

# Współczesne laboratorium nanotoksykologiczne

Marcin Magacz<sup>1</sup>, Karolina Kędziora<sup>1</sup>, Maciej Gawlik<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Oddział Analityki Medycznej, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

<sup>2</sup> Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

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

## Wstęp

W ostatnich kilkunastu latach obserwuje się rosnące zainteresowanie strukturami w skali nano. Coraz częściej w publikacjach pojawiają się dyscypliny i pojęcia zawierające przedrostek nano- i są to na przykład: nanotechnologia, nanochemia, nanomateriały, nanocząstki, nanonauka. W życiu codziennym, często nieświadomie, spotykamy się z różnego rodzaju nanomateriałami jak choćby nanocząstkami TiO<sub>2</sub> w kosmetykach, nanocząstkami srebra w ubraniach, pralkach, czy nanowłóknami węglowymi w rowerach [1]. Powszechne i masowe zastosowanie nanomateriałów stworzyło zapotrzebowanie na powstanie nowej dziedziny toksykologii – nanotoksykologii, która miałaby badać bezpieczeństwo stosowania nanomateriałów dla człowieka, jak i środowiska. Przedrostek nanopochodzi od łacińskiego *nanus*, co oznacza karła lub coś bardzo małego [2]. Zgodnie z układem SI przedrostek nano- dodawany do jednostek powoduje ich zmniejszenie do wartości 10<sup>-9</sup> wartości podstawowej [3]. Nanotechnologia (wg amerykańskiego federalnego programu National Nanotechnology Initiative), jest to „zrozumienie i kontrola materii o wymiarach około 1–100 nanometrów, przy których unikatowe właściwości stwarzają nowe możliwości” [4].

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie aktualnych narzędzi badawczych, służących ocenie zagrożeń toksykologicznych płynących z narażenia na nanocząstki i nanostruktury oraz określeniu mechanizmów działania różnicujących je jako czynniki toksyczne w stosunku do tych rozpatrywanych w ujęciu toksykologii klasycznej.

## Nanomateriały – charakterystyka, rodzaje, właściwości

Nanomateriały definiowane są jako struktury materii, których przynajmniej jeden wymiar

**A contemporary nanotoxicological laboratory** · Nanomaterials are structures with at least one dimension between 1–100 nm, which leads to their distinct physical, chemical and biological properties different from macro form of the same compound. The progress in production and exploitation of unique nanostructures enabled further advancement in such fields as electronics, chemistry, material engineering, biotechnology and medicine. The use of nanomaterials on a massive scale in everyday products resulted in need for new discipline – nanotoxicology – which would focus on human and environmental safety of those products. This review describes methods of research used in nanotoxicology dedicated to examining nanoparticles properties and their effect on function of living cells *in vivo* and *in vitro* conditions.

**Keywords:** nanotoxicology, nanomaterials.

© Farm Pol, 2018, 74(10): 569–575

mieści się w zakresie 1–100 nm [2,5]. Struktury te mogą mieć postać zaglomerowanych geometrycznych cząstek lub ich agregatów, włókien lub rurek o budowie prostej lub zakrzywionej oraz powłok o zróżnicowanym kształcie. Osobliwymi postaciami nanomateriałów są tzw. kropki kwantowe (wszystkie wymiary linowe w skali nano) [6] oraz nanokryształy (nanocząstka będąca monokryształem). Z farmaceutycznego punktu widzenia wśród nanocząstek możemy wyróżnić nanosfery – nanocząstka stanowi macierz, w której lek został równomiernie rozproszony oraz nanokapsułki – lek otoczony polimerową membraną [2].

W związku ze swoim rozmiarem, nanocząstki wykazują odmienne właściwości chemiczne, fizyczne, biologiczne i toksykologiczne od form makro tego samego związku [5]. Fakt ten sprawia, że badania nad nimi prowadzi się w wielu dziedzinach nauki, takich jak: elektronika, chemia, inżynieria materiałowa, biotechnologia czy wreszcie medycyna. Wysoki stosunek powierzchni względem objętości, jak i mały rozmiar sprawiają, że tworzą te

są chętnie stosowane jako nośniki leków umożliwiające przenikanie barier biologicznych i wnikanie do komórek [5]. Sprzężenie leku z nanocząstką dodatkowo może zwiększać jego trwałość czy umożliwiać zwiększoną kontrolę jego uwalniania [5]. Niektóre rodzaje nanocząstek metalicznych same w sobie wykazują działanie terapeutyczne. Wykazano, że nanocząstki srebra posiadają znakomite właściwości bakteriobójcze, silniejsze niż srebro w postaci makro. Dodatkowo, sprzężenie z antybiotykiem, na który dana bakteria wytworzyła lekooporność, pozwala na przełamanie tej oporności [7].

Systematyzując podział nanostruktur, można pogrupować je w zależności od posiadanej liczby wymiarów liniowych w skali nano.

**Nanostruktury o jednym wymiarze w skali nano** są to powłoki o grubości do 100 nm. Mają niewielkie zastosowanie w medycynie. Znajdują zastosowanie w elektronice – produkcja półprzewodników czy w chemii jako katalizatory [2].

**Nanostruktury o dwóch wymiarach w skali nano** są to cząstki o minimum dwóch wymiarach z zakresu 1–100 nm. Przykładem mogą być nanorurki węglowe. Znajdują zastosowanie głównie w elektronice, ze względu na dużą maksymalną gęstość przewodzonego prądu oraz w konstruowaniu materiałów o wysokiej wytrzymałości [2].

Największe zainteresowanie w naukach farmaceutycznych budzą nanocząstki o trzech wymiarach w skali nano, którym warto w tym miejscu poświęcić trochę więcej uwagi.

### **Nanocząstki o trzech wymiarach w skali nano**

**Nanocząstki o trzech wymiarach w skali nano** to obiekty materii, które posiadają rozciągłość w przedziale 1–100 nm we wszystkich trzech wymiarach liniowych. Wśród nich uwagę zwracają dendrymery sferyczne, kropki kwantowe i fulereny, ze względu na swe zastosowania w medycynie i farmacji.

**Dendrymery sferyczne** są szczególnie chętnie stosowane w przemyśle farmaceutycznym jako nośniki leków. Charakteryzują się obecnością wielu grup funkcyjnych, które rozgałęziają się, oddalając od rdzenia, ponadto posiadają dodatni ładunek na swojej powierzchni, co może przyczynić się do uszkodzenia błon komórkowych [2].

**Kropki kwantowe** są to nanocząstki półprzewodnikowe o strukturze krystalicznej [2]. Przykładowe składowe kropki kwantowych to ind, arsen, kadm, gal, selen, tellur czy cynk [6]. Posiadają szczególne właściwości optyczne i fluorescencyjne, dzięki czemu znalazły zastosowanie w obrazowaniu [6]. Istnieje możliwość sprzęgania kropek kwantowych z przeciwciałami, ligandami czy receptorami, a następnie wprowadzenia powstałego kompleksu

do materiału tkankowego zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* i badania obecności konkretnych komórek (np. nowotworowych) czy struktur z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej [6].

**Fulereny** są to węglowe nanocząstki zbudowane z 28 do ponad 100 atomów węgla układających się w pięciokąty lub sześciokąty połączone razem w strukturę przypominającą piłkę. Najszerzej stosowane są w elektronice, niemniej jednak próbuje się wykorzystać wewnątrz cząstki jako nośnika leków [2].

### **Synteza nanocząstek**

Ze względu na występowanie różnych typów nanocząstek (m.in. metalicznych, metalotlenkowych, organicznych), istnieje duże zróżnicowanie metod stosowanych w ich syntezie. Dokładne ich omówienie wykracza poza tematykę tej pracy, niemniej jednak poniżej zostaną przedstawione 3 przykładowe metody syntez szczególnie użyteczne w zastosowaniach farmaceutycznych.

**Metoda odparowania rozpuszczalnika z emulsji** należy do jednej z najczęściej stosowanych metod otrzymywania nanocząstek. W pierwszym etapie wytwarza się emulsję polimeru budującego cząstki w wodzie. Drugi etap polega na odparowywaniu rozpuszczalnika polimeru [8]. Wielkość otrzymanej nanocząstki można regulować poprzez dobór parametrów fizycznych procesu, takich jak: temperatura, lepkość, ciśnienie, szybkość mieszania oraz przez dobór rozpuszczalnika organicznego. Ostatni etap to ultrawierowanie i przepłukiwanie [8]. Metoda ta jest przydatna do otrzymywania nanocząstek będących nośnikiem leków lipofilowych [2].

**Metoda wysalania.** Początkowo lek oraz właściwy związek budujący nanocząstkę rozpuszczone są w wodzie. Następnie doprowadza się do powstania emulsji olej-woda z użyciem stabilizatora i środka wysalającego (może być to chlorek magnezu). Kolejnym krokiem jest dodawanie wody, co powoduje dyfuzję rozpuszczalnika do fazy wodnej i tworzenie nanocząstki. Metoda ta jest stosowana do wytwarzania nanocząstek zawierających substancje termowrażliwe, ze względu na to, że proces nie wymaga stosowania podwyższonych temperatur [2].

**Metoda dyfuzyjno-emulsyjna.** Polimer budujący nanocząstkę początkowo rozpuszczony jest w rozpuszczalniku, częściowo mieszalnym z wodą, a następnie nią nasycany. W obecności stabilizatora prowadzi się emulsyfikację mieszaniny. Proces ten prowadzi do dyfuzji rozpuszczalnika do fazy zewnętrznej, w efekcie prowadząc do formowania i wytrącania nanocząstek. Główną zaletą tej metody jest wysoka efektywność tworzenia nanokapsulek [2].

## Badanie toksyczności nanomateriałów

### Wpływ drogi podania

Powszechnie wiadomo, że toksyczność danej substancji zależy między innymi od drogi podania. W przypadku nanomateriałów wyróżnia się następujące drogi ekspozycji organizmu: *per os*, wstrzyknięcie, podanie przezskórne oraz inhalacja [4]. Istnienie tych czterech sposobów wniknięcia niesie za sobą konieczność opracowania odpowiednich modeli *in vitro*, najlepiej odpowiadających fizjologii poszczególnych dróg. Omawiane modele zazwyczaj składają się z wybranej linii zwykle nieśmiertelnych komórek, przy czym dobór jej ma największe znaczenie dla otrzymania poprawnych wyników. W tabeli 1 przedstawiono przykłady stosowanych linii komórkowych do oceny toksyczności nanomateriałów podawanych różnymi drogami.

### Badanie poboru nanomateriałów oraz wewnątrzkomórkowej lokalizacji

Zdolność wnikania nanomateriałów do komórki oraz ich końcowa lokalizacja w jej wnętrzu jest decydującym etapem w kontekście wykazywania późniejszych potencjalnych efektów toksycznych [12]. Parametr ten jest jednym z pierwszych parametrów ocenianych w badaniach nanotoksykologicznych konkretnego nanomateriału.

### TEM

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) jest jedną z najczęściej stosowanych metod badania tego parametru. Jest to metoda jakościowa, pozwalająca ocenić, po pierwsze – czy doszło do wchłonięcia nanomateriału do komórki, po drugie – pozwala ocenić dokładną lokalizację gromadzenia się nanocząstek w jej wnętrzu. Dodatkowo modyfikacja tej metody – transmisyjna mikroskopia elektronowa wysokiej rozdzielczości (HRTEM) pozwala ocenić strukturę krystaliczną badanego tworzywa [12]. Jak się okazało, w trakcie przygotowywania materiału do badań z użyciem TEM, wewnątrz komórki mogą powstawać agregaty substancji użytych w tym procesie imitujące nanomateriały, co może prowadzić do fałszywie pozytywnych rozpoznania, dlatego niektórzy badacze stosują dodatkowe metody mikroanalizy, pozwalające zidentyfikować agregaty potencjalnie będące nanomateriałami (np. EDS – dyspersyjno-elektronowa analiza rentgenowska) [12].

### Analiza składu

Z racji, że niektóre nanomateriały składają się z pierwiastków nieobecnych naturalnie w organizmie (Ag, Au, Ce), istnieje możliwość badania wchłaniania przez komórki tych materiałów metodami analizy chemicznej. Zasada metody polega na

Tabela 1. Rodzaje komórek stosowanych w badaniach toksyczności w zależności od drogi ekspozycji na nanomateriały

Droga podania	Komórki	Literatura
Doustnie	Nieodróżniony ludzki gruczołokrak okrężnicy	[9]
Wstrzyknięcie	Eryocyty – hemoliza	[1]
	Płytki – agregacja	[1]
	Mieloblasty	[10]
	Linie komórek nowotworowych: HeLa, MCF-7, HCT-116	[1]
Przezskórnie	Izolowana skóra	[1]
	Ludzkie keratynocyty HaCaT	[1]
	Ludzkie keratynocyty naskórka HEKs	[11]
Inhalacja	Nieśmiertelne linie komórek płuc, np. A549, H1,299	[1]
	Komórki błony śluzowej nosa	[1]
	Makrofagi pęcherzyków płucnych	[1]

trawieniu kwasem komórek/izolowanego organu (wcześniej poddanych ekspozycji na dany nanomateriał), po uprzednim przepłukaniu, a następnie analizie za pomocą atomowej spektroskopii emisyjnej indukowanej plazmą (ICP-AES) [12].

### Metoda fluorescencyjna

Metoda ta może być zastosowana w przypadku nanomateriałów wykazujących fluorescencję *per se*, natomiast w przypadku nanomateriałów niefluoryzujących istnieje możliwość wyznaczenia ich przy użyciu znaczników, takich jak: FITC, Texas Red, biotyna-streptawidyna-FITC i innych [12]. Detekcja może być dokonana na dwa sposoby: przy użyciu technik mikroskopii fluorescencyjnej albo za pomocą cytometru przepływowego. Mikroskopowe techniki detekcji cechuje ograniczona rozdzielczość w porównaniu do TEM [12].

### Badania toksyczności *in vitro*

Postęp syntezy chemicznej, przejawiający się produkcją ogromnej liczby nowych związków oraz coraz większa świadomość toksykologiczna, spowodowały zapotrzebowanie na metodologię pozwalającą na szybką i dokładną ocenę parametrów toksykologicznych nowo produkowanych substancji, w tym nanomateriałów. Obecnie główną rolę w tych badaniach odgrywają testy *in vitro*, które cechują się większą szybkością, niższym kosztem, większą kontrolą nad eksperymentem oraz brakiem konieczności wykorzystywania do badań zwierząt lub wykorzystywania ich w mniejszej liczbie niż w doświadczeniach *in vivo* [12].

### Badanie proliferacji

Badanie proliferacji jest dobrym testem przesiewowym pozwalającym ocenić cytotoxyczność badanego związku/nanomateriału. Stosowany jest jako jeden z pierwszych testów przy badaniach nad danym nanomateriałem, ponieważ pozwala na ilościową ocenę cytotoxyczności, niezależnie od jej mechanizmu [12]. Test redukcji związków

tetrazoliowych (zwykle MTT) do formazanów jest najczęstszą metodą badania zdolności do proliferacji. Dokładny mechanizm reakcji nie został do końca wyjaśniony [12], niemniej jednak wiadomo, że żywe komórki posiadają zdolność redukcji związku tetrazoliowego do barwnego formazanu, którego stężenie (po rozpuszczeniu) mierzy się spektrofotometrycznie. Test wykonuje się po inkubacji danej linii komórkowej z badanym nanomaterialem/związkiem. Im wyższy odczyt, tym większa zdolność proliferacyjna komórek. Wykazano możliwe wyniki fałszywie zawyżone, co może być spowodowane reduktorami obecnymi w środowisku reakcji. Na wynik mogą mieć również wpływ pH, cholesterol czy dodatki obecne w podłożu hodowlanym [13]. Inne metody badania proliferacji to test inkorporacji tymidyny znakowanej trytem lub test z barwnikiem Almar Blue [12].

### *Indukcja stresu oksydacyjnego*

Duże zainteresowanie w badaniu cytotoksyczności nanocząstek budzi ich potencjalna zdolność do wywoływania stresu oksydacyjnego (OS), który w efekcie może prowadzić do zachwiania równowagi i zaburzenia fizjologicznego środowiska redukcyjnego komórek. Na działanie reaktywnych form tlenu i azotu (ROS/RNS) wrażliwe są takie struktury jak białka, lipidy, węglowodany i kwasy nukleinowe, wszystkie o krytycznym znaczeniu dla poprawnego funkcjonowania komórki. Szkody obejmują peroksydację lipidów, zmiany w ekspresji genów zależnych od wrażliwych na potencjał redukcyjny czynników transkrypcyjnych czy wpływ na odpowiedź zapalną, wszystkie mogące prowadzić do śmierci komórki [14].

Do oceny nasilenia produkcji ROS/RNS w komórce, badania można prowadzić w kilku kierunkach. Pierwszy z nich wykorzystuje zdolność wolnych rodników do utlenienia fluorochromów wykazujących w wyniku tej reakcji fluorescencję. Najczęściej używa się DCFDA-dioctan 2',7'-dichlorofluoresceiny, który po przejściu przez błonę komórkową do wnętrza ulega hydrolizie, a następnie reakcji z HO•, ROO•, RO•, ewentualnie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [15]. Podobnie działa dihydrorodamina 123, lecz jest ona wrażliwa tylko na utlenienie przez O<sub>2</sub>• i NO• [12]. W badaniach prowadzonych przez Long i wsp. [16] nad OS w neuronach indukowanym przez nanocząstki TiO<sub>2</sub> wykorzystano podobne właściwości innego barwnika – hydroetydyny, jednak zmodyfikowanej tak, aby pomiar dotyczył produkcji nadtlenu wewnątrz mitochondriów.

Innym podejściem do pomiaru nasilenia produkcji wolnych rodników jest oznaczenie obecności produktów ich szkodliwego oddziaływania, takich jak fragmentacja DNA, peroksydacja białek i lipidów. Do monitorowania tych ostatnich w badaniu

toksyczności nanocząstek Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [17] i kobaltu [18], wykorzystano oznaczenie malonyldialdehydu (MDA), produktu peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, za pomocą kwasu tio-barbiturowego (TBA). W wyniku reakcji dochodzi do zmiany barwy mierzonej spektrofotometrycznie. Trzecia możliwość oceny wpływu nanocząstek na OS obejmuje pomiar zmiany stanu i aktywności bariery antyoksydacyjnej, czyli stężenia GSH i GSSG, aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) czy peroksydazy glutationowej (GPX). Do pomiarów GSH stosowana jest metoda kolorymetryczna, w której w obecności NADPH redukowany jest GSSH, a produkt tej reakcji reaguje z DNTP, co pozwala na powstanie kwasu 5-tio-2-nitrobenzoesowego [19]. Z kolei do oznaczenia aktywności SOD w badaniach indukcji OS przez nanorurki węglowe posłużono się pomiarem ekspresji każdej z obu izoform tego enzymu za pomocą immunoblottingu, gdzie po izolacji i elektroforezie wykorzystuje się pierwszorzędowe, a następnie drugorzędowe przeciwciała skoniugowane z enzymem a pomiar zależnie od substratu może zostać przeprowadzony fluorymetrycznie, chemiluminescencyjnie lub kolorymetrycznie [19].

### *Apoptoza i nekroza*

Badanie wskaźników śmierci komórki, zarówno apoptozy jak i nekrozy, dostarcza bezpośrednich dowodów na zdolność nanomaterialów do indukowania mechanizmów odpowiedzialnych za niszczenie komórek. W przypadku apoptozy, która jest zaprogramowaną, kontrolowaną śmiercią komórki, ostateczny efekt może nastąpić na wielu drogach, w tym związanej z uszkodzeniem DNA, mitochondriów czy aktywacją specyficznych receptorów [20]. Niezależnie jednak od tego, czy apoptoza zainicjowana została wewnątrzkomórkowo czy zewnątrzkomórkowo, wspólną cechą tych procesów jest aktywacja kaspaz – wewnątrzkomórkowych proteaz cysteinowych pierwotnie syntezowanych w formie zymogenów. Do zidentyfikowania, czy doszło do ich aktywacji, stosuje się znakowane fluorochromami białkowe substraty dodawane do próbki, po uprzedniej lizie komórek. W przypadku gdy pożądane jest zachowanie integralności błony komórek i wykorzystanie do odczytu cytofluorometru lub mikroskopu fluorescencyjnego, możliwe jest użycie substratów, które mają zdolność do przenikania błony komórkowej. Inną metodą jest wykorzystanie immunoblottingu – metody wykrywającej obecność odciętych fragmentów białkowych substratów, rozdzielonych na żelu poliakrylamidowym za pomocą przeciwciał monoklonalnych [21]. Podczas badań nad mechanizmami apoptotycznymi nanocząstek krzemu [20] i srebra [22], brano pod uwagę także zmiany ekspresji Bcl-2, p53 i Bax.

W komórkach znajdujących się na późnych etapach apoptozy można wykryć obecność dwuniciowych fragmentów DNA, będących produktem intensywnej działalności endonukleaz. Dwie spośród metod ich wykrywania, test drabinki DNA (ang. DNA laddering) i test kometowy, cechują się wykorzystaniem elektroforezy w żelu agarozowym do zwizualizowania zmian w nici DNA. Różnica polega na sposobie uzyskania DNA do rozdzielania, w pierwszym przypadku dokonuje się izolacji DNA, a w drugim unieruchamia komórki na żelu i następnie doprowadza do ich lizy, co pozwala na uwolnienie zawartości jądra [12].

Pośród innych metod chętnie stosowanych do oceny genotoksyczności jest TUNEL assay (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick End Labeling) [22]. Dzięki użyciu końcowej transferazy deoksynukleotydów do końców 3'OH dobudowywane są znakowane dUTP, co przekłada się na wzrost intensywności fluorescencji mierzonej fluorymetrycznie. Znakowanie dUTP może polegać na biotynylacji, wtedy, aby wykryć dobudowane nukleotydy wykorzystuje się kompleks streptawidyna-znacznik fluorescencyjny [23] lub polega na wykorzystaniu BrdUTP wraz z przeciwciałami monoklonalnymi anty-BrdUTP skoniugowanymi z fluorescencyjnym znacznikiem [24]. Potwierdzenie istnienia apoptotycznych fragmentów dwuniciowego DNA dokonywane jest za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, która umożliwia przegląd pojedynczych komórek hodowli lub preparatu histologicznego [25].

Do badania zachodzenia zjawiska nekrozy stosowane są metody uwidaczniające utratę przez komórki integralności błony komórkowej. W tym celu stosowane są różnego rodzaju barwniki: błękit trypanu, czerwień obojętna (wykazujące absorpcję odpowiednio przy 605 i 540 nm) i jodek propidyny, które wnikają tylko przez uszkodzoną błonę, przy czym jodek propidyny wnika do jądra i barwi obecne tam DNA. Jeśli użyje się połączenia fluorescencyjnych barwników kalceiny AM (ulegającej hydrolizie w żywych komórkach) z homodimerem etydyny, można równocześnie wybarwić populację żywych i martwych komórek [12]. Inna metoda określenia integralności błony komórkowej stosowana m.in. w badaniu cytotoksyczności nanocząstek tlenku żelaza [26] wykorzystuje oznaczenie przecieku dehydrogenazy mleczanowej do medium hodowlanego za pomocą kolorymetrycznego testu, zawierającego sól tetrazoliową, którego produktem jest czerwony formazan [27].

### Badanie toksyczności *in vivo*

O ile badania toksyczności *in vitro* nie są zbyt kosztowne, pozwalają przebadać dużą liczbę rodzajów nanomateriałów w krótkim czasie, o tyle nie

pozwalają odwzorować całkowicie właściwości toksycznych, w tym efektów długoterminowych wykazywanych przez nanomateriały w żywym organizmie. Z tego powodu nanomateriały, które zostają wprowadzane do produkcji na większą skalę, czy to do wykorzystania w medycynie czy w przemyśle, muszą przejść etap badań *in vivo* [28]. Najczęściej stosowane organizmy to: myszy, szczury, króliki, *Caenorhabditis elegans* czy danio pręgowany (ang. zebrafish). W badaniach tych sprawdza się toksyczność względem narządów i układów kluczowych (wątroba, nerki, układ pokarmowy, układ oddechowy, układ sercowo-naczyniowy, układ nerwowy, układ odpornościowy) [28].

Badania te obejmują ocenę struktury mikroskopowej i makroskopowej narządów i tkanek, ocenę wskaźników procesu zapalnego, ocenę markerów biochemicznych uszkodzenia danego narządu, ocenę równowagi kwasowo-zasadowej i wodno-elektrolitowej czy ocenę wskaźników OS [28]. **Tabela 2** zawiera zestawienie badanych cech uszkodzenia charakterystycznych dla danego organu (wg [28]).

### Perspektywy rozwoju

Przegląd prac dotyczących zastosowań nanomateriałów w medycynie i innych dziedzinach życia człowieka wskazuje, że będą one coraz częściej stosowane w coraz większej skali. Rodzi to konieczność dalszego rozwoju technik badawczych dedykowanych badaniom nad nanomateriałami oraz wiedzy o mechanizmach toksyczności, wykazywanej przez te struktury. Na podstawie wielu badań chemicznych i toksykologicznych udowodniono, że nanomateriały mają odmienne właściwości chemiczne, fizyczne i biologiczne od tego samego materiału w formie „makro”, co m.in. wynika z ich małego rozmiaru. Na tym poziomie rozdrobnienia materii, trzeba brać pod uwagę efekty kwantowe wpływające na końcowe efekty biologiczne, w tym toksyczne nanomateriałów. Można wnioskować, iż fakt ten stworzy konieczność rozwoju nowej dziedziny nauki – biologii kwantowej.

Wydaje się, że dobrze znane i stosowane od dawna metody oceny parametrów toksykologicznych będą wymagały dokładniejszej oceny ich przydatności w przypadku badań nad ksenobiotykami w skali nano. Należy zwrócić uwagę na to, że wyniki badania toksyczności tego samego rodzaju nanomateriału mogą różnić się znacznie pomiędzy sobą ze względu na występowanie zmiennych parametrów fizycznych, takich jak wielkość, kształt, potencjał zeta.

Można zauważyć, że spośród wyżej opisanych metod badań nanotoksyczności wiele stosowanych jest od dawna w klasycznej toksykologii. Zachodzi

**Tabela 2.** Badania *in vivo* oceniające toksyczność nanocząstek względem poszczególnych organów/układów (wg [28])

Organ/układ	Badana cecha
Wątroba	<b>Zmiany immunohistochemiczne</b> – zwłóknienie i cechy zapalne <b>Poziom enzymów</b> – AlAT, AspAT, ALP
Nerki	<b>Ocena histopatologiczna</b> – uszkodzenie kłębuszków <b>Zmiany immunohistochemiczne</b> – stwardnienie kłębuszków, kolagenoza, ocena proliferacji (wykrycie antygenów proliferacji komórkowej) <b>Testy funkcjonalne i biochemiczne</b> – TP, albumina, GFR, hematuria, proteinuria, kreatynina
Układ pokarmowy	<b>Zmiany histologiczne</b> – atrofia mikrososmków i nabłonka, liczba mastocytów <b>Analizy biochemiczne</b> – równowaga wodno-elektrolitowa i kwasowo-zasadowa
Układ oddechowy	<b>Ocena akumulacji płucnej</b> z zastosowaniem MRI u myszy z indukowanym POChP (przewlekła obturacyjna choroba płuc) <b>Analiza BAL (płukanie oskrzelowo-płucne)</b> – LDH (ocena uszkodzenia pneumocytów), liczba neutrofilii (wskaźnik zapalenia) <b>Stres oksydacyjny</b> – wskaźnik peroksydacji lipidów (np. MDA) oraz stosunek molowy stężeń GSH/GSSG w materiale z BAL
Układ krążenia	<b>Ocena stanu naczyń krwionośnych</b> w poszukiwaniu zakrzepów, obrzęków, tętniaków <b>Analizy biochemiczne</b> – troponina-T, CK-MB, mioglobina, wapń w mięśniu sercowym <b>Stres oksydacyjny</b> – peroksydacja lipidów (MDA), produkcja ROS/RNS, aktywność enzymów antyoksydacyjnych: SOD, GPX, CAT <b>Ocena poboru</b> radioznakowanych nanocząstek przez serce
Układ nerwowy	<b>Badania z zastosowaniem metod obrazowania</b> <b>Ocena szczelności bariery krew-mózg</b> <b>Ocena stosunku stężeń nanocząstek</b> w mózgu/surowicy po podaniu dożylnym <b>Badania mózgu ex vivo</b> <b>Badania behawioralne</b> <b>Badania parametrów łańcucha oddechowego</b>
Układ odpornościowy i rozrodczy	<b>Ocena immunotoksyczności</b> <b>Poziom IL, TNF</b> <b>Ocena morfologiczna</b> narządów układu odpornościowego <b>Ocena przewlekłego wpływu</b> na produkcję gamet oraz hormonów

zatem obawa, że w stosunku do tak różnorodnej grupy ksenobiotyków pod względem budowy, składu i właściwości mogą pojawić się niespodziewane interferencje w danym oznaczeniu, co musi być wyeliminowane metodologicznie. Wydaje się, że w toku rozwoju nanotoksykologii wrośnie znaczenie liczba badań z zakresu toksykogenomiki [29, 30] jako metody oceny wcześniej uchwytnych zmian w ekspresji genów, nawet podczas krótkich okresów narażenia, a rozwój techniki pozwalającej na monitorowanie dynamicznych zmian w organizmie modelowych zwierząt, za pomocą wszczepionych implantów [31], może przewyższyć ograniczenia badań *in vitro*.

Ważnym zadaniem toksykologii środowiskowej po wprowadzeniu nanomateriałów do powszechnego stosowania jest znalezienie odpowiednich metod badania długoterminowych skutków uwalniania ich do środowiska. Wykazano, że nanomateriały mogą podlegać wielu przemianom w środowisku, zarówno korzystnym (spadek toksyczności) jak i niekorzystnym (wzrost toksyczności).

### Podsumowanie

Nanomateriały z pewnością zostaną zastosowane w przyszłości na większą skalę w wielorakich dziedzinach życia, w tym medycynie, co, jak można sądzić, przyniesie wiele korzyści. Koniecznym warunkiem efektywnego wykorzystania nanotechnologii będzie systematyczne prowadzenie badań nanotoksykologicznych, dających gwarancję

bezpieczeństwa ich stosowania. Priorytetem musi być w tym wypadku dostosowywanie warsztatu laboratoryjnego do wiarygodnej oceny zjawisk często na poziomie molekularnym, spotykanych w skali nano. Innym wyzwaniem jest prognozowanie skutków długoterminowych oddziaływania nanomateriałów zarówno na organizm człowieka, jak i na środowisko. Te będą mogły być w pełni ocenione dopiero po kilkudziesięcioletnim okresie stosowania.

Otrzymano: 2018.09.07 · Zaakceptowano: 2018.10.12

### Piśmiennictwo

- Love S., Maurer-Jones M., Thompson J., Lin Y., Haynes C.: Assessing nanoparticle toxicity. *Annu Rev Anal Chem.* 2012 (5): 181–205.
- Lal Pal S., Jana U., Manna P., Mohanta G., Manavalan R.: Nanoparticle: An overview of preparation and characterisation. *J Appl Pharm Sci.* 2011, 1(6): 228–234.
- Organisation Intergouvernementale de la Convention du Metre. The international system of units. 8<sup>e</sup> édition, STEDI Media, Paryż 2006.
- US National Nanotechnology Initiative, Nanotechnology 101. Official website of the United States National Nanotechnology Initiative. <https://www.nano.gov/nanotech-101> [dostęp: 5.09.2018].
- Nikam A., Ratnaparkhiand M., Chaudhari P.: Nanoparticles – an overview. *Int J Res Dev Pharm L Sci.* 2014, 3(5): 1121–1127.
- Hardman R.: A toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environment Factors. *Environ Health Perspect.* 2006, 114(2): 165–172.
- Rai M., Deshmukh S., Ingle A., Gade A.: Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J Appl Microbiol.* 2012, 112(5): 841–852.
- Ueda M., Kreuter J.: Optimization of the preparation of loperamide-loaded poly (L-lactide) nanoparticles by high pressure emulsification-solvent evaporation. *J Microencapsul.* 1997, 14(5): 593–605.
- Gerloff K., Albrecht C., Boots A.W., Förster I., Schins R.P.: Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intestinal Caco-2 cells. *Nanotoxicology.* 2009, 3(4): 355–364.

10. Yan M., Zhang Y., Xu K., Fu T., Qin H., Zheng X.: An *in vitro* study of vascular endothelial toxicity of CdTe quantum dots. *Toxicology*. 2011, 282(3): 94–103.
11. Sharma V., Singh S.K., Anderson D., Tobin D.J., Dhawan A.: Zinc oxide nanoparticle induced geno-toxicity in primary human epidermal keratinocytes. *J Nanosci Nanotechnol*. 2011, 11(5): 3782–3788.
12. Marquis B., Love S., Braun K., Haynes C.: Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. *Analyst*. 2009, 134(3): 425–439.
13. Kumar V., Sharma N., Maitra S.S.: *In vitro* and *in vivo* toxicity assessment of nanoparticles. *International Nano Letters*. 2017, 7(4): 243–256.
14. Fu P.P., Xia Q., Hwang H.M., Ray P.C., Yu H.: Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *J Food Drug Anal*. 2014, 22(1): 64–75.
15. Huerta-García E., Pérez-Arízti J.A., Márquez-Ramírez S.G., Delgado-Buenrostro N.L., Chirino Y.I., Iglesias G.G., López-Marure R.: Titanium dioxide nanoparticles induce strong oxidative stress and mitochondrial damage in glial cells. *Free Radic Biol Med*. 2014, 73: 84–94.
16. Long T.C., Saleh N., Tilton R.D., Lowry G.V., Veronesi B.: Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environ Sci Technol*. 2006, 40(14): 4346–4352.
17. Wang L., Min Y., Xu D., Yu F., Zhou W., Cuschieri A.: Membrane lipid peroxidation by the peroxidase-like activity of magnetite nanoparticles. *Chem Commun (Camb)*. 2014, 50(76): 11147–11150.
18. Akhtar M.J., Ahamed M., Alhadlaq H.A., Alshamsan A.: Nanotoxicity of cobalt induced by oxidant generation and glutathione depletion in MCF-7 cells. *Toxicol In Vitro*. 2017, 40: 94–101.
19. Sharma C.S., Sakar S., Periyakaruppan A., Barr J., Wise K., Thomas R., Wilson B.L., Ramesh G.T.: Carbon Nanotubes Induces Oxidative Stress in Rat Lung Epithelial Cells. *J Nanosci Nanotechnol*. 2007, 7(7): 2466–2472.
20. Asweto C.O., Wu J., Alzain M.A., Hu H., Andrea S., Feng L., Yang X., Duan J., Sun Z.: Cellular pathways involved in silica nanoparticles induced apoptosis: A systematic review of *in vitro* studies. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017, 56: 191–197.
21. Kaufmann SH, Lee S, Meng XW, Loegering DA, Kottke TJ, Henzing AJ, Ruchaud S, Samejima K, Earnshaw WC. Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods*. 2008, 44(3): 262–272.
22. Habas K., Brinkworth M.H., Anderson D.: Silver nanoparticle-mediated cellular responses in isolated primary Sertoli cells *in vitro*. *Food Chem Toxicol*. 2018, 116, Pt B: 182–188.
23. Kyrylkova K., Kyryachenko S., Leid M., Kioussi C.: Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol*. 2012, 887: 41–47.
24. Li X., Darzynkiewicz Z.: Labelling DNA strand breaks with BrdUTP. Detection of apoptosis and cell proliferation. *Cell Prolif*. 1995, 28(11): 571–579.
25. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S.A.: Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992(119), 3: 493–501.
26. Gonzales M., Mitsumori L.M., Kushleika J.V., Rosenfeld M.E., Krishnan K.M.: Cytotoxicity of iron oxide nanoparticles made from the thermal decomposition of organometallics and aqueous phase transfer with Pluronic F127. *Contrast Media Mol Imaging*. 2010, 5(5): 286–293.
27. Ka-Ming Chan.F, Moriwaki K., De Rosa M.J.: Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity. *Methods Mol Biol*. 2013, 979: 65–70.
28. Yang Y, Qin Z., Zeng W, Yang T., Cao Y, Mei C., Kuang Y: Toxicity assessment of nanoparticles in various systems and organs. *Nanotechnology Reviews*. 2017, 6(3): 279–289.
29. Dwivedi S., Saquib Q., Ahmad B., Ansari S.M., Azam A., Musarrat J.: Toxicogenomics: A New Paradigm for Nanotoxicity Evaluation. *Adv Exp Med Biol*. 2018, 1048: 143–161.
30. Gonzalez-Moragas L., Yu S.M., Benseny-Cases N., Stürzenbaum S., Roig A., Laromaine A.: Toxicogenomics of iron oxide nanoparticles in the nematode *C. elegans*. *Nanotoxicology* 2017, 11(5): 647–657.
31. Shivaram A., Bose S., Bandyopadhyay A.: Understanding long-term silver release from surface modified porous titanium implants. *Acta Biomater*. 2017, 58: 550–560.