (czarna strzałka).



**Rycina 10.** Reprezentatywne elektronogramy przedstawiające zmiany ultrastrukturalne w obrębie synaps zlokalizowanych w korze mózgowej zwierząt eksponowanych na cytrynian srebra. (A) zwiększona gęstość pęcherzyków synaptycznych ułożonych w skupiska w centrum części presynaptycznej (biała strzałka); (B-D) rozmyta i „pogrubiona” struktura szczeliny synaptycznej, bez wyraźnej błony presynaptycznej i postsynaptycznej (czarna strzałka) oraz lokalne obrzęki zakończeń synaptycznych widziane jako przejaśnienia w cytoplazmie (czarna gwiazdka).

#### 4.4.2. Poziom białek presynaptycznych i postsynaptycznych w homogenatach mózgowych

Oznaczenie poziomu białek presynaptycznych – synaptofizyny i synapsyny I oraz białka postsynaptycznego – białka 95 gęstości postsynaptycznej (PSD-95, ang. *postsynaptic density protein 95*) w homogenatach mózgowych przeprowadzono metodą Western blot.

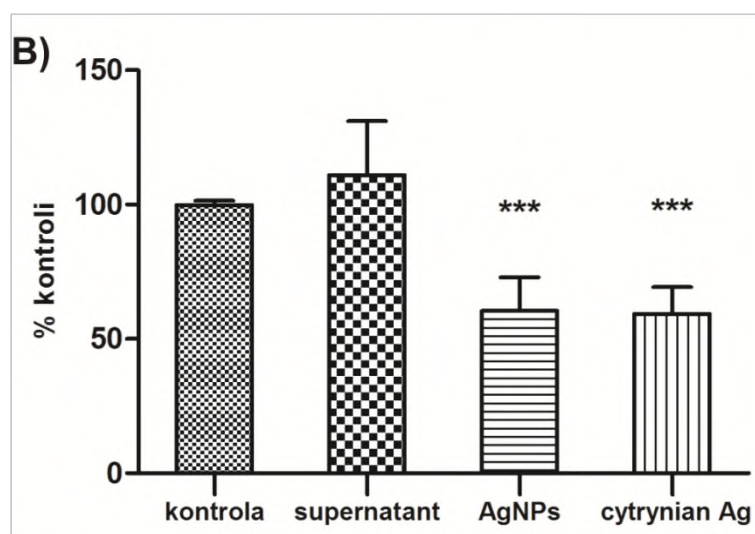
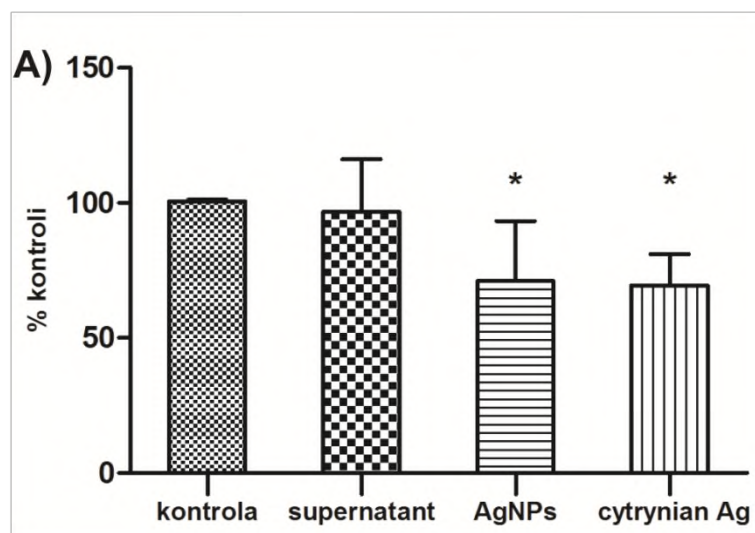
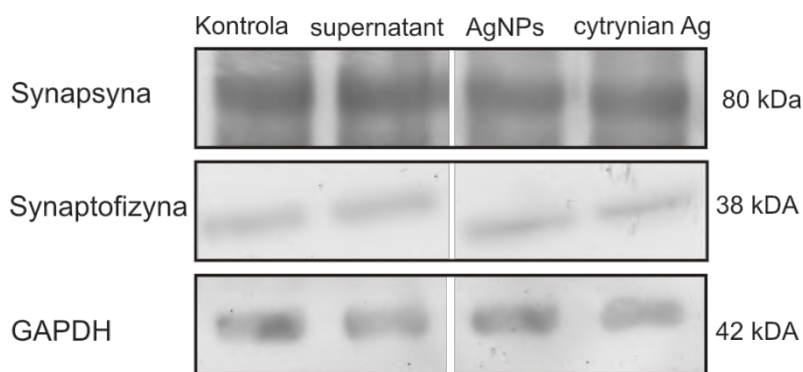
Synapsyna I jest białkiem specyficznym dla neuronów, łączącym pęcherzyki synaptyczne z filamentami aktynowymi cytoszkieletu wewnątrz aksonu (De Camilli i wsp., 1986). Dzięki tworzeniu takich połączeń białko to kontroluje proces mobilizacji puli pęcherzyków gotowych do egzocytozy, a tym samym reguluje uwalnianie neuroprzekaźników do szczeliny synaptycznej (Li i wsp., 1995). Z kolei synaptofizyna to białko występujące w błonie pęcherzyków synaptycznych, odpowiedzialne za proces ich przyłączenia do błony presynaptycznej, poprzedzający uwalnianie neuroprzekaźnika do szczeliny synaptycznej (Greengard i wsp., 1993). PSD-95 natomiast jest niezwykle istotnym składnikiem zagęszczenia postsynaptycznego, tworzącym jego rusztowanie, m.in. dla receptorów NMDA i kanałów potasowych. Połączenie się tych receptorów z PSD-95 jest niezbędne do ich zakotwiczenia w błonie postsynaptycznej i oddziaływania z kompleksem sygnałowym syntazy tlenku azotu (NOS, ang. *nitric oxide synthase*) i białka synGAP (Taft i wsp., 2014).

U zwierząt eksponowanych zarówno na AgNPs jak i na Ag<sup>+</sup> wykazano znamienne statystycznie obniżenie względnego poziomu synaptofizyny o ok. 40% w porównaniu do grupy kontrolnej (sól fizjologiczna) (Ryc. 11B). W przypadku synapsyny I w obydwu grupach zwierząt otrzymujących związki srebra zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie względnego jej poziomu o ok. 30% w porównaniu do kontroli (Ryc. 11A).

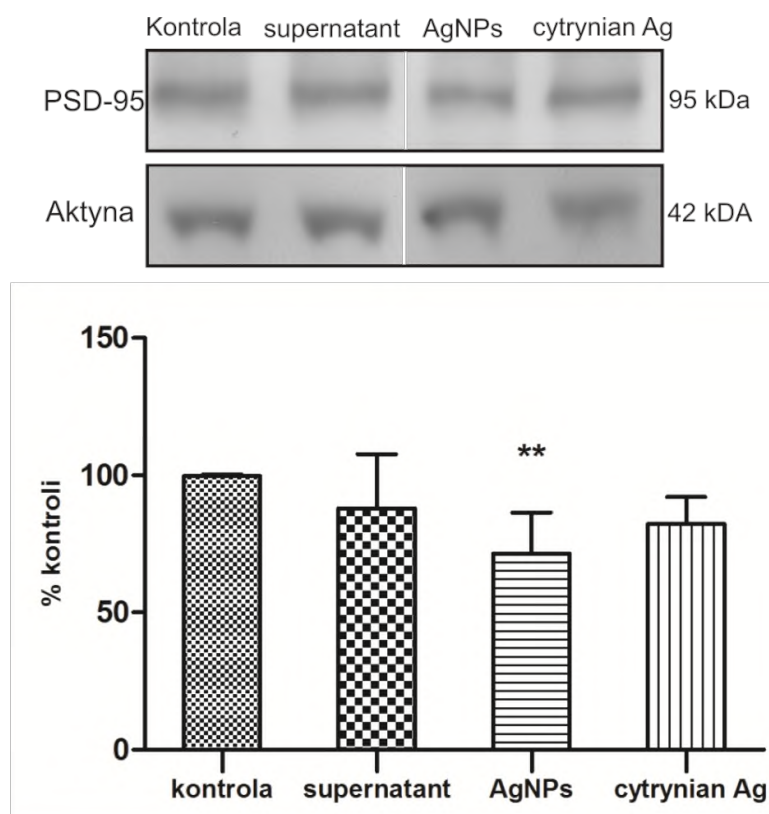
Z kolei istotne statystycznie obniżenie względnego poziomu PSD-95 o ok. 30% w porównaniu do kontroli zaobserwowano tylko w grupie zwierząt eksponowanej na AgNPs. W grupie zwierząt, która otrzymywała cytrynian srebra, również stwierdzono obniżenie poziomu tego białka (o ok. 18%), ale zmiana ta nie była istotna statystycznie (Ryc. 12).

Poziom wszystkich 3 badanych białek w grupie eksponowanej na supernatant był porównywalny do grupy kontrolnej.





**Rycina 11.** Względne poziomy białek presynaptycznych: synapsyny I (A) i synaptofizyny (B) w homogenatach mózgowych zwierząt kontrolnych (sól fizjologiczna) oraz eksponowanych na supernatant, nanocząstki srebra (AgNPs) lub cytrynian srebra, otrzymane metodą Western blot. Reprezentatywne immunobloty oraz wykresy przedstawiające wartości średnie  $\pm$  SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. Wyniki znormalizowano względem poziomu GAPDH i przedstawiono jako procent kontroli. Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Dunnetta; różnice istotne statystycznie \* -  $p < 0,05$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$  vs kontrola.



**Rycina 12.** Względny poziom białka postsynaptycznego (PSD-95) w homogenatach mózgowych zwierząt kontrolnych (sól fizjologiczna) oraz eksponowanych na supernatant, nanocząstki srebra (AgNPs) lub cytrynian srebra, otrzymany metodą Western blot. Reprezentatywny immunoblot oraz wykres przedstawiający wartości średnie  $\pm$  SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. Wyniki znormalizowano względem poziomu aktyny i przedstawiono jako procent kontroli. Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Dunnetta; różnice istotne statystycznie \*\* -  $p < 0,01$  vs kontrola.

U zwierząt eksponowanych na AgNPs stwierdzono znamienne statystycznie obniżenie względnego poziomu synaptofizyny, synapsyny I i PSD-95 w porównaniu do kontroli. Z kolei ekspozycja na jony srebra spowodowała istotne statystycznie obniżenie względnego poziomu białek presynaptycznych w porównaniu do kontroli. Zmianom biochemicznym towarzyszyły zmiany ultrastrukturalne, przy czym silniejszym czynnikiem uszkadzającym okazały się AgNPs.

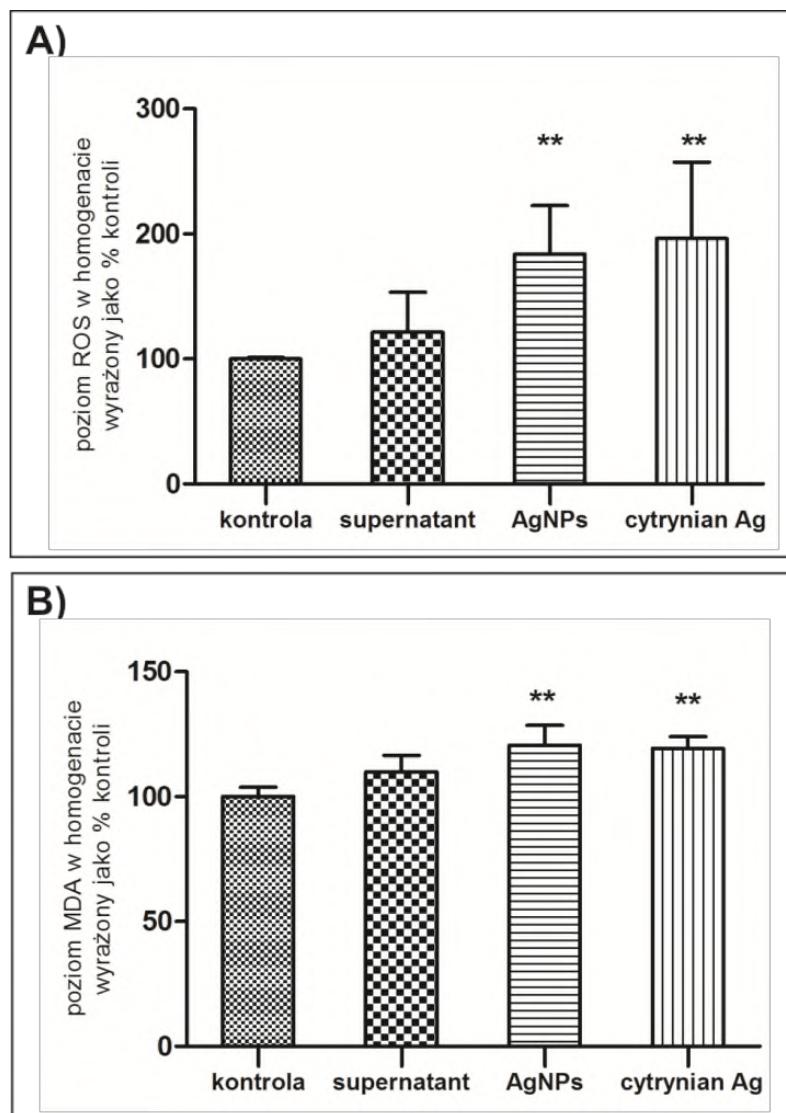
## **4.5. Ocena zdolności nanocząstek srebra i jonów srebra do wywoływania stresu oksydacyjnego. Porównanie wybranych markerów stresu oksydacyjnego oraz aktywności enzymatycznych i nieenzymatycznych układów antyoksydacyjnych w mózgu i wątrobie**

### **4.5.1. Wpływ AgNPs i jonów srebra na poziom reaktywnych form tlenu oraz poziom peroksydacji lipidów w mózgu i wątrobie szczurów eksponowanych**

Porównano wpływ AgNPs i jonów srebra na produkcję ROS i peroksydację lipidów błon, wyrażoną jako poziom dialdehydu malonylowego, w mózgu i wątrobie zwierząt eksponowanych.

W homogenatach mózgowych uzyskanych od zwierząt eksponowanych na AgNPs zaobserwowano wzrost poziomu ROS o 83,8% w porównaniu do grupy kontrolnej (sól fizjologiczna), a z kolei w grupie, która otrzymywała cytrynian srebra, poziom ROS był podwyższony o 96,3% w porównaniu do grupy kontrolnej. U zwierząt, które otrzymywały supernatant nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic (Ryc. 13A).

Ekspozycja zwierząt na AgNPs lub  $Ag^+$  powodowała także istotny statystycznie wzrost poziomu MDA w homogenatach mózgowych w stosunku do grupy kontrolnej. Odpowiednio: w grupie AgNPs wzrost ten wynosił 20,5%, a w grupie otrzymującej cytrynian srebra – 19,3% (Ryc. 13B).



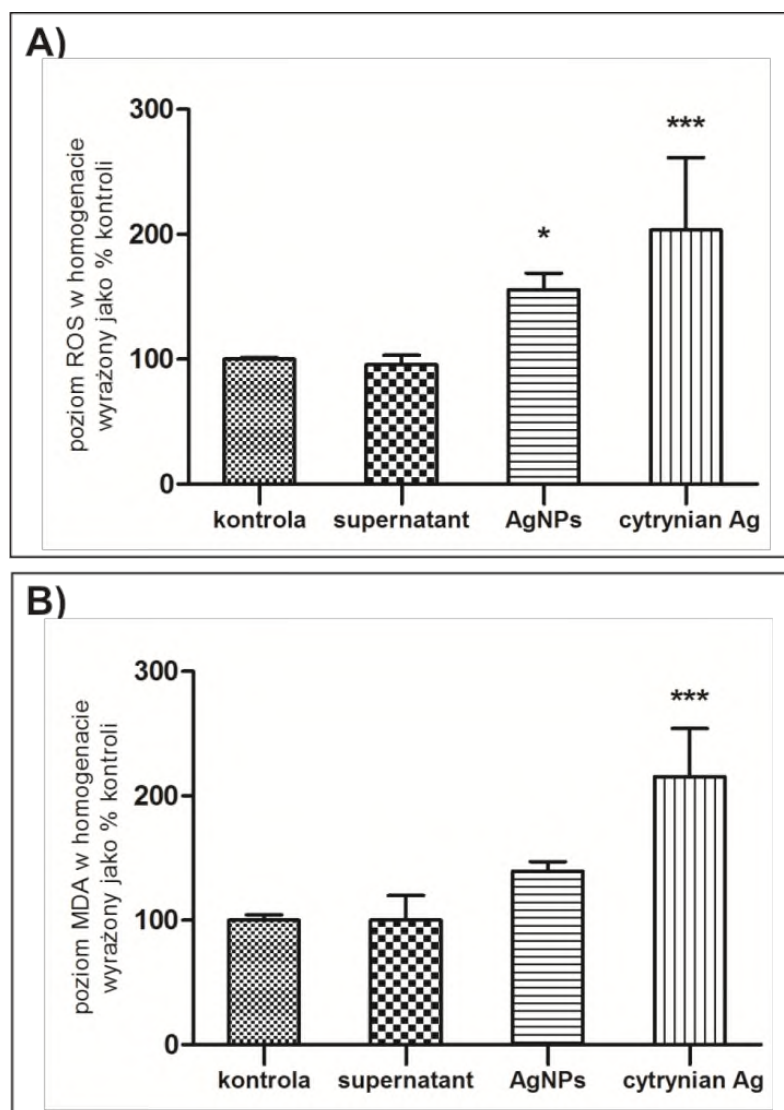
**Rycina 13.** Poziom reaktywnych form tlenu (ROS) i poziom peroksydacji lipidów błon w homogenatach mózgowych zwierząt kontrolnych (sól fizjologiczna) oraz eksponowanych na supernatant, nanocząstki srebra (AgNPs) lub cytrynian srebra. (A) Wykres przedstawiający poziom ROS wyrażony jako % kontroli. (B) Wykres przedstawiający poziom peroksydacji lipidów błon, wyrażony jako poziom dialdehydu malonylowego (MDA), względem kontroli.

Słupki przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SD dla  $n=6$  (poziom ROS) i  $n=4$  (poziom peroksydacji lipidów) zwierząt w każdej grupie. Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Dunnetta; różnice istotne statystycznie \*\* -  $p < 0,01$  vs kontrola.

W homogenatach wątrobowych uzyskanych od zwierząt eksponowanych na AgNPs lub cytrynian srebra również stwierdzono istotny statystycznie wzrost poziomu ROS w porównaniu do grupy kontrolnej. W przypadku grupy otrzymującej AgNPs poziom wolnych rodników był wyższy o 55,7% w porównaniu do grupy kontrolnej, a w przypadku cytrynianu srebra wzrost ten wynosił 103,4% (Ryc. 14A). U zwierząt, które otrzymywały supernatant nie stwierdzono istotnych różnic.



Jedynie w homogenatach wątrobowych uzyskanych od zwierząt otrzymujących cytrynian srebra zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu MDA o 115,3% w stosunku do grupy kontrolnej. W grupie otrzymującej AgNPs, choć obserwowano tendencję wzrostową poziomu MDA w porównaniu do grupy kontrolnej, nie stwierdzono różnicy istotnej statystycznie, podobnie jak w przypadku grupy otrzymującej supernatant (Ryc. 14B).



**Rycina 14.** Poziom reaktywnych form tlenu (ROS) i poziom peroksydacji lipidów błon w homogenatach wątrobowych zwierząt kontrolnych (sól fizjologiczna) oraz eksponowanych na supernatant, nanocząstki srebra (AgNPs) lub cytrynian srebra. (A) Wykres przedstawiający poziom ROS wyrażony jako % kontroli. (B) Wykres przedstawiający poziom peroksydacji lipidów, wyrażony jako poziom dialdehydu malonylowego (MDA), względem kontroli.

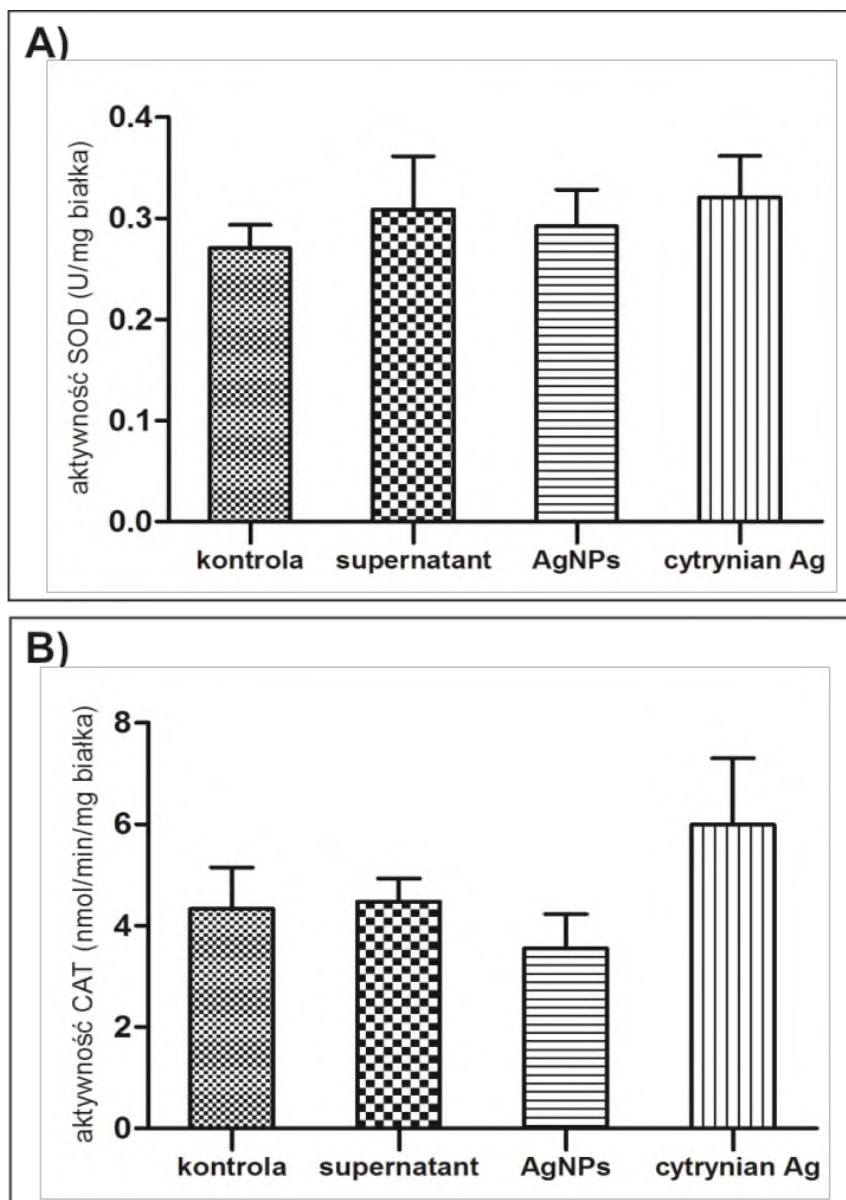
Słupki przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SD dla  $n=6$  (poziom ROS) i  $n=4$  (poziom peroksydacji lipidów) zwierząt w każdej grupie. Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Dunnetta; różnice istotne statystycznie \* -  $p < 0,05$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$  vs kontrola.

#### **4.5.2. Wpływ AgNPs i jonów srebra na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i katalazy (CAT) w mózgu i wątrobie szczurów eksponowanych**

Porównano wpływ AgNPs i jonów srebra na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy w mózgu i wątrobie zwierząt eksponowanych.

W homogenatach mózgowych nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w aktywności SOD pomiędzy grupami badanymi a negatywną kontrolą (sól fizjologiczna). W przypadku grupy kontrolnej średnia aktywność tego enzymu wynosiła 0,27 U/mg białka (Ryc. 15A).

Nie stwierdzono również istotnych statystycznie różnic w aktywności CAT pomiędzy grupami badanymi a negatywną kontrolą, dla której średnia aktywność CAT wynosiła 4,33 nmol/min/mg białka, choć zaobserwowano nieznaczny spadek aktywności tego enzymu w grupie otrzymującej AgNPs (o 18% vs. kontrola) oraz nieznaczny wzrost jego aktywności w grupie, która otrzymywała cytrynian srebra (o 38,3% vs. kontrola) (Ryc. 15B).

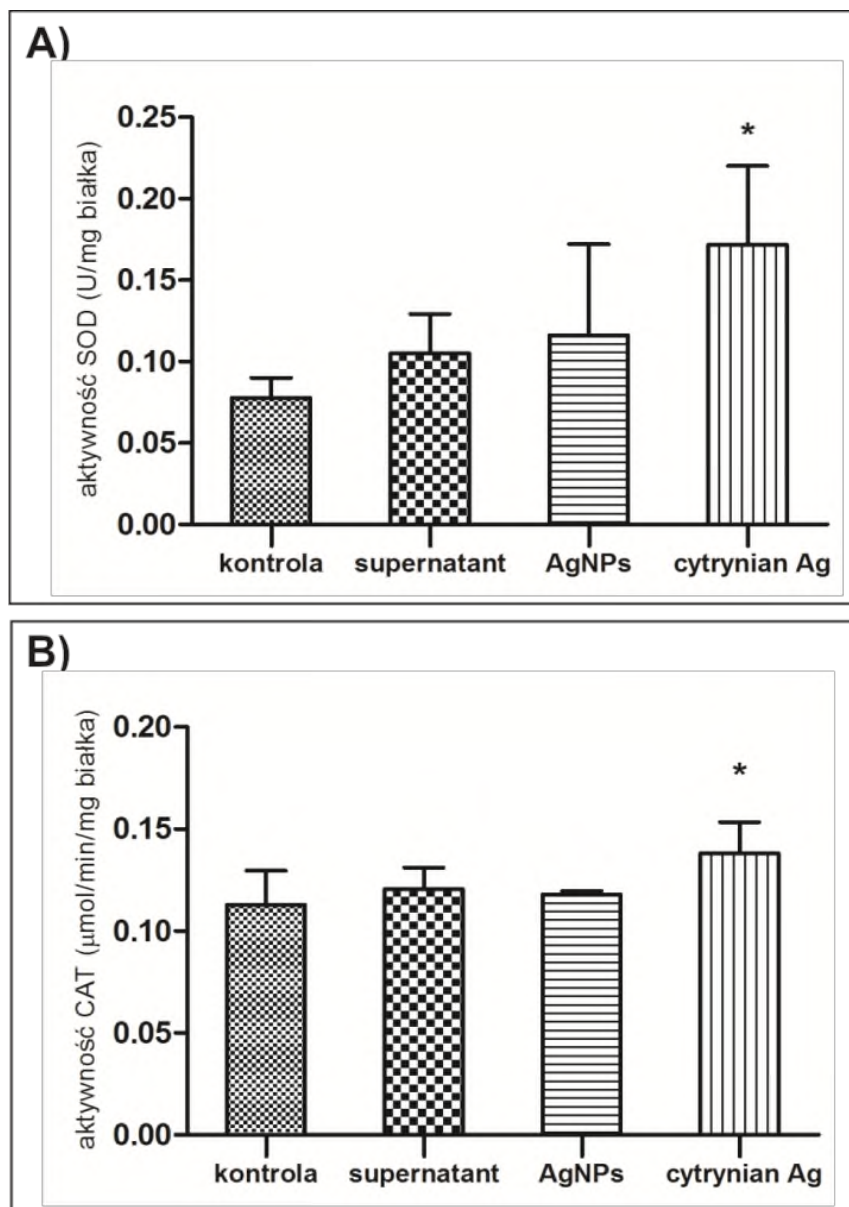


**Rycina 15.** Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) (A) i katalazy (CAT) (B) w homogenatach mózgowych zwierząt kontrolnych (sól fizjologiczna) oraz eksponowanych na supernatant, nanocząstki srebra (AgNPs) lub cytrynian srebra.

Słupki przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SD dla  $n=4$  zwierząt w każdej grupie. Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Dunnetta.

Średnia aktywność SOD, zmierzona w homogenatach wątrobowych uzyskanych od zwierząt kontrolnych, wynosiła 0,078 U/mg białka. U zwierząt, którym podawano cytrynian srebra, zaobserwowano istotny statystycznie wzrost aktywności tego enzymu w porównaniu do grupy kontrolnej (o 120,3%). W pozostałych dwóch grupach nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w porównaniu do kontroli (Ryc. 16A).

Zaobserwowano również istotny statystycznie wzrost aktywności CAT w grupie zwierząt otrzymujących cytrynian srebra o ok. 22% w porównaniu do kontroli. Średnia aktywność tego enzymu w grupie kontrolnej wynosiła 0,113  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  białka (Ryc. 16B).



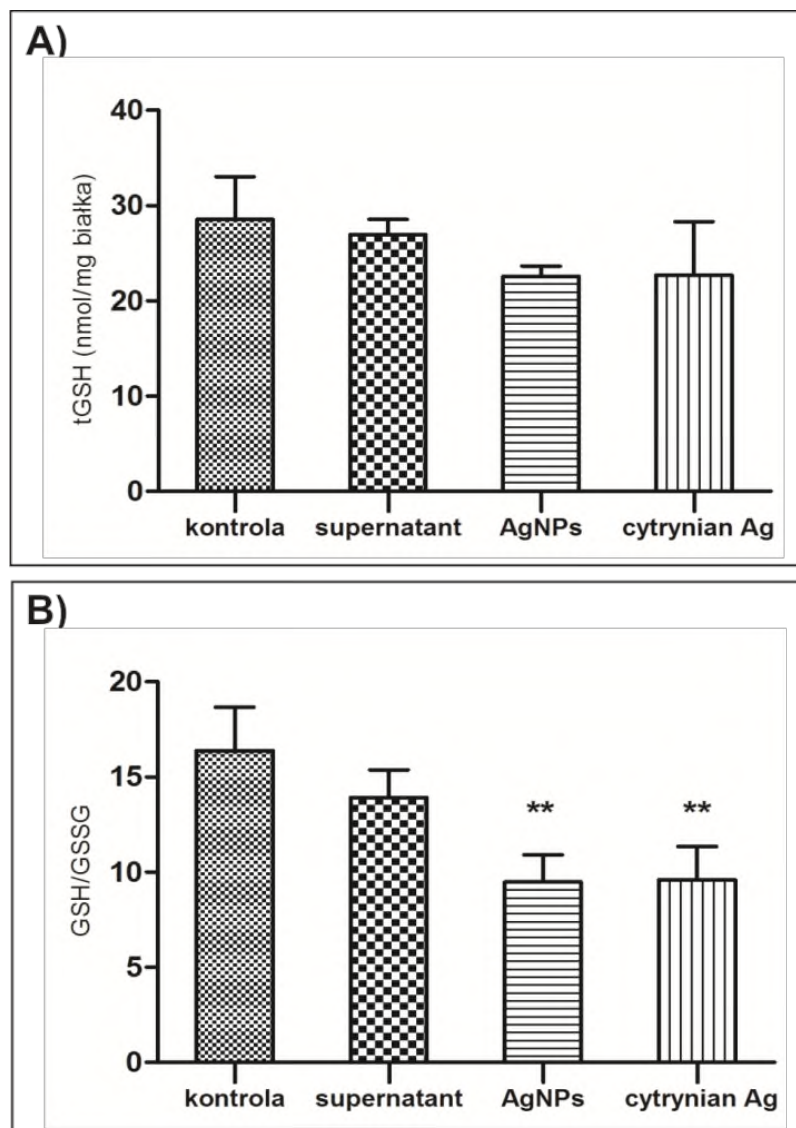
**Rycina 16.** Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) (A) i katalazy (CAT) (B) w homogenatach wątrobowych zwierząt kontrolnych (sól fizjologiczna) oraz eksponowanych na supernatant, nanocząstki srebra (AgNPs) lub cytrynian srebra.

Słupki przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SD dla  $n=4$  zwierząt w każdej grupie. Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Dunnetta; różnice istotne statystycznie \* -  $p < 0,05$  vs kontrola.

#### **4.5.3. Wpływ AgNPs i jonów srebra na poziom glutationu całkowitego (tGSH) oraz stosunek glutationu zredukowanego do utlenionego (GSH/GSSG) w mózgu i wątrobie szczurów eksponowanych**

Porównano wpływ AgNPs i jonów srebra na poziom całkowitego glutationu (tGSH, t.j. sumy jego formy zredukowanej – GSH oraz utlenionej – GSSG) oraz stosunek GSH do GSSG w mózgu i wątrobie zwierząt eksponowanych.

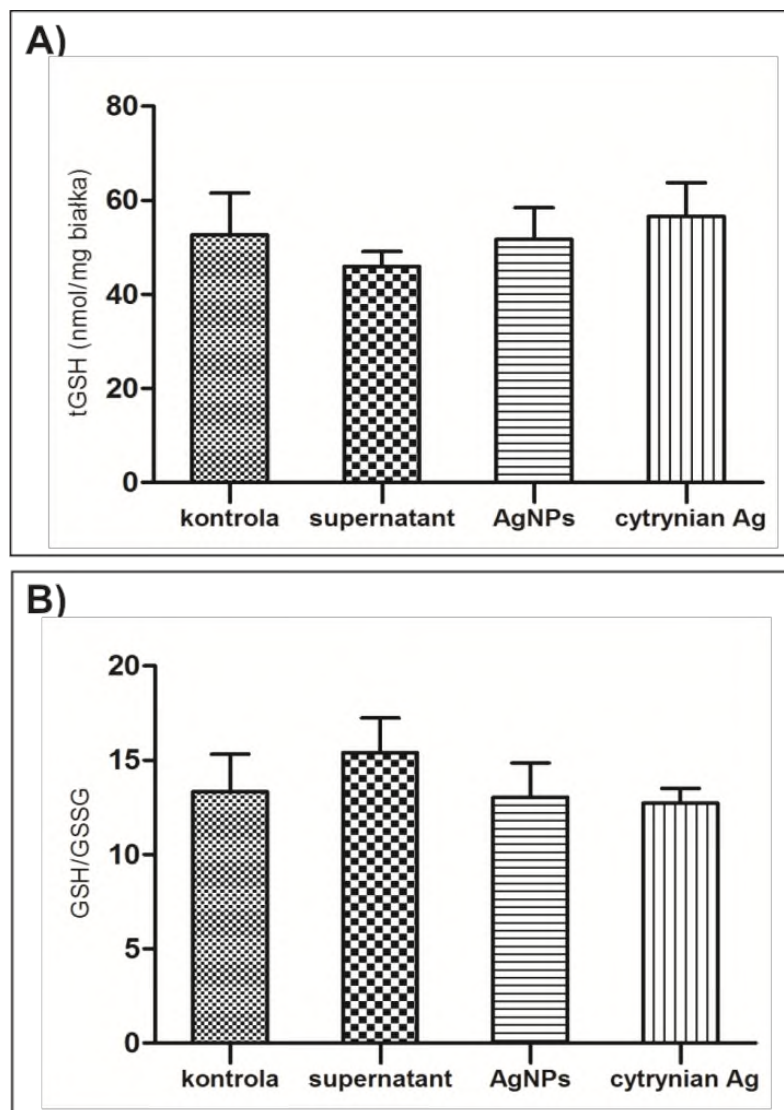
W homogenatach mózgowych nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie tGSH pomiędzy grupami badanymi a negatywną kontrolą (sól fizjologiczna). Jego stężenie wynosiło odpowiednio:  $28,55 \pm 4,51$  nmol tGSH/mg białka dla grupy kontrolnej,  $26,97 \pm 1,58$  dla grupy eksponowanej na supernatant,  $22,57 \pm 1,07$  nmol tGSH/mg białka dla grupy AgNPs,  $22,71 \pm 5,59$  nmol tGSH/mg białka dla grupy eksponowanej na cytrynian srebra (Ryc. 17A). Stwierdzono natomiast, że w homogenatach mózgowych uzyskanych od zwierząt eksponowanych na AgNPs lub cytrynian srebra, stosunek GSH do GSSG obniżył się w porównaniu do kontroli. W przypadku grupy AgNPs stwierdzono spadek o 57,7% w porównaniu do kontroli, a w przypadku grupy eksponowanej na jony srebrowe – o 58,5%. Stosunek GSH/GSSG w grupie otrzymującej supernatant był zbliżony do kontroli (Ryc. 17B).



**Rycina 17.** Poziom glutationu całkowitego (tGSH) (A) i stosunek glutationu zredukowanego do glutationu utlenionego (GSH/GSSG) (B) w homogenatach mózgowych zwierząt kontrolnych (sól fizjologiczna) oraz eksponowanych na supernatant, nanocząstki srebra (AgNPs) lub cytrynian srebra. Słupki przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SD dla  $n=4$  zwierząt w każdej grupie. Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Dunnetta; różnice istotne statystycznie \*\* -  $p < 0,01$  vs kontrola.

W homogenatach wątrobowych również nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie tGSH pomiędzy grupami badanymi a negatywną kontrolą (sól fizjologiczna). Jego poziom wynosił odpowiednio:  $52,65 \pm 8,90$  nmol tGSH/mg białka dla grupy kontrolnej,  $45,87 \pm 3,23$  dla grupy eksponowanej na supernatant,  $51,68 \pm 6,77$  nmol tGSH/mg białka dla grupy AgNPs,  $56,58 \pm 7,21$  nmol tGSH/mg białka dla grupy eksponowanej na cytrynian srebra (Ryc. 18A).

Nie stwierdzono również istotnych statystycznie różnic w stosunku GSH/GSSG uzyskanym dla poszczególnych grup (Ryc. 18B).



**Rycina 18.** Poziom glutationu całkowitego (tGSH) (A) i stosunek glutationu zredukowanego do glutationu utlenionego (GSH/GSSG) (B) w homogenatach wątrobowych zwierząt kontrolnych (sól fizjologiczna) oraz eksponowanych na supernatant, nanocząstki srebra (AgNPs) lub cytrynian srebra. Słupki przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SD dla  $n=4$  zwierząt w każdej grupie. Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Dunnetta.

#### 4.5.4. Wpływ AgNPs i jonów srebra na aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) i reduktazy glutationowej (GR) w mózgu i wątrobie szczurów eksponowanych

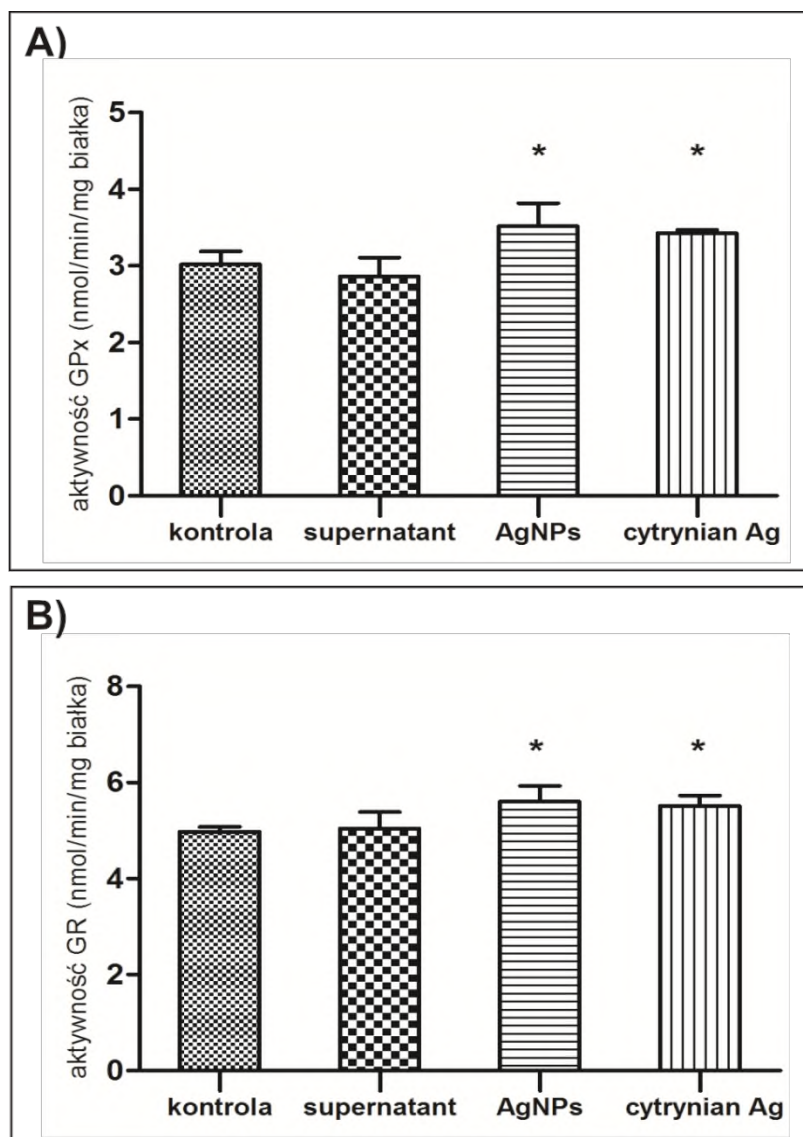
Porównano wpływ AgNPs i jonów srebra na aktywność peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej w mózgu i wątrobie zwierząt eksponowanych.

Średnia aktywność GPx, zmierzona w homogenatach mózgowych uzyskanych od zwierząt z grupy kontrolnej, wynosiła 3,02 nmol/min/mg białka. U zwierząt, którym podawano AgNPs lub cytrynian srebra, zaobserwowano istotny statystycznie wzrost aktywności GPx w porównaniu do grupy kontrolnej. W przypadku grupy AgNPs aktywność tego enzymu była wyższa o około 17% w porównaniu do kontroli, a w przypadku grupy otrzymującej cytrynian



srebra – o około 14%. W przypadku grupy otrzymującej supernatant nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic (Ryc. 19A).

U zwierząt z grupy kontrolnej średnia aktywność GR wynosiła 4,98 nmol/min/mg białka. U zwierząt eksponowanych na AgNPs stwierdzono ok. 13% wzrost aktywności tego enzymu w porównaniu do kontroli, zaś w grupie eksponowanej na cytrynian srebra – ok. 11%. W obu przypadkach różnice były istotne statystycznie. W przypadku grupy otrzymującej supernatant nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic (Ryc. 19B).



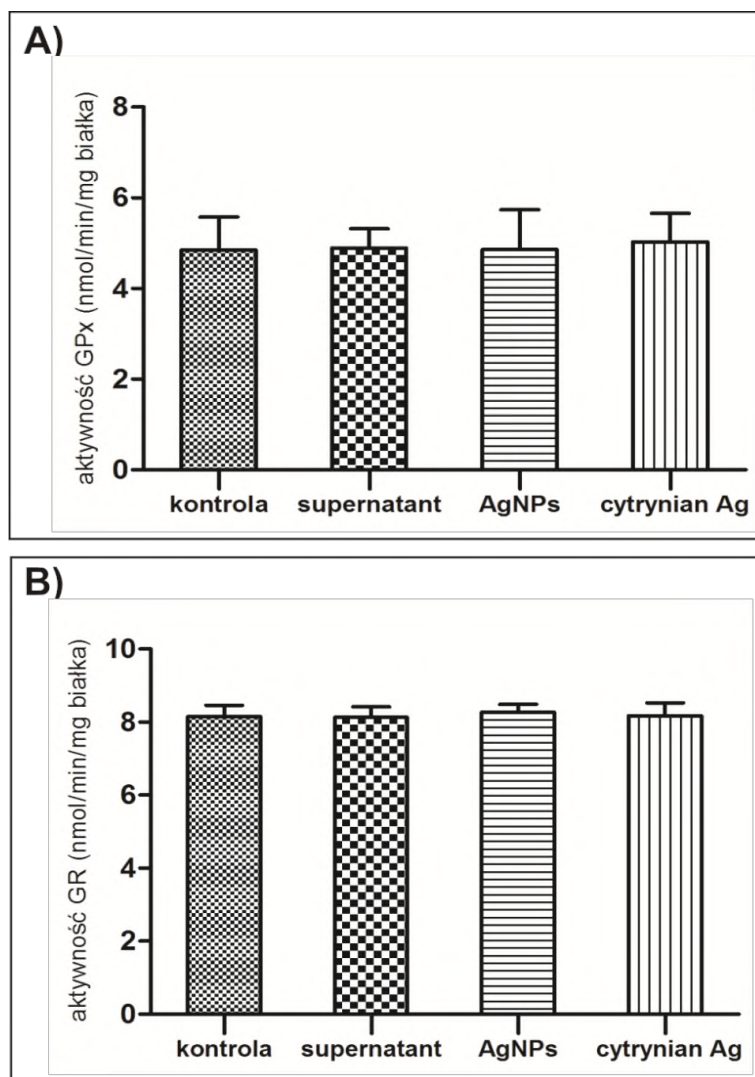
**Rycina 19.** Aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) (A) i reduktazy glutationowej (GR) (B) w homogenatach mózgowych zwierząt kontrolnych (sól fizjologiczna) oraz eksponowanych na supernatant, nanocząstki srebra (AgNPs) lub cytrynian srebra.

Słupki przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SD dla  $n=4$  zwierząt w każdej grupie. Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Dunnetta; różnice istotne statystycznie \* -  $p < 0,05$  vs kontrola.



W homogenatach wątrobowych nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w aktywności GPx pomiędzy grupami badanymi a negatywną kontrolą (sól fizjologiczna). U zwierząt z grupy kontrolnej średnia aktywność tego enzymu wynosiła 4,85 nmol/min/mg białka (Ryc. 20A).

Również w przypadku GR nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w aktywności tego enzymu pomiędzy grupami badanymi a negatywną kontrolą. W grupie kontrolnej średnia aktywność tego enzymu wynosiła 8,15 nmol/min/mg białka (Ryc. 20B).



**Rycina 20.** Aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) (A) i reduktazy glutationowej (GR) (B) w homogenatach wątrobowych zwierząt kontrolnych (sól fizjologiczna) oraz eksponowanych na supernatant, nanocząstki srebra (AgNPs) lub cytrynian srebra.

Słupki przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SD dla  $n=4$  zwierząt w każdej grupie. Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Dunnetta.

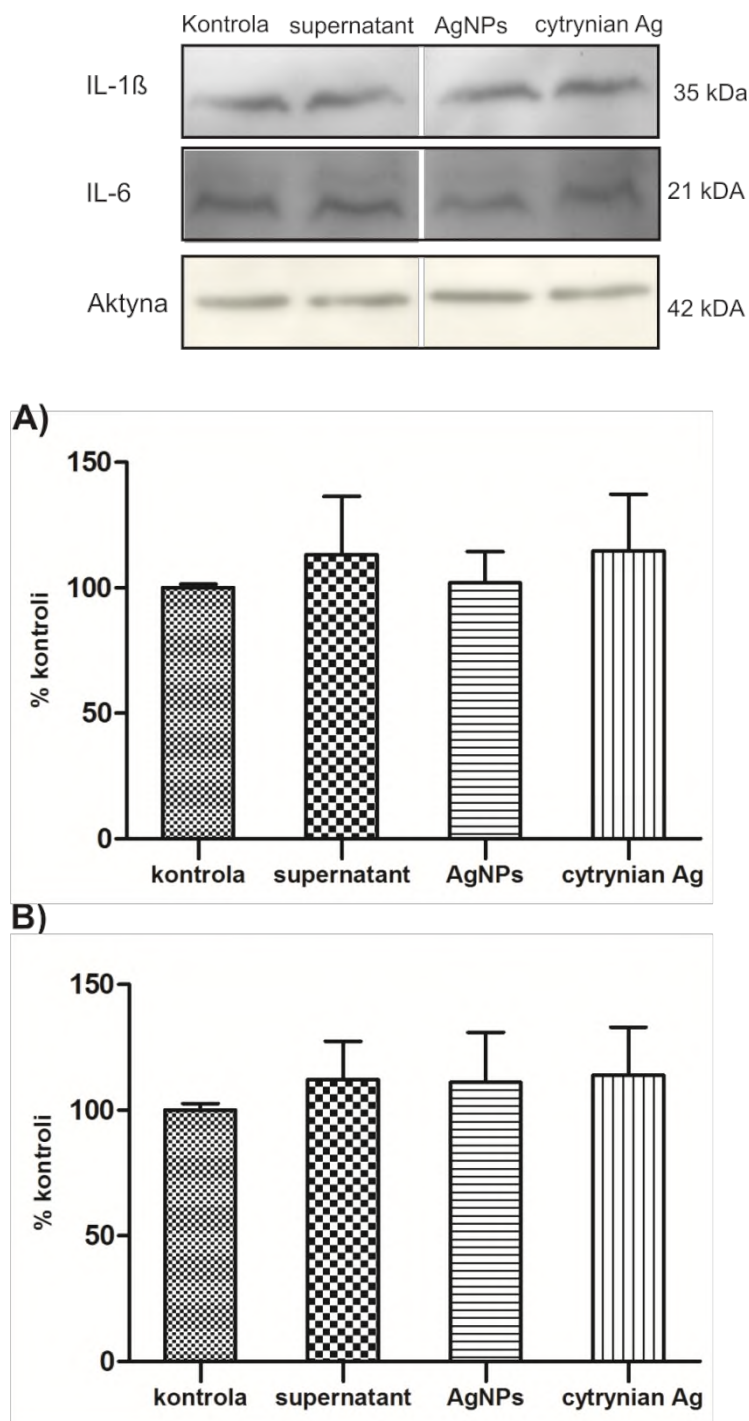
Analiza markerów stresu oksydacyjnego i aktywności układów antyoksydacyjnych wykazała, że ekspozycja na AgNPs powoduje istotne statystycznie podwyższenie poziomu ROS w obu badanych narządach oraz istotny statystycznie wzrost poziomu MDA, aktywności GPx i GR w porównaniu do grupy kontrolnej (sól fizjologiczna). Z kolei, w grupie eksponowanej na cytrynian srebra obserwowano istotne statystycznie podwyższenie poziomu ROS i MDA w obu narządach, istotny statystycznie wzrost aktywności SOD i CAT w wątrobie oraz GPx i GR w mózgu w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto, zarówno AgNPs jak i jony srebra wywoływały istotne statystycznie obniżenie stosunku GSH/GSSG w mózgu zwierząt eksponowanych.

#### **4.6. Ocena zdolności nanocząstek srebra i jonów srebra do indukcji cytokin prozapalnych oraz śmierci komórkowej w mózgu i wątrobie na podstawie wybranych markerów apoptozy i autofagii.**

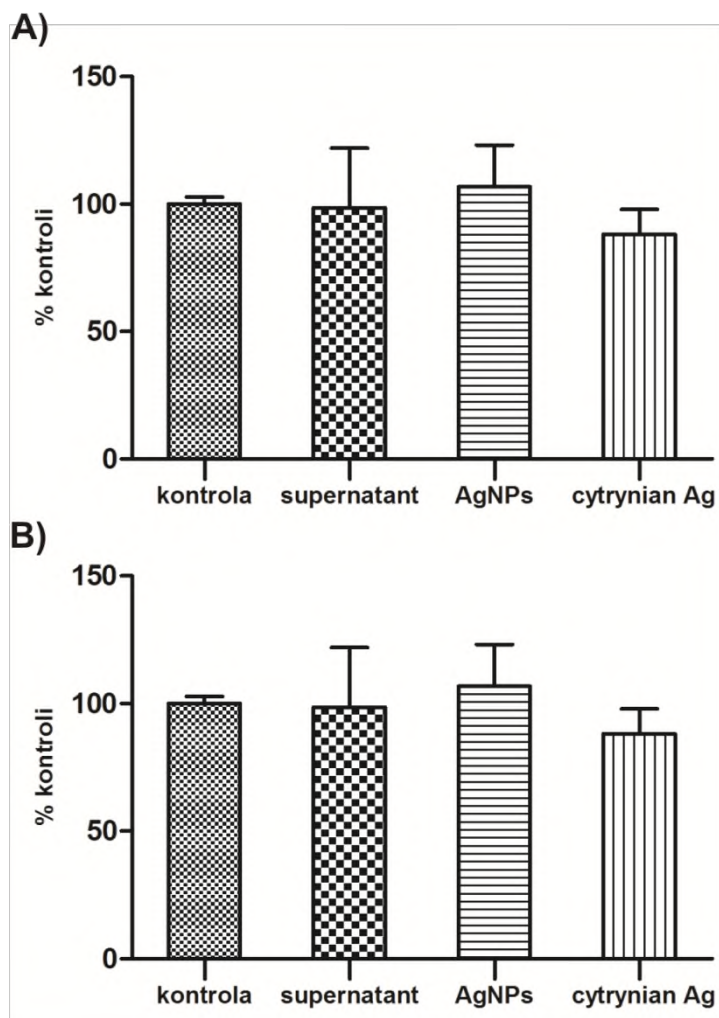
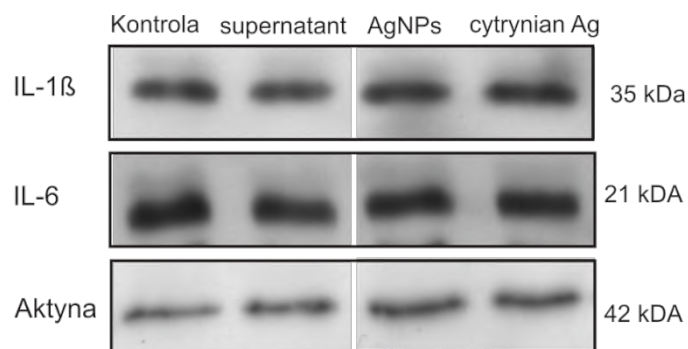
W kolejnym etapie badań sprawdzono czy zaobserwowane zmiany w markerach wskazujących na obecność stresu oksydacyjnego skutkują procesami biochemicznymi prowadzącymi do śmierci komórkowej na drodze autofagii lub apoptozy, bądź indukcją cytokin o charakterze prozapalnym. Dodatkowo, zbadano wpływ obu form srebra na mitochondrialny potencjał błonowy w narządach zwierząt eksponowanych.

##### **4.6.1. Wpływ AgNPs i jonów srebra na poziom interleukiny 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) i interleukiny 6 (IL-6) w mózgu i wątrobie szczurów eksponowanych**

Interleukina 1 $\beta$  występuje w komórce w formie nieaktywnej o wielkości 35 kDa. W wyniku pobudzenia enzymów aktywujących dochodzi do cięcia proteolitycznego formy nieaktywnej i wytworzenia formy aktywnej o wielkości 18 kDa. W badanych homogenatach (mózgowych i wątrobowych) nie stwierdzono obecności formy aktywnej tej cytokiny. Nie zaobserwowano również zmian poziomu interleukiny 1 $\beta$  w formie nieaktywnej w mózgu (Ryc. 21A) i wątrobie (Ryc. 22A) zwierząt z grup eksponowanych na srebro w porównaniu do kontroli (otrzymującej sól fizjologiczną). Nie wykazano również zmian we względnym poziomie interleukiny 6 zarówno w mózgu (Ryc. 21B) jak i w wątrobie badanych zwierząt (Ryc. 22B).



**Rycina 21.** Względne stężenia białka prekursorowej formy cytokiny prozapalnej IL-1 $\beta$  (A) i IL-6 (B) w homogenatach mózgowych zwierząt kontrolnych (sól fizjologiczna) oraz eksponowanych na supernatant, nanocząstki srebra (AgNPs) lub cytrynian srebra, otrzymane metodą Western blot. Reprezentatywne immunobloty oraz wykresy przedstawiające wartości średnie  $\pm$  SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. Wyniki znormalizowano względem poziomu aktyny i przedstawiono jako procent kontroli. Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Dunnetta.



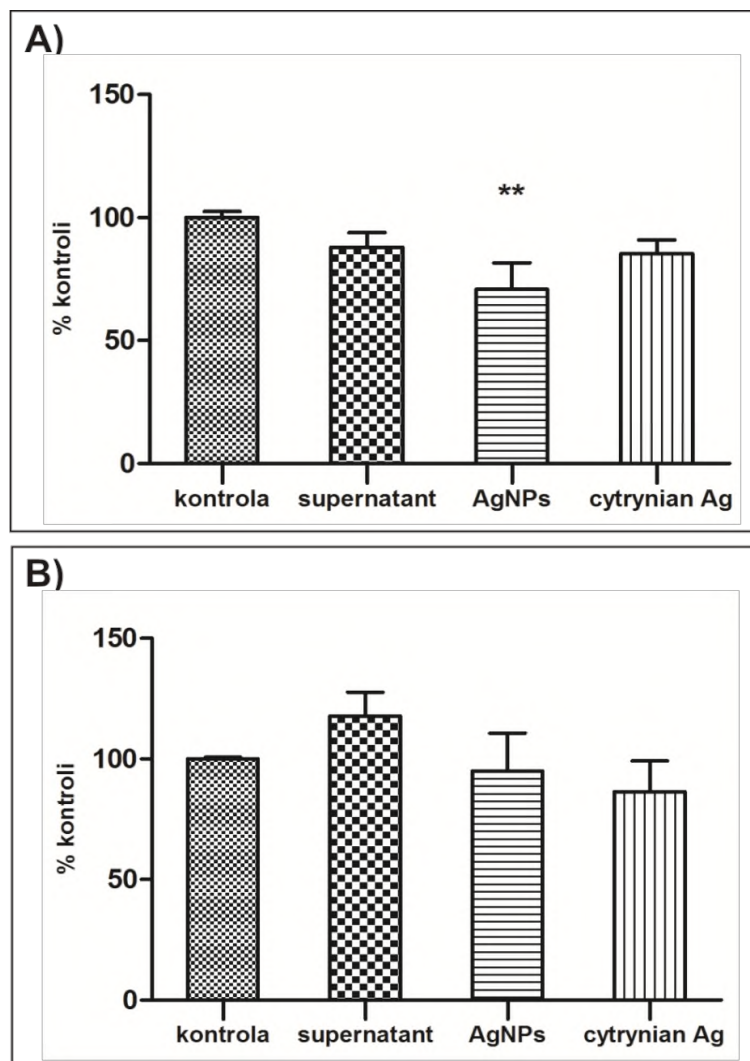
**Rycina 22.** Względne stężenia białka prekursorowej formy cytokiny prozapalnej IL-1 $\beta$  (A) i IL-6 (B) w homogenatach wątrobowych zwierząt kontrolnych (sól fizjologiczna) oraz eksponowanych na supernatant, nanocząstki srebra (AgNPs) lub cytrynian srebra, otrzymane metodą Western blot. Reprezentatywne immunobloty oraz wykresy przedstawiające wartości średnie  $\pm$  SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. Wyniki znormalizowano względem poziomu aktyny i przedstawiono jako procent kontroli. Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Dunnetta.

#### **4.6.2. Wpływ nanocząstek srebra i jonów srebra na mitochondrialny potencjał błonowy w mózgu i wątrobie zwierząt eksponowanych**

Porównano wpływ AgNPs i jonów srebra na mitochondrialny potencjał błonowy w narządach zwierząt eksponowanych.

Jedynie w mózgu zwierząt, którym podawano AgNPs, zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu mitochondrialnego potencjału błonowego (o około 29%) w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie otrzymującej cytrynian srebra wartość potencjału nie obniżała się statystycznie istotnie w porównaniu do kontroli. W przypadku grupy otrzymującej supernatant również nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic (Ryc. 23A).

Podobnie w wątrobie szczurów nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian mitochondrialnego potencjału błonowego (Ryc. 23B).



**Rycina 23.** Mitochondrialny potencjał błonowy w homogenatach mózgowych (A) i wątrobowych (B) zwierząt eksponowanych na sól fizjologiczną (kontrola), supernatant, nanocząstki srebra (AgNPs) lub cytrynian srebra, zmierzony z użyciem barwnika JC-1.

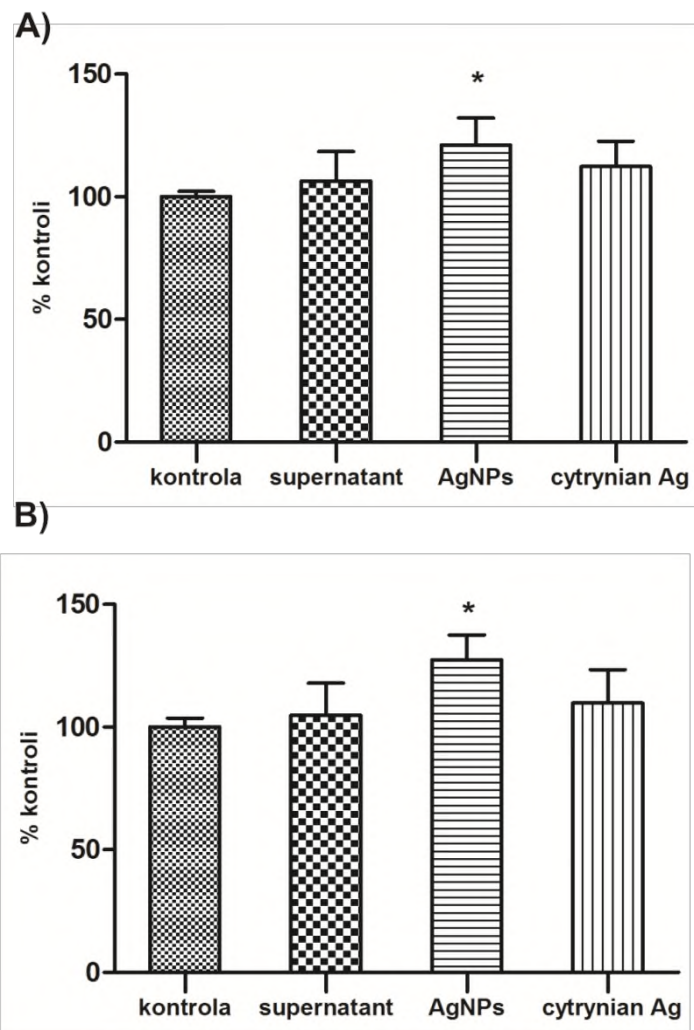
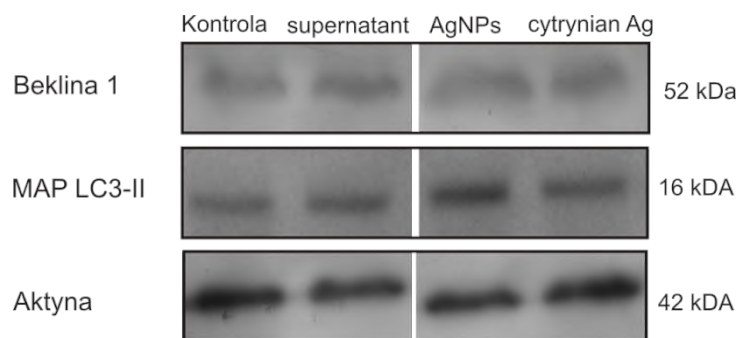
Słupki przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SD dla  $n=4$  zwierząt w każdej grupie. Wyniki wyrażono jako % kontroli. Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Dunnetta; różnice istotne statystycznie \*\* -  $p < 0,01$  vs kontrola.

Spadek mitochondrialnego potencjału błonowego obserwowany w mózgu zwierząt eksponowanych na AgNPs może skutkować obniżeniem produkcji ATP i indukcją procesu autofagii. Dlatego następnym krokiem była analiza poziomu wybranych markerów tego procesu.

#### **4.6.3. Poziom wybranych markerów autofagii (bekliny 1, białka MAP LC3-II) w warunkach ekspozycji na AgNPs/Ag<sup>+</sup> w mózgu i wątrobie**

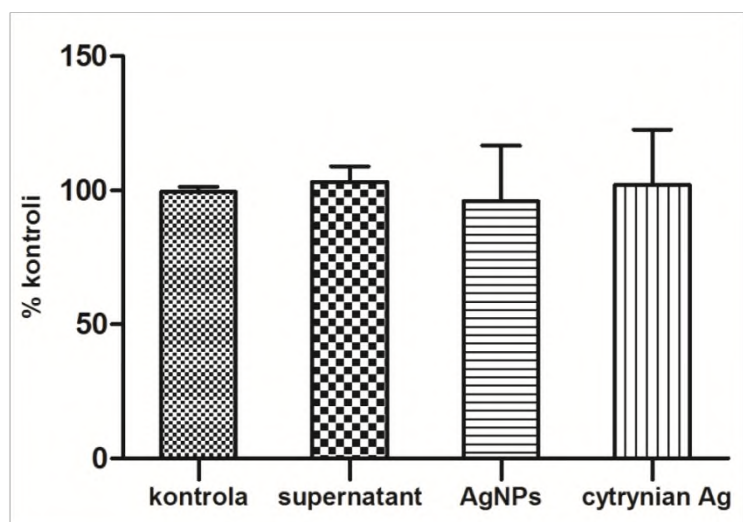
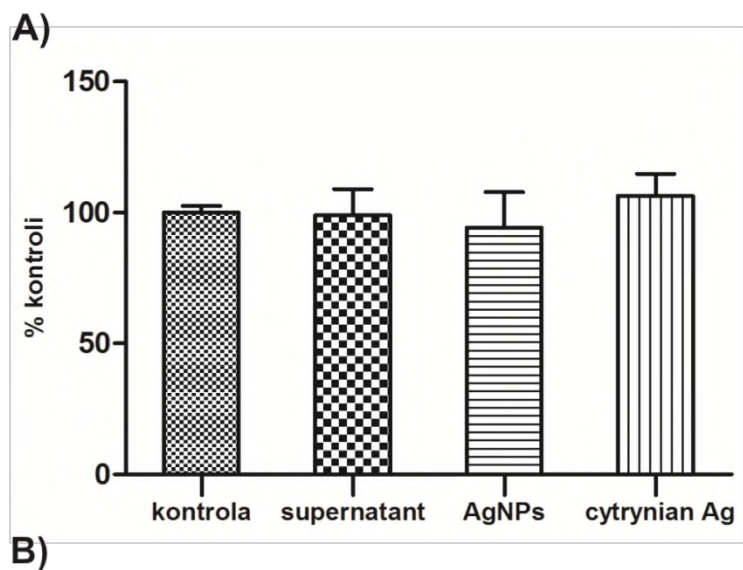
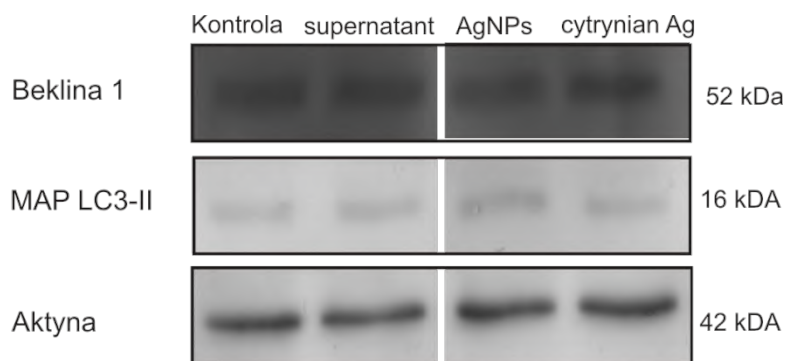
Analiza TEM skrawków mózgu ujawniła obecność ciał mielinopodobnych u zwierząt eksponowanych na AgNPs, które są wiązane ze zjawiskiem autofagii (Kelekar, 2005), co w połączeniu z obserwowanym obniżeniem mitochondrialnego potencjału błonowego sugeruje możliwość indukcji tego procesu przez AgNPs. Rzeczywiście, badania immunochemiczne (Western blot) wykazały istotny statystycznie wzrost względnego poziomu bekliny 1 (o ok. 20%) i istotny statystycznie wzrost względnego poziomu białka MAP LC3-II (o ok. 27%) w homogenatach mózgowych zwierząt eksponowanych na AgNPs w porównaniu do grupy kontrolnej (sól fizjologiczna). W przypadku zwierząt eksponowanych na Ag<sup>+</sup> względne poziomy bekliny 1 i MAP LC3-II były nieznacznie podwyższone (odpowiednio o ok. 12% i 10%) w porównaniu do grupy kontrolnej, jednakże różnice były nieistotne statystycznie. W przypadku grupy, która otrzymywała supernatant, również nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian (Ryc. 24 A i B).

Dla porównania, w homogenatach wątrobowych zwierząt eksponowanych na AgNPs lub jony srebrne nie stwierdzono żadnych istotnych statystycznie różnic w stężeniach obydwu białek w porównaniu do grupy kontrolnej. Również w przypadku grupy zwierząt, która otrzymywała supernatant, nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian we względnym poziomie tych białek względem kontroli (Ryc. 25 A i B).



**Rycina 24.** Względne stężenia białek – markerów autofagii: bekliny 1 (A) i MAP LC3-II (B) w homogenatach mózgowych zwierząt kontrolnych (sól fizjologiczna) i eksponowanych na supernatant, nanocząstki srebra (AgNPs) lub cytrynian srebra, otrzymane metodą Western blot. Reprezentatywne immunobloty oraz wykresy przedstawiające wartości średnie  $\pm$  SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. Wyniki znormalizowane względem poziomu aktyny i przedstawione jako procent kontroli. Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Dunnetta; różnice istotne statystycznie \* -  $p < 0,05$  vs kontrola.





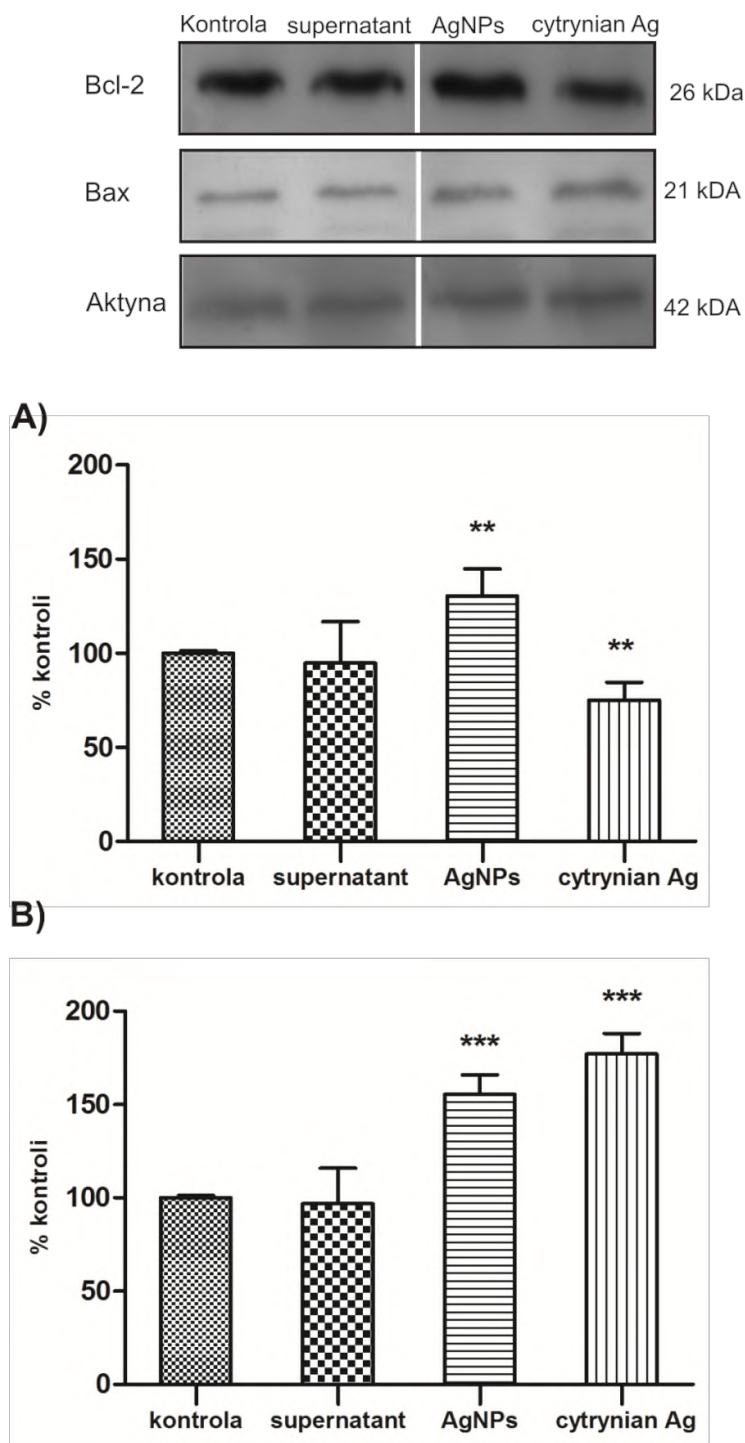
**Rycina 25.** Względne stężenia białek – markerów autofagii: bekliny 1 (A) i MAP LC3-II (B) w homogenatach wątrobowych zwierząt kontrolnych (sól fizjologiczna) i eksponowanych na supernatant, nanocząstki srebra (AgNPs) lub cytrynian srebra, otrzymane metodą Western blot. Reprezentatywne immunobloty oraz wykresy przedstawiające wartości średnie  $\pm$  SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. Wyniki znormalizowane względem poziomu aktyny i przedstawione jako procent kontroli. Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Dunnetta.

#### **4.6.4. Poziom białka antyapoptotycznego (Bcl-2) i białka proapoptotycznego (Bax) w warunkach ekspozycji na AgNPs/Ag<sup>+</sup> w mózgu i wątrobie**

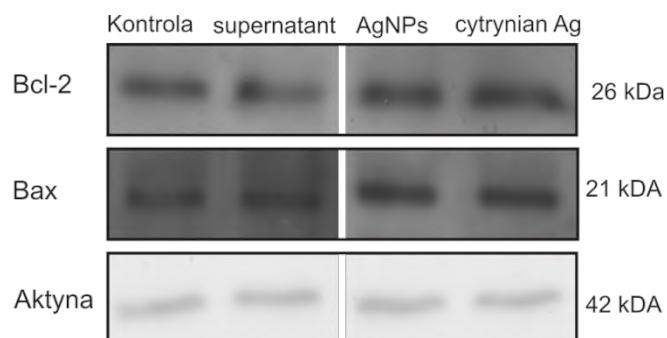
W badaniach ultrastrukturalnych nie stwierdzono obecności zmian charakterystycznych dla apoptozy w neuronach kory mózgowej i hipokampa po ekspozycji na srebro. Natomiast badania immunochemiczne (Western blot) wykazały wzrost względnego poziomu białka Bcl-2 o ok. 30% i wzrost względnego poziomu białka Bax o ok. 55% w homogenatach mózgowych zwierząt eksponowanych na AgNPs. W przypadku zwierząt eksponowanych na Ag<sup>+</sup> względny poziom Bcl-2 obniżył się o ok. 25%, a poziom Bax wzrósł o ok. 77% (Ryc. 26 A i B).

Dla porównania, w homogenatach wątrobowych zwierząt, którym podawano AgNPs, stwierdzono ok. 69% wzrost względnego poziomu Bcl-2 i ok. 52% wzrost względnego poziomu białka Bax. Z kolei po ekspozycji na Ag<sup>+</sup> stwierdzono ok. 77% wzrost względnego poziomu Bcl-2 i ok. 42% wzrost względnego poziomu białka Bax (Ryc. 27 A i B).

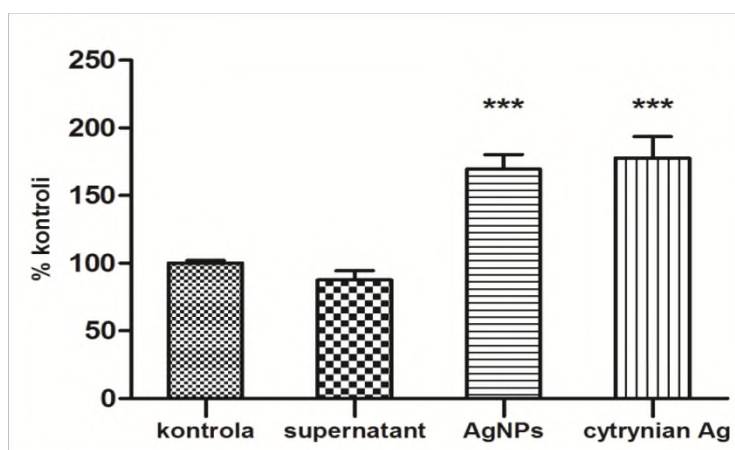
W przypadku grupy zwierząt, która otrzymywała supernatant nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w stężeniu białek ani w mózgu, ani w wątrobie.



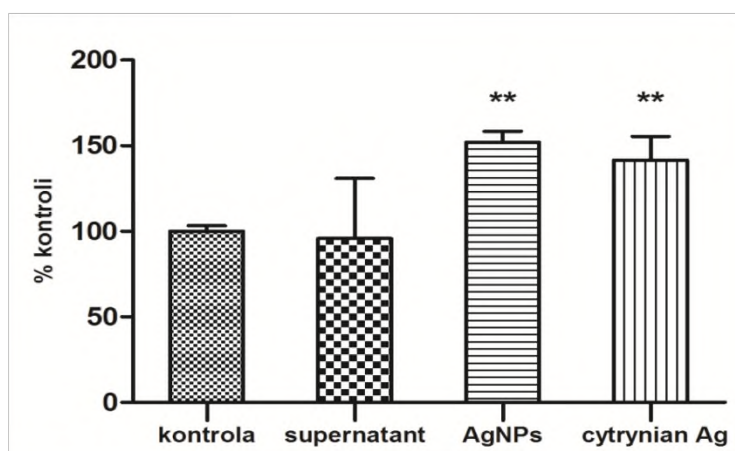
**Rycina 26.** Względne stężenia białka antyapoptotycznego Bcl-2 (A) i proapoptotycznego Bax (B) w homogenatach mózgowych zwierząt kontrolnych (sól fizjologiczna) oraz eksponowanych na supernatant, nanocząstki srebra (AgNPs) lub cytrynian srebra, otrzymane metodą Western blot. Reprezentatywne immunobloty oraz wykresy przedstawiające wartości średnie  $\pm$  SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. Wyniki znormalizowane względem poziomu aktyny i przedstawione jako procent kontroli. Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Dunnetta; różnice istotne statystycznie \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$  vs kontrola.



A)



B)



**Rycina 27.** Względne stężenia białka antyapoptycznego Bcl-2 (A) i proapoptycznego Bax (B) w homogenatach wątrobowych zwierząt kontrolnych (sól fizjologiczna) oraz eksponowanych na supernatant, nanocząstki srebra (AgNPs) lub cytrynian srebra, otrzymane metodą Western blot. Reprezentatywne immunobloty oraz wykresy przedstawiające wartości średnie  $\pm$  SD z pomiarów densytometrycznych immunoblotów otrzymanych z 4 niezależnych doświadczeń. Wyniki znormalizowane względem poziomu aktyny i przedstawione jako procent kontroli. Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem porównań wielokrotnych Dunnetta; różnice istotne statystycznie \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$  vs kontrola.

Podsumowując, żadna z badanych form srebra nie spowodowała indukcji badanych cytokin prozapalnych (IL-1 $\beta$ , IL-6). Wykazano za to, że ekspozycja na AgNPs powoduje

istotne statystycznie obniżenie mitochondrialnego potencjału błonowego w mózgu zwierząt eksponowanych, czemu towarzyszył niewielki, ale istotny statystycznie wzrost względnego poziomu bekliny 1 i MAP LC3-II w homogenatach mózgowych. Z kolei, jony srebra nie wywołały istotnych statystycznie zmian w wymienionych parametrach. Choć obserwowano zmiany względnych poziomów Bcl-2 i Bax w homogenatach mózgowych i wątrobowych zwierząt eksponowanych na AgNPs/Ag<sup>+</sup>, to badania ultrastrukturalne nie wykazały obecności struktur charakterystycznych dla apoptozy.

## 5. Dyskusja

Obecnie nanocząstki wykorzystuje się w wielu gałęziach przemysłu, a także w biologii i medycynie. Podejmowane są próby zastosowania ich m.in. w diagnostyce immunofluorescencyjnej umożliwiającej ocenę struktur wewnątrzkomórkowych oraz śledzenie procesów w nich zachodzących. W fazie badań eksperymentalnych jest obecnie wiele narzędzi w skali nano, pozwalających wykryć komórki nowotworowe, bardzo wczesne zmiany przedkliniczne czy umożliwiających śledzenie wędrówki wirusów w organizmie. Obiecujące są również próby wykorzystania nanocząstek jako nośników umożliwiających dostarczenie substancji leczniczych do konkretnych struktur organizmu, co może przynieść wiele korzyści w terapii chorób neurodegeneracyjnych czy tzw. terapii celowanej nowotworów (Gryberg, 2001; Suri i wsp., 2007). Ponadto, obecność nanocząstek w produktach stosowanych w życiu codziennym staje się coraz bardziej powszechna.

Początkowe przekonanie badaczy, że nanocząstki nie spowodują niekorzystnych zjawisk w środowisku naturalnym i w organizmach żywych, jest obecnie kwestionowane. Tak szybki i niekontrolowany rozwój nanotechnologii prowadzi bowiem do występowania zagrożeń związanych z emisją nanocząstek (zwłaszcza nieorganicznych, opartych o metale) do atmosfery, zbiorników wodnych i gleby. Mogą się one w nich gromadzić lub ulegać transformacjom. Losy nanocząstek w środowisku nie są znane, nie można więc wykluczyć powstania bardziej toksycznych związków. Stopniowo wdrażane są metody oceny zagrożeń środowiskowych związanych z ich stosowaniem oraz wprowadzane są normy środowiskowego i zawodowego narażenia (Stander i wsp., 2011; Hristozov i wsp., 2016). Jednakże rzetelna analiza zagrożeń jest trudna do przeprowadzenia ze względu na duże zróżnicowanie toksyczności poszczególnych nanocząstek, nawet jeśli zostały one utworzone z tego samego materiału.

Duże ryzyko narażenia zawodowego występuje wśród osób zajmujących się nanocząstkami węglowymi i otrzymanymi z tlenku tytanu, gdyż ich światowa produkcja jest najwyższa spośród nanomateriałów (Hristozov i wsp., 2014). Nie powinno się jednak lekceważyć zagrożeń związanych ze stosowaniem nanocząstek otrzymanych z metali przejściowych, gdyż praktycznie nie ulegają one biodegradacji (McGillicuddy i wsp., 2016).

## 5.1. Zasadność użycia modelu

Badania nad neurotoksycznością AgNPs (ok. 10 nm) zostały przeprowadzone na modelu zwierzęcym, ponieważ w warunkach *in vitro* nie ma możliwości wykazania zależności między biodystrybucją AgNPs w organizmie a ich toksycznością. Z literatury wiadomo, że ten typ nanocząstek, choć nie ustalono w jakiej postaci, wchłaniany jest z przewodu pokarmowego do układu krążenia (Park i wsp., 2011a). Tę obserwację potwierdziły również nasze własne badania, w których oceniliśmy stężenie srebra w surowicy szczurów 3, 5 i 8 godz. po podaniu nanocząstek. Porównaliśmy również stężenie srebra w surowicy zwierząt eksponowanych na sól fizjologiczną, AgNPs lub cytrynian srebra po dwutygodniowej ekspozycji zwierząt na badane substancje. Analiza wykazała, że stężenie srebra w surowicy w grupie eksponowanej na nanocząstki srebra jest takie samo jak w przypadku grupy otrzymującej jony srebra (około 12 µg Ag/l) (Ryc. 4).

Zbliżony poziom srebra stwierdzono także w surowicy szczurów, którym podawano drogą pokarmową mieszaninę AgNPs o różnej wielkości (od 28 do 122 nm) lub AgNO<sub>3</sub> w dawce 1 mg/kg m.c. przez 28 dni. Wykazano ponadto, że w narządach zwierząt (wątroba, nerki i śledziona) eksponowanych na jony srebrowe, zgromadziło się więcej srebra niż w przypadku grupy, która otrzymała AgNPs (Qin i wsp., 2017). Nieco inne obserwacje poczynili Loeschner i wsp. (2012), którzy wykazali, że całkowite stężenie srebra w surowicy i narządach zwierząt badanych było wyższe w przypadku grup eksponowanych na Ag<sup>+</sup> i na tej podstawie wysunęli wniosek, że jony srebra są lepiej wchłaniane z jelita cienkiego niż AgNPs.

Po analizie uzyskanych przez nas wyników i dostępnych danych literaturowych, nie jesteśmy w stanie jednoznacznie ocenić czy uzyskane przez nas podobne stężenia srebra w surowicy zwierząt z obu grup badanych są spowodowane przez zbliżony stopień absorpcji obu form srebra, czy też są związane z innym sposobem ich biodystrybucji w organizmie, m.in. zdolnością wiązania z białkami osocza, cyrkulacją pomiędzy narządami a krwią czy wydalaniem z żółcią. Ponieważ pomiar wykonano 24 godz. po ostatnim podaniu, wydaje się bardziej prawdopodobne, że proces biodystrybucji odgrywa tu większą rolę.

Różnice między wynikami uzyskanymi przez Loeschnera i wsp. (2012) a naszymi mogą wynikać, m.in. z zastosowania innego typu pokrycia (PVP), odmiennego czasu ekspozycji (28 dni) i większej dawki AgNPs (9 mg/kg m.c./dzień).

Kolejnym krokiem po wykazaniu, że badane AgNPs są wchłaniane z przewodu pokarmowego do krwi, było sprawdzenie obecności srebra w mózgu i wątrobie zwierząt. Nie udało się wykryć tego metalu techniką ICP-MS w badanych narządach, co wskazuje, że jego

poziom był poniżej granicy czułości tej metody (0,241 µg/kg mokrej tkanki). Dane literaturowe pokazują jednak, że podawanie zwierzętom większych dawek AgNPs i/lub dłuższa ekspozycja, umożliwiają wykrycie srebra w narządach tą techniką (Lee i wsp., 2013a; Qin i wsp., 2017).

Zastępczo zastosowano więc zmodyfikowaną procedurę przygotowania materiału do analizy w TEM, która pozwoliła na stwierdzenie obecności nanogranul pomiędzy blaszkami osłonek mielinowych, jak również w lizosomach i mitochondriach komórek nerwowych oraz w lizosomach zlokalizowanych w mikronaczyniach mózgowych (Ryc. 5). Nasze obserwacje są zgodne z opisanymi w literaturze doświadczeniami z użyciem AgNPs, w których przy zastosowaniu tej samej metody obrazowania, stwierdzono obecność nanogranul w wyżej wymienionych strukturach. Haase i wsp. (2012) zaobserwowali je wewnątrz lizosomów astrocytów i komórek nerwowych, po inkubacji hodowli komórkowych wzbogacanych w astrocyty oraz hodowli komórkowych wzbogacanych w neurony z AgNPs. Podobne nanogranule obserwowano również w przedziałach endosomalno-lizosomalnych (ang. *endosomal-lysosomal compartments*) komórek wątrobowych (Lee i wsp., 2013b) oraz w lizosomach błony podstawnej nabłonka jelitowego eksponowanych zwierząt (Loeschner i wsp., 2011).

W literaturze opisano różne modele zwierzęce użyte do badań nad toksycznością AgNPs. AgNPs podawano drogą pokarmową (Ebabe Elle i wsp., 2013; Patlolla i wsp., 2015), wziewną (Sung i wsp., 2008), donosową (Genter i wsp., 2012; Wen i wsp., 2016), pozajelitową (De Jong i wsp., 2013; Feng i wsp., 2014) i na skórę (Tak i wsp., 2015). Wykorzystano również różne gatunki zwierząt, w tym szczury (Ebabe Elle i wsp., 2013; Feng i wsp., 2014), myszy (Genter i wsp., 2012; Heydrnejad i wsp., 2015) i króliki (Lee i wsp., 2013c). W badaniach nad biodystrybucją AgNPs wykazano, że przenikają one przez barierę krew-mózg niezależnie od drogi podania i kumulują się w parenchymie mózgowej (van der Zande i wsp., 2012; Lee i wsp., 2013a), gdzie mogą powodować zmiany neurodegeneracyjne (Sharma i wsp., 2010; Wen i wsp., 2016). Co istotne, Lee i wsp. (2013a) wykazali zdolność AgNPs do kumulacji w mózgu, stosując model badawczy zbliżony do opisanego w niniejszej pracy, w którym AgNPs stabilizowane cytrynianem (o wielkości ok. 10 nm) były podawane szczurom drogą pokarmową. Zastosowanie znacznie większej dawki, tj. 100-500 mg/kg m.c./dzień, pozwoliło na detekcję srebra w tym narządzie.

W wielu badaniach *in vivo* poświęconych toksyczności AgNPs stosowano wysokie dawki jednorazowe i wykazano, że powodują one zmiany histopatologiczne i/lub biochemiczne w wielu narządach (Sung i wsp., 2009; Kim i wsp., 2010; Ebabe Elle i wsp., 2013). W



przypadku neurotoksyczności problem wielkości dawki jednorazowej jest bardziej złożony, gdyż istnieją doniesienia, że biologiczny okres półtrwania srebra w mózgu jest dłuższy po zastosowaniu mniejszych dawek AgNPs (Yang i wsp., 2010b).

Co więcej, opisany w literaturze przedział dawek jednorazowych AgNPs jest bardzo szeroki i wynosi od 0,2 do 1000 mg/kg m.c., jak również bardzo różna jest ich wielkość (od ok. 3 nm do ok. 100 nm) (Rahman i wsp., 2009; Park i wsp., 2010a; Ebabe Elle i wsp., 2013; Patlolla i wsp., 2015; Skalska i wsp., 2015a; Charehsaz i wsp., 2016). Wybrana przez nas dawka (0,2 mg AgNPs/kg m.c.) obejmuje dolny zakres tego przedziału, a w chwili kiedy rozpoczynaliśmy badania, w literaturze nie było informacji o zastosowaniu tak niskiej dawki. Ponadto, użyliśmy najmniejszych z komercyjnie dostępnych nanocząstek (ok. 10 nm), a jak wspomniano wcześniej, ich toksyczność jest odwrotnie proporcjonalna do wielkości.

Taki dobór modelu może posłużyć do ustalenia poziomu nie wywołującego dających się zaobserwować szkodliwych skutków (NOAEL, ang. *no observable adverse effect level*) AgNPs, którego jeszcze nie określono, pomimo skomercjalizowania nanoproductów zawierających ten typ nanocząstek. Wartość NOAEL może być wykorzystana do oceny poziomu ryzyka stosowania danej substancji. NOAEL, jak również dopuszczalne poziomy narażenia zawodowego (najwyższe dopuszczalne stężenie w powietrzu środowiska pracy), zostały już wstępnie ustalone dla nanocząstek tlenku tytanu (Swidwinska-Gajewska i wsp., 2014).

Wyniki uzyskane z badań nad toksycznością AgNPs u gryzoni wskazują na ryzyko występowania narażenia zawodowego, a za główną drogę narażenia uważa się drogę wziewną. Narażenie zawodowe dotyczy przede wszystkim osób, które biorą udział w toku produkcji wyrobów z udziałem nanokomponentów, jak również zajmują się pakowaniem, transportem i magazynowaniem gotowych produktów (Hristozov i wsp., 2014). Nie można również zapominać, że wzrastająca z roku na rok produkcja nanomateriałów, zwiększa ryzyko środowiskowego narażenia, aczkolwiek wciąż brak dokładnych danych na ten temat, gdyż ta gałąź przemysłu dopiero od niedawna zaczyna podlegać ściślejszym regulacjom prawnym. Dostępne dane wskazują, że roczna światowa produkcja AgNPs wynosi od 5,5 do 550 ton (Piccinno, 2012) albo, wg innych źródeł – od 7.2 do 716 ton rocznie (Massarsky i wsp., 2014b). Przewiduje się także, że środowiskowe stężenie AgNPs w zbiornikach wodnych może osiągnąć poziom ok. 1306 ng/l, a w osadach dennych ok. 57,1 mg/kg osadu (Massarsky i wsp., 2014b).

Użyty w naszych badaniach model ekspozycji na AgNPs został opracowany samodzielnie, jako model imitujący możliwe narażenie środowiskowe. Wybrano podanie drogą pokarmową ze względu na to, że jest ona najczęstsza i najbardziej prawdopodobna dla

człowieka zarówno obecnie, jak i w przyszłości. Jest to związane z zanieczyszczeniem wody i gleby przez AgNPs stopniowo uwalniane do środowiska z produktów je zawierających, np. podczas prania czy mycia (Benn i wsp., 2010). AgNPs są również obecne w żywności, na skutek ich uwalniania z opakowań produktów spożywczych (Artiaga i wsp., 2015). Wydaje się, że organizmy niższe mogą być także źródłem AgNPs dla człowieka, gdyż w badaniach modelujących zależności biocenotyczne zaobserwowano, że nanocząstki skumulowane w organizmach niższych mogą być przenoszone w łańcuchu pokarmowym do organizmów wyższych. Taka zależność została stwierdzona pomiędzy bakteriami *Escherichia coli*, które eksponowano na AgNPs pokryte PVP, a *Caenorhabditis elegans*, u którego zaobserwowano zaburzenia procesów rozrodczych tym wyraźniejsze, im mniejsze nanocząstki inkubowano z bakteriami (Luo i wsp., 2016).

Niektórzy badacze (Ebabe Elle i wsp., 2013; Zhang i wsp., 2013) zaobserwowali spadek masy ciała zwierząt otrzymujących AgNPs w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej; inni z kolei wykazali, że AgNPs nie wpływają na masę ciała zwierząt (Sung i wsp., 2011; Davenport i wsp., 2015; El Mahdy i wsp., 2015). Z kolei badania przeprowadzone w naszej pracowni, na opisanym tutaj modelu badawczym, ujawniły istotny statystycznie wzrost masy ciała zwierząt z grupy AgNPs w porównaniu do grupy kontrolnej otrzymującej sól fizjologiczną, przy czym ten wzrost był obserwowany tylko w 14 dniu eksperymentu (Dabrowska-Bouta i wsp., 2016).

Stwierdzone rozbieżności, dotyczące wpływu AgNPs na masę ciała zwierząt, mogą wynikać z użycia różnych modeli badawczych, gdyż w wymienionych pracach stosowano różne drogi podania AgNPs i różny czas ekspozycji, jak również stosowano AgNPs o różnej wielkości i o różnym typie pokrycia.

## **5.2. Wpływ AgNPs i jonów srebra na zakończenia synaptyczne i ultrastrukturę neuropilu**

Przy rozważaniach nad mechanizmem toksyczności AgNPs podkreśla się rolę jonów srebra uwalnianych z ich powierzchni wewnątrz komórek, a zwłaszcza wewnątrz lizosomów, gdzie panują najkorzystniejsze warunki dla tego procesu (Setyawati i wsp., 2014). Wykazano przy tym, że im mniejsze nanocząstki, tym więcej jonów uwalniają ze swej powierzchni, co może wzmacniać ich toksyczność w porównaniu z nanocząstkami o większych rozmiarach (Gluga i wsp., 2014). Sugeruje się również, że nanocząstki mogą być syntetyzowane *de novo* w organizmie, tzn. mogą zostać zsyntetyzowane z jonów srebra wprowadzonych do organizmu

(Juling i wsp., 2016). Te wzajemne przemiany nanocząstek i jonów uniemożliwiają jasne określenie, która forma srebra i w jakim stopniu odpowiada za toksyczność AgNPs.

Jeszcze kilka lat temu istniało przekonanie, że toksyczność AgNPs jest głównie związana z tą pulą jonów srebrowych, które są uwalniane bezpośrednio do rozpuszczalnika. Tym samym uważano, że zsyntetyzowanie nanocząstek stabilnych w medium wyraźnie zmniejszy ich toksyczność (Navarro i wsp., 2008). Przekonanie to skłoniło nas do wprowadzenia dodatkowej grupy zwierząt przy projektowaniu eksperymentu, której podawano supernatant otrzymany poprzez ultrawirowanie badanego roztworu AgNPs. Ten zabieg pozwolił ocenić stopień uwalniania jonów srebrowych z powierzchni badanych nanocząstek i sprawdzić tezę o udziale tej puli jonów w toksyczności AgNPs. Zaprezentowane w ramach tej pracy wyniki zweryfikowały negatywnie to założenie. Po przeprowadzeniu analizy elektronogramów uzyskanych z grupy eksponowanej na supernatant stwierdziliśmy, że synapsy, pęcherzyki synaptyczne, mitochondria i inne struktury komórkowe zlokalizowane w obrębie neuropilu mają prawidłową strukturę, tak jak w przypadku grupy kontrolnej eksponowanej na sól fizjologiczną. Ponadto w tej grupie nie wykazano istotnych statystycznie zmian w żadnym z badanych parametrów biochemicznych, w poziomach przebadanych białek czy mitochondrialnym potencjale błonowym.

Pomimo braku odpowiednich narzędzi obrazowania, pozwalających jednoznacznie stwierdzić, jaka forma srebra gromadzi się w tkankach/narządach, podejmowane są próby rozstrzygnięcia czy obserwowane efekty toksyczne po zastosowaniu AgNPs są tylko wynikiem działania jonów srebrowych uwolnionych z ich powierzchni wewnątrz komórki, czy też może jest to efekt addycyjnego działania nanocząstek (pierwotnych i wtórnych) i uwolnionych jonów. Część rozważań nad tym zagadnieniem została zaprezentowana we wstępie do niniejszej pracy. W tym miejscu zostaną przedyskutowane te, które są związane z ośrodkowym układem nerwowym i badaniami nad neurotoksycznością nanocząstek srebra.

Ziemińska i wsp. (2014) wykazali, że inkubacja hodowli komórek ziarnistych mózdzku szczura z AgNPs powoduje aktywację receptorów glutaminergicznych NMDA, ale nie zaobserwowano takiego efektu po inkubacji z jonami srebra. W innym doświadczeniu stwierdzono, że pod wpływem AgNPs doszło do wzrostu aktywności kaspazy i indukcji apoptozy w szczurzych astrocytach korowych, podczas gdy  $Ag^+$  wpływały negatywnie na integralność błony komórkowej astrocytów i sprzyjały nekrozie tych komórek. Dodatkowo, AgNPs indukowały wydzielanie wielu cytokin prozapalnych przez astrocyty, czego nie stwierdzono w przypadku inkubacji z  $Ag^+$  (Sun i wsp., 2016).

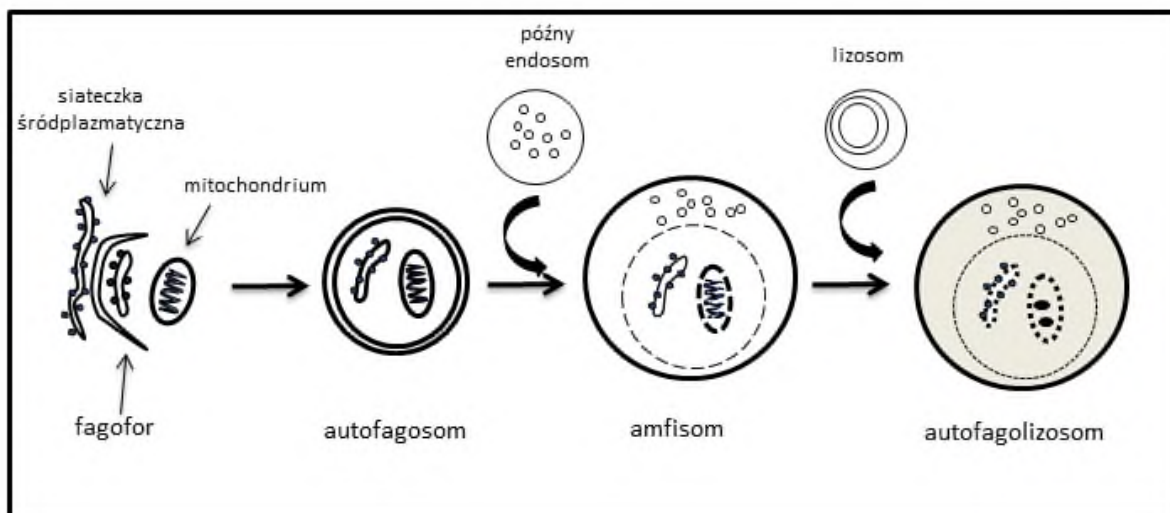
Uzyskane przez nas wyniki również wskazują, że istnieją pewne różnice w neurodegeneracyjnym działaniu AgNPs stabilizowanych cytrynianem a  $Ag^+$  w postaci cytrynianu srebra. Zaobserwowaliśmy, że zmiany ultrastrukturalne w obrębie synaps są bardziej nasilone w grupie eksponowanej na nanocząstki niż w przypadku grupy otrzymującej cytrynian srebra, przy czym w największym stopniu występowały one w obrębie hipokampa. Co więcej, niektóre z tych zmian były charakterystyczne tylko dla AgNPs.

W neuropilu zwierząt eksponowanych zarówno na AgNPs jak i jony srebra stwierdziliśmy obrzęk zakończeń synaptycznych, zwiększoną gęstość pęcherzyków synaptycznych, „rozmycie” struktury szczeliny synaptycznej oraz obecność ciał wielopęcherzykowych (Ryc. 9 i 10). Do zmian ultrastrukturalnych, które były obserwowane tylko w grupie eksponowanej na AgNPs, należały: luźne skupiska pęcherzyków synaptycznych w neuropilu (prawdopodobnie będące rezultatem zniszczenia błon synaptycznych) oraz ciała mielinopodobne, których obecność dowodzi zachodzenia procesów neurodegeneracyjnych (Ryc. 9).

Ciała mielinopodobne, widoczne na elektronogramach, zawierają w swojej strukturze skupiska pęcherzyków synaptycznych (Ryc. 9D) lub nieprawidłowe mitochondria (Ryc. 9F) otoczone koncentrycznie ułożonymi fragmentami błon biologicznych. Formowanie takich struktur obserwowano m.in. w aksonopatii (zaniku aksonów) nerwu wzrokowego indukowanej pod wpływem ekscytotoksyczności (Saggu i wsp., 2010) oraz w trakcie neurodegeneracji siatkówki oka (Schuettauf i wsp., 2004). Opisane struktury są uważane przez niektórych badaczy za początkowe stadium makroautofagolizosomów, które są formowane w procesie autofagii indukowanej w odpowiedzi na stres (makroautofagii). Makroautofagia (dla uproszczenia nazywana tutaj autofagią) jest procesem lizosomalnej degradacji dużych białek cytoplazmatycznych oraz uszkodzonych organelli, takich jak mitochondria czy retikulum endoplazmatyczne (Kelekar, 2005).

Formowanie się makroautofagolizosomu jest procesem wieloetapowym (Ryc. 28). W pierwszym etapie powstają fagofory, a następnie dochodzi do uformowania się błon autofagosomu. Do tego procesu konieczne jest utworzenie kompleksów białkowych składających się z bekliny 1 (Atg 6), podjednostki katalitycznej i regulatorowej kinazy fosfatydyloinozytolu klasy III (odpowiednio podjednostki Vps34 i Vps15) oraz kilku innych białek, w tym białek z rodziny Atg (Vicencio i wsp., 2009). Dalsze etapy są związane z przekształceniem się białka MAP1 LC3 z formy cytozolowej (MAP LC3-I) do formy lipidowej związanej z wewnętrzną błoną autofagosomu (MAP LC3-II) (Nixon, 2013), dlatego też w

ramach tej pracy zostały także zbadane poziomy wybranych białek związanych z tym procesem (beklina 1 i MAP LC3-II), a wyniki przedyskutowane w kolejnym podrozdziale.



**Rycina 28.** Schematyczne przedstawienie poszczególnych etapów autofagii [zmodyfikowane wg (Yang i wsp., 2010a).

Dotychczasowe dane literaturowe w niewielkim stopniu dostarczają informacji na temat wpływu AgNPs na ultrastrukturę neuropilu, dlatego też nasze badania, skupione na zmianach w synapsach, w znacznym stopniu uzupełniają ogólny stan wiedzy. Dotychczas wykazano, że te nanocząstki powodują zwiększenie przepuszczalności BBB prowadzące do obrzęku, aktywację komórek glejowych, zanik otoczek mielinowych włókien nerwowych (Sharma i wsp., 2007; Sharma i wsp., 2009) oraz zmiany degeneracyjne w obrębie warstwy ziarnistej mózdzku nowonarodzonych szczurów (Yin i wsp., 2015b). Zaobserwowano także pyknozę jąder komórkowych i obrzęk astrocytów w mózgu szczurów, którym podawano AgNPs drogą pokarmową (w dawce 1 mg/kg m.c./dzień) przez 14 dni (Xu i wsp., 2015b). W kolejnym badaniu, przeprowadzonym na opisanym w tej pracy modelu, wykazano zmiany ultrastrukturalne w obrębie osłonek mielinowych, którym towarzyszyło obniżenie poziomu wybranych białek wchodzących w ich skład: glikoproteiny związanej z mieliną (MAG, ang. *myelin associated glycoprotein*), glikoproteiny mieliny i oligodendrocytów (MOG, ang. *myelin oligodendrocyte glycoprotein*) i 2'3'-cyklicznej nukleotydowej fosfodiesterazy (CNP-aza, ang. *2'3'-cyclic nucleotide phosphodiesterase*) (Dabrowska-Bouta i wsp., 2016).

Nasze badania pokazują także, że hipokamp jest bardziej wrażliwy na niekorzystny wpływ AgNPs niż kora mózgowa. Podobne wnioski wyciągnęli Davenport i wsp. (2015), którzy badali ekspresję genu dla oksygenazy hemowej 1 w hipokampie i korze mózgowej

mysz i stwierdzili, że poziom ekspresji tego genu, jak również poziom samego białka, jest podwyższony tylko w pierwszej z wymienionych struktur.

Wykazaliśmy również, że zmianom ultrastrukturalnym w obrębie synaps towarzyszą zmiany biochemiczne. Ekspozycja na AgNPs lub jony srebrne spowodowała znaczące obniżenie względnych stężeń wybranych białek presynaptycznych (synaptofizyny i synapsyny I) (Ryc. 11) i białka postsynaptycznego – PSD-95 (Ryc. 12). Nasze wyniki są w zgodzie z badaniami *in vitro*, które wykazały wyraźny spadek względnego stężenia synaptofizyny i PSD-95 w hodowlach neuronów korowych inkubowanych z AgNPs (Xu i wsp., 2013). W kolejnym doświadczeniu, w którym inkubowano neurony glutaminergiczne (otrzymane z ludzkich zarodkowych komórek macierzystych) z AgNPs (20 nm) stabilizowanymi cytrynianem, również wykazano zmniejszenie ekspresji PSD-95, jak też zaburzenia we wzroście neurytów, wzrost produkcji ROS, napływ  $Ca^{2+}$  do komórek czy zmniejszenie ekspresji receptora NMDA. Ponadto, AgNPs wywoływały ekscytotoksyczność na skutek aktywacji kalmoduliny i indukcji NO oraz fosforylacji kinazy syntazy glikogenu 3 (GSK-3) (Begum i wsp., 2016).

Obserwowane przez nas spadki względnych poziomów białek synaptycznych są ściśle związane ze zniszczeniem prawidłowej struktury synaps, co wskazuje, że AgNPs mogą powodować upośledzenie funkcji neuronów. Zbadane przez nas białka presynaptyczne są bowiem zaangażowane w proces przemieszczania się pęcherzyków synaptycznych wzdłuż filamentów aktynowych cytoszkieletu wewnątrz aksonu oraz ich łączenia z błoną presynaptyczną. Wykazano, że zablokowanie procesu przyłączania się pęcherzyków do błony presynaptycznej z powodu niedoboru synaptofizyny prowadzi do ich nagromadzenia się w cytoplazmie aksonu i uniemożliwia uwalnianie neuroprzekaźników do szczeliny synaptycznej (Valtorta i wsp., 1989). Z kolei spadek poziomu ufosforylowanej synapsyny I uniemożliwia przesuwanie się pęcherzyków synaptycznych z miejsc ich magazynowania w aksonie w kierunku błony presynaptycznej (Yamagata, 2003).

Wydaje się, że zmniejszenie ekspresji białek presynaptycznych biorących udział w regulacji cyklu pęcherzyków synaptycznych pod wpływem AgNPs (i w mniejszym stopniu jonów srebra), doprowadziło do zwiększenia gęstości pęcherzyków synaptycznych, tworzących skupiska w środkowej części aksonu (Ryc. 9B i 10B), zamiast w rejonie błony presynaptycznej.

Białko PSD-95 jest bardzo ważną składową zagęszczeń postsynaptycznych. Ich udział jest konieczny w zjawisku plastyczności synaps związanej z NMDAR, do regulowania funkcji tych receptorów oraz do zmiany ich gęstości na powierzchni błony synaptycznej (Keith i wsp., 2008). PSD-95 jest zaangażowane w regulację długotrwałego wzmocnienia synaptycznego

(LTP, ang. *long-term potentiation*) oraz w proces dojrzewania pęcherzyków synaptycznych. Rozmyta struktura synaps, zaobserwowana przez nas w hipokampie i korze mózgowej szczurów, może mieć właśnie związek ze zmianą struktury tego białka lub jego rozmieszczenia, co może skutkować zmianą jego powinowactwa do odczynników stosowanych podczas przygotowania narządu do analizy TEM (Ryc. 9B i 10B-D).

Powyższe obserwacje, dotyczące zmiany względnych stężeń białek synaptycznych oraz zaburzonej struktury synaps, mogą dowodzić, że pod wpływem AgNPs dochodzi do upośledzenia funkcji synaps pobudzających. Przy czym należy zwrócić uwagę, że uszkodzenia tych synaps są obserwowane w przebiegu wielu chorób neurodegeneracyjnych (Masliah, 2001; Rao i wsp., 2012).

Zmiany te, obserwowane pod wpływem AgNPs, a w mniejszym stopniu także pod wpływem jonów srebra, wskazują na degenerację synaps oraz upośledzenie uwalniania neuroprzekazników. Istotnie, wykazano, że dwudziestoosmiodniowa ekspozycja szczurów na AgNPs (14 nm) wywołuje zmiany stężenia dopaminy i serotoniny w mózgu szczurów (Hadrup i wsp., 2012). Występowanie tych nieprawidłowości głównie w obrębie hipokampa może sugerować upośledzenie zdolności poznawczych i procesów pamięci. Taka hipoteza znajduje potwierdzenie w pracy Liu i wsp. (2012b), którzy zaobserwowali, że po czternastu dniach donosowego podawania szczurom AgNPs (o wielkości 32,68 – 380,21 nm i w dawce 30 mg/kg m.c.) dochodziło w hipokampie do nadprodukcji ROS i zmian ultrastrukturalnych (obrzęk, pyknoza jąder komórkowych), czemu towarzyszyło pogorszenie zdolności poznawczych u zwierząt. Wykazano również, że powtarzające się narażenie na AgNPs może wpływać niekorzystnie na zdolności motoryczne zwierząt. U myszy (po siedmiodniowym, donosowym podawaniu AgNPs o wielkości 25 nm i w dawce 50 mg/kg m.c.) następowało pogorszenie pamięci przestrzennej, nie stwierdzono natomiast zmian w pamięci operacyjnej (Davenport i wsp., 2015). Wykazano również upośledzenie koordynacji ruchowej oraz spadek aktywności motorycznej nowonarodzonych szczurów, którym AgNPs podawano donosowo przez 14 tygodni. Zmianom motorycznym towarzyszyły zmiany degeneracyjne w warstwie ziarnistej mózdzku i aktywacja komórek glejowych. Autorzy sugerowali, że zaobserwowane zaburzenia motoryczne są spowodowane zmniejszeniem poziomu białek kanałów wapniowych w obrębie mózdzku (Yin i wsp., 2015b). Spadek aktywności ruchowej został również stwierdzony u dorosłych szczurów, którym podawano AgNPs (5 nm) dożylnie (Zhang i wsp., 2013). W kolejnym badaniu, przeprowadzonym w naszej pracowni na opisanym w tej pracy modelu, stwierdzono zmiany w ultrastrukturze osłonek mielinowych, zarówno pod wpływem AgNPs,

jak i jonów srebra. Na elektronogramach obserwowano liczne odcinki osłonki mielinowej z rozluźnionymi i rozwarstwionymi blaszkami. Towarzyszyło temu istotne statystycznie obniżenie względnego stężenia białek charakterystycznych dla osłonek mielinowych (MOG, MAG i CNP). Nie stwierdzono natomiast zmian w procesach poznawczych, aktywności motorycznej czy koordynacji ruchowej u szczurów w zastosowanych testach behawioralnych (Dabrowska-Bouta i wsp., 2016).

Analiza elektronogramów w niniejszej pracy ujawniła także zmiany ultrastrukturalne w obrębie organelli komórkowych, takie jak obrzęknięte mitochondria z widoczną fragmentacją grzebieni, nadreaktywność aparatu Golgiego czy zaburzenia cytoszkieletu jądrowego. Wymienione nieprawidłowości były obecne głównie w neuronach korowych i hipokampalnych zwierząt eksponowanych na AgNPs (Ryc. 6 i 7). Prawdopodobnie zaobserwowane zmiany w ultrastrukturze mitochondriów są skorelowane ze zmianami w przepuszczalności błon mitochondrialnych i aktywności enzymów mitochondrialnych. Wiadomo bowiem, że nanocząstki mogą przenikać przez bariery biologiczne, w tym także przez błony mitochondrialne. Ze względu na swoje właściwości oksydoredukcyjne mogą również zaburzać funkcjonowanie enzymów łańcucha oddechowego (Costa i wsp., 2010). Uzyskane przez nas wyniki potwierdzają to, gdyż zaobserwowaliśmy istotny statystycznie (około 29%) spadek wartości mitochondrialnego potencjału błonowego w mózgu szczurów, którym podawano AgNPs.

Zmiany w obrębie organelli komórkowych w neuropilu zwierząt eksponowanych na cytrynian srebra nie były tak nasilone, jak w przypadku zwierząt eksponowanych na nanocząstki. Ta obserwacja jest skorelowana z niewielkim (ok. 15%), statystycznie nieistotnym spadkiem mitochondrialnego potencjału błonowego w tej grupie (Ryc. 23).

### **5.3. AgNPs a stres oksydacyjny, stan zapalny i śmierć komórkowa**

W literaturze można znaleźć coraz więcej informacji na temat biodystrybucji nanocząstek srebra w organizmie, ale wiedza dotycząca mechanizmów ich toksyczności wciąż wymaga uzupełnienia. Szczególnie mało uwagi poświęca się badaniu neurotoksyczności tych substancji w warunkach *in vivo*, pomimo ich narastającej obecności w technologiach medycznych, jak również w produktach konsumenckich.

Zaprezentowane w tej pracy wyniki badań pokazują wpływ małych dawek AgNPs o niewielkiej średnicy oraz jonów srebrowych w tej samej dawce na markery stresu



oksydacyjnego oraz aktywność enzymatycznych i nieenzymatycznych układów antyoksydacyjnych obecnych w mózgu. Dla porównania, analogiczne oznaczenia przeprowadzono w wątrobie badanych zwierząt.

Na podstawie danych literaturowych wiadomo, że stres oksydacyjny jest ważnym elementem mechanizmu toksyczności AgNPs, przy czym im mniejsza nanocząstka tym obserwowane efekty toksyczne są silniejsze (Carlson i wsp., 2008; Gliga i wsp., 2014). Wykazano, że AgNPs zmniejszają przeżywalność wielu linii komórek ssaczych, m.in. makrofagów pęcherzyków płucnych (Carlson i wsp., 2008) i ludzkich monocytów (Foldbjerg i wsp., 2009). Stwierdzono, że jest to spowodowane nadprodukcją ROS i powstaniem stresu oksydacyjnego, który prowadzi do śmierci komórkowej na drodze apoptozy lub nekrozy (Carlson i wsp., 2008; Foldbjerg i wsp., 2009). Także inkubacja szczurzych komórek ziarnistych mózdzku z AgNPs (20-25 nm) powodowała wzrost produkcji ROS, czemu towarzyszyło zmniejszenie puli zredukowanego glutationu (Yin i wsp., 2013). Indukcję stresu oksydacyjnego zaobserwowano także podczas ekspozycji pierwotnych korowych komórek neuralnych z AgNPs (około 20 nm). Stwierdzono wzrost produkcji ROS, karbonylację białek i podwyższoną ekspresję HO-1 (Haase i wsp., 2012) – białka o właściwościach cytoprotekcyjnych i przeciwutleniających, biorącego także udział w wyciszeniu stanu zapalnego (Kozakowska i wsp., 2015).

Dane literaturowe wskazują, że AgNPs wywołują stres oksydacyjny w wielu narządach, przy czym najwięcej doniesień dotyczy udziału tego patomechanizmu w hepatotoksyczności. Zainteresowanie wpływem AgNPs na wątrobę jest związane z wynikami badań nad biodystrybucją pokazującymi, że jest ona głównym narządem, do którego nanocząstki są transportowane po przeniknięciu do krążenia i gromadzone w największych ilościach (Loeschner i wsp., 2011). Nadprodukcję ROS zaobserwowano m.in. w wątrobie szczurów eksponowanych na AgNPs drogą pokarmową (Ebabe Elle i wsp., 2013; Patlolla i wsp., 2015), co koreluje z uzyskanymi przez nas wynikami. Ponadto stwierdziliśmy, że powstawanie ROS w wątrobie było bardziej nasilone w grupie otrzymującej Ag<sup>+</sup> (prawie dwukrotnie) niż po ekspozycji na AgNPs (Ryc. 14A).

Nadmierna produkcja ROS jest składową mechanizmu neurotoksyczności. Stwierdzono, że jednorazowe dootrzewnowe podanie myszom AgNPs (29,3 ± 12,5 nm) w bardzo dużej dawce (1000 mg/kg m.c.) powoduje zmiany ekspresji wielu genów w mózgu, w tym genów związanych ze stresem oksydacyjnym i stanem zapalnym (Rahman i wsp., 2009). Nadprodukcję ROS zaobserwowano również w hipokamie szczurów, które były narażone na 14-dniowe donosowe podanie AgNPs (33 – 380 nm) w dawce 30 mg/kg m.c./dzień (Liu i wsp.,

2012b). Jak pokazują nasze badania, już niewielkie dawki AgNPs (0,2 mg/kg m.c.) podawane przewlekle drogą pokarmową powodują nasilenie produkcji ROS w mózgu. Podobne zmiany w poziomie tego markera stresu oksydacyjnego zaobserwowaliśmy także w grupie eksponowanej na Ag<sup>+</sup> (Ryc. 13A).

Komórki posiadają mechanizmy antyoksydacyjne, których zadaniem jest usuwanie nadmiaru ROS. Jeśli mechanizmy obronne nie są w stanie zneutralizować tych wysoce reaktywnych molekuł, to nagromadzone ROS łatwo wchodzi w reakcje z makrocząsteczkami takimi jak DNA, białka i lipidy, powodując zaburzenia procesów fizjologicznych. Dochodzi wtedy do powstania stresu oksydacyjnego, który prowadzi m.in. do peroksydacji lipidów błon biologicznych, co może zaburzać ich strukturę i zwiększać przepuszczalność.

W naszych badaniach wykazaliśmy, że zarówno ekspozycja na AgNPs, jak i jony srebrne, powoduje istotny statycznie, umiarkowany wzrost poziomu MDA w mózgu eksponowanych zwierząt. Tak jak w przypadku ROS, zmiana poziomu MDA była zbliżona w obu grupach eksponowanych na srebro (o ok. 20% w porównaniu do kontroli) (Ryc. 13B).

Uzyskany przez nas wynik badania poziomu MDA w mózgu trudno jest odnieść do danych literaturowych, gdyż dotychczas tylko Krawczyńska i wsp. (2015) ocenili wpływ AgNPs na peroksydację lipidów błon w warunkach *in vivo*. Ich model badawczy, całkowicie różniący się od naszego, wykazał, że jednorazowe dożylnie podanie szczurom AgNPs (20 nm, dawka 10 mg/kg m.c.) powoduje obniżenie peroksydacji lipidów, przy czym oznaczenie przeprowadzono dopiero 28 dni po iniekcji, a nie jak w przypadku naszego modelu – bezpośrednio po kilkunastodniowym podawaniu.

W badaniach wykonanych na linii ludzkich komórek wątrobowych wykazano, że jony srebra powodują silniejszy stres oksydacyjny niż AgNPs, pomimo że absorpcja obydwu form srebra przez komórki była zbliżona (Vrcek i wsp., 2014). Koreluje to z uzyskanymi przez nas wynikami, bowiem w wątrobie szczurów tylko Ag<sup>+</sup> spowodowały istotne statycznie podwyższenie poziomu MDA (oraz bardziej nasiloną produkcję ROS) (Ryc. 14B). Nie oznacza to jednak, że pod wpływem AgNPs nie dochodzi w tym narządzie do peroksydacji lipidów, gdyż prawdopodobnie dłuższa ekspozycja i/lub większe dawki AgNPs nasiliłyby ten proces. Tę teorię potwierdzają inne badania *in vivo*, w których obserwowano istotny statycznie wzrost poziomu MDA w wątrobie zwierząt eksponowanych na AgNPs (El Mahdy i wsp., 2015; Patlolla i wsp., 2015). Wzrost poziomu MDA wykazano również we krwi szczurów, którym podano AgNPs (10 nm, dawka 1 mg/kg m.c.) drogą wziewną (Lingabathula i wsp., 2017).

Obserwowane różnice w wartościach wybranych markerów stresu oksydacyjnego w mózgu i wątrobie zwierząt eksponowanych na AgNPs, pozwalają wysnuć wniosek, że mózg

jest bardziej podatny niż wątroba na toksyczne działanie niskich dawek AgNPs. Może to mieć związek z większą podatnością mózgu na stres oksydacyjny, gdyż w tym narządzie obserwuje się wyższe zużycie tlenu niż w innych tkankach oraz obecność aktywnego układu glutaminergicznego. Ponadto występują znaczne ilości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, które łatwo ulegają utlenieniu, a aktywność układów antyoksydacyjnych jest względnie niska w porównaniu z innymi narządami. Nie bez znaczenia jest również fakt, że w mózgu występują obszary z wysoką zawartością metali o właściwościach oksydoredukcyjnych, które katalizują reakcje prowadzące do powstania ROS (Sayre i wsp., 2008; Friedman, 2011).

Obserwowany wzrost poziomu wybranych markerów stresu oksydacyjnego świadczy o obniżeniu skuteczności enzymatycznych i nieenzymatycznych układów antyoksydacyjnych, które w warunkach fizjologicznych zapobiegają uszkodzeniu makrocząsteczek w wyniku reakcji z ROS. Taką funkcję pełnią, m.in. enzymy antyoksydacyjne CAT, SOD, GPx i GR oraz układ glutationu.

Uzyskane przez nas wyniki wskazują, że aktywacja wymienionych enzymów antyoksydacyjnych w mózgu szczurów pod wpływem AgNPs (jak również  $Ag^+$ ) nie jest procesem oczywistym. Żadna z podanych form srebra nie spowodowała istotnych statystycznie zmian w aktywności SOD czy CAT. Stwierdzono jedynie nieznaczne obniżenie aktywności CAT w grupie eksponowanej na AgNPs i nieznaczne podwyższenie aktywności tego enzymu w grupie eksponowanej na cytrynian srebra (Ryc. 15). Również w wątrobie zwierząt eksponowanych na AgNPs nie wykazano różnic w aktywności obu enzymów w porównaniu do grupy kontrolnej. Jedynie ekspozycja na cytrynian srebra spowodowała istotny statystycznie wzrost aktywności obu enzymów w tym narządzie (Ryc. 16).

Nasze obserwacje, dotyczące wpływu AgNPs na aktywność CAT i SOD, trudno jest odnieść do danych literaturowych, gdyż występują w nich znaczne rozbieżności. W badaniach przeprowadzonych na liniach komórek ludzkich stwierdzono zarówno spadek aktywności SOD przy równocześnie podwyższonym poziomie MDA (Song i wsp., 2012), jak i wzrost aktywności tego enzymu, czemu towarzyszyło, m.in. podwyższenie poziomu ROS i obniżenie poziomu glutationu zredukowanego (Vrcek i wsp., 2014; Suliman i wsp., 2015). Chociaż nasze badania nie wykazały zmian w aktywności SOD w mózgu i wątrobie szczurów pod wpływem AgNPs, to z danych literaturowych wynika, że mogą one w pewnych warunkach wpływać na ten enzym. Wykazano, że po jednorazowym dożylnym podaniu szczurom tych nanocząstek następuje wzrost aktywności SOD w mózgu przy równoczesnym obniżeniu poziomu mRNA *Sod 1* (Krawczynska i wsp., 2015). Z kolei spadek aktywności tego enzymu (i równoczesny

wzrost poziomu MDA) został stwierdzony w jądrach szczurów, którym podano AgNPs dożyłdkowo w dawce 5 mg/kg m.c. (Ansar i wsp., 2016) oraz we krwi szczurów eksponowanych na nie drogą wziewną (Lingabathula i wsp., 2017). Brak zmian w aktywności tego enzymu stwierdzono w wątrobie szczurów, którym podano dużą dawkę AgNPs (Ebabe Elle i wsp., 2013) oraz w mózgu i wątrobie karpia (łac. *Cyprinus carpio*) (Lee i wsp., 2012).

Wzrost aktywności CAT pod wpływem AgNPs zaobserwowano w niektórych ludzkich liniach komórkowych (Suliman i wsp., 2015; Zhang i wsp., 2015) oraz w surowicy myszy na nie eksponowanych (Negahdary i wsp., 2015). Z kolei wyraźny spadek aktywności tego enzymu pod wpływem AgNPs stwierdzono w jądrach szczurów eksponowanych drogą pokarmową (Ansar i wsp., 2016) oraz we krwi szczurów po ekspozycji drogą wziewną (Lingabathula i wsp., 2017). Wyniki badań Lee i wsp. (2012), podobnie jak nasze, nie wykazały zmian w aktywności tego enzymu w mózgu i wątrobie karpia.

Natomiast w przypadku GPx i GR zaobserwowaliśmy, że zarówno AgNPs jak i Ag<sup>+</sup> powodują istotny statystycznie wzrost aktywności tych enzymów w mózgu badanych zwierząt (Ryc. 19), ale nie wpływają na ich aktywność w wątrobie (Ryc. 20). Dane literaturowe wskazują, że AgNPs mogą zarówno obniżać, jak i podwyższać aktywność GPx. Zmniejszenie aktywności tego enzymu pod ich wpływem obserwowano w linii ludzkich hepatocytów (Song i wsp., 2012) oraz w jądrach szczurów (Ansar i wsp., 2016). Z kolei wzrost jego aktywności stwierdzono w mózgu szczurów, którym podano AgNPs (20 nm, dawka 10 mg/kg m.c.) jednorazowo drogą dożylną (Krawczyńska i wsp., 2015). Szczególnie trudno dostępne są informacje o wpływie nanocząstek srebra na aktywność GR. Krawczyńska i wsp. (2015) wykazali, że mogą one zwiększać aktywność GR w mózgu szczurów, czemu towarzyszyło obniżenie poziomu mRNA dla tego białka.

Podsumowując, zastosowanie niskich dawek AgNPs/Ag<sup>+</sup> w naszym modelu narażenia wywołało indukcję umiarkowanego stresu oksydacyjnego w mózgu i wątrobie szczurów, nie powodując przy tym nasilonej aktywacji wybranych enzymów układu antyoksydacyjnego (CAT, SOD, GPx i GR).

Zbadaliśmy również wpływ AgNPs i Ag<sup>+</sup> na nieenzymatyczny układ antyoksydacyjny – układ glutationu. Wykazaliśmy, że pod wpływem obu form srebra dochodzi do istotnego statystycznie spadku stosunku GSH/GSSG w mózgu badanych zwierząt w porównaniu do grupy kontrolnej otrzymującej sól fizjologiczną. Równocześnie poziom tGSH pomiędzy poszczególnymi grupami był zbliżony (Ryc. 17).

Grupy tiolowe białek są bardzo wrażliwe na utlenianie pod wpływem reaktywnych form tlenu i azotu, dlatego też są one zabezpieczane przed nieodwracalnymi modyfikacjami na drodze S-tiolacji, przy czym najczęściej mamy do czynienia z S-glutationylacją. Proces S-glutationylacji zachodzi głównie w warunkach umiarkowanego stresu i polega na utworzeniu mostków disulfidowych między grupami tiolowymi białek a glutationem (Rodacka i wsp., 2014). Proces ten może wyjaśnić obserwowany spadek stosunku GSH/GSSG przy praktycznie nie zmienionym poziomie tGSH. Przyczyną obniżenia poziomu GSH może też być jego bezpośrednia reakcja z anionorodnikiem ponadtlenkowym i rodnikiem hydroksylowym. Ponadto glutation jest kofaktorem w reakcji katalizowanej przez GPx, co również prowadzi do obniżenia stężenia GSH i powstania GSSG (Cnubben i wsp., 2001).

Obniżenie poziomu zredukowanego glutationu stwierdzono m.in. w szczyrkich komórkach ziarnistych mózdzku (Yin i wsp., 2013), szczyrkich komórkach wątrobowych (Hussain i wsp., 2005) i w ludzkich hepatocytach (Piao i wsp., 2011) inkubowanych z AgNPs. Z kolei badania *in vivo* nie wykazały wpływu AgNPs na układ glutationu w wątrobie gryzoni. 28-dniowe dootrzewnowe podawanie szczyrom AgNPs (8,7 nm, dawka 4 mg/kg m.c./dzień) nie spowodowało zmiany stężenia GSH, pomimo że obserwowano peroksydację lipidów błon w tym narządzie (El Mahdy i wsp., 2015). Również nasze wyniki przy zastosowaniu niższej dawki AgNPs i krótszym okresie ekspozycji pokazują, że AgNPs nie wpływają na układ glutationu w tym narządzie (Ryc. 18).

Ocenę wpływu AgNPs na układ glutationu przeprowadzono także w innych narządach gryzoni. Davenport i wsp. (2015) wykazali, że ekspozycja myszy na duże dawki AgNPs (25 i 50 mg/kg m.c.) powoduje spadek stosunku GSH do GSSG oraz obniża pulę limfocytów w śledzionie. Uważa się, że istnieje związek pomiędzy spadkiem stosunku GSH/GSSG a pogorszeniem funkcji limfocytów. Limfocyty nie są bowiem zdolne do prawidłowej odpowiedzi odpornościowej przy zbyt niskim poziomie GSH, co może sprzyjać rozwojowi stanu zapalnego (Morris i wsp., 2013). Spadek poziomu GSH stwierdzono również we krwi szczyrów narażonych na AgNPs drogą wziewną (Lingabathula i wsp., 2017).

Dostępne dane literaturowe oraz nasze własne wyniki nie dają jednoznacznej odpowiedzi na pytanie o wpływ AgNPs na wymienione wcześniej układy antyoksydacyjne, pomimo że wykazano ich zdolność do indukcji stresu oksydacyjnego. Uzyskane rozbieżności w wynikach (zwłaszcza *in vivo*) mogą być spowodowane kilkoma czynnikami, takimi jak droga podania, czas narażenia czy typ zastosowanych nanocząstek. Uważa się również, że w obronę komórek przed AgNPs mogą być zaangażowane nieprzebadane przez nas układy

antyoksydacyjne. Wśród nich wymienia się HO-1 (Davenport i wsp., 2015), układ tioredoksyiny (Xu i wsp., 2015a) oraz metalotioneiny (Luther i wsp., 2012). Co istotne, Xu i wsp. (2015a) zaobserwowali, że nadmierna ekspozycja na AgNPs może upośledzać funkcjonowanie układu tioredoksyiny, co w konsekwencji prowadzi do rozwoju stanu zapalnego lub śmierci komórkowej.

Ciekawych informacji o mechanizmach toksyczności AgNPs (i dla porównania Ag<sup>+</sup>) dostarczają nam także badania nad ich wpływem na organizmy niższe. W jednym z nich oceniono wpływ AgNPs i Ag<sup>+</sup> na zdolność wywołania stresu oksydacyjnego u *Enchytraeus crypticus* (robaka doniczkowego). Badając liczne parametry, m.in. aktywności CAT, GPx, GST, GR, MT i peroksydację lipidów, wykazano, że Ag<sup>+</sup> indukują stres oksydacyjny wcześniej niż AgNPs, przy czym w obydwu przypadkach stwierdzono wzmożoną peroksydację lipidów. Ponadto, każda z form srebra w odmienny sposób wpływała na aktywność enzymów antyoksydacyjnych. Po ekspozycji na AgNPs wzrosła aktywność CAT, MT, podczas gdy Ag<sup>+</sup> zwiększyły aktywność GST i GPx. Uzyskane wyniki mogą wskazywać, że efekty toksyczne AgNPs pojawiają się z pewnym opóźnieniem w porównaniu do jonów srebra, co może mieć związek ze stopniowym uwalnianiem jonów z powierzchni AgNPs i/lub bezpośrednim działaniem samych nanocząstek (Ribeiro i wsp., 2015).

Ponieważ stres oksydacyjny może prowadzić do rozwoju stanu zapalnego, przeprowadziliśmy ocenę wpływu niskich dawek AgNPs na indukcję tego procesu. Wykazaliśmy, że przewlekłe podawanie szczurom tak małej dawki nie powoduje zmian w poziomie wybranych markerów stanu zapalnego (cytokin prozapalnych: IL-1 $\beta$  i IL-6) zarówno w mózgu (Ryc. 21), jak i w wątrobie (Ryc. 22) eksponowanych zwierząt. Z danych literaturowych wiadomo jednak, że AgNPs mogą wpływać na poziom cytokin, immunoglobulin i aktywność komórek układu odpornościowego, jeśli poda się zwierzętom wysoką dawkę i/lub zastosuje dłuższy czas ekspozycji. Podwyższony poziom IL-6 i TNF- $\alpha$  stwierdzono w wątrobie szczurów, które były eksponowane na AgNPs (20 nm, dawka 500 mg/kg m.c./dzień) drogą pokarmową przez 81 dni (Ebabe Elle i wsp., 2013). Dożylnie podawanie szczurom AgNPs (20 nm, dawka 6 mg/kg m.c.) przez 28 dni również skutkowało zmianami w poziomach IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  i interleukiny 10 (IL-10) w surowicy zwierząt. Ponadto obserwowano spadek wytwarzania interferonu- $\gamma$ , wzrost poziomu immunoglobuliny M (IgM) i immunoglobuliny E (IgE) oraz supresję komórek NK (ang. *natural killer cells*) (De Jong i wsp., 2013). Wykazano również, że AgNPs podawane myszom drogą pokarmową w dawce 1 mg/kg m.c., zwiększały stężenie TGF- $\beta$  w surowicy, który to czynnik bierze udział w

kontroli procesu proliferacji i różnicowania komórek oraz wykazuje działanie przeciwwzpalne. Przedłużona ekspozycja prowadziła również do podwyższenia stężenia IL-1, interleukiny 4 (IL-4), IL-6, IL-10, interleukiny 12 (IL-12) i TGF- $\beta$  oraz poziomu IgE w surowicy badanych zwierząt, przy czym nie towarzyszyły temu żadne zmiany histopatologiczne w wątrobie (Park i wsp., 2010a). Z danych literaturowych wynika także, że pojedyncza dożylna iniekcja AgNPs (20 nm) może spowodować podwyższenie poziomu mRNA dla interleukiny 8 (IL-8), MIP-2, TNF- $\alpha$  i receptora IL-1 (Gaiser i wsp., 2013).

Wiadomo, że AgNPs indukują nadprodukcję ROS i zaburzenia funkcji mitochondriów prowadzące w konsekwencji do powstania stresu oksydacyjnego (Lee i wsp., 2014b; Ziemska i wsp., 2014), ale mogą również aktywować makroautofagię, czyli proces pozyskiwania energii na drodze degradacji utlenionych białek czy uszkodzonych pod wpływem stresu oksydacyjnego organelli, pozwalający zahamować wewnątrzkomórkową produkcję ROS. Jednak przedłużająca się makroautofagia może prowadzić do śmierci komórkowej, m.in. na drodze apoptozy. Opisany łańcuch zależności został zaobserwowany głównie w badaniach toksyczności AgNPs w modelach *in vitro* (Chen i wsp., 2007; Lee i wsp., 2014b).

Jak dotąd w literaturze jest niewiele informacji na temat wpływu nanocząstek na proces autofagii, pochodzących głównie z badań *in vitro*. Stwierdzono, m.in. że inkubacja ludzkich fibroblastów z nanocząstkami złota aktywuje ten proces. Obserwowano występowanie autofagosomów, istotny statystycznie wzrost poziomu białka MAP LC3-II oraz niewielki wzrost poziomu bekliny 1 w porównaniu do kontroli. Według niektórych badaczy poziom bekliny 1 jest tylko przejściowo podwyższony (Li i wsp., 2010). Również inkubacja mysich embrionalnych fibroblastów ze stabilizowanym cytrynianem AgNPs (20 nm) spowodowała powstanie licznych autofagosomów, istotny wzrost poziomu MAP LC3-II i niewielkie zmiany w poziomie bekliny 1 (Lee i wsp., 2014b). Ponadto, aktywację autofagii z następującą po niej aktywacją apoptozy, zaobserwowano w wątrobie szczurów, którym podano jednorazowo dootrzewnowo AgNPs (10-30 nm, dawka 500 mg/kg m.c.). Stwierdzono istotny statystycznie wzrost poziomu białka MAP LC3-II, który utrzymywał się do 4 dnia po ekspozycji i następnie wracał do normy (Lee i wsp., 2013b). Z kolei nasze badania nie wykazały zmian w poziomie bekliny 1 i MAP LC3-II w wątrobie zwierząt ekspozowanych na AgNPs lub jony srebra (Ryc. 25). Prawdopodobnie, pomimo 14-dniowej ekspozycji, zastosowana dawka związków srebra była zbyt mała, aby aktywować proces w tym narządzie. W przypadku homogenatów mózgowych stwierdziliśmy, że ekspozycja na AgNPs powoduje niewielki, ale istotny statystycznie wzrost poziomu bekliny 1 (ok. 20%) i MAP LC3-II (ok. 27%) w porównaniu do

grupy kontrolnej oraz tworzenie ciał mielinopodobnych w hipokampie (Ryc. 24 i 9). Podobnego efektu nie obserwowaliśmy u zwierząt eksponowanych na jony srebra.

O ile tworzenie się ciał mielinopodobnych może odpowiadać strukturom charakterystycznym dla wczesnych etapów autofagii (patrz Ryc. 28), o tyle w badaniach TEM nie zanotowaliśmy obecności struktur późnych. Obserwowany przez nas i przez innych badaczy brak autofagolizosomów i równoczesne nagromadzenie się autofagosomów są najprawdopodobniej spowodowane upośledzeniem zdolności lizosomów do przeprowadzania procesu degradacji, przy czym sugeruje się, że ma to związek z alkalizacją ich cytoplazmy oraz utratą stabilności błony lizosomalnej na skutek obecności AgNPs. Powoduje to upośledzenie procesu przyłączania autofagosomu do lizosomu, co w konsekwencji może skierować komórkę na drogę śmierci komórkowej (Lee i wsp., 2014b; Xu i wsp., 2015c; Mao i wsp., 2016).

Pomimo obserwowanych zmian w poziomie białka antyapoptotycznego Bcl-2 i białka proapoptotycznego Bax w homogenatach mózgowych (jak również wątrobowych) zwierząt eksponowanych na AgNPs/Ag<sup>+</sup> (Ryc. 26 i 27), nie stwierdzono występowania zmian ultrastrukturalnych typowych dla tego procesu podczas analizy TEM skrawków mózgu. Może to wynikać z zastosowania małej dawki badanych form srebra w porównaniu do doniesień literaturowych o indukowanej przez AgNPs apoptozie.

Indukcję apoptozy pod wpływem AgNPs stwierdzono zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*. Potwierdzono ją podczas inkubacji ludzkich hepatocytów (Piao i wsp., 2011), komórek ziarnistych mózdzku (Yin i wsp., 2013) czy ludzkich fibroblastów (Hsin i wsp., 2008) z AgNPs. Wykazano także, że 14-dniowa ekspozycja szczurów na te nanocząstki drogą pokarmową wywołuje apoptozę w hipokampie (Bagheri-Abassi i wsp., 2015), a jednorazowe dootrzewnowe podanie ich szczurom (10 – 20 nm) w dawce 500 mg/kg m.c. może indukować ten proces w wątrobie (Lee i wsp., 2013b).

Zmiany w poziomie białek markerowych apoptozy i autofagii mogą świadczyć o uruchomieniu mechanizmów mających zapobiec uszkodzeniu, a następnie śmierci komórkowej. Sugeruje się, że zjawisko autofagii może mieć kluczowe znaczenie w odpowiedzi komórkowej skierowanej przeciwko toksycznemu działaniu AgNPs (Lee i wsp., 2014b).

Uzyskane przez nas wyniki pokazują, że ekspozycja na niską dawkę AgNPs wywołuje umiarkowany stres oksydacyjny w mózgu, któremu towarzyszą zmiany ultrastrukturalne w neuronach i zakończeniach synaptycznych, co może prowadzić do nasilonych procesów neurodegeneracyjnych. Obserwowaliśmy także aktywację autofagii, ale zastosowana dawka nie wywołała indukcji stanu zapalnego czy śmierci komórkowej, choć inni badacze



obserwowali te procesy. Pomimo że o mechanizmach neurotoksyczności AgNPs wiadomo coraz więcej, to wciąż stan naszej wiedzy jest niepełny, co może w przyszłości prowadzić do przykrych odkryć. Od kilkunastu lat bada się, jak AgNPs wpływają na różne układy biologiczne, co cały czas prowadzi do nowych odkryć. Ostatnio stwierdzono m.in. że AgNPs powodują wzrost aktywności neuronalnej syntazy tlenku azotu w mózgu szczurów, co może oznaczać, że ekspozycja na AgNPs podwyższa również produkcję tlenku azotu (Sharma i wsp., 2013).

## 6. Podsumowanie wyników

- W zastosowanym modelu narażenia na niskie dawki AgNPs wykazano, że są one wchłaniane z przewodu pokarmowego do układu krwionośnego w stopniu podobnym do jonów srebra i są obecne w parenchymie mózgowej, w otoczkach mielinowych oraz w lizosomach neuronów i komórek endotelialnych.
- Pod wpływem ekspozycji na obie formy srebra dochodzi do spadku względnego poziomu białek presynaptycznych (synapsyny I i synaptofizyny) i postsynaptycznego (PSD-95, przy czym tylko dla AgNPs jest to zmiana istotna statystycznie) oraz zmian ultrastrukturalnych w obrębie synaps, przy czym niektóre ze zmian (luźne skupiska pęcherzyków synaptycznych w neuropilu, ciała mielinopodobne) są charakterystyczne dla formy „nano” a strukturą szczególnie wrażliwą jest hipokamp.
- AgNPs, w przeciwieństwie do jonów srebra, jedynie w mózgu indukują powstawanie wolnych rodników tlenowych, prowadzące do wzmożonej peroksydacji lipidów błon.
- Pomimo braku różnic w poziomie całkowitego glutationu w homogenatach mózgu zwierząt eksponowanych na AgNPs/Ag<sup>+</sup>, obserwuje się spadek stosunku formy zredukowanej do utlenionej, co może świadczyć o spadku funkcji antyoksydacyjnej układu glutationowego.
- Spośród wybranych enzymów antyoksydacyjnych, jedynie aktywność GPx i GR wzrasta w mózgu pod wpływem AgNPs, co może wiązać się ze zwiększonym zużyciem GSH. Pod wpływem jonów srebra dochodzi do wzrostu aktywności GPx i GR w mózgu oraz wzrostu aktywności SOD i CAT w wątrobie.
- Nie stwierdzono wpływu zastosowanej dawki AgNP/Ag<sup>+</sup> na indukcję cytokin prozapalnych (w oparciu o poziom ekspresji IL-1 $\beta$  i IL-6).
- Wykazano zmiany ultrastrukturalne w mitochondriach, spadek potencjału błon mitochondrialnych oraz wzrost poziomu ekspresji bekliny 1 i MAP LC3-II jedynie w mózgu zwierząt eksponowanych na AgNPs.
- Pomimo braku ultrastrukturalnych cech apoptozy stwierdzono zmiany profilu białkowych markerów pro- i antyapoptotycznych (Bax i Bcl-2) w narządach zwierząt eksponowanych na obie formy srebra. Profil tych zmian sugeruje jedynie proapoptotyczne działanie jonów srebra w mózgu.

## 7. Wnioski

1. Obecność nanogranul w parenchymie mózgowej zwierząt eksponowanych drogą pokarmową na niskie dawki AgNPs, wskazuje na zdolność AgNPs do przenikania przez barierę krew-mózg i gromadzenia się w strukturach komórkowych (głównie lizosomach).
2. Zmiany ultrastrukturalne w obrębie synaps wraz ze zmianami ekspresji białek synaptycznych wskazują na możliwość dysfunkcji zakończeń nerwowych i rozwój procesów neurodegeneracyjnych, głównie w rejonie hipokampa, już przy narażeniu na niskie dawki AgNPs.
3. Mózg jest narządem szczególnie wrażliwym na AgNPs, które już w niskich dawkach wywołują umiarkowany stres oksydacyjny oraz zaburzenia mitochondriów prowadzące do aktywacji procesu autofagii, nie indukując jednakże procesu zapalnego ani procesów prowadzących do śmierci komórkowej na drodze apoptozy.
4. Profil zmian badanych parametrów w mózgu i wątrobie zwierząt eksponowanych na obie formy srebra wskazuje, że srebro w postaci jonowej indukuje większy stres oksydacyjny (przede wszystkim w wątrobie), podczas gdy forma „nano” wykazuje wybiórczą toksyczność w stosunku do mózgu opartą o charakterystyczne dla niej mechanizmy prowadzące do indukcji autofagii.

## 8. Bibliografia

1. "<http://www.nanosilver.com.my/images/silversol/SilverSol-Coated-Glove.jpg>."
2. Ahamed, M., Karns M., Goodson M., Rowe J., Hussain S. M., Schlager J. J., Hong Y. (2008). "DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells." *Toxicol Appl Pharmacol* 233(3): 404-410.
3. Al Gurabi, M. A., Ali D., Alkahtani S., Alarifi S. (2015). "In vivo DNA damaging and apoptotic potential of silver nanoparticles in Swiss albino mice." *Onco Targets Ther* 8: 295-302.
4. Ali, D. (2014). "Oxidative stress-mediated apoptosis and genotoxicity induced by silver nanoparticles in freshwater snail *Lymnea luteola* L." *Biol Trace Elem Res* 162(1-3): 333-341.
5. Allahverdiyev, A. M., Abamor E. S., Bagirova M., Rafailovich M. (2011). "Antimicrobial effects of TiO<sub>2</sub> and Ag<sub>2</sub>O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites." *Future Microbiol* 6(8): 933-940.
6. Almofti, M. R., Ichikawa T., Yamashita K., Terada H., Shinohara Y. (2003). "Silver ion induces a cyclosporine a-insensitive permeability transition in rat liver mitochondria and release of apoptogenic cytochrome C." *J Biochem* 134(1): 43-49.
7. Ansar, S., Abudawood M., Hamed S. S., Aleem M. M. (2016). "Sodium Selenite Protects Against Silver Nanoparticle-Induced Testicular Toxicity and Inflammation." *Biol Trace Elem Res*.
8. Arora, S., Jain J., Rajwade J. M., Paknikar K. M. (2008). "Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies." *Toxicol Lett* 179(2): 93-100.
9. Artiaga, G., Ramos K., Ramos L., Camara C., Gomez-Gomez M. (2015). "Migration and characterisation of nanosilver from food containers by AF(4)-ICP-MS." *Food Chem* 166: 76-85.
10. Asakawa, T., and Matsushita, S. (1980). "Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxidas." *Neurol Toxicol* 14: 137-148.
11. AshaRani, P. V., Low Kah Mun G., Hande M. P., Valiyaveetil S. (2009). "Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells." *ACS Nano* 3(2): 279-290.
12. ATSDR (1990). "(Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological Profile for Silver. Toxicological Profile for Silver." Prepared by Clement International Corporation, under Contract 205-88-0608. U.S. Public Health Service ATSDR/TP-90-24.
13. Austin, L. A., Mackey M. A., Dreaden E. C., El-Sayed M. A. (2014). "The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in biodiagnostics, therapy, and drug delivery." *Arch Toxicol* 88(7): 1391-1417.
14. Bagheri-Abassi, F., Alavi H., Mohammadipour A., Motejaded F., Ebrahimzadeh-Bideskan A. (2015). "The effect of silver nanoparticles on apoptosis and dark neuron production in rat hippocampus." *Iran J Basic Med Sci* 18(7): 644-648.
15. Ballabh, P., Braun A., Nedergaard M. (2004). "The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications." *Neurobiol Dis* 16(1): 1-13.
16. Baram-Pinto, D., Shukla S., Perkas N., Gedanken A., Sarid R. (2009). "Inhibition of herpes simplex virus type 1 infection by silver nanoparticles capped with mercaptoethane sulfonate." *Bioconjug Chem* 20(8): 1497-1502.
17. Bastos, V., Ferreira de Oliveira J. M., Brown D., Jonhston H., Malheiro E., Daniel-da-Silva A. L., Duarte I. F., Santos C., Oliveira H. (2016). "The influence of Citrate or PEG coating on silver nanoparticle toxicity to a human keratinocyte cell line." *Toxicol Lett* 249: 29-41.
18. Begum, A. N., Aguilar J. S., Elias L., Hong Y. (2016). "Silver nanoparticles exhibit coating and dose-dependent neurotoxicity in glutamatergic neurons derived from human embryonic stem cells." *Neurotoxicology* 57: 45-53.
19. Benn, T., Cavanagh B., Hristovski K., Posner J. D., Westerhoff P. (2010). "The release of nanosilver from consumer products used in the home." *J Environ Qual* 39(6): 1875-1882.
20. Benn, T. M., Westerhoff P. (2008). "Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics." *Environ Sci Technol* 42(11): 4133-4139.
21. Betteridge, D. J. (2000). "What is oxidative stress?" *Metabolism* 49(2 Suppl 1): 3-8.

22. Bosetti, M., Masse A., Tobin E., Cannas M. (2002). "Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity." *Biomaterials* 23(3): 887-892.
23. Boveris, A. (1998). "Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues." *Medicina (B Aires)* 58(4): 350-356.
24. Braydich-Stolle, L. K., Breitner E. K., Comfort K. K., Schlager J. J., Hussain S. M. (2014). "Dynamic characteristics of silver nanoparticles in physiological fluids: toxicological implications." *Langmuir* 30(50): 15309-15316.
25. Brigelius-Flohe, R. (1999). "Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases." *Free Radic Biol Med* 27(9-10): 951-965.
26. Busse, M., Stevens D., Kraegeloh A., Cavelius C., Vukelic M., Arzt E., Strauss D. J. (2013). "Estimating the modulatory effects of nanoparticles on neuronal circuits using computational upscaling." *Int J Nanomedicine* 8: 3559-3572.
27. Carlson, C., Hussain S. M., Schrand A. M., Braydich-Stolle L. K., Hess K. L., Jones R. L., Schlager J. J. (2008). "Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species." *J Phys Chem B* 112(43): 13608-13619.
28. Chae, Y. J., Pham C. H., Lee J., Bae E., Yi J., Gu M. B. (2009). "Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*)." *Aquat Toxicol* 94(4): 320-327.
29. Chaloupka, K., Malam Y., Seifalian A. M. (2010). "Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications." *Trends Biotechnol* 28(11): 580-588.
30. Charehsaz, M., Hougaard K. S., Sipahi H., Ekici A. I., Kaspar C., Culha M., Bucurgat U. U., Aydin A. (2016). "Effects of developmental exposure to silver in ionic and nanoparticle form: A study in rats." *Daru* 24(1): 24.
31. Chellaram, C., Murugaboopathi, G., John, A. A., Sivakumar, R., Ganesan, S., Krithika, S., and Priya, G. (2014). "Significance of Nanotechnology in Food Industry." *APCBEE Procedia* 8: 109-113.
32. Chen, D., Xi T., Bai J. (2007). "Biological effects induced by nanosilver particles: in vivo study." *Biomed Mater* 2(3): S126-128.
33. Chen, X., Schluesener H. J. (2008). "Nanosilver: a nanoparticle in medical application." *Toxicol Lett* 176(1): 1-12.
34. Christensen, F. M., Johnston H. J., Stone V., Aitken R. J., Hankin S., Peters S., Aschberger K. (2010). "Nano-silver - feasibility and challenges for human health risk assessment based on open literature." *Nanotoxicology* 4(3): 284-295.
35. Cincotto, F. H., Canevari T. C., Campos A. M., Landers R., Machado S. A. (2014). "Simultaneous determination of epinephrine and dopamine by electrochemical reduction on the hybrid material SiO<sub>2</sub>/graphene oxide decorated with Ag nanoparticles." *Analyst* 139(18): 4634-4640.
36. Clement, J. L., Jarrett P. S. (1994). "Antibacterial silver." *Met Based Drugs* 1(5-6): 467-482.
37. Cnubben, N. H., Rietjens I. M., Wortelboer H., van Zanden J., van Bladeren P. J. (2001). "The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense." *Environ Toxicol Pharmacol* 10(4): 141-152.
38. Coccini, T., Manzo L., Bellotti V., De Simone U. (2014). "Assessment of cellular responses after short- and long-term exposure to silver nanoparticles in human neuroblastoma (SH-SY5Y) and astrocytoma (D384) cells." *ScientificWorldJournal* 2014: 259765.
39. Costa, C. S., Ronconi J. V., Daufenbach J. F., Goncalves C. L., Rezin G. T., Streck E. L., Paula M. M. (2010). "In vitro effects of silver nanoparticles on the mitochondrial respiratory chain." *Mol Cell Biochem* 342(1-2): 51-56.
40. Cronholm, P., Karlsson H. L., Hedberg J., Lowe T. A., Winnberg L., Elihn K., Wallinder I. O., Moller L. (2013). "Intracellular uptake and toxicity of Ag and CuO nanoparticles: a comparison between nanoparticles and their corresponding metal ions." *Small* 9(7): 970-982.
41. Czajka, A. (2006). "Wolne rodniki tlenowe a mechanizmy obronne organizmu." *Nowiny Lekarskie* 75(6): 582-586.
42. Dabrowska-Bouta, B., Zieba M., Orzelska-Gorka J., Skalska J., Sulkowski G., Frontczak-Baniewicz M., Talarek S., Listos J., Struzynska L. (2016). "Influence of a low dose of silver nanoparticles on cerebral myelin and behavior of adult rats." *Toxicology* 363-364: 29-36.

43. Davenport, L. L., Hsieh H., Eppert B. L., Carreira V. S., Krishan M., Ingle T., Howard P. C., Williams M. T., Vorhees C. V., Genter M. B. (2015). "Systemic and behavioral effects of intranasal administration of silver nanoparticles." *Neurotoxicol Teratol* 51: 68-76.
44. De Camilli, P., Greengard P. (1986). "Synapsin I: a synaptic vesicle-associated neuronal phosphoprotein." *Biochem Pharmacol* 35(24): 4349-4357.
45. De Jong, W. H., Van Der Ven L. T., Sleijffers A., Park M. V., Jansen E. H., Van Loveren H., Vandebriel R. J. (2013). "Systemic and immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study in rats." *Biomaterials* 34(33): 8333-8343.
46. De Matteis, V., Malvindi M. A., Galeone A., Brunetti V., De Luca E., Kote S., Kshirsagar P., Sabella S., Bardi G., Pompa P. P. (2015). "Negligible particle-specific toxicity mechanism of silver nanoparticles: the role of Ag<sup>+</sup> ion release in the cytosol." *Nanomedicine* 11(3): 731-739.
47. Didier, N., Romero I. A., Creminon C., Wijkhuisen A., Grassi J., Mabondzo A. (2003). "Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability." *J Neurochem* 86(1): 246-254.
48. dos Santos, C. A., Seckler M. M., Ingle A. P., Gupta I., Galdiero S., Galdiero M., Gade A., Rai M. (2014). "Silver nanoparticles: therapeutical uses, toxicity, and safety issues." *J Pharm Sci* 103(7): 1931-1944.
49. Drake, P. L., Hazelwood K. J. (2005). "Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review." *Ann Occup Hyg* 49(7): 575-585.
50. Dreaden, E. C., El-Sayed M. A. (2012). "Detecting and destroying cancer cells in more than one way with noble metals and different confinement properties on the nanoscale." *Acc Chem Res* 45(11): 1854-1865.
51. Duran, N., Silveira C. P., Duran M., Martinez D. S. (2015). "Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review." *J Nanobiotechnology* 13: 55.
52. Dziendzikowska, K., Gromadzka-Ostrowska J., Lankoff A., Oczkowski M., Krawczynska A., Chwastowska J., Sadowska-Bratek M., Chajduk E., Wojewodzka M., Dusinska M., Kruszewski M. (2012). "Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats." *J Appl Toxicol* 32(11): 920-928.
53. Ebabe Elle, R., Gaillet S., Vide J., Romain C., Lauret C., Rugani N., Cristol J. P., Rouanet J. M. (2013). "Dietary exposure to silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats: effects on oxidative stress and inflammation." *Food Chem Toxicol* 60: 297-301.
54. Eby, D. M., Luckarift H. R., Johnson G. R. (2009). "Hybrid antimicrobial enzyme and silver nanoparticle coatings for medical instruments." *ACS Appl Mater Interfaces* 1(7): 1553-1560.
55. Eckelman, M. J., Graedel T. E. (2007). "Silver emissions and their environmental impacts: a multilevel assessment." *Environ Sci Technol* 41(17): 6283-6289.
56. El Mahdy, M. M., Eldin T. A., Aly H. S., Mohammed F. F., Shaalan M. I. (2015). "Evaluation of hepatotoxic and genotoxic potential of silver nanoparticles in albino rats." *Exp Toxicol Pathol* 67(1): 21-29.
57. Fabrega, J., Luoma S. N., Tyler C. R., Galloway T. S., Lead J. R. (2011). "Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment." *Environ Int* 37(2): 517-531.
58. Feng, H., Pyykko I., Zou J. (2014). "Hyaluronan up-regulation is linked to renal dysfunction and hearing loss induced by silver nanoparticles." *Eur Arch Otorhinolaryngol*.
59. Feng, Q. L., Wu J., Chen G. Q., Cui F. Z., Kim T. N., Kim J. O. (2000). "A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*." *J Biomed Mater Res* 52(4): 662-668.
60. Foldbjerg, R., Dang D. A., Autrup H. (2011). "Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549." *Arch Toxicol* 85(7): 743-750.
61. Foldbjerg, R., Olesen P., Hougaard M., Dang D. A., Hoffmann H. J., Autrup H. (2009). "PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes." *Toxicol Lett* 190(2): 156-162.
62. Franco, R., Sanchez-Olea R., Reyes-Reyes E. M., Panayiotidis M. I. (2009). "Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois." *Mutat Res* 674(1-2): 3-22.

63. Friedman, J. (2011). Why is the nervous system vulnerable to oxidative stress? In: Gadoth, N., Gobel, H.H., (Eds.), Oxidative stress and free radical damage in neurology, oxidative stress in applied basic research and clinical practice.
64. Gagne, F., Auclair J., Turcotte P., Gagnon C. (2013). "Sublethal effects of silver nanoparticles and dissolved silver in freshwater mussels." *J Toxicol Environ Health A* 76(8): 479-490.
65. Gaiser, B. K., Hirn S., Kermanizadeh A., Kanase N., Fytianos K., Wenk A., Haberl N., Brunelli A., Kreyling W. G., Stone V. (2013). "Effects of silver nanoparticles on the liver and hepatocytes in vitro." *Toxicol Sci* 131(2): 537-547.
66. Gajbhiye, M., Kesharwani J., Ingle A., Gade A., Rai M. (2009). "Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole." *Nanomedicine* 5(4): 382-386.
67. Gaki, G. S., Papavassiliou A. G. (2014). "Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease." *Neuromolecular Med* 16(2): 217-230.
68. Galdiero, S., Falanga A., Vitiello M., Cantisani M., Marra V., Galdiero M. (2011). "Silver nanoparticles as potential antiviral agents." *Molecules* 16(10): 8894-8918.
69. Garcia-Contreras, R., Argueta-Figueroa L., Mejia-Rubalcava C., Jimenez-Martinez R., Cuevas-Guajardo S., Sanchez-Reyna P. A., Mendieta-Zeron H. (2011). "Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice." *Int Dent J* 61(6): 297-301.
70. Garcia-Reyero, N., Kennedy A. J., Escalon B. L., Habib T., Laird J. G., Rawat A., Wiseman S., Hecker M., Denslow N., Steevens J. A., Perkins E. J. (2014). "Differential effects and potential adverse outcomes of ionic silver and silver nanoparticles in vivo and in vitro." *Environ Sci Technol* 48(8): 4546-4555.
71. Garza-Ocanas, L., Ferrer D. A., Burt J., Diaz-Torres L. A., Ramirez Cabrera M., Rodriguez V. T., Lujan Rangel R., Romanovicz D., Jose-Yacamán M. (2010). "Biodistribution and long-term fate of silver nanoparticles functionalized with bovine serum albumin in rats." *Metallomics* 2(3): 204-210.
72. Ge, L., Li Q., Wang M., Ouyang J., Li X., Xing M. M. (2014). "Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity." *Int J Nanomedicine* 9: 2399-2407.
73. Genter, M. B., Newman N. C., Shertzer H. G., Ali S. F., Bolon B. (2012). "Distribution and systemic effects of intranasally administered 25 nm silver nanoparticles in adult mice." *Toxicol Pathol* 40(7): 1004-1013.
74. Glenn, J. C. (2006). "Nanotechnology: Future military environmental health considerations." *Technological Forecasting and Social Change* 73(2): 128-137.
75. Glick, D., Barth S., Macleod K. F. (2010). "Autophagy: cellular and molecular mechanisms." *J Pathol* 221(1): 3-12.
76. Gliga, A. R., Skoglund S., Wallinder I. O., Fadeel B., Karlsson H. L. (2014). "Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release." *Part Fibre Toxicol* 11: 11.
77. Gnanadhas, D. P., Ben Thomas M., Thomas R., Raichur A. M., Chakravorty D. (2013). "Interaction of silver nanoparticles with serum proteins affects their antimicrobial activity in vivo." *Antimicrob Agents Chemother* 57(10): 4945-4955.
78. Gonet, B. (1996). "Wolne rodniki i antyoksydanty w zdrowiu i chorobie." *Czynniki Ryzyka* 1(11): 5-14.
79. Gopinath, P., Gogoi S. K., Sanpui P., Paul A., Chattopadhyay A., Ghosh S. S. (2010). "Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis." *Colloids Surf B Biointerfaces* 77(2): 240-245.
80. Gordon, O., Vig Slenters T., Brunetto P. S., Villaruz A. E., Sturdevant D. E., Otto M., Landmann R., Fromm K. M. (2010). "Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction." *Antimicrob Agents Chemother* 54(10): 4208-4218.
81. Gozuacik, D., Kimchi A. (2004). "Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism." *Oncogene* 23(16): 2891-2906.
82. Greengard, P., Valtorta F., Czernik A. J., Benfenati F. (1993). "Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function." *Science* 259(5096): 780-785.
83. Gryberg, M. (2001). "Najjaśniejsze kropki." *Wiedza i Życie* 6: 38-40.

84. Haase, A., Arlinghaus H. F., Tentschert J., Jungnickel H., Graf P., Mantion A., Draude F., Galla S., Plendl J., Goetz M. E., Masic A., Meier W., Thunemann A. F., Taubert A., Luch A. (2011). "Application of laser postionization secondary neutral mass spectrometry/time-of-flight secondary ion mass spectrometry in nanotoxicology: visualization of nanosilver in human macrophages and cellular responses." *ACS Nano* 5(4): 3059-3068.
85. Haase, A., Rott S., Mantion A., Graf P., Plendl J., Thunemann A. F., Meier W. P., Taubert A., Luch A., Reiser G. (2012). "Effects of silver nanoparticles on primary mixed neural cell cultures: uptake, oxidative stress and acute calcium responses." *Toxicol Sci* 126(2): 457-468.
86. Hachicho, N., Hoffmann P., Ahlert K., Heipieper H. J. (2014). "Effect of silver nanoparticles and silver ions on growth and adaptive response mechanisms of *Pseudomonas putida* mt-2." *FEMS Microbiol Lett* 355(1): 71-77.
87. Hadrup, N., Loeschner K., Mortensen A., Sharma A. K., Qvortrup K., Larsen E. H., Lam H. R. (2012). "The similar neurotoxic effects of nanoparticulate and ionic silver in vivo and in vitro." *Neurotoxicology* 33(3): 416-423.
88. Haes, A. J. H. W. P. C. L. K. W. L. V. D. R. P. (2004). "A localized surface plasmon resonance biosensor: first steps toward an assay for Alzheimer's disease." *Analyst* 139(18): 4634-4640.
89. Halliwell, B., Gutteridge J. M. (1995). "The definition and measurement of antioxidants in biological systems." *Free Radic Biol Med* 18(1): 125-126.
90. Hanada, S., Fujioka K., Inoue Y., Kanaya F., Manome Y., Yamamoto K. (2014). "Cell-based in vitro blood-brain barrier model can rapidly evaluate nanoparticles' brain permeability in association with particle size and surface modification." *Int J Mol Sci* 15(2): 1812-1825.
91. Hancock, J. T., Desikan R., Neill S. J. (2001). "Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways." *Biochem Soc Trans* 29(Pt 2): 345-350.
92. Heydrnejad, M. S., Samani R. J., Aghaeivanda S. (2015). "Toxic Effects of Silver Nanoparticles on Liver and Some Hematological Parameters in Male and Female Mice (*Mus musculus*)." *Biol Trace Elem Res* 165(2): 153-158.
93. Hristozov, D., Gottardo S., Semenzin E., Oomen A., Bos P., Peijnenburg W., van Tongeren M., Nowack B., Hunt N., Brunelli A., Scott-Fordsmand J. J., Tran L., Marcomini A. (2016). "Frameworks and tools for risk assessment of manufactured nanomaterials." *Environ Int* 95: 36-53.
94. Hristozov, D. R., Gottardo S., Cinelli M., Isigonis P., Zabeo A., Critto A., Van Tongeren M., Tran L., Marcomini A. (2014). "Application of a quantitative weight of evidence approach for ranking and prioritising occupational exposure scenarios for titanium dioxide and carbon nanomaterials." *Nanotoxicology* 8(2): 117-131.
95. Hsin, Y. H., Chen C. F., Huang S., Shih T. S., Lai P. S., Chueh P. J. (2008). "The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells." *Toxicol Lett* 179(3): 130-139.
96. Huang, C. L., Hsiao I. L., Lin H. C., Wang C. F., Huang Y. J., Chuang C. Y. (2015). "Silver nanoparticles affect on gene expression of inflammatory and neurodegenerative responses in mouse brain neural cells." *Environ Res* 136: 253-263.
97. Hussain, S. M., Hess K. L., Gearhart J. M., Geiss K. T., Schlager J. J. (2005). "In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells." *Toxicol In Vitro* 19(7): 975-983.
98. Hussein, K. A. (2015). "Applications of nanotechnology in renewable energies—A comprehensive overview and understanding." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 42: 460-476.
99. Ijaz, M. (2013). "Role of nanotechnology in the field of textile finishes." *Research Journal of Social Science & Management* 3(3): 201-207.
100. Ivask, A., Kurvet I., Kasemets K., Blinova I., Aruoja V., Suppi S., Vija H., Kakinen A., Titma T., Heinlaan M., Visnapuu M., Koller D., Kisand V., Kahru A. (2014). "Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro." *PLoS One* 9(7): e102108.
101. Jain, P. K., Huang X., El-Sayed I. H., El-Sayed M. A. (2008). "Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine." *Acc Chem Res* 41(12): 1578-1586.



102. Jang, H., Min D. H. (2015). "Spherically-clustered porous Au-Ag alloy nanoparticle prepared by partial inhibition of galvanic replacement and its application for efficient multimodal therapy." *ACS Nano* 9(3): 2696-2703.
103. Jeeva, J. S., Sunitha J., Ananthalakshmi R., Rajkumari S., Ramesh M., Krishnan R. (2015). "Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases." *J Pharm Bioallied Sci* 7(Suppl 2): S331-333.
104. Jiang, T., Song J., Zhang W., Wang H., Li X., Xia R., Zhu L., Xu X. (2015a). "Au-Ag@Au Hollow Nanostructure with Enhanced Chemical Stability and Improved Photothermal Transduction Efficiency for Cancer Treatment." *ACS Appl Mater Interfaces* 7(39): 21985-21994.
105. Jiang, X., Miclaus T., Wang L., Foldbjerg R., Sutherland D. S., Autrup H., Chen C., Beer C. (2015b). "Fast intracellular dissolution and persistent cellular uptake of silver nanoparticles in CHO-K1 cells: implication for cytotoxicity." *Nanotoxicology* 9(2): 181-189.
106. Jimenez-Lamana, J., Laborda F., Bolea E., Abad-Alvaro I., Castillo J. R., Bianga J., He M., Bierla K., Mounicou S., Ouerdane L., Gaillet S., Rouanet J. M., Szpunar J. (2014). "An insight into silver nanoparticles bioavailability in rats." *Metallomics* 6(12): 2242-2249.
107. Joshi, N., Ngwenya B. T., Butler I. B., French C. E. (2015). "Use of bioreporters and deletion mutants reveals ionic silver and ROS to be equally important in silver nanotoxicity." *J Hazard Mater* 287: 51-58.
108. Juling, S., Bachler G., von Gotz N., Lichtenstein D., Bohmert L., Niedzwiecka A., Selve S., Braeuning A., Lampen A. (2016). "In vivo distribution of nanosilver in the rat: The role of ions and de novo-formed secondary particles." *Food Chem Toxicol* 97: 327-335.
109. Kalishwaralal, K., BarathManiKanth S., Pandian S. R., Deepak V., Gurunathan S. (2010). "Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*." *Colloids Surf B Biointerfaces* 79(2): 340-344.
110. Keith, D., El-Husseini A. (2008). "Excitation Control: Balancing PSD-95 Function at the Synapse." *Front Mol Neurosci* 1: 4.
111. Kelekar, A. (2005). "Autophagy." *Ann N Y Acad Sci* 1066: 259-271.
112. Kelsall, R. W., Hamley, R.W., Geoghegan, M. (2008). *Nanotechnologie*. Warszawa, PWN.
113. Kennedy, D. C., Orts-Gil G., Lai C. H., Muller L., Haase A., Luch A., Seeberger P. H. (2014). "Carbohydrate functionalization of silver nanoparticles modulates cytotoxicity and cellular uptake." *J Nanobiotechnology* 12: 59.
114. Kim, K. T., Truong L., Wehmas L., Tanguay R. L. (2013). "Silver nanoparticle toxicity in the embryonic zebrafish is governed by particle dispersion and ionic environment." *Nanotechnology* 24(11): 115101.
115. Kim, Y. S., Song M. Y., Park J. D., Song K. S., Ryu H. R., Chung Y. H., Chang H. K., Lee J. H., Oh K. H., Kelman B. J., Hwang I. K., Yu I. J. (2010). "Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles." *Part Fibre Toxicol* 7: 20.
116. Klasen, H. J. (2000). "Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses." *Burns* 26(2): 117-130.
117. Kozakowska, M., Dulak J., Jozkowicz A. (2015). "[Heme oxygenase-1 - more than the cytoprotection]." *Postepy Biochem* 61(2): 147-158.
118. Krawczynska, A., Dziendzikowska K., Gromadzka-Ostrowska J., Lankoff A., Herman A. P., Oczkowski M., Krolikowski T., Wilczak J., Wojewodzka M., Kruszewski M. (2015). "Silver and titanium dioxide nanoparticles alter oxidative/inflammatory response and renin-angiotensin system in brain." *Food Chem Toxicol* 85: 96-105.
119. Landgraf, L., Muller I., Ernst P., Schafer M., Rosman C., Schick I., Kohler O., Oehring H., Breus V. V., Basche T., Sonnichsen C., Tremel W., Hilger I. (2015). "Comparative evaluation of the impact on endothelial cells induced by different nanoparticle structures and functionalization." *Beilstein J Nanotechnol* 6: 300-312.
120. Lara, H. H., Ayala-Nunez N. V., Ixtepan-Turrent L., Rodriguez-Padilla C. (2010). "Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1." *J Nanobiotechnology* 8: 1.
121. Lee, B., Duong C. N., Cho J., Lee J., Kim K., Seo Y., Kim P., Choi K., Yoon J. (2012). "Toxicity of citrate-capped silver nanoparticles in common carp (*Cyprinus carpio*)." *J Biomed Biotechnol* 2012: 262670.

122. Lee, J., Mahendra S., Alvarez P. J. (2010). "Nanomaterials in the construction industry: a review of their applications and environmental health and safety considerations." *ACS Nano* 4(7): 3580-3590.
123. Lee, J. H., Kim Y. S., Song K. S., Ryu H. R., Sung J. H., Park J. D., Park H. M., Song N. W., Shin B. S., Marshak D., Ahn K., Lee J. E., Yu I. J. (2013a). "Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague-Dawley rats." *Part Fibre Toxicol* 10: 36.
124. Lee, T. Y., Liu M. S., Huang L. J., Lue S. I., Lin L. C., Kwan A. L., Yang R. C. (2013b). "Bioenergetic failure correlates with autophagy and apoptosis in rat liver following silver nanoparticle intraperitoneal administration." *Part Fibre Toxicol* 10: 40.
125. Lee, W., Kim K. J., Lee D. G. (2014a). "A novel mechanism for the antibacterial effect of silver nanoparticles on *Escherichia coli*." *Biometals* 27(6): 1191-1201.
126. Lee, Y., Kim P., Yoon J., Lee B., Choi K., Kil K. H., Park K. (2013c). "Serum kinetics, distribution and excretion of silver in rabbits following 28 days after a single intravenous injection of silver nanoparticles." *Nanotoxicology* 7(6): 1120-1130.
127. Lee, Y. H., Cheng F. Y., Chiu H. W., Tsai J. C., Fang C. Y., Chen C. W., Wang Y. J. (2014b). "Cytotoxicity, oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts." *Biomaterials* 35(16): 4706-4715.
128. Leite, P. E., Pereira M. R., Granjeiro J. M. (2015). "Hazard effects of nanoparticles in central nervous system: Searching for biocompatible nanomaterials for drug delivery." *Toxicol In Vitro* 29(7): 1653-1660.
129. Li, J. J., Hartono D., Ong C. N., Bay B. H., Yung L. Y. (2010). "Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles." *Biomaterials* 31(23): 5996-6003.
130. Li, L., Chin L. S., Shupliakov O., Brodin L., Sihra T. S., Hvalby O., Jensen V., Zheng D., McNamara J. O., Greengard P., et al. (1995). "Impairment of synaptic vesicle clustering and of synaptic transmission, and increased seizure propensity, in synapsin I-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20): 9235-9239.
131. Liao, S. Y., Read D. C., Pugh W. J., Furr J. R., Russell A. D. (1997). "Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions." *Lett Appl Microbiol* 25(4): 279-283.
132. Likus, W., Bajor G., Siemianowicz K. (2013). "Nanosilver - does it have only one face?" *Acta Biochim Pol* 60(4): 495-501.
133. Lingabathula, H., Yellu N. (2017). "Evaluation of oxidative stress induction in rats following exposure to silver nanorods." *Toxicol Mech Methods*: 1-7.
134. Liu, J., Zhao Y., Guo Q., Wang Z., Wang H., Yang Y., Huang Y. (2012a). "TAT-modified nanosilver for combating multidrug-resistant cancer." *Biomaterials* 33(26): 6155-6161.
135. Liu, W., Wu Y., Wang C., Li H. C., Wang T., Liao C. Y., Cui L., Zhou Q. F., Yan B., Jiang G. B. (2010). "Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size." *Nanotoxicology* 4(3): 319-330.
136. Liu, Y., Guan W., Ren G., Yang Z. (2012b). "The possible mechanism of silver nanoparticle impact on hippocampal synaptic plasticity and spatial cognition in rats." *Toxicol Lett* 209(3): 227-231.
137. Liu, Z., Ren G., Zhang T., Yang Z. (2009). "Action potential changes associated with the inhibitory effects on voltage-gated sodium current of hippocampal CA1 neurons by silver nanoparticles." *Toxicology* 264(3): 179-184.
138. Locatelli, E., Naddaka M., Uboldi C., Loudos G., Fragogeorgi E., Molinari V., Pucci A., Tsotakos T., Psimadas D., Ponti J., Franchini M. C. (2014). "Targeted delivery of silver nanoparticles and alisertib: in vitro and in vivo synergistic effect against glioblastoma." *Nanomedicine (Lond)* 9(6): 839-849.
139. Loeschner, K., Hadrup N., Qvortrup K., Larsen A., Gao X., Vogel U., Mortensen A., Lam H. R., Larsen E. H. (2011). "Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate." *Part Fibre Toxicol* 8: 18.
140. Lok, C. N., Ho C. M., Chen R., He Q. Y., Yu W. Y., Sun H., Tam P. K., Chiu J. F., Che C. M. (2007). "Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities." *J Biol Inorg Chem* 12(4): 527-534.
141. Loo, C. Y., Young P. M., Lee W. H., Cavaliere R., Whitchurch C. B., Rohanizadeh R. (2014). "Non-cytotoxic silver nanoparticle-polyvinyl alcohol hydrogels with anti-biofilm activity: designed as coatings for endotracheal tube materials." *Biofouling* 30(7): 773-788.

142. Lowry, O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* 193(1): 265-275.
143. Lu, L., Sun R. W., Chen R., Hui C. K., Ho C. M., Luk J. M., Lau G. K., Che C. M. (2008). "Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication." *Antivir Ther* 13(2): 253-262.
144. Luo, X., Xu S., Yang Y., Li L., Chen S., Xu A., Wu L. (2016). "Insights into the Ecotoxicity of Silver Nanoparticles Transferred from *Escherichia coli* to *Caenorhabditis elegans*." *Sci Rep* 6: 36465.
145. Luther, E. M., Schmidt M. M., Diendorf J., Epple M., Dringen R. (2012). "Upregulation of metallothioneins after exposure of cultured primary astrocytes to silver nanoparticles." *Neurochem Res* 37(8): 1639-1648.
146. Łukaszewicz-Hussain, A. (2003). "Rola glutationu i enzymów z nim związanych w procesach antyoksydacyjnych organizmu." *Medycyna Pracy* 54(5): 473-479.
147. Łuszczewski, A. M.-P., E.; Trefler, J.; Wawer, I.; Łacki, J.; Śliwińska-Stańczyk, P. (2007). "Reaktywne formy tlenu - znaczenie w fizjologii i stanach patologii organizmu." *Reumatologia* 45(5): 284-289.
148. Ma, W., Jing L., Valladares A., Mehta S. L., Wang Z., Li P. A., Bang J. J. (2015). "Silver nanoparticle exposure induced mitochondrial stress, caspase-3 activation and cell death: amelioration by sodium selenite." *Int J Biol Sci* 11(8): 860-867.
149. Mackevica, A., Olsson M. E., Hansen S. F. (2016). "The release of silver nanoparticles from commercial toothbrushes." *J Hazard Mater*.
150. Mao, B. H., Tsai J. C., Chen C. W., Yan S. J., Wang Y. J. (2016). "Mechanisms of silver nanoparticle-induced toxicity and important role of autophagy." *Nanotoxicology* 10(8): 1021-1040.
151. Masliah, E. (2001). "Recent advances in the understanding of the role of synaptic proteins in Alzheimer's Disease and other neurodegenerative disorders." *J Alzheimers Dis* 3(1): 121-129.
152. Massarsky, A., Abraham R., Nguyen K. C., Rippstein P., Tayabali A. F., Trudeau V. L., Moon T. W. (2014a). "Nanosilver cytotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes and hepatocytes." *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 159: 10-21.
153. Massarsky, A., Trudeau V. L., Moon T. W. (2014b). "Predicting the environmental impact of nanosilver." *Environ Toxicol Pharmacol* 38(3): 861-873.
154. Matsumura, Y., Yoshikata K., Kunisaki S., Tsuchido T. (2003). "Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate." *Appl Environ Microbiol* 69(7): 4278-4281.
155. McGillicuddy, E., Murray I., Kavanagh S., Morrison L., Fogarty A., Cormican M., Dockery P., Prendergast M., Rowan N., Morris D. (2016). "Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology." *Sci Total Environ* 575: 231-246.
156. Miclaus, T., Bochenkov V. E., Ogaki R., Howard K. A., Sutherland D. S. (2014). "Spatial mapping and quantification of soft and hard protein coronas at silver nanocubes." *Nano Lett* 14(4): 2086-2093.
157. Mizushima, N. (2007). "Autophagy: process and function." *Genes Dev* 21(22): 2861-2873.
158. Mody, V. V., Siwale R., Singh A., Mody H. R. (2010). "Introduction to metallic nanoparticles." *J Pharm Bioallied Sci* 2(4): 282-289.
159. Mohammed Fayaz, A., Ao Z., Girilal M., Chen L., Xiao X., Kalaichelvan P., Yao X. (2012). "Inactivation of microbial infectiousness by silver nanoparticles-coated condom: a new approach to inhibit HIV- and HSV-transmitted infection." *Int J Nanomedicine* 7: 5007-5018.
160. Monteiro-Riviere, N. A., Tran, L. (2014). Safety implications of nanomaterial exposure to skin. Boca Raton, CRC Press.
161. Monteiro, D. R., Takamiya A. S., Feresin L. P., Gorup L. F., de Camargo E. R., Delbem A. C., Henriques M., Barbosa D. B. (2015). "Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms to silver nanoparticles in intermediate and mature development phases." *J Prosthodont Res* 59(1): 42-48.
162. Morones, J. R., Elechiguerra J. L., Camacho A., Holt K., Kouri J. B., Ramirez J. T., Yacaman M. J. (2005). "The bactericidal effect of silver nanoparticles." *Nanotechnology* 16(10): 2346-2353.
163. Morris, D., Khurasany M., Nguyen T., Kim J., Guilford F., Mehta R., Gray D., Saviola B., Venketaraman V. (2013). "Glutathione and infection." *Biochim Biophys Acta* 1830(5): 3329-3349.

164. Mukherjee, S., Chowdhury D., Kotcherlakota R., Patra S., B V., Bhadra M. P., Sreedhar B., Patra C. R. (2014). "Potential theranostics application of bio-synthesized silver nanoparticles (4-in-1 system)." *Theranostics* 4(3): 316-335.
165. Navarro, E., Piccapietra F., Wagner B., Marconi F., Kaegi R., Odzak N., Sigg L., Behra R. (2008). "Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*." *Environ Sci Technol* 42(23): 8959-8964.
166. Negahdary, M., Chelongar R., Zadeh S. K., Ajdary M. (2015). "The antioxidant effects of silver, gold, and zinc oxide nanoparticles on male mice in in vivo condition." *Adv Biomed Res* 4: 69.
167. Nishanth, R. P., Jyotsna R. G., Schlager J. J., Hussain S. M., Reddanna P. (2011). "Inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages upon exposure to nanoparticles: role of ROS-NFkappaB signaling pathway." *Nanotoxicology* 5(4): 502-516.
168. Nixon, R. A. (2013). "The role of autophagy in neurodegenerative disease." *Nat Med* 19(8): 983-997.
169. Noh, M. S., Lee S., Kang H., Yang J. K., Lee H., Hwang D., Lee J. W., Jeong S., Jang Y., Jun B. H., Jeong D. H., Kim S. K., Lee Y. S., Cho M. H. (2015). "Target-specific near-IR induced drug release and photothermal therapy with accumulated Au/Ag hollow nanoshells on pulmonary cancer cell membranes." *Biomaterials* 45: 81-92.
170. Nordberg, G., Gerhardsson, L. (1988). *Silver*. New York, H.G. Seiler and H. Sigel, eds. Marcel Dekker.
171. Orłowski, P., Tomaszewska E., Gniadek M., Baska P., Nowakowska J., Sokolowska J., Nowak Z., Donten M., Celichowski G., Grobelny J., Krzyzowska M. (2014). "Tannic acid modified silver nanoparticles show antiviral activity in herpes simplex virus type 2 infection." *PLoS One* 9(8): e104113.
172. Palanisamy, N. K., Ferina N., Amirulhusni A. N., Mohd-Zain Z., Hussaini J., Ping L. J., Durairaj R. (2014). "Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa*." *J Nanobiotechnology* 12: 2.
173. Park, E. J., Bae E., Yi J., Kim Y., Choi K., Lee S. H., Yoon J., Lee B. C., Park K. (2010a). "Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles." *Environ Toxicol Pharmacol* 30(2): 162-168.
174. Park, E. J., Yi J., Kim Y., Choi K., Park K. (2010b). "Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism." *Toxicol In Vitro* 24(3): 872-878.
175. Park, K., Park E. J., Chun I. K., Choi K., Lee S. H., Yoon J., Lee B. C. (2011a). "Bioavailability and toxicokinetics of citrate-coated silver nanoparticles in rats." *Arch Pharm Res* 34(1): 153-158.
176. Park, M. V., Neigh A. M., Vermeulen J. P., de la Fonteyne L. J., Verharen H. W., Briede J. J., van Loveren H., de Jong W. H. (2011b). "The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles." *Biomaterials* 32(36): 9810-9817.
177. Parveen, S., Misra R., Sahoo S. K. (2012). "Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging." *Nanomedicine* 8(2): 147-166.
178. Patlolla, A. K., Hackett D., Tchounwou P. B. (2015). "Silver nanoparticle-induced oxidative stress-dependent toxicity in Sprague-Dawley rats." *Mol Cell Biochem* 399(1-2): 257-268.
179. Pereira, L., Dias N., Carvalho J., Fernandes S., Santos C., Lima N. (2014). "Synthesis, characterization and antifungal activity of chemically and fungal-produced silver nanoparticles against *Trichophyton rubrum*." *J Appl Microbiol* 117(6): 1601-1613.
180. Persidsky, Y., Ramirez S. H., Haorah J., Kanmogne G. D. (2006). "Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions." *J Neuroimmune Pharmacol* 1(3): 223-236.
181. Petryayeva, E., Krull U. J. (2011). "Localized surface plasmon resonance: nanostructures, bioassays and biosensing--a review." *Anal Chim Acta* 706(1): 8-24.
182. Piao, M. J., Kang K. A., Lee I. K., Kim H. S., Kim S., Choi J. Y., Choi J., Hyun J. W. (2011). "Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis." *Toxicol Lett* 201(1): 92-100.
183. Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., and Nowack, B. (2012). "Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world." *J. Nanopart. Res.* 14: 1109.

184. Pohanka, M. (2014). "Alzheimer s disease and oxidative stress: a review." *Curr Med Chem* 21(3): 356-364.
185. Powers, C. M., Badireddy A. R., Ryde I. T., Seidler F. J., Slotkin T. A. (2011). "Silver nanoparticles compromise neurodevelopment in PC12 cells: critical contributions of silver ion, particle size, coating, and composition." *Environ Health Perspect* 119(1): 37-44.
186. Pulit, J., Banach M., Szczyglowska R., Bryk M. (2013). "Nanosilver against fungi. Silver nanoparticles as an effective biocidal factor." *Acta Biochim Pol* 60(4): 795-798.
187. Qin, G., Tang S., Li S., Lu H., Wang Y., Zhao P., Li B., Zhang J., Peng L. (2017). "Toxicological evaluation of silver nanoparticles and silver nitrate in rats following 28 days of repeated oral exposure." *Environ Toxicol* 32(2): 609-618.
188. Quadros, M. E., Pierson R. t., Tulve N. S., Willis R., Rogers K., Thomas T. A., Marr L. C. (2013). "Release of silver from nanotechnology-based consumer products for children." *Environ Sci Technol* 47(15): 8894-8901.
189. Qureshi, A. T., Terrell L., Monroe W. T., Dasa V., Janes M. E., Gimble J. M., Hayes D. J. (2014). "Antimicrobial biocompatible bioscaffolds for orthopaedic implants." *J Tissue Eng Regen Med* 8(5): 386-395.
190. Rada, B., Leto T. L. (2008). "Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases." *Contrib Microbiol* 15: 164-187.
191. Rahman, M. F., Wang J., Patterson T. A., Saini U. T., Robinson B. L., Newport G. D., Murdock R. C., Schlager J. J., Hussain S. M., Ali S. F. (2009). "Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles." *Toxicol Lett* 187(1): 15-21.
192. RAIS (1992). "Formal Toxicity Summary for silver." Prepared by: Rosmarie A. Faust, Ph.D., Chemical Hazard Evaluation and Communication Group, Biomedical and Environmental Information Analysis Section, Health and Safety Research Division, Oak Ridge, Tennessee, for the U.S. Department of Energy under Contract No. DE-AC05-84OR21400.
193. Raj, S., Jose S., Sumod U. S., Sabitha M. (2012). "Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges." *J Pharm Bioallied Sci* 4(3): 186-193.
194. Rao, J. S., Kellom M., Kim H. W., Rapoport S. I., Reese E. A. (2012). "Neuroinflammation and synaptic loss." *Neurochem Res* 37(5): 903-910.
195. Reier, T., Oezaslan, M., and Strasser, P. (2012). "Electrocatalytic Oxygen Evolution Reaction (OER) on Ru, Ir, and Pt Catalysts: A Comparative Study of Nanoparticles and Bulk Materials." *ACS Catal.* 2: 1765-1772.
196. Rejeski, D. (2011). "Project on emerging Emerging Nanotechnologies. Woodrow Wilson International Center for Scholars, Washington, DC."
197. Ribeiro, F., Gallego-Urrea J. A., Jurkschat K., Crossley A., Hasselov M., Taylor C., Soares A. M., Loureiro S. (2014). "Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*." *Sci Total Environ* 466-467: 232-241.
198. Ribeiro, M. J., Maria V. L., Scott-Fordsmand J. J., Amorim M. J. (2015). "Oxidative Stress Mechanisms Caused by Ag Nanoparticles (NM300K) are Different from Those of AgNO<sub>3</sub>: Effects in the Soil Invertebrate *Enchytraeus Crypticus*." *Int J Environ Res Public Health* 12(8): 9589-9602.
199. Rinna, A., Magdolenova Z., Hudecova A., Kruszewski M., Refsnes M., Dusinska M. (2015). "Effect of silver nanoparticles on mitogen-activated protein kinases activation: role of reactive oxygen species and implication in DNA damage." *Mutagenesis* 30(1): 59-66.
200. Rodacka, A., Gerszon J., Puchala M. (2014). "[The biological significance of oxidative modifications of cysteine residues in proteins illustrated with the example of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase]." *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 68: 280-290.
201. Royall, J. A., Ischiropoulos H. (1993). "Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescin and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells." *Arch Biochem Biophys* 302(2): 348-355.
202. Ruskiewicz, J., Albrecht J. (2015). "Changes in the mitochondrial antioxidant systems in neurodegenerative diseases and acute brain disorders." *Neurochem Int* 88: 66-72.

203. Saggiu, S. K., Chotaliya H. P., Blumbergs P. C., Casson R. J. (2010). "Wallerian-like axonal degeneration in the optic nerve after excitotoxic retinal insult: an ultrastructural study." *BMC Neurosci* 11: 97.
204. Samuel, U., Guggenbichler J. P. (2004). "Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter." *Int J Antimicrob Agents* 23 Suppl 1: S75-78.
205. Sanpui, P., Chattopadhyay A., Ghosh S. S. (2011). "Induction of apoptosis in cancer cells at low silver nanoparticle concentrations using chitosan nanocarrier." *ACS Appl Mater Interfaces* 3(2): 218-228.
206. Sarhan, O. M., Hussein R. M. (2014). "Effects of intraperitoneally injected silver nanoparticles on histological structures and blood parameters in the albino rat." *Int J Nanomedicine* 9: 1505-1517.
207. Sayre, L. M., Perry G., Smith M. A. (2008). "Oxidative stress and neurotoxicity." *Chem Res Toxicol* 21(1): 172-188.
208. SCENIHR (2009). "(Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) : Risk assessment of products of nanotechnologies."
209. Schuettauf, F., Rejdak R., Walski M., Frontczak-Baniewicz M., Voelker M., Blatsios G., Shinoda K., Zagorski Z., Zrenner E., Grieb P. (2004). "Retinal neurodegeneration in the DBA/2J mouse-a model for ocular hypertension." *Acta Neuropathol* 107(4): 352-358.
210. Schwaninger, M., Sallmann S., Petersen N., Schneider A., Prinz S., Libermann T. A., Spranger M. (1999). "Bradykinin induces interleukin-6 expression in astrocytes through activation of nuclear factor-kappaB." *J Neurochem* 73(4): 1461-1466.
211. Segal, A. W. (2005). "How neutrophils kill microbes." *Annu Rev Immunol* 23: 197-223.
212. Serlin, Y., Shelef I., Knyazer B., Friedman A. (2015). "Anatomy and physiology of the blood-brain barrier." *Semin Cell Dev Biol* 38: 2-6.
213. Setyawati, M. I., Yuan X., Xie J., Leong D. T. (2014). "The influence of lysosomal stability of silver nanomaterials on their toxicity to human cells." *Biomaterials* 35(25): 6707-6715.
214. Sharma, A., Muresanu D. F., Patnaik R., Sharma H. S. (2013). "Size- and age-dependent neurotoxicity of engineered metal nanoparticles in rats." *Mol Neurobiol* 48(2): 386-396.
215. Sharma, H. S., Ali S. F., Hussain S. M., Schlager J. J., Sharma A. (2009). "Influence of engineered nanoparticles from metals on the blood-brain barrier permeability, cerebral blood flow, brain edema and neurotoxicity. An experimental study in the rat and mice using biochemical and morphological approaches." *J Nanosci Nanotechnol* 9(8): 5055-5072.
216. Sharma, H. S., Hussain S., Schlager J., Ali S. F., Sharma A. (2010). "Influence of nanoparticles on blood-brain barrier permeability and brain edema formation in rats." *Acta Neurochir Suppl* 106: 359-364.
217. Sharma, H. S., Sharma A. (2007). "Nanoparticles aggravate heat stress induced cognitive deficits, blood-brain barrier disruption, edema formation and brain pathology." *Prog Brain Res* 162: 245-273.
218. Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao P., Dash, D. (2007). "Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles." *Nanotechnology* 18(22): 103-225.
219. Silver, S. (2003). "Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds." *FEMS Microbiol Rev* 27(2-3): 341-353.
220. Singh, R. P., Ramarao P. (2012). "Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles." *Toxicol Lett* 213(2): 249-259.
221. Skalska, J., Frontczak-Baniewicz M., Struzynska L. (2015a). "Synaptic degeneration in rat brain after prolonged oral exposure to silver nanoparticles." *Neurotoxicology* 46: 145-154.
222. Skalska, J., Struzynska J. (2015b). "Toxic effects of silver nanoparticles in mammals - does a risk of neurotoxicity exist?" *Folia Neuropathol* 53(4): 281-300.
223. Sleiman, H. K., Romano R. M., Oliveira C. A., Romano M. A. (2013). "Effects of prepubertal exposure to silver nanoparticles on reproductive parameters in adult male Wistar rats." *J Toxicol Environ Health A* 76(17): 1023-1032.
224. Slezakova, K., Morais, S., Maria do Carmo Pereira (2013). Atmospheric nanoparticles and their impacts on public health, current topics in public health.

225. Sondi, I., Salopek-Sondi B. (2004). "Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria." *J Colloid Interface Sci* 275(1): 177-182.
226. Song, X. L., Li B., Xu K., Liu J., Ju W., Wang J., Liu X. D., Li J., Qi Y. F. (2012). "Cytotoxicity of water-soluble mPEG-SH-coated silver nanoparticles in HL-7702 cells." *Cell Biol Toxicol* 28(4): 225-237.
227. Stander, L., Theodore L. (2011). "Environmental implications of nanotechnology--an update." *Int J Environ Res Public Health* 8(2): 470-479.
228. Suliman, Y. A., Ali D., Alarifi S., Harrath A. H., Mansour L., Alwasel S. H. (2015). "Evaluation of cytotoxic, oxidative stress, proinflammatory and genotoxic effect of silver nanoparticles in human lung epithelial cells." *Environ Toxicol* 30(2): 149-160.
229. Sun, C., Yin N., Wen R., Liu W., Jia Y., Hu L., Zhou Q., Jiang G. (2016). "Silver nanoparticles induced neurotoxicity through oxidative stress in rat cerebral astrocytes is distinct from the effects of silver ions." *Neurotoxicology* 52: 210-221.
230. Sun, C. Y., Che Y. J., Lu S. J. (2015). "Preparation and application of collagen scaffold-encapsulated silver nanoparticles and bone morphogenetic protein 2 for enhancing the repair of infected bone." *Biotechnol Lett* 37(2): 467-473.
231. Sung, J. H., Ji J. H., Park J. D., Yoon J. U., Kim D. S., Jeon K. S., Song M. Y., Jeong J., Han B. S., Han J. H., Chung Y. H., Chang H. K., Lee J. H., Cho M. H., Kelman B. J., Yu I. J. (2009). "Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles." *Toxicol Sci* 108(2): 452-461.
232. Sung, J. H., Ji J. H., Song K. S., Lee J. H., Choi K. H., Lee S. H., Yu I. J. (2011). "Acute inhalation toxicity of silver nanoparticles." *Toxicol Ind Health* 27(2): 149-154.
233. Sung, J. H., Ji J. H., Yoon J. U., Kim D. S., Song M. Y., Jeong J., Han B. S., Han J. H., Chung Y. H., Kim J., Kim T. S., Chang H. K., Lee E. J., Lee J. H., Yu I. J. (2008). "Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles." *Inhal Toxicol* 20(6): 567-574.
234. Suri, S. S., Fenniri H., Singh B. (2007). "Nanotechnology-based drug delivery systems." *J Occup Med Toxicol* 2: 16.
235. Swidwinska-Gajewska, A. M., Czerczak S. (2014). "[Titanium dioxide nanoparticles: occupational exposure limits]." *Med Pr* 65(3): 407-418.
236. Ścibior D., C. H. (2006). "Katalaza-budowa, właściwości, funkcje." *Postępy Hig Med Dosw* 60: 170-180.
237. Taft, C. E., Turrigiano G. G. (2014). "PSD-95 promotes the stabilization of young synaptic contacts." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369(1633): 20130134.
238. Tak, Y. K., Pal S., Naoghare P. K., Rangasamy S., Song J. M. (2015). "Shape-Dependent Skin Penetration of Silver Nanoparticles: Does It Really Matter?" *Sci Rep* 5: 16908.
239. Tamboli, D. P., Lee D. S. (2013). "Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly synthesized silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria." *J Hazard Mater* 260: 878-884.
240. Tang, J., Xiong L., Zhou G., Wang S., Wang J., Liu L., Li J., Yuan F., Lu S., Wan Z., Chou L., Xi T. (2010). "Silver nanoparticles crossing through and distribution in the blood-brain barrier in vitro." *J Nanosci Nanotechnol* 10(10): 6313-6317.
241. Tang, J., Xiong, L., Wang, S., Wang, J., Liu, L., Li, J., Wan, Z., Xi, T., (2008). "Influence of silver nanoparticles on neurons and blood-brain barrier via subcutaneous injection in rats." *Appl Surf Sci* 255: 502-504.
242. Tang, S., Wang M., Germ K. E., Du H. M., Sun W. J., Gao W. M., Mayer G. D. (2015). "Health implications of engineered nanoparticles in infants and children." *World J Pediatr* 11(3): 197-206.
243. Ting, B. P., Zhang J., Gao Z., Ying J. Y. (2009). "A DNA biosensor based on the detection of doxorubicin-conjugated Ag nanoparticle labels using solid-state voltammetry." *Biosens Bioelectron* 25(2): 282-287.
244. Todde, V., Veenhuis M., van der Klei I. J. (2009). "Autophagy: principles and significance in health and disease." *Biochim Biophys Acta* 1792(1): 3-13.
245. Topuz, E., Sigg L., Talinli I. (2014). "A systematic evaluation of agglomeration of Ag and TiO<sub>2</sub> nanoparticles under freshwater relevant conditions." *Environ Pollut* 193: 37-44.
246. Trickler, W. J., Lantz-McPeak S. M., Robinson B. L., Paule M. G., Slikker W., Jr., Biris A. S., Schlager J. J., Hussain S. M., Kanungo J., Gonzalez C., Ali S. F. (2014). "Porcine brain microvessel endothelial cells

show pro-inflammatory response to the size and composition of metallic nanoparticles." *Drug Metab Rev* 46(2): 224-231.

247. Trickler, W. J., Lantz S. M., Murdock R. C., Schrand A. M., Robinson B. L., Newport G. D., Schlager J. J., Oldenburg S. J., Paule M. G., Slikker W., Jr., Hussain S. M., Ali S. F. (2010). "Silver nanoparticle induced blood-brain barrier inflammation and increased permeability in primary rat brain microvessel endothelial cells." *Toxicol Sci* 118(1): 160-170.

248. Valtorta, F., Tarelli F. T., Campanati L., Villa A., Greengard P. (1989). "Synaptophysin and synapsin I as tools for the study of the exo-endocytotic cycle." *Cell Biol Int Rep* 13(12): 1023-1038.

249. van der Zande, M., Vandebriel R. J., Van Doren E., Kramer E., Herrera Rivera Z., Serrano-Rojero C. S., Gremmer E. R., Mast J., Peters R. J., Hollman P. C., Hendriksen P. J., Marvin H. J., Peijnenburg A. A., Bouwmeester H. (2012). "Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure." *ACS Nano* 6(8): 7427-7442.

250. Vicencio, J. M., Ortiz C., Criollo A., Jones A. W., Kepp O., Galluzzi L., Joza N., Vitale I., Morselli E., Tailler M., Castedo M., Maiuri M. C., Molgo J., Szabadkai G., Lavandro S., Kroemer G. (2009). "The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1." *Cell Death Differ* 16(7): 1006-1017.

251. Volker, C., Boedicker C., Daubenthaler J., Oetken M., Oehlmann J. (2013). "Comparative toxicity assessment of nanosilver on three *Daphnia* species in acute, chronic and multi-generation experiments." *PLoS One* 8(10): e75026.

252. von Goetz, N., Fabricius L., Glaus R., Weitbrecht V., Gunther D., Hungerbuhler K. (2013). "Migration of silver from commercial plastic food containers and implications for consumer exposure assessment." *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 30(3): 612-620.

253. Vrcek, I. V., Zuntar I., Petlevski R., Pavicic I., Dutour Sikiric M., Curlin M., Goessler W. (2014). "Comparison of in vitro toxicity of silver ions and silver nanoparticles on human hepatoma cells." *Environ Toxicol*.

254. Weldon, B. A., E M. F., Oberdorster G., Workman T., Griffith W. C., Kneuer C., Yu I. J. (2016). "Occupational exposure limit for silver nanoparticles: considerations on the derivation of a general health-based value." *Nanotoxicology*: 1-13.

255. Wen, R., Yang X., Hu L., Sun C., Zhou Q., Jiang G. (2016). "Brain-targeted distribution and high retention of silver by chronic intranasal instillation of silver nanoparticles and ions in Sprague-Dawley rats." *J Appl Toxicol* 36(3): 445-453.

256. Wilbur, K. M., Bernheim F., Shapiro O. W. (1949). "The thiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids by various agents." *Arch Biochem* 24(2): 305-313.

257. Wu, J., Zheng Y., Song W., Luan J., Wen X., Wu Z., Chen X., Wang Q., Guo S. (2014). "In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing." *Carbohydr Polym* 102: 762-771.

258. Xiang, D., Zheng Y., Duan W., Li X., Yin J., Shigdar S., O'Connor M. L., Marappan M., Zhao X., Miao Y., Xiang B., Zheng C. (2013). "Inhibition of A/Human/Hubei/3/2005 (H3N2) influenza virus infection by silver nanoparticles in vitro and in vivo." *Int J Nanomedicine* 8: 4103-4113.

259. Xu, F., Pielt C., Farkas S., Qazzaz M., Syed N. I. (2013). "Silver nanoparticles (AgNPs) cause degeneration of cytoskeleton and disrupt synaptic machinery of cultured cortical neurons." *Mol Brain* 6: 29.

260. Xu, L., Dan M., Shao A., Cheng X., Zhang C., Yokel R. A., Takemura T., Hanagata N., Niwa M., Watanabe D. (2015a). "Silver nanoparticles induce tight junction disruption and astrocyte neurotoxicity in a rat blood-brain barrier primary triple coculture model." *Int J Nanomedicine* 10: 6105-6118.

261. Xu, L., Shao A., Zhao Y., Wang Z., Zhang C., Sun Y., Deng J., Chou L. L. (2015b). "Neurotoxicity of Silver Nanoparticles in Rat Brain After Intragastric Exposure." *J Nanosci Nanotechnol* 15(6): 4215-4223.

262. Xu, R., Ma J., Sun X., Chen Z., Jiang X., Guo Z., Huang L., Li Y., Wang M., Wang C., Liu J., Fan X., Gu J., Chen X., Zhang Y., Gu N. (2009). "Ag nanoparticles sensitize IR-induced killing of cancer cells." *Cell Res* 19(8): 1031-1034.



263. Xu, Y., Wang L., Bai R., Zhang T., Chen C. (2015c). "Silver nanoparticles impede phorbol myristate acetate-induced monocyte-macrophage differentiation and autophagy." *Nanoscale* 7(38): 16100-16109.
264. Xue, Y., Zhang S., Huang Y., Zhang T., Liu X., Hu Y., Zhang Z., Tang M. (2012). "Acute toxic effects and gender-related biokinetics of silver nanoparticles following an intravenous injection in mice." *J Appl Toxicol* 32(11): 890-899.
265. Yamagata, Y. (2003). "New aspects of neurotransmitter release and exocytosis: dynamic and differential regulation of synapsin I phosphorylation by acute neuronal excitation in vivo." *J Pharmacol Sci* 93(1): 22-29.
266. Yang, Z., Klionsky D. J. (2010a). "Eaten alive: a history of macroautophagy." *Nat Cell Biol* 12(9): 814-822.
267. Yang, Z., Liu Z. W., Allaker R. P., Reip P., Oxford J., Ahmad Z., Ren G. (2010b). "A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system." *J R Soc Interface* 7 Suppl 4: S411-422.
268. Ye, D., Raghnaill M. N., Bramini M., Mahon E., Aberg C., Salvati A., Dawson K. A. (2013). "Nanoparticle accumulation and transcytosis in brain endothelial cell layers." *Nanoscale* 5(22): 11153-11165.
269. Yin, N., Liu Q., Liu J., He B., Cui L., Li Z., Yun Z., Qu G., Liu S., Zhou Q., Jiang G. (2013). "Silver nanoparticle exposure attenuates the viability of rat cerebellum granule cells through apoptosis coupled to oxidative stress." *Small* 9(9-10): 1831-1841.
270. Yin, N., Yao X., Zhou Q., Faiola F., Jiang G. (2015a). "Vitamin E attenuates silver nanoparticle-induced effects on body weight and neurotoxicity in rats." *Biochem Biophys Res Commun* 458(2): 405-410.
271. Yin, N., Zhang Y., Yun Z., Liu Q., Qu G., Zhou Q., Hu L., Jiang G. (2015b). "Silver nanoparticle exposure induces rat motor dysfunction through decrease in expression of calcium channel protein in cerebellum." *Toxicol Lett* 237(2): 112-120.
272. Zhang, B., Zhai W., Liu R., Yu Z., Shen H., Hu X. (2015). "Evaluation on the Toxic Effects of NanoAg to Catalase." *J Nanosci Nanotechnol* 15(2): 1473-1479.
273. Zhang, Y., Ferguson S. A., Watanabe F., Jones Y., Xu Y., Biris A. S., Hussain S., Ali S. F. (2013). "Silver nanoparticles decrease body weight and locomotor activity in adult male rats." *Small* 9(9-10): 1715-1720.
274. Zieminska, E., Stafiej A., Struzynska L. (2014). "The role of the glutamatergic NMDA receptor in nanosilver-evoked neurotoxicity in primary cultures of cerebellar granule cells." *Toxicology* 315: 38-48.