Toksičnost nanočestica srebra i zlata

Zec, Kristina

Undergraduate thesis / Završni rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:057141

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

TOKSIČNOST NANOČESTICA SREBRA I ZLATA

TOXICITY OF GOLD AND SILVER NANOPARTICLES

SEMINARSKI RAD

Kristina Zec
Preddiplomski studij Molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: prof. dr. sc. Goran Klobučar

Zagreb, 2012.

SADRŽAJ

1. Uvod

2. Toksičnost nanočestica zlata

2.1 Stabilnost nanočestica zlata ovisi o površinskim konjugatima 5.

2.2 *In vitro* studije citotoksičnosti nanočestica zlata 6.

2.3 Imunogeničnost nanočestica zlata 6.

2.4 Utjecaj nanočestica zlata na staničnu morfologiju 8.

2.5 Akutna oralna toksičnost nanočestica zlata u miša 9.

2.6 Biodistribucija i bubrežna ekskrecija nanočestica zlata 11.

2.7 Genotoksičnost nanočestica zlata 12.

2.8 Mutageni učinak nanočestica zlata na modelu vinske mušice 13.

3. Toksičnost nanočestica srebra

3.1 *In vitro* studije toksičnosti nanočestica srebra 14.

3.2 *In vivo* studije toksičnosti nanočestica srebra 15.

3.3 Molekularni mehanizmi toksičnosti nanočestica srebra 15.

4. Zaključak 16.

5. Literatura 17.

6. Sažetak 18.

7. Summary 18.

1. UVOD

Nanotehnologija podrazumijeva sintezu i primjenu čestica promjera manjeg od 100 nanometara te proučava njihove interakcije s biološkim strukturama na molekularnom nivou i njihov utjecaj na biologiju organizama općenito te u nekom sveobuhvatnom pogledu njihov ekološki utjecaj.

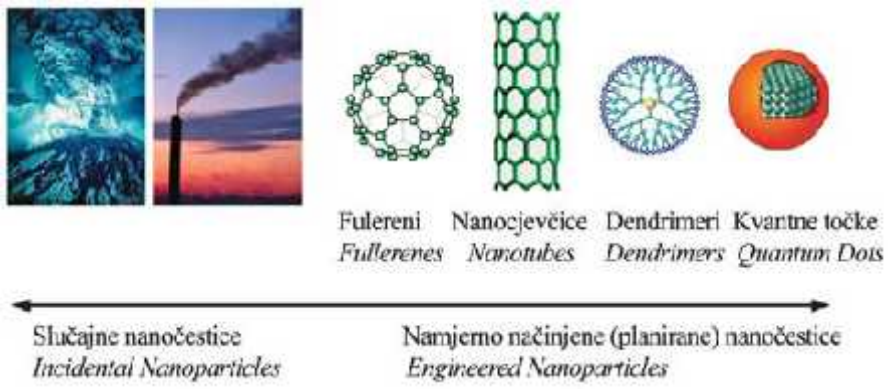
Fizikalna svojstva nanočestica razlikuju se bitno od svojstava čestica većih dimenzija. Bilo koji materijal sveden na veličinu u nanometrima imat će promijenjena svojstva koja ponekad mogu rezultirati u neočekivanom ponašanju tog materijala. Npr. izolatori postanu vodljivi, netopljive tvari topljivima jer na vidjelo izlaze kvantno mehaničke značajke pojedinih atoma unutar materijala.

Iako je nanotehnologija relativno mlada znanost, čovječanstvu su nanočestice bile poznate od davnina. Kinezi su bili prvi koji su pripremali i koristili crveno koloidno zlato kao alkemijski lijek za dugovječnost 2500 p.n.e. Riječ alkemija ima korijen u dvije kineske riječi: *Kim* (zlato) i *Yeh* (sok). Složenica *Kimyeh* (zlatni sok) je ušla u arapski jezik kao *kimiya* te sa određenim članom al tvorila *alkimiya*, što je u zapadnom svijetu dalo riječ alkemija. Srednjovjekovni alkemičari tražili su načine za pripremu suspenzija metala koje bi mogli piti: aurum potable (pitko zlato) i luna potable (pitko srebro) za koje su vjerovali da su eliksiri života (Prema Shukla R., 2007).

Nanotehnologija danas ima vro široku primjenu u gotovo svim poljima ljudske djelatnosti uprvo zbog jedinstvenih svojstava nanočestica. Poznato je da smanjenjem veličine čestice za određeni volumen materijala znatno raste broja atoma na njenoj površini, tj. povećava se omjer površine i volumena. Zbog toga se nanočestice koriste u katalizi. Primjerice zlato, iako plemeniti metal u makro dimenzijama, kao nanočestice dispergirane u aluminij ili željezo oksidu katalizira oksidaciju ugljikova monoksida. Nadalje, mehanička i magnetna svojstva nanočestica također su jedinstvena upravo zbog omjera površine naspram volumena. Nanočestice mogu promijeniti naboj dodavanjem ili oduzimanjem elektrona čak i kad nema napona, odnosno imaju vrlo nisku kapacitanciju te su zbog toga ekstremno osjetljive na susjedne naboje. Nanočestice imaju fascinantna optička svojstva i mijenjaju boju u ovisnosti o veličini, konjugiranim molekulama i okolnom mediju. Zbog toga su pronašle primjenu kao optički senzori i kontrastna sredstva. Optička svojstva nanočestica proizlaze iz zajedničke oscilacije elektrona vodljive vrpce nanočestice koji ekscitirani svjetlošću momentuma istog njihovom povećaju amplitudu oscilacije. Međutim, amplituda se brzo smanjuje putovanjem kroz dielektrični okoliš. Opažene promjene boje rezultat su dakle apsorpcije prilikom pobuđivanja elektrona. Primarni interes za

nanočestice na polju je biologije i medicine. Njihova primjena u dijagnostici, kulturi tkiva i razvoju učinkovitijih načina primjene lijekova nameće potrebu za istraživanjem njihove biokompatibilnosti. To je vrlo zahtjevan posao jer postoje brojni načini za njihovu sintezu i modifikaciju odnosno funkcionalizaciju te je potreban individualni pristup u istraživanju svake pojedine vrste nanočestica. Njihovoj potencijalnoj toksičnost može biti uzrok veličina, molekule kojima su konjugirane (u eng. literaturi *capping agents*), način pripreme itd. Uglavnom vrijedi da se smanjenjem veličine povećava toksičnost (Prema Shukla R., 2007.)

Prema podrijetlu, nanočestice se mogu podijeliti u dvije skupine: sintetizirane s ciljem i one nastale uzgred u proizvodnom procesu, izgranjem goriva te nekim prirodnim pojavama, npr. erupcija vulkana. Tehničke nanočestice (kvantne točke, dendrimeri) stvorene su radi iskorištavanja svojstava poput vodljivosti, spektralnih svojstava, bioraspodjele karakterističnih za nanorazinu. Ugljikove nanocjevčice i fulereni mogu pripadati i jednoj i drugoj skupini. Na slici 1. Prikazani su tiovi nanočestica . (Prema Ivanković M., 2011.)



Slika 1. *Vrste nanočestica*

Nanotoksikologija kao grana znanosti unutar nanotehnologije ima za cilj odrediti potencijalne štetne učinke nanočestica na organizme kao i sudbinu nanočestica u okolišu. Istraživanja se temelje na proučavanju citotoksičnosti, imunotoksičnosti i imunogeničnosti nanočestica in vitro i in vivo. Neki od mogućih dosad opaženih patofizioloških učinaka nanočestica prikazani su u tablici 1. (Preuzeto i prilagođeno prema Shukla R. 2007.)

Tablica 1. *Toksični i patofiziološki učinci nanomaterijala*

Eksperimentalni efekti NM	**Mogući patofiziološki učinci**
Stvaranje ROS	Oštećenje membarne, proteina i DNA, oksidativni stres
Oksidativni stres	Indukcija enzima faze 2., upala, perturbacija mitohondrija
Perturbacija mitohondrija	Oštećenje unutarnje membrane, promjene u permeabilnosti otvarnje pora, energetski kolaps, nekroza, apoptoza
Upala	Nakupljanje upalnih stanica u tkivu, fibroza, stvaranje granuloma, aterogeneza, ekspresija proteina akutne faze (C-reaktivni protein)
Nakupljanje u retikulo-endotelnom sustavu	Asimptomatična sekvestracija i pohrana u jetri, slezeni, limfnim čvorovima, povećanje tih organa i njihova disfunkcija
Denaturacija i degradacija proteina	gubitak enzimske funkcija, autoantigeničnost
Ulaz u jezgru	Oštećenje DNA, agregacija nukleoproteina, autoantigeni
Prodor u živčano tkivo	Oštećenje mozga i perifernog živčanog sustava
Kronična upala, fibroza, stvaranje granuloma, prezasićenost nanočesticama, otpuštanje medijatora	interferencija u oslobađanju organizma od patogena
Disfunkcija endotela, učinci na zgrušavanje krvi	Disfunkcija endotela, učinci na zgrušavnje krvi
Stvaranje neoantigena, smanjivanje imunotolerancije	autoimunost, efekt adjuvansa
Oštećenje DNA	mutageneza, metaplazija, karcinogeneza

Nanočestice plemenitih metala lako se pripremaju, jednostavno biokonjugiraju i njihova se optička svojstva mogu kontrolirati. Nanočestice zlata odavno se koriste u vizualiziranju substaničnih komponetnti elektronskom mikroskopijom. Nadalje, pokazalo se da nanočestice zlata posebne stukture zbog svojih apsorpcijskih svojstava selektivno ubijaju stanice raka in vivo primjenom laserske radijacije. (Preuzeto iz Shukla R. 2007.). Zbog svega spomenutog cilj je ovog pregleda napraviti rezime nekih dosadašnjih saznanja o ponašanju nanočestica srebra i zlata unutar i izvan stanice te o njihovoj biokompatibilnosti.

2.1 Stabilnost nanočestica zlata ovisi o površinskim konjugatima

Sumistha Das i suradnici (2012) nedavno su pokazali da stabilnost nanočestica zlata u različitim medijima direktno ovisi o površinskim konjugatima. Oni su istaživali agregaciju nanočestice zlata konjugiranih aspartatom (GNPA), trinatrij-citrat dihidratom (GNPC) i albuminom telećeg seruma (GNPB) pri različitim pH vrijednostima i ionskim jakostima u različiti medijima (PBS, NaCl, HEPES). Spektroskopski su pokazali da su GNPB stabilne i pri

kiselom i pri bazičnom pH, dok GNPA i GNPC aglomeriraju pri jako kiselom pH (pH 1). Nadalje, GNPB pokazale su se najstabilnijima pri svim razmatranim koncentracijama triju korištenih medija. GNPA i GNPC stabilne su u HEPES-u, a aglomeriraju u NaCl-u i PBS –u pri koncentraciji od 50 mM ili višoj. Ova saznanja vrlo su bitna za sintezu odgovarajućih nanočestica za biološku uporabu. Činjenica da serumski albumin štiti od aglomeracije daje naslutiti isti slučaj u sustavima in vivo.

2.2 *In vitro* studije citotoksičnosti nanočestica zlata

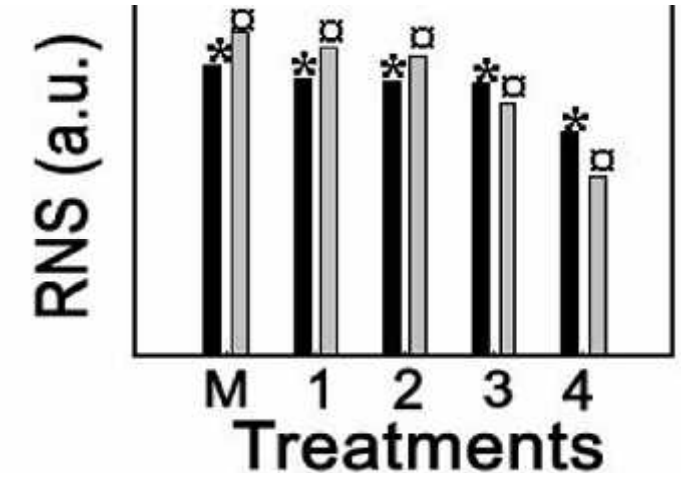
Sumistha Das i suradnici (2012) analizirali su citotoksičnost spomenuta tri tipa nanočestica (GNPA, GNPB i GNPC) na staničnoj liniji ljudskih fibroblasta koristeći tetrazolijsku sol WST-1 (4-[3-(4-jodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolij]-1,3-benzen disulfont) koju reducira mitohondrijski enzim sukcinat-reduktaza na ljubičasti produkt formazan u živim stanicama što se mjeri spektrofotometrijski. Za sva tri tipa nanočestica opažena je blaga citotoksičnost u ovisnosti o dozi. Pri 51 ppm GNPA, GNPB I GNPC, 93, 98 i 91% stanica je bilo vijabilno. Pri 5,000 ppm 76, 77 i 70%. Dakle, LD_{50} nije utvrđena ni pri tako visokoj dozi. Slične rezultate dobili su i LDH testom. Laktat-dehidrogenaza (LDH) je topljivi stanični enzim koji se otpušta u okolni medij kada je membrana oštećena stoga se mjerenjem njegove aktivnosti u mediju dobivaju podaci o integritetu membrane odnosno vijabilnosti stanica. Sumistha Das i suradnici spominju u svom radu i neke druge studije kojima je utvrđena necitotoksičnost nanočestica zlata različitih u promjeru (4, 12, 18 nm) i različito konjugiranih (citrat, cistein, glukoza, biotin, cetiltrimetil-amonij-bromid) na ljudskim tumorskim limfoblastima (Connor et al. 2005.). Shukla Ravi i suradnici (2007) proučavali su citotoksičnost nanočestica veličine 3-4 nm dobivenih redukcijom vodikovog tetrakloroaurata natrij-borhidridom. Mišji tumorski makrofagi, normalni makrofagi štakora, ljudske epitelne stanice raka dojke, epitelne stanice ribe i ljudski fibroblasti izloženi su rastućim koncentracijama nanočestica tijekom 48 sati. Testom ekskluzije tripanskog modrila nije utvrđena citotoksičnost osim kod ljudskih fibroblasta koji pokazuju marginalnu citotoksičnost pri koncentraciji od 200 µM. Naime, postotak vijabilnosti ljudskih fibroblasta pri toj konc. iznosio je otprilike 65%. Ovo saznanje daje mogućnost korištenja nanočestica zlata u selektivnom uzgoju stanica epitela, spriječavanju kontaminacije kultura stanica fibroblastima te u cijeljenju rana za spriječavanje stvaranja ožiljaka.

2.3 Imunogeničnost nanočestica zlata

Citotoksičnost nije jedini mehanizam djelovanja nanočestica. One mogu izazvati druge morfološke i funkcijske poremećaje stoga je potrebno pri utvrđivanju njihove potencijalne štetnosti uzeti u obzir i druge parametre, kao što je njihov utjecj na imunološki sustav. Shukla

Ravi i suradnici (2007) proučavali su indukciju stvaranja RNS (reaktivni dušikovi intermedijeri) i ROS (reaktivni kisikovi intermedijeri) u mišjim tumorskim makrofagima tretiranim rastućim koncentracijama koloidnog zlata tijekom 24 i 48 sati.

Makrofagi su glavne imunoregulacijske stanice i čine prvu crtu obrane protiv stranih antigena u mnogim tkivima, kao što su pluća, jetra, mozak i krv. Njihova uloga u nespecifičnoj imunosti temelji se na fagocitozi. Mehanizmi kojima aktivirani makrofagi uništavaju i inaktiviraju mikroorganizme i druge strane stanice jesu respiratorna eksplozija kojom se stvaraju reaktivni kisikovi radikali i vodikov peroksid, zatim stvaranje dušikovog oksida dušik-oksid sintazom te degranulacija i otpuštanje lizosomskih enzima na površinu ciljne stanice. U slučaju endocitoze nanočestica makrofagima prva dva mehanizma obrane mogla bi biti inducirana (Prilagođeno prema Shukla R., 2007.). Međutim, rezultati istraživanja pokazuju čak na smanjenje razine RNS u ovisnosti o dozi i vremenu tretmana koloidnim zlatom kao što je vidljivo iz podataka na slici 2. (Preuzeto i prilagođeno prema Shukla R., 2007.)



Slika 2. *Određivanje koncentracije dušikovog oksida u supernatantu kulture mišjih tumorskih makrofaga Griessovim reagensom nakon 24(*) i 48h(¤) primjene 10, 25, 50 i 100μM nanočestica zlata.*

Proizvodnja ROS mjerena je protočnom citometrijom na fluorescencijom aktiviranom razvrstavaču stanica. ROS su esencijalni intermedijeri oksidativnog metabolizma, ali pretjerano proizvedeni peroksidiraju lipide, narušavaju strukturu proteina, enzima i nukleinskih kiselina. Protočnim citometrom vizualizirana je internalizacija nanočestica zlata u mišjim tumorskim makrofagim u ovinosti o dozi i vremenu na temelju razlika u raspršivanju svjetlosti . Makrofagi koji su sadržavali nanočestice zlata razvrstavani su citometrom prema razini fluorescencije koja je direktno ovisna o proizvodni ROS. Naime, 2,7-dikloro-dihidro-fluorescein-diacetat (H_2DCF-

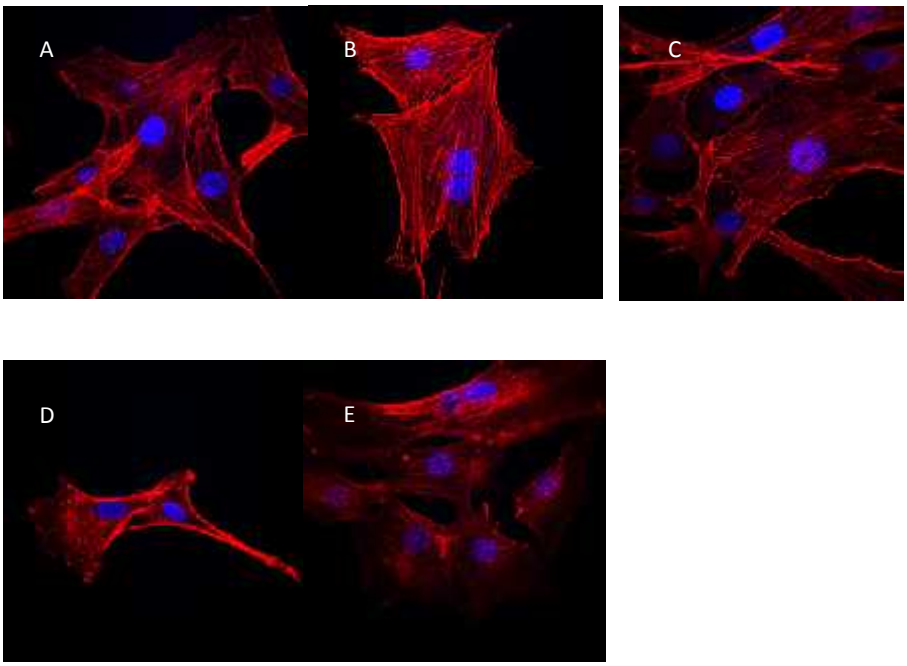
DA) kojim su tretirani stanične esteraze makrofaga cijepaju na nefluorescentni 2,7-dikloro-dihidro-fluorescein (H_2DCF) koji se u prisutnosti vodikovog peroksida oksidira na fluorescnetni 2, 7-diklorofluorescein (DCF). (Preuzeto i prilagođeno prema http://www.protocol-online.org/biology-forums-2/posts/13855.html). Opaženi rezultati poklapaju se s rezultatim za RNS, odnosno pokazuju smanjenje ROS pri većoj koncentraciji nanočestica zlata (100μM) i produljenom vremenu izloženosti (48h). Shukla Ravi i suradnici uspoređuju svoje rezultate s rezultatima jedne prijašnje studije kojom je utvrđeno da nanočestice zlata (AuI) onemogućuju vezivanje transkripcijskih faktora AP-1 i NF-κB čime negativno reguliraju ekspresiju seta gena uključenih u sintezu receptora interleukina-2 i drugih upalnih citokina s posljedičnim smanjenjem proizvodnje RNS i ROS. Pretpostavljaju sličnost u mehanizmu djelovanja ispitivanih nanočestica zlata (Au0) sa spomenutim (AuI). Takvi rezultati upućuju na antioksidacijsko djelovanje ispitivanih nanočestica zlata (Au0) što bi moglo biti od koristi u tretiranju autoimunih bolesti poput reumatoidnog artritisa. (Preuzeto i prilagođeno prema Shukla Ravi 2007.).

Imunogeničnost nanočestica zlata testirana je i proučavajući proizvodnju upalnih citokina TNF-α i IL-β na razini mRNA (nakon 3h) i proteina (nakon 24h) mišje tumorske stanične linije makrofaga. RT-PCR-om (reverzna transkriptaza PCR) nije utvrđena mRNA niti za jedan od dva spomenuta citokina, niti su bili dokazani proteinski produkti metodom ELISA za koncentracije nanočestica do 100 μM. Uz spomenute studije citotoksičnosti i imunogeničnosti napravljen je i profil staničnih proteina makrofaga tretiranih nanočesticama zlata konc. 100 μM na SDS-PAGE-u koji se nije razlikovao od proteinskog profila netretiranih makrofaga iz čega je jasno da nanočestice zlata konc. do 100 μM nemaju utjecaj na stanične funkcije i metabolizam makrofaga. (Prema Shukla Ravi 2007.)

2.4 Utecaj nanočestica zlata na staničnu morfologiju

Stanični citoskelet važan je za lokomociju, endocitozu, unutrastanični prijenos proteina, oblik i morfologiju stanice, obrambene mehanizme i prijenos signala. Čine ga tubularni aktinski filamenti promjera 7 nm (F aktin) izgrađeni od po dvije monomerne jedinice globularnog aktina (G aktin) u nizu. Aktinski tubuli nalaze se po cijeloj stanici, ali ih je najviše u kortikalnoj regiji ispod plazma membrane. Mišji fibroblast uzgajani na staklu tretirani su nanočesticama zlata konc. 50 i 100 μM tijekom 48 i 96h. Obilježeni su faloidin-tetrametilrodamin-izotiocijanatom (faloidin-TRITC; faloidin veže aktinske tubule, TRITC fluorescira narančasto) i promatrani pod mikroskopom. Manjak aktinskih filamenata zbog depolimerizacije ili poremećaja u sintezi opažen je na fibroblastima izloženim višim koncentracijama nanočestica zlata (100 μM) kroz

dulje vrijeme (96h). Potpuno smanjenje veličine fibroblasta i eventualna stanična smrt opažena je u tretmanu prekursorom nanočestica zlata, tetrakloroauričnom kiselinom. Slika 3. zorno sumira rezultate. (Preuzeto i prilagođeno prema Shukla R., 2007.).



Slika 3. *Mikroskopske slike aktinskog citoskeleta (crveno). (C) netretirana kontrola nakon 96h, (B) konc. nanočestica zlata 100 μM, 48h , (D) 100 μM, 96h, (A) 50 μM, 96h, (E) 50 μM HAuCl4, 48h. Jezgra je bojana DAPI-em.*

2.5 Akutna oralna toksičnost nanočestica zlata u miša

In vitro metode istraživanja toksičnosti imaju određena ograničenja pa ih valja usporediti s testovima in vivo. Sumistha Das i suradnici (2007) testirali su toksičnost tri već spomenuta tipa nanočestica na modelu miša proučavajući hematološke vrijednosti i histopatologiju jetre i bubrega. Sva tri tipa nanočestica povisila su razinu hemoglobina u krvi dok je koncentracija crvenih krvnih stanica ostala nepromijenjena što upućuje na stresni odgovor. Tretman sa GNPC i GNPA povisio je broj limfocita. Razina jetrenog enzima serumska glutamin-oksaloacetat transaminaza (SGOT) povišena je tretmanom sa GNPA, a uz nju tretmanom sa GNPC i serumska glutamin-piruvat transaminaza (SGPT) što ukazuje na poremećaj u radu jetre. Zdravlje bubrega, odnosno pravilna glomerularna filtracija ogleda se razinom kreatinina, mokraćne kiseline i dušika podrijetlom iz uree (BUN) u krvi. Kod tretmana sa GNPC povišena je razina BUN-a. Vrijednosti svih mjerenih parametara prikazani su u tablicama 2.,3. i 4. (Preuzeto i prilagođeno prema Sumistha Das i suradnici, 2012.)

Tablica 2. *Hematološka analiza kontrolnih i miševa tretiranih nanočesticama zlata*

Parametri	Kontrola	GNPA	GNPB	GNPC
Hemoglobin	13.5 ± 0.45	16.1 ± 0.6*	15.6 ± 0.7*	15.7 ± 1.2*
Uk. br. Eritrociti ($X\ 10^6$ mm^{-3})	4.1 ± 0.4	4.6 ± 0.7	4.3 ± 0.3	5.1 ± 0.2
Leukociti ($X\ 10^2$ mm^{-3})	56 ± 0.07	58 ± 0.17	56.8 ± 0.11	57.3 ± 0.4
DKS (%)				
Neutrofili	42 ±3	43 ±4	44 ±1	42 ± 1
Limfociti	53 ±1	64 ± 4*	52 ±3	66 ± 3*
Monociti	2	2	2	2
Eozinofili	3 ± 0.57	2	3 ± 0.57	2
Bazofili	0	0	0	0
Trombociti ($X\ 10^5$ mm^{-3})	1.54 ± 0.04	1.56 ± 0.03	1.52 ± 0.03	1.6 ± 0.02
Sedimentacijska stopa eritrocita (1h)	12 ±1	10 ±1	12 ±2	12 ± 2
SSE (2h)	16 ±3	16 ±5	16 ±1	15 ± 1

*značajna razlika u odnosu na kontrolu, $P < 0.05$

Tablica 3. *Učinak nanočestica zlata na jetrene enzime*

Parametri	Kontrola	GNPA	GNPB	GNPC
Alkalna fosfataza (U/L)	60 ±2	62 ±2	61 ±4	59 ± 2
SGOT (U/L)	12 ±2	19 ± 2*	11 ±1	21 ± 3*
SGPT(U/L)	11 ± 10	14 ±5	13 ±1	22 ± 7*

* značajna razlika u odnosu na kontrolu, $P < 0.05$

Tablica 4. *Učinak nanočestica zlata na parametre bubrega*

Parametri	Kontrola	GNPA	GNPB	GNPC
Kreatinin (mg/dl)	0.71 ± 0.03	0.76 ± 0.08	12 ±1	11 ±2
Mokraćna kiselina (mg/dl)	2.9 ± 0.1	2.6 ± 0.6	3.0 ± 0.1	3.1 ± 0.1
BUN (mg/dl)	10 ±2	12 ±1	11 ±2	16 ± 3*

* značajna razlika u odnosu na kontrolu, $P < 0.05$

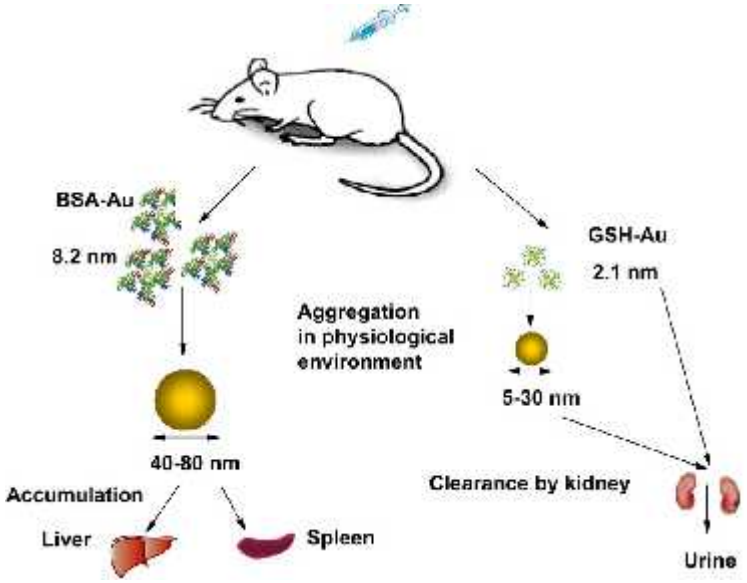
Histopatološke promjene na jetri uočene su pri tretmanu sa GNPA i GNPC. One uključuju infiltraciju upalnih stanica u portalnu trijadu, dilataciju sinusoida, vrlo proširenu centralnu venu prepunu krvi, natečene hepatocite s poremećajem u metabolizmu masti zbog njihove peroksidacije i posljedičnog uništenja endoplazmatske mrežice. Sve su ovo značajke imunosnog odgovora protiv stranih nanočestica.

Promijenjena histologija bubrega u studiji koju su proveli Sumistha Das i suradnici sastoji se u anizokariozi i vakuolizaciji nekih stanica bubrežnih tubula kao rezultat tretmana sa GNPC. Nikakve histopatološke promjene nisu utvrđene u tkivima jajnika, testisa, srca, pluća i slezene niti za jedan od tri tipa nanočestica zlata. Vjerojatno je da jetra i bubreg pokušavaju očistiti organizam od nanočestica i tako zapravo sprječavaju sekundarne i tercijarne patološke promjene na drugim organima. Moguće je da su najizraženije histopatološke promjene u jetri kao što je proširena centralna vena razultat povećanog ulaska vode i iona natrija u stanice. (Prema Sumistha Das i suradnici, 2012.)

2.6 Biodistribucija i bubrežna ekskrecija nanočestica zlata

Xiao-Dong Zhang i suradnici (2012) proveli su in vivo studiju s različito konjugiranim nanočesticama zlata sličnu ranije opisanoj s jednog novog aspekta. Proučili su tendenciju nakupljanja nanočestica u jetri i slezeni i toksične učinke time uzrokovane. Zanimalo ih je kako veličina i konjugati utječu na čišćenje tkiva od nanočestica i njihov eventualni izlazak iz organizma. Mjerili su hematološke i biokemijske parametre kod miševa tretiranih nanočesticama zlata konjugiranih goveđim serumskim albuminom (BSA-NP) i glutationom (GSH-NP) koncetracije 7550 μg/kg nakon 24h i 28 dana. Pokazali su da se BSA-NP uglavnom nakupkalju u jetri i slezeni, dok je relativno niska koncetracija GSH-NP bila prisutna u svim organima. Nakon 24h 36% GSH-NP, a samo 1% BSA-NP izbačeno je iz organizma urinom. Nakon 28 dana taj

omjer iznosi 94% : 5%. Povišenje količine bijelih krvnih stanica opaženo je za oba tipa nanočestica nakon 24h. Također je povišena razina kreatinina što ukazuje na toksični učinak BSA-NP i GSH-NP na bubreg. Međutim, nakon 28 dana toksični učinci GSH-NP eliminirani SU jer one očigledno mogu biti uspješno metabolizirane, dok to nije slučaj sa BSA-NP koje su i nakon tog vremena ostale u bubregu i jetri izazivajući upalu. Slika 4. Vrlo lijepo sumira rezultate (Preuzeto iz Xiao-Dong Zhang i suradnici, 2012.). Prethodno opisana studija akutne oralne toksičnosti nanočestica zlata označila je biokompatibilnima nanočestice zlata konjugirane govođim serumskim albuminom, ali je iz istraživanje biodistribucije vidljivo da se teško metbolizirju te stoga ne mogu biti primjenjive na polju biomedicine.



Slika 4. *Biodistribucija i bubrežna ekskrecija BSA i GSH konjugiranih nanočestica zlata.*

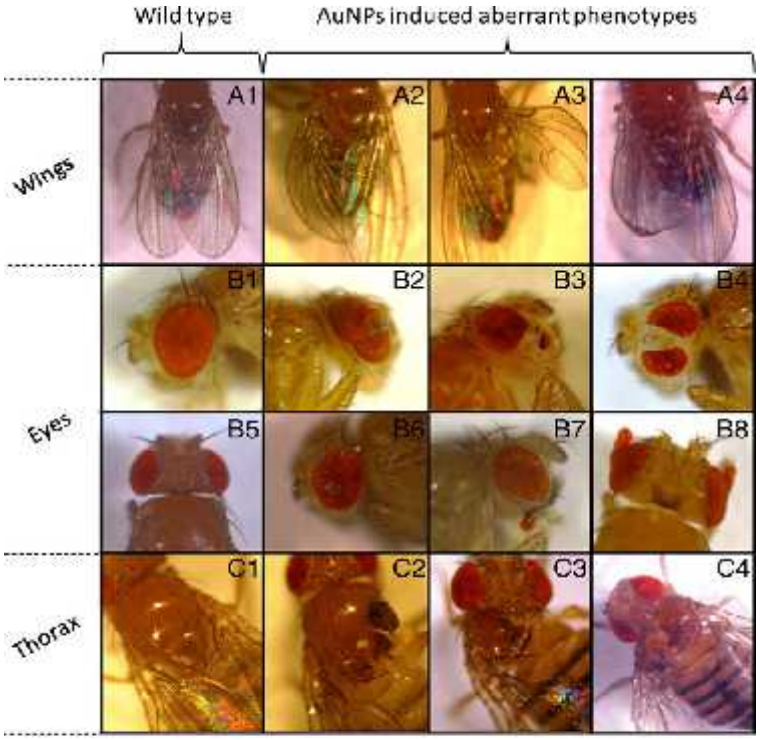
2.7 Genotoksičnost nanočestica zlata

Markus Shulz i suradnici (2012) proučavali su genotoksičnost nanočestica zlata veličine 2, 20 i 200nm komet i mikronukleus testom na polikromatskim eritrocitima koštane srži i stanicama pluća štakora. Nanočestice su u miševe unošene intratrahealno pod narkozom te su nakon 72 h provedena mjerenja. Tkivo pluća bilo je prvo na „udaru“ nanočestica, ali komet testom nije utvrđen genotoksični učinak na stanice pluća. Naime, intenzitet repa (postotak DNA u repu) za sva tri tipa nanočestica nije se statistički značajno razlikovao od kontrole. Također, mikronukleus testom na stanicama koštane srži nije utvrđen klastogeni ili aneugeni učinak uzrokovan nanočesticama. Međutim, autori ove studije spominju potrebu za utvrđivanjem genotoksičnosti nanočestica zlata u tkivima jetre i slezene kao organima u kojima se primarno dešava bioakumulacija tih nanočestica. Također upućuju na općeniti zaključak autora jedne

druge provedene studije o utjecaju veličine na toksičnost. Male nanočestice inaktivirane su imunološkim odgovorom, nanočestice srednje veličine nakupljaju se u različitim organima uzrokujući citotoksičnost dok veće nanočestice uglavnom ne prolaze tkivnu barijeru.

2.8 Mutageni učinak nanočestica zlata na modelu vinske mušice

Giuseppe Vecchio i suradnici (2012) tretirali su vinske mušice nanočesticama zlata veličine 15 nm. Ustanovili su genotoksični učinak na hemocitima koji su analogni limfocitima sisavaca i imaju istu funkciju. Fragmentaciju DNA utvrdili su TUNEL testom, a čak 15% hemocita proučavanih aneksin V/PI testom bilo je apoptotično. Mjerili su razinu ekspresije proteina p53 koji se povezuje sa stresnim odgovorom stanice i oštećenjem DNA real-time PCR-om te i tu dobili potvrdu genotoksičnosti jer je se ekspresija povećala čak tri puta kod tretiranih mušica u odnosu na netretirane. Ovi rezultati potaknuli su ih da prouče dugotrajniji mutageni potencijal nanočestica zlata. Tretirali su mušice kroz cijeli životni ciklus i ustanovili smanjenu fertilnost, smanjenu vijabilnost zbog letalnih mutacija i nasljednje promjene u fenotipu kao što su abnormalna krila, toraks i oči (slika 5.). Mutacije u podlozi opaženih fenotipskih aberacija pokazale su se dominatnima križanjem s mušicama divljeg tipa gdje je potomstvo imalo 50% promijenjeni, 50% fenotip divljeg tipa. (Prema Giuseppe Vecchio i suradnici, 2012.)

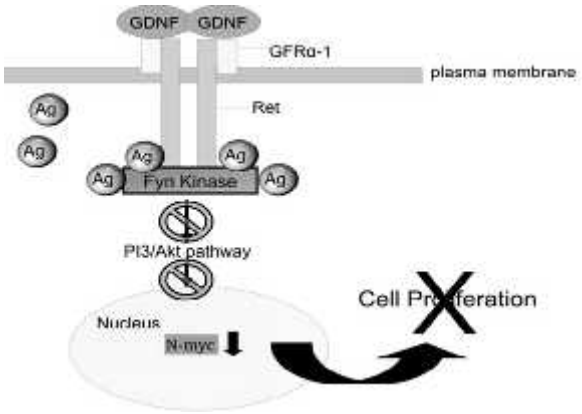


Slika 5. *Mutageni učinak nanočestica zlata na fenotip vinske mušice*

3.1 In vitro studije toksičnosti nanočestica srebra

Zbog njihovog antimikrobnog djelovanja, nanočestice srebra danas se naširoko koriste u raznovrsnim komercijalno dostupnim proizvodima koji su namijenjeni direktnom kontaktu s kožom stoga je posebno zanimljivo istraživanje koje su proveli Caterina Zanette i suradnici o učinku koji nanočestice srebra imaju na ljudske keratinocite. Nakon što su 24h bili izloženi nanočesticama srebra MTT testom izmjerena je smanjena aktivnost mitohondrija pri kon. od 100 i 330 μM . Slični rezultati dobiveni su istraživanjem toksičnog učinka nanočestica srebra i na drugim tipovima stanica, ljudskim i štakorskim stnicama jetre, alveolarnim makrofagima, na fibroblastima, germinativnim i stanicama jetre miša navode u svom radu Caterina Zanette i suradnici. Nadalje, SRB testom mjerili su ukupni sadržaj staničnih proteina, odnosno indeks stanične biomase koja je bila ponešto smanjena nakon izlaganja najvećoj konc. nanočestica srebra. Smanjenje intenziteta fluorescencije DAPI-em obojanih jezgri u suglasju je sa ostalim testovima opaženim smanjenjem broja keratinocita. Pokazano je da smanjenje vijabilnosti keratinocita osim o koncentraciji ovisi i o vremenu izloženosti tih stanica nanočesticama srebra. Iz navedenih rezultata i na temelju nekih drugih provedenih studija kojima je utvrđena kromosomska nestabilnost i zastoj u G2 fazi kao posljedica izloženosti nanočesticama srebra autori zaključuju da one imaju antiproliferacijski učinak na keratinocite (Caterina Zanette i suradnici, 2012.).

Laura K. Braydich-Stolle i suradnici (2012) pokazali su da nanočestice srebra smanjuju vijabilnost i proliferaciju zametnih stanica sperme u ovisnosti o veličini i koncentraciji te da konjugati na naočesticama zapravo nemaju utjecaj na toksičnost jer se degradiraju u lizosomima s mogućim posljedičnim otpuštanjem iona srebra koji su sami po sebi toksični. Nadalje, utvrđena je proizvodnja reaktivnih kisikovih radikala kao posljedica izloženosti stanica manjim nanočesticama srebra koja vodi putem apoptoze zbog oštećenja DNA i aktivacije staničnih kaspaza. Stvaranje ROS ne objašnjava potpuno opaženu smanjenu proliferciju i vijabilnost pa su autori proučavali utjecaj nanočestica srebra na GDNF signalni put. GDNF je faktor rasta bitan za proliferaciju zametnih stanica sperme i pokazalo se da nanočestice srebra neovisno o veličini i konjugatima inhibiraju aktivnost Fyn kinaze ovog signalnog puta onemogućujući signalne učinke nizvodno od Fyn kinaze kao što pokazuje slika 5. (Preuzeto i prilagođeno prema Laura K. Braydich Stolle i suradnici 2012.)



Slika 5. *Molekularni mehanizam inhibicije proliferacije zametnih stanica sperme nanočesticama srebra.*

3.2 In vivo studije toksičnosti nanočestica srebra

Za sada nema baš puno studija in vivo o toksičnosti nanočestica srebra i većina ih je proveden na vodenim organizmima. Također ih većina prati toksični učinak ionskog srebra jer se vjeruje da je taj oblik srebra bioaktivniji.

Kod zebrica (*Danio rerio*) se toksičnost nanočestica srebra u ovisnosti o dozi (0.19 nM se pokazala kritičnom) očituje različitim abnormalnostima u embriju (deformacije kralježnice, srčana aritmija te smanjeno preživljenje). Zbog izmjerene pretjerane ekspresije katalaze ovi učinci pripisani su stvaranju ROS s posljedičnim oštećenjem DNA. (Prema A. Lapresta-Fernandez i suradnici, 2011.). Kod gregeča (*Perca fluviatilis*) je utvrđeno da se nanočestice srebra veličine 81 nm konjugirane PVP-om (polivinilpirolidon) akumuliraju u škrgama i smanjuju toleranciju na hipoksične uvjete. U pastrve (*Salmo trutta*) je uočeno stvaranje ROS u tkivu škrga pri tretmanu nekonjugiranim nanočesticama srebra veličine 10-35 nm. (Prema pregledu Julie Fabrega i suradnika, 2010)

3.3 Molekularni mehanizmi toksičnosti nanočestica srebra

Toksični učinci nanočestica srebra i iona srebra koji se iz njih u određenim uvjetima (pH, ionska jakost, temperatura) otpuštaju ogledaju se u proizvodnji ROS te poremećajem u ionskoj ravnoteži stanica i posljedičnom energetskom kolapsu zbog narušenog membranskog integriteta kroz interakciju tiolnih grupa proteina membrane sa spomenutim nanočesticama (Prema A. Lapresta Fernandez i suradnici, 2011.)

4. Zaključak

Toksičnost nanočestica zlata i srebra ovisi o njihovoj veličini i konjugiranim molekulama. Fiziološki uvjeti u organizmu (pH, temperatura, ionska jakost) utječu na stupanj agregacije i time na njihovu mogućnost ulaska u stanicu. Stabilizacija i sprječavanje agregiranja postiže se upravo konjugacijom s najrazličitijim molekulama o kojima ovisi biodistribucija i mogućnost razgradnje i bubrežne ekskrecije. Međutim, jednom u stanici, lizosomski enzimi mogu vrlo lako razgraditi konjugate nanočestica stoga se na to treba obratiti posebna pažnja pri sintezi i istraživanju biokompatibilnih nanočestica za medicinske potrebe. Općeniti molekularni mehanizmi toksičnosti nanočestica zlata i srebra sastoje se u produkciji ROS i RNS (oksidativni stres), narušavanju stabilnosti membrana i poremećenom protoku iona s posljedičnim energetskim kolapsom te oštećenjem DNA (bilo zbog direktnog djelovanja nanočestica ako su dovoljno male da uđu u jezgru ili kao posljedica oksidativnog stresa). Dakako, postoje još mnogi nedovoljno istraženi specifični toksični učinci nanočestica kao što je njihova uloga u regulaciji genske ekspresije te najrazličitiji učinci na metabolizam stanice zbog specifičnih interakcija nanočestica s proteinima koji su ovisni o veličini i konjugatima pa je svaku novosintetiziranu nanočesticu potrebno individualno odrediti. Zbog svega ovoga, teško je utvrditi opću proceduru karakterizacije nanočestica koja može biti kompletna jedino ako određuje biološku dostupnost koju određuju okolišni čimbenici te međuvrsne razlike u sveukupnim toksičnim učincima što predstavlja veliki izazov znanstvenicima koji se bave ovim područjem.

5. Literatura

Lapresta-Fernandez A., Fernandez A., Blasco J., 2011. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 32, 2012, 40-59.

Zanette C., Pelin M., Crosera M., Adami G., Bovenzi M., Filon Larese F., Florio C. (2011) Silver nanoparticles exert a long-lasting antiproliferative effect on human keratinocyte HaCaT cell line. Toxicology in Vitro 25: 1053–1060.

Vecchio G., Galeone A., Brunetti V., Maiorano G., Rizzello L., Sabella S., Cingolani C., Pompa P., 2012. Mutagenic effects of gold nanoparticles induce aberrant phenotypes in *Drosophila melanogaster*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 8, 1–7.

Fabrega J., N. Luoma S., R. Tyler C., S. Galloway T., R. Lead J., (2010). Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. Environment International 37 (2011) 517–531.

Ivanković M. (2011.), Nanomaterijali i nanoproizvodi, mogućnosti i rizici.Polimeri, vol. 32, 23-28.

K. Braydich-Stolle L., Lucas B., Schrand A., C. Murdock R., Lee T., J. Schlager J., M. Hussain S., Claude Hofmann M., (2010). Silver Nanoparticles Disrupt GDNF/Fyn kinase Signaling in Spermatogonial Stem Cells. TOXICOLOGICAL SCIENCES 116(2), 577–589.

Schulz M., Ma-Hock L., Brill S., Strauss V., Treumann S., Gröters S., Van Ravenzwaay B., Landsiedel R., (2012). Investigation on the genotoxicity of different sizes of gold nanoparticles administered to the lungs of rats. Mutation Research 745, 51– 57.

Shukla R., (2007.) Studies on assessment of biocompatibility of Gold and Silver nanoparticles in cell culture for tissue engineering applications.

Das S., Debnat N., Mitra S., Datta A., Goswami A., (2012). Comparative analysis of stability and toxicity profile of three differently capped gold nanoparticles for biomedical usage. Biometals, DOI 10.1007/s10534-012-9567-1

Zhang X-D., Wu D., Shen X., Liu P-X., Fan F-Y., Fan S-J., (2012). In vivo renal clearance, biodistribution, toxicity of gold nanoclusters. Biomaterials 33 4628-4638.

http://www.protocol-online.org/biology-forums-2/posts/13855.html

6. SAŽETAK

Nanotehnologija se bavi česticama veličine do 100 nm zbog njihovih novih zanimljivih svojstava u odnosu na materijale makro dimenzija. Predmetom su proučavanja zbog potencijalne primjene u medicinske i druge najrazličitije svrhe. Nanočestice srebra se već koriste u komercijalne svrhe u raznim antibakterijskim sredstvima, a nanočestice zlata pokazuju potencijal za korištenje u dijagnozi i liječenju raka pa je bitno utvrditi njihove potencijalno toksične učinke na živi svijet. S tim ciljem rađena su istraživanja in vitro i in vivo na različitim modelima kojima je pokazano da se nanočestice srebra i zlata akumuliraju u jetri i slezeni, da mogu izazvati imunološki odgovor te djelovati toksično ovisno o veličini, konjugatima, koncentraciji i vremenu izloženosti tkiva i organa. Toksični učinci nanočestica srebra i zlata su indukcija proizvodnje ROS i RNS, narušavanje integriteta membrane i oštećenje DNA iako postoje i drugi specifični učinci koje još valja istražiti. Nanočestice srebra označene su toksičnijim od onih zlata jer lakše oksidiraju.

7. SUMMARY

Nanotechnology manipulates material at nanoscale (1-100 nm) for its interesting novel properties comparing to those of the materials in macro dimensions. Nanoparticles recieve much interest due to their potential applications in medicine and many other fileds. Silver nanoparticles are commercially available in various antibacterial products while gold nanoparticles show great potential in cancer treatment and diagnositcs. Thus, it is essential to determine possible toxic effects that silver and gold nanoparticles can have on both humans and wildlife. Following that purpose, experiments that have been taken on various different in vitro and in vivo models have shown that silver and gold nanoparticles tend to accumalate in spleen and liver, that they can stimulate immune response and can exert toxic effects depending on the size and capping agents of the particle, as well as on the dose and time of exposure. ROS and RNS production, membrane and DNA damage are some general effects silver and gold nanoparticles can have on cells, although there are many other specific effects that need further investigation. It is believed that silver nanoparticles are more toxic than the gold ones because they oxidize more readily.