

Štetni učinci nanočestica na animalne organizme i ekološke posljedice

Đurić, Marina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:330656>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



**ODJEL ZA
BIOLOGIJU**
Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski studij biologije

Marina Đurić

Štetni učinci nanočestica na animalne organizme i ekološke
posljedice

Završni rad

Mentor:

doc. dr. sc. Sandra Ečimović

Osijek, 2017. godine

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Završni rad
Preddiplomski sveučilišni studij Biologije
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

ŠTETNI UČINCI NANOČESTICA NA ANIMALNE ORGANIZME I EKOLOŠKE POSljedICE

Marina Đurić

Mentor: doc. dr. sc. Sandra Ečimović

Proizvodnja i upotreba nanočestica u posljednje je vrijeme u značajnom porastu. Budući da značajne količine nanočestica dospijevaju u okoliš, time postaju raspoložive živim organizmima koje ih unose i akumuliraju brže nego što ih mogu eliminirati.. Nanočestice u organizmima predstavljaju strane elemente sa vlastitim fizikalno-kemijskim svojstvima zbog svoje male veličine. Dakle, nanočestice mogu imati velikog utjecaja na fiziološke mehanizme zametaka, mladih i odraslih životinja te je neophodno razumjeti izravne i neizravne štetne učinke na životinjske organizme.

U ovome je radu opisano što su to nanočestice, koje vrste nanočestica postoje te koje štetne učinke uzrokuju u animalnim organizmima i samome okolišu. Do sada su istraženi utjecaji nanočestica na brojnim organizmima, a ovaj rad obuhvaća nekoliko primjera do sada najistraženijih kopnenih i vodenih beskrležnjaka i kralježnjaka.

Broj stranica: 18

Broj slika: 5

Broj literaturnih navoda: 21

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: nanočestica, nanotehnologija, ekotoksičnost

Rad je pohranjen u:

knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Department of Biology
Bachelor thesis
Undergraduate study of Biology
Scientific Area: Natural science
Scientific Field: Biology

HARMFUL EFFECTS OF NANOPARTICLES ON ANIMAL ORGANISMS AND ECOLOGICAL CONSEQUENCES

Marina Đurić

Mentor: doc. dr. sc. Sandra Ečimović

Since nanoparticles are manufactured and widely used by the industry, they can be found in land and aquatic habitats where they are consumed by living organisms and accumulated in their bodies faster than they are eliminated. Nanoparticles are foreign to the organisms, with their own physicochemical properties due to their small size. They can have a significant effect on the physiological mechanisms of fetuses, as well as small and adult animals and it is important to understand direct and indirect harmful effects on animals.

The purpose of this paper is to describe nanoparticles, types of nanoparticles and harmful effects they cause to animals and the environment. The effect of nanoparticles has been studied on numerous species, and this paper includes some of the most well researched land and aquatic vertebrates and invertebrates.

Number of pages: 18

Number of figures: 5

Number of references: 21

Original in: Croatian

Key words: nanoparticle, nanotechnology, ecotoxicity

Thesis deposited in:

Library of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek and in National university library in Zagreb in electronic form. It is also available on the web site of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1 Obilježja nanočestica.....	2
1.2. Vrste i primjena nanočestica	2
2. Osnovni dio	4
2.1 Utjecaj nanočestica na kopnene organizme.....	4
2.1.1. Sisavci	4
2.1.2. Gujovice	5
2.2. Utjecaj nanočestica na poluvodene organizme (vodozemce).....	8
2.3. Utjecaj nanočestica na vodene organizme.....	9
2.3.1. Ribe	9
2.3.2. Rakovi	11
2.3.3. Bodljikaši	12
2.3.4. Školjkaši	12
2.4. Veza između nanočestica i okoliša.....	13
3. Zaključak	15
4. Literatura	16

1. Uvod

U posljednjih nekoliko desetljeća upotreba nanočestica i nanotehnologije u svakodnevnom je životu u značajnom porastu. Osnovna definicija nanočestica je da su to čestice s barem jednom dimenzijom manjom od 100 nm. Nanotehnologija je skupni pojam koji podrazumijeva sposobnost za rad s materijalima nanometarske ljestvice. Nanotehnologija ima potencijalne primjene u širokom spektru sektora, od energije (proizvodnje, katalize, skladištenja), materijala (maziva, abraziva, boja, guma i sportskih pribora), elektronike (čipovi i zasloni), optike, hrane (aditivi i pakiranje), kozmetike (losioni za kožu i kreme za sunčanje) i medicine (dijagnostika i isporuka lijeka). Ova širina odražava raznolikost materijala koji se primjenjuju ili će se primjenjivati u različitim djelatnostima (Joner i sur., 2008).

Nanočestice se nalaze i u vodenim i u kopnenim staništima gdje postaju raspoložive živim organizmima koji ih onda unose i akumuliraju u svoje tijelo prije nego ih ukloni imunološki ili neki drugi sustav. U organizmima nanočestice predstavljaju strane elemente s vlastitim fizikalno-kemijskim svojstvima, tako da mogu ometati normalne fiziološke mehanizme zametaka, mladih životinja u razvoju i odraslih. U zametcima, nanočestice često poremete razvoj, dovodeći do malformacija koje mogu biti smrtonosne. Sama veličina nanočestica donosi određena svojstva koja ometaju fizikalne, kemijske i biološke aktivnosti organizma. Zbog svoje male veličine, nanočestice mogu lako prodrijeti preko stanične membrane, izbjegavajući mehanizme obrane. Nanočestice potom migriraju u stanicu i dopijevaju u organele poput mitohondrija, modificiraju metabolizam stanice i izazivaju smrt stanice. Ako nanočestice nisu dovoljno male da prodiru u stanicu, mogu utjecati na staničnu membranu ometajući membranske funkcije kao što su ionski transport ili signalna transdukcija. Kemijski sastav i fizička svojstva nanočestica mogu biti citotoksični, a pozitivni električni naboji nanočestica mogu oštetiti membranske lipidne dvosloje. Osim toga, nanočestice mogu stupiti u interakciju sa drugim zagađivačima koji se unose u organizam (Exbrayat i sur., 2015). Zbog navedenog, važno je istražiti učinke ovih čestica na različitim razinama biološke organizacije sastavnica okoliša (molekularnoj, staničnoj, tkivnoj, populacijskoj).

1.1 Obilježja nanočestica

Nanočestice pripadaju ultrafinim česticama. Tako male čestice imaju svojstva i mogućnosti koje iste tvari veće građe nemaju. Mogu prodrijeti na mjesta gdje veće čestice ne mogu, zbiti se međusobno i time efektivno smanjiti volumen predmeta koji grade. Osim smanjenog volumena, gušće zbijanje nanočestica je važno za čvrstoću i izdržljivost strukture koju grade. Iz velikog omjera površine i volumena nanočestica proizlaze druga svojstva koja ih karakteriziraju, a među njima su visoka reaktivnost, dobra katalitička svojstva i sklonost aglomeraciji. Površina služi kao indirektna mjera veličine čestice. Mogu biti prirodne ili sintetizirane, a u bilo kojem obliku imaju veliki raspon mogućih primjena. Prema nastanku, nanočestice se mogu podijeliti na tri vrste: prirodne (nastaju bez utjecaja čovjeka, npr. morska sol u atmosferi i vulkanska prašina), antropogene (indirektno nastale čovjekovim utjecajem na okoliš, npr. čađa nastala izgaranjem fosilnih goriva) i sintetizirane (vrsta nanočestica koja je dizajnirana i stvorena umjetno) (Okanović, 2014).

1.2. Vrste i primjena nanočestica

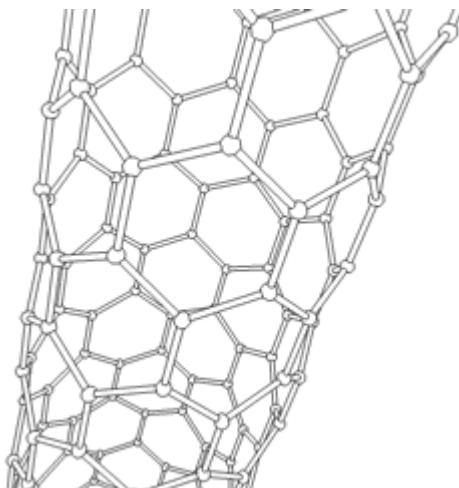
Ugljen

Razlikujemo tri oblika ugljena; crni ugljen, grafit i grafen. Crni ugljen dobiva se nepotpunim izgaranjem ili termalnom razgradnjom ugljikovodika. Ovisno o načinu proizvodnje, mijenjaju se veličina površine i struktura čestica, a o njima ovise svojstva završnog produkta. Čestice s većom površinom koriste se u stvaranju provodnih materijala, a one s manjom površinom koriste se kao strukturni popunjivači. U današnje vrijeme glavna uloga im je strukturno pojačanje, pogotovo u proizvodima od gume (npr. automobilske gume). Od ostalih svojstava važno je navesti UV zaštitu i pigmentaciju, što se primjenjuje u pomorskim ili avijatičarskim djelatnostima u obliku zaštitnih premaza i boja. Grafit je jednodimenzionalni ugljik čiji slojevi imaju debljinu reda veličine manje od nanometra, a razmak između slojeva mjeren u nanometrima omogućava upotrebu grafita kao maziva, smanjujući trenje među premazanim površinama. Grafen je jednoslojni oblik grafita za koji se smatra da ima posebna magnetska svojstva koja rastu s temperaturom i brojem defekata u strukturi (Okanović, 2014.)

Nanocijevi

Nanocijevi su cilindri grafena, obično barem s jedne strane "poklopljeni" fullerenom. Pokazuju izvanrednu snagu i jedinstvena električna svojstva te su odlični toplinski vodiči.

Postoje dvije osnovne vrste: jednozidne (SWNT *single wall nano tubes*) i višezidne (MWNT *multi wall nano tubes*) nanocijevi. Jednozidne nanocijeci (Slika 1) imaju promjer od oko 1nm dok im duljina može biti više tisuća puta veća. Imaju posebna električna svojstva koja ih čine favoritima za buduću minijaturizaciju elektroničkih komponenata. Cijenjene su zbog iznimne čvrstoće i elastičnosti unatoč maloj gustoći (Okanović, 2014).



Slika 1. Jednozidna karbonska nanocijev (web 1).

Metali

Nanočestice od metala već su jako dugo u uporabi, ali tek ih je nekoliko pronašlo širu upotrebu u obliku baterija ili kao sastavni dijelovi eksploziva. Među njima su najzastupljeniji aluminij, srebro, nikal, željezo i kobalt (Okanović, 2014).

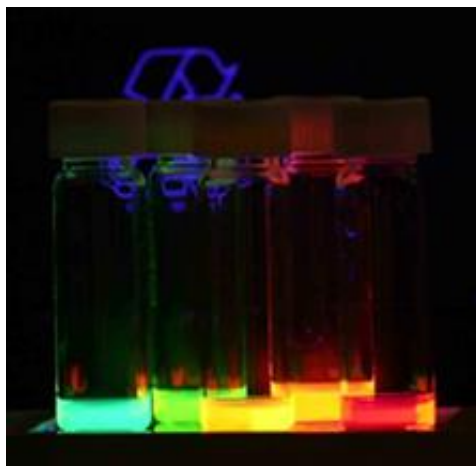
Metalni oksidi

Oni čine najveću skupinu anorganskih nanočestica, od kojih su najpoznatiji titanijevi, cinkovi i silicijski oksidi. Titanijev se oksid koristi u proizvodima koji služe zaštiti od UV svjetla poput krema za sunčanje, boja i premaza, solarnim ćelijama kao fotokatalizatori te u fotokatalitičkom čišćenju voda. Silicijev dioksid, poznat pod imenom silika-gel, svoju je primjenu našao u mnogobrojnim industrijama, među ostalim i u građevinskoj, u obliku aditiva raznim adhezivima, premazima ili cementu. Željezov oksid najčešće je upotrebljavan u kozmetici i dizel industriji kao katalizator u pročišćavanju goriva (Okanović, 2014).

Kvantne točke

Raspored elektrona i rupa u materijalu igraju veliku ulogu kada se radi o kvantnim točkama. Ove poluprovodljive čestice, veličine od 1 - 10 nm imaju kvantna svojstva, odakle

im potječe ime. Stimulacijom proizvode svjetlost (Slika 2), i to u količini obrnuto proporcionalnoj svojoj veličini. Primjenu su našle u proizvodnji višebojnih LED svjetala te kao markeri u biološkim istraživanjima. Spajanjem kvantnih točaka s točno određenom vrstom molekula moguće je uz visoku specifičnost proučavati tkiva. Takva se primjena već našla u medicini, a predviđa se da će u budućnosti imati još veći utjecaj (Okanović, 2014).



Slika 2. Koloidne kvantne točke ozračene UV svjetlom. Različite veličine kvantnih točaka emitiraju različite boje svjetlosti zbog kvantnog ograničenja (web 2).

2. Osnovni dio

2.1 Utjecaj nanočestica na kopnene organizme

2.1.1. Sisavci

Sisavci, a osobito ljudi, izloženi su nanočesticama koje mogu prodrijeti u tijelo inhalacijom ili na transkutani način. U oba slučaja veličina nanočestica omogućava prodiranje endocitozom u stanicu te prodiranje transcitozom u nekoliko stanica, jedna za drugom. Kada se udahnu, nanočestice mogu doći do živčanih krajeva olfaktivnog epitela, zatim uzvodno od aksona do mozga gdje pogađaju moždane neurone. Nanočestice napadaju i pluća, a zatim stižu u krvotok te napadaju krvno-moždanu barijeru. Napadnuti mogu biti i drugi organi poput koštane srži, limfnih čvorova, slezene ili srca. Dokazano je da nanočestice mogu izazvati upalu i aktivnosti prooksidansa i antioksidansa, oksidacijskog stresa i modifikacije mitohondrijske raspodjele (Exbrayat, 2015).

Eksperimenti provedeni sa štakorima i miševima pokazali su štetno djelovanje nanočestica na mozak. U štakora, izlaganje Cu-nanočesticama promjera 40-60 nm izazvalo je proliferaciju endotelnih stanica moždanih kapilara kada su primijenjene niske koncentracije

(oko 1,5 µg / mL). Veće koncentracije (oko 50 µg / mL) inducirale su povećanje prostaglandina E2. Ekstracelularne razine TNFα i ILβ bile su značajno visoke, a toksičnost je konačno utjecala na krvno-moždanu barijeru (Trickler i sur., 2012). Druga studija provedena na štakoru pokazala je da 24-satna ekspozicija Ag-nanočesticama veličine 25, 40 ili 80 nm utječe na krvno-moždanu barijeru izazivajući proupalnu reakciju koja bi mogla prouzročiti upalu mozga uz neurotoksične efekte (Trickler i sur., 2010). Ostali radovi, izvedeni na mozgu štakora ili miša, potvrdili su štetne učinke nanočestica na permeabilnost krvno-moždane barijere što utječe na krvne procese mozga, a time i stvaranje cerebralnog edema. Morfološki učinci mogu uzrokovati ozljede neurona, modifikaciju aktivnosti nekih glija stanica i gubitak mijelinskog vlakna zbog aktivacije HSP (*heat shock proteina*). Učinci Cu-nanočestica i Ag-nanočestica veličine 50-60 nm bili su veći i važniji od učinaka Al-nanočestica iste veličine. Usporedni radovi, izvedeni na svinji, pokazali su patogene učinke Ag-nanočestica veličine 25, 40 i 80 nm, Cu-nanočestica veličine 40 i 60 nm i Au-nanočestica veličine 3 i 5 nm na barijeru krvno-moždanih stanica, uz prigušeni učinak Au-nanočestica. U štakora su 45 nm Ag-nanočestice utjecale na djelovanje acetilkolina uz proizvodnju NO (dušikovog oksida) koji inducira hiperaktivnost trahealnog glatkog mišića (Gonzales i sur., 2011). Kod miša, injekcija Ag-nanočestica promjera 25 nm izazvala je oksidacijski stres. Agregati nanočestica zapaženi su u crvenoj pulpi slezene, plućima, bubrezima te u nosnom zraku, bez značajnih morfoloških promjena osim u nosnoj šupljini. Učinci Au-nanočestica promjera 5 i 15 nm ispitani su na kulturi mišjih fibroblasta. Samo najmanje nanočestice promjera 5 nm predstavile su toksične učinke na oblik stanica koje su postale uske te su tako ometale aktin citoskeleta. Stanice izložene Au-nanočesticama tijekom 72 sata pokazale su degradaciju teškog lanca klatrina, proteina citoskeleta (Coradeghini i sur., 2013).

2.1.2. Gujavice

Zbog učestale upotrebe različitih nanometerijala, brojne nanočestice različitim putevima dopijevaju u okoliš, posebno u tla gdje mogu utjecati na organizme koji se u njemu nalaze.

Gujavice zbog svojih biološko ekoloških osobina znatno doprinose poboljšanju kvalitete tla tako što premještaju i miješaju različite slojeve tla, poboljšavaju prozračivanje, svojim aktivnostima poboljšavaju propusnost za vodu i time pozitivno utječu na hidraulička svojstva tla, te izgrađuju sloj humusa (Edwards i Bohlen, 1992). Osim toga, gujavice čine čak 60% do 80% biomase tla. Zbog svoje ekološke važnosti, brojni istraživanja su provedena kako bi otkrili učinci nanočestica na ove organizme. Nekoliko je metoda korišteno za

razmatranje tih učinaka, od kojih je jedan usmjeren na apoptotski proces. Međutim, različite vrste gujavica ne mogu se smatrati ekvivalentnim modelima u ovim tipovima eksperimenata. *Lumbricus terrestris* endogejna je vrsta (živi duboko u tlu) dok je *Eisenia fetida* epigejna vrsta (cijeli životni ciklus provodi pri površini tla ili komposta). Dakle, te životinje nisu podvrgnute istom toksičnom učinku te su rezultati eksperimenata provedenim na te dvije vrste različiti (Lapied i sur., 2010).

Velik broj istraživanja proveden je na vrsti *Eisenia fetida* (Slika 3). Eksperimenti koji su koristili Ag-nanočestice promjera 20 nm u suspenziji u vodi pokazali su da se broj apoptotičnih stanica povećao s koncentracijom Ag-nanočestica koji nikada nije agregiran. Kod vrste *Eisenia fetida*, navedene su nanočestice uklonjene unutar 24 sata. Učinci nanočestica bili su slabiji u tlu nego u vodi. Apoptotične stanice su opažene u kutikuli i crijevnom epitelu tj. dijelovima tijela koji su bili izravno izloženi nanočesticama. Može se zaključiti da su nanočestice utjecale na proširenu barijeru koja se sastoji od sluzi i antibakterijskih molekula koje nadalje utječu na apsorpciju hranjivih tvari i imunosnu zaštitu, što je uloga kloragogenog tkiva (Lapied i sur., 2010).

TiO₂ ulazi u sastav nekoliko slojeva tla i smatra se inertnim. Ova molekula je naširoko koristi u mnogim industrijskim proizvodima, kao što su kreme za sunčanje. Toksični učinci TiO₂-nanočestica mogu biti povezani s stvaranjem slobodnih radikala s vodom u prisutnosti sunčeve svjetlosti. Istraživanja su pokazala da kod vrste *Eisenia fetida*, TiO₂-nanočestice promjera 10 do 20 nm u koncentracijama većim od 1 g/kg tla utječu na enzimsku aktivnost, dolazi do oštećenja mitohondrija i induciraju apoptozu (Exbrayat i sur., 2015).

Istraživanje vezano za unošenje, izlučivanje i biodistribuciju Co-nanočestica promjera 4 nm i Ag-nanočestica promjera 20 nm te topljivih Co i Ag soli kod vrste *Eisenia fetida*, pokazalo je da su Co ioni i Co-nanočestice bile akumulirane, a da su Ag ioni i Ag – nanočestice vrlo brzo izlučene. Samo 32% nakupljenih Co iona i Co-nanočestica bilo je izlučeno. Visoka nakupina kobalta zabilježena je u krvi i probavnom traktu. Co nanočestice pokazale su otpuštanje iona, dok su Ag ioni i nanočestice bili više inertni (Coutris i sur., 2012).

Pojedine jedinke vrste *Eisenia fetida* bile su izložene tijekom nekoliko tjedana Ag-nanočesticama promjera 30-50 nm obloženih polivinilpirolidonom (PVP) -hidrofilnom supstancom ili oleinskom kiselinom- hidrofobnom supstancom. Neke od njih su bile izloženi i soli AgNO₃. Bez obzira na izvor Ag, gujavice su akumulirale Ag s varijacijama prema koncentraciji. Akumulacija je bila viša s ionima nego sa nanočesticama. Nije zabilježena razlika toksičnosti između nanočestica obloženih PVP-om ili oleinskom kiselinom. Ekspresija

nekoliko gena oksidativnog stresa, aktivnost katalaze, inhibitora glutation-reduktaze, fosfataze i Na^+/K^+ ATPaze varirali su ovisno o koncentraciji i trajanju izloženosti soli AgNO_3 ili Ag-nanočesticama. Bez obzira na oblik u kojem je Ag bio primijenjen, mehanizmi toksičnosti bili su usporedivi (Exbrayat i sur., 2015).

Otrovni učinci ZnO-nanočestica i TiO_2 -nanočestica također su istraženi kod vrste *Eisenia fetida*. U prirodnom tlu, ZnO-nanočestice vrlo su toksične u suprotnosti s TiO_2 -nanočesticama. No, kada su gujavice bile izložene u pješčanim tlima, nije zabilježena nikakva toksičnost, bez obzira na vrstu nanočestica. Nakon četiri mjeseca izloženosti umjetnim tlima, na reprodukciju gujavica utjecala su obje vrste nanočestica. Toksični učinci ZnO-nanočestica bili su značajniji od učinaka TiO_2 -nanočestica (Coutris i sur., 2012).



Slika 3. *Eisenia fetida* u svome prirodnom staništu-tlu (web 3).

Lumbricus, drugi rod gujavica, također je korišten za ispitivanje nekih bioloških učinaka nanočestica. Kod *Lumbricus terrestris* izloženih Ag-nanočesticama, stupanj apoptoze bio je mjera za procjenu toksičnosti Ag-nanočestica koje su svoju široku primjenu našle kao antimikrobne tvari za radnu odjeću. Nekoliko eksperimenata pokazalo je da apoptoza utječe na crijevni epitel kada je izravno u kontaktu s nanočesticama, posebice u tiflosolu u kojem apoptoza utječe na kloragogene stanice koje imaju funkciju usporedivu s jetrom kod kralježnjaka ili hepatopankreasa u školjkaša i člankonožaca (Exbrayat i sur., 2015).

Kada su u hranu za *Lumbricus terrestris* dodane TiO_2 -nanočestice obložene $\text{Al}(\text{OH})_3$ i polidimetilsiloksanom, nije zabilježeno povećanje apoptotičkih stanica. Ako su iste nanočestice raspršene u tlu, broj apoptotičnih stanica povećao se u kutikuli, kao kod životinja

izloženim nanočesticama u vodi. Konačno, učinci TiO₂-nanočestica nisu bili značajno različiti između vode i tla. Učinci inducirani TiO₂-nanočesticama bili su slabiji od Ag-nanočestica, a u oba su slučaja bila pogođena ista tkiva. Kod životinja uzgojenih u vodi, TiO₂-nanočestice nakupljale su se u lumenu crijeva, ali nikad u tkivima. U *Lumbricus terrestris* zabilježeni su štetni učinci TiO₂-nanočestica pri nižim koncentracijama (100 mg/kg) od onih u vrste *Eisenia fetida* (1000 mg / kg) (Exbrayat i sur., 2015).

2.2. Utjecaj nanočestica na poluvodene organizme (vodozemce)

Ličinački život vodozemaca vezan je za vodu s prilagođenom anatomijom i fiziologijom. Udišu preko škrge, crijevo je osobito izduženo za biljnu hranu, ekskretorni sustav prilagođen vodi s jakim uklanjanjem vode iz organizma te posjeduju rep i repne peraje kako bi se kretali plivanjem. Kada postanu kopneni organizmi, podvrgavaju se metamorfozi koja je kritično razdoblje njihova života. Ova faza je karakterizirana važnim promjenama dišnog sustava uključujući nestanak škrge i razvoj pluća te se zbog toga mijenja cirkulacijski sustav. Škrge nestaju, aortalni lukovi postaju zaduženi za mali i veliki optok krvi. Bubrezi postaju organi za izlučivanje s mogućnošću štednje vode. Kod nekih vrsta rep nestaje, a kod nekih ostaje. Kod većine vrsta razvijaju se prednje i stražnje noge. Životinja je u životnoj fazi metamorfoze vrlo krhka. Metamorfoza je pod kontrolom štitnjače i hipofize pa su vodozemci izvrsni modeli za procjenu toksičnih učinaka nanočestica na hipofizu i štitnjaču.

U nekoliko eksperimenata ispitivano je djelovanje nanočestica na stres i hormone štitnjače upotrebom *in vitro* kultura kaudalnih peraja u žabe *Rana catesbeiana*. Kod ove vrste zabilježeni su učinci Ag i ZnO-nanočestica na ekspresiju gena trijodotironina (T3) pomoću qPCR-a. Rezultati su uspoređeni s onim dobivenim za tkiva izloženima AgNO₃, Ag česticama od nekoliko µm, te česticama Cd koje su također iznosile nekoliko µm. Ag-nanočestice utjecale su na ekspresiju transkriptata vezanih za T3. ZnO-nanočestice nisu imali nikakav učinak. Male koncentracije Ag-nanočestica su poremetile signalizaciju T3 hormona bez izazivanja bilo kakvog stresa (Hinter i sur., 2010).

Istraživanja na epitelnim sojevima vrste *Xenopus laevis* pokazala su da je toksičnost bakra u tri različita oblika: Cu ++, CuO-nanočestice promjera 6nm i agregat CuO-nanočestica promjera 100nm. Citotoksični učinci bili su različiti ovisno o vrsti spoja te o stadiju staničnog ciklusa. Kod mitotičkih stanica tretiranih sa sve tri vrste tvari, nakon nekog vremena zaustavljena je njihova podjela značajnim povećanjem broja apoptotičnih stanica, ovisno o vrsti Cu supstancije (Thit i sur., 2013).

Istraživanje o embrionalnom razvoju vodozemaca pokazalo je slab smrtonosni učinak na zametke, ali ranu smrt u najvišim koncentracijama. CuO-nanočestice, TiO₂-nanočestice i ZnO-nanočestice nisu izazvale smrt embrija, već su izazvale teratogene učinke, posebno na crijevu kada su koncentracije bile veće od 50 mg/L. ZnO-nanočestice izazvale su najštetnije učinke na crijevnu barijeru, gdje dopiru do vezivnog tkiva. TiO₂-nanočestice slabo su teratogene s možda skrivenim fiziološkim učincima. Procjena toksičnih učinaka TiSiO₄-nanočestica pokazala je smrtnost manju od 11% u punoglavaca vrste *Pelophylax perezi* (*Rana perezi*). Uočeni su važni učinci na laktat i melanin, što je posljedica povećanja oksidativnog stresa. TiSiO₄-nanočestice svakako su imale dugoročne učinke na te životinje (Salvaterra i sur., 2013).

Suprotno općim štetnim učincima nanočestica, neki eksperimenti pokazali su da ZnO-nanočestice veće od 40 nm mogu poboljšati nekoliko vizualnih funkcija. Elektroretinogramom (ERG) ustvrđeno je da te nanočestice znatno povećavaju amplitudu valne duljine kod žabe krastača kada su bile izložene svjetlu. Osim toga, ZnO-nanočestice poboljšale su vizualnu osjetljivost i skratile vrijeme regeneracije rodopsina, pigmenta koji je uključen u osjetljivost na svjetlost (Exbrayat i sur., 2015).

2.3. Utjecaj nanočestica na vodene organizme

2.3.1. Ribe

Velike količine nanočestica nalaze se i u morskom i u slatkovodnom okolišu. Nekoliko radova provedenih na vodenim organizmima omogućilo je poznavanje učinaka tih nanočestica. Međutim, ti efekti su promjenjivi. Dosadašnje studije smatraju nanočestice kao novu vrstu zagađivača u okolišu čiji učinci ovise o njihovoj veličini, ali još uvijek nisu dovoljno istraženi. Razni životinjski modeli korišteni su za procjenu prirode tih štetnih učinaka; neki su usredotočeni na ribe koštunjače, osobito na zebricu *Danio rerio* (Slika 4) ili na pastrvu *Onchorynchus mykiss* dok su ostali usmjereni na rakove, mekušce i planktone.

Učinci ZnO-nanočestica istraženi su na *in vitro* kulturama sojeva hepatocita koji dolaze od ljudi i ribe. Te su nanočestice agregirane, što snažno doprinosi toksičnosti na ribljim stanicama. Za ljudske stanice, toksičnost bi bila uzrokovana otopljenim solima koji su oslobođene iz nanočestica. Komparativna studija izvedena *in vivo* na zebrici (*Danio rerio*) i *in vitro* kulturi tumorskih humanih hepatocita Huh7 pokazala je da Ag-nanočestice promjera 120 nm prodiru u hepatocyte inducirajući oksidacijski stres karakteriziran prisutnošću ROS molekula, utječu na ekspresiju INF α i rad endoplazmatskog retikuluma (ER). Promatrane su

i transkripcijske promjene p53 i Bax gena uključenih u apoptozu. Ipak, neke su razlike zabilježene između ribe i ljudskih hepatocita, što upućuje na postojanje nekoliko mehanizama stresa povezanih s modifikacijom endoplazmatskog retikuluma. Također je zamijećen utjecaj Ag-nanočestica na razvoj zametaka zebrica nastankom malformacija (Christen i sur., 2013).

In vitro studije na zebrici pokazale su da Ag-nanočestice uzrokuju neurotoksične učinke koji su različiti od utjecaja Ag⁺ iona. Učinci Ag-nanočestica s različitim veličinama (promjera 12 i 28 nm), Ag-nanočestica obloženih PVP-om (promjera 45, 63, 65 i 324 nm) i Ag iona bili su različiti i na razvoj embrija. Ag⁺ ioni usporili su razvoj plivajućeg mjehura, implicirajući i nekoliko malformacija dok su učinci Ag-nanočestica bili slabiji. Ponašanje riba je također modificirano uz dodatni svjetlosni podražaj; najmanje nanočestice obložene PVP-om izazvale su hiperaktivnost, a najveće PVP-om obložene nanočestice izazvale su hipoaktivnost. Detaljne analize su pokazale da su učinci Ag-nanočestica promjera 1-20 nm na embrijima zebrica opaženi i u živčanom sustavu odraslih zebrica. Ag ioni oslobođeni iz Ag-nanočestica povećavaju smrtnost i malformacije. Također su kod embrija zebrica Ni-nanočestice bile odgovorne za smrtnost i inducirane malformacije. Crijeva su postala vrlo tanka u kontaktu s Ni-nanočesticama, skeletni mišići su također bili pogođeni sa Ni-nanočesticama te topivim niklom. Veliki klasteri agregiranih Ni-nanočestica promjera 60nm s dendritom strukturom bili su osobito toksični i na crijevnim i skeletnim mišićima što govori da je konfiguracija Ni (u obliku nanočestice, agregata ili iona) važnija od njegove veličine. Au-nanočestice promjera 10 nm raširile su se u sve dijelove tijela u embrijima zebrica. Dobivene malformacije mogu biti uzrokovane slučajnom raspodjelom Au-nanočestica u stanicama tijekom razvoja. Uspoređujući toksičnost ovisno o kemijskim svojstvima, Au-nanočestice manje su štetne od Ag-nanočestica. Dakle, zametci zebrica (*Danio rerio*) mogu se koristiti kao *in vivo* modeli, osobito u pogledu biokompatibilnosti materijala (Exbrayat i surr., 2015).



Slika 4. Slatkovodna riba zebrica *Danio rerio*, čest model u istraživanjima toksičnosti nanočestica (web 4).

Zebrice su zasigurno dobar model za proučavanje utjecaja nanočestica, ali se u velikoj mjeri koriste i druge vrste riba kao što su pastrve. Učinci TiO₂-nanočestica i C-nanočestica istraženi su u hepatocitima pastrve. Ispitivani učinci odnosili su se na nanomaterijale koje se trenutno koriste, kao što su C60 fulereni, MWNT i SWNT nanocijevi te TiO₂-nanočestice koji mjere od 5 do 200 nm. Pokusi su pokazali da navedene tvari pokazuju ekotoksikološke učinke. U vrsti *Onchorynchus mykiss* uspoređeni su učinci Cu-nanočestica promjera 87 nm i CuSO₄. Mlade pastrve bile su izložene s nekoliko koncentracija CuSO₄ i Cu-nanočestica. Akumulacija nanočestica i CuSO₄ je zabilježena u škragama, ali s različitim omjerima. Povećanje Cu je primjećeno i sa Cu-nanočesticama i sa soli. Cu-nanočestice nisu bile toksične za hidromineralnu regulaciju, ali smanjenje Na + / K + ATPaze je zabilježeno u mozgu i crijevima. Toksični učinci Cu-nanočestica slični su učincima CuSO₄, ali pri nižim koncentracijama. Izloženost *Onchorynchus mykiss* TiO₂-nanočesticama promjera 20 nm izazvano je nekoliko patologija na škragama karakteriziranih edemom i debljinom škržnih lamela. Zabilježeno je smanjenje Na + / K + ATPaze u škragama i crijevima. Koncentracija tiobarbiturne kiseline (TBA), ovisno o koncentraciji nanočestica, povećavala se u škragama i mozgu. Manja varijacija lipida uočena je u jetri u kojoj je nekoliko hepatocita postalo apoptozno (Shaw i sur., 2012).

2.3.2. Rakovi

Kod vrste *Daphnia magna* (Slika 5), istražen je utjecaj AgNO₃ i rezultati su pokazali utjecaj na reprodukciju, dok Ag-nanočestice promjera 20nm utječu na rast. Nekoliko tipova TiO₂-nanočestica koji se koriste u industriji pokazali su fotokatalitičke učinke na *Daphnia magna*, tj. učinci tih tvari bili su različiti ovisno o količini svjetla i prirodi čestica.. Toksični učinci Ag-nanočestica kada je Ag vezan za PVP ili kolargol (koloidno srebro) bili su vrlo jaki za *Daphnia magna* i *Thamnocephalus platyurus*, u usporedbi s učinkom AgNO₃. Ag-nanočestice 10 puta su toksičnije od AgNO₃. Istraživani su i toksični učinci AgNO₃, koloidne otopine Ag-nanočestica promjera 15nm te učinci suspenzije Ag-nanočestica koje tvore agregate od 25 do 100 nm, također u vrsti *Daphnia magna*. Teratogeni učinci i posljedice na plivanje uočeni su ovisno o koncentraciji i obliku Ag čestica. Agregati suspenzije Ag-nanočestica bili su najštetniji; nanočestice su bile fiksirane ispod karapaksa rakova, koji izravno utječu na plivanje životinja (Asghari i sur., 2012). *Daphnia magna* izložena algama kontaminiranih s TiO₂-nanočesticama

pokazala je nakupljanje Ti unutar probavnog trakta. Kad je izloženost bila kronična, rast i reprodukcija su se smanjili. (Exbrayat i sur., 2015.)



Slika 5. Velika vodenbuha *Daphnia magna*, slatkovodni planktonskih račić (web 5).

2.3.3. Bodljikaši

Učinci metalo-oksidnih nanočestica (SnO_2 -, CeO_2 -, Fe_3O_4 -nanočestica) testirani su na imunološkim stanicama u morskom ježu *Paracentrotus lividus*. Nanočestice su pronađene u celomocitima, imunološkim stanicama morskih ježeva. Ove stanice pokazale su značajno smanjenu aktivnost kolinesteraze, podregulaciju stresnih proteina i varijabilne morfološke promjene ER lizosoma (Falugi i sur., 2012).

2.3.4. Školjkaši

Kod školjkaša, uočen je utjecaj nanočestica na imunološki sustav. Veliki broj istraživanja odnosi se na učinke nanočestica na imunološki sustav dagnje *Mytilus galloprovincialis*. Hemociti su apsorbirali nekoliko tipova nanočestica koje su utjecale na nekoliko parametara kao što su lizosomna aktivnost, sposobnost fagocitoze, proizvodnja slobodnih radikala ili povećanje apoptotičke aktivnosti. U kamenicama *Crassostrea gigas*, ekspozicija s nekoliko vrsta nanočestica izazvala je i učinke na oksidacijski stres i lizosomalnu aktivnost i apoptozu, osobito u škragama i probavnim žlijezdama te utjecaj na embrionalni razvoj. Akumulacija nanočestica također je zabilježena u nekoliko tkiva ovisno o prirodi nanočestica. Kod *Mytilus edulis*, TiO_2 -nanočestice pokazale su i istraživanjima *in vivo* određene imunomodulatorske učinke. TiO_2 -nanočestice se agregiraju u vodi, a zatim se mogu

zalijepiti na škrge, ući izravno u probavnu žlijezdu i prodirati u stanice s posljedičnim lizosomskim perturbacijama i modifikacijom ekspresije gena koji su uključeni u antioksidacijski stres i na imuni odgovor, osobito lizozima i antimikrobnih peptida. Nanočestice mogu biti izbačene iz probavnog trakta kroz hemolimfu i kroz hemocite u kojima induciraju funkcionalne modifikacije, posebice lizosomsku funkciju, fagocitozu, proizvodnju NO i ROS molekula koje su uključene u oksidativni stres, s iniciranjem apoptoze i u membrani i u mitohondrijima. Također su zapažene značajne varijacije ekspresije antioksidacijskih i imunoloških gena. TiO₂-nanočestice potiču podregulaciju imunih gena u probavnoj žlijezdi i hiperregulaciju tih istih gena u hemocitima (Canesi i Prochazkova, 2014).

2.4. Veza između nanočestica i okoliša

Čimbenici okoliša mogu pridonijeti toksičnosti nanočestica. Vremenski uvjeti kao što su vlažnost, temperatura, brzina protoka vjetra, zemljopisna širina i priroda svjetlosti mogu utjecati na određena svojstva nanočestica koji potiču njihovu toksičnost. Na višim temperaturama, nanočestice se mogu dispergirati u većoj mjeri u usporedbi s nižim ili normalnim temperaturama. Poznata je činjenica da se nanočestice ponašaju različito pod različitim svjetlima, kao što su vidljiva i ultraljubičasta svjetlost. Brzina vjetra može pomoći ovim iznimno malim česticama da bolje prodiru u biljna i životinjske tkiva (Sajid i sur., 2015).

Ljudska i ekološka izloženost antropogenim nanočesticama u zraku znatno se povećala posljednjih nekoliko desetljeća uglavnom zbog procesa uzrokovanih nepravilnim sagorijevanjem te zbog sve većeg napretka u razvoju i primjeni nanotehnologije. Mnoga su istraživanja usredotočena na nanočestice u svrhu zaštite okoliša. Nanočestice u okolišu djeluju kao preteča većih čestica koje snažno utječu na kemiju atmosfere, globalne klimatske promjene, vidljivost, globalne i regionalne Transporte bioloških vrsta i onečišćenje tvari. Prisutnost nanočestica u zraku može uvelike utjecati na ljudsko zdravlje i povećati utjecaj drugih onečišćivača u okolišu. Nanočestice utječu na kemiju atmosfere u smislu sastava i reaktivnosti, što dovodi do stvaranja aglomerata i većih čestica čađe (Pipal i sur., 2014).

Najznačajnija područja na koja se treba usredotočiti uključuju procjenu životnog ciklusa post-produkcije nanočestica u smislu ulaznog mehanizma i putova u okolišu te toksičnih učinaka na sam ekosustav. Najznačajniji procesi koji se javljaju tijekom transporta i sudbine nanočestica u okolišu uključuju taloženje, agregaciju, otapanje, kemijsku

transformaciju, oksidaciju i interakciju s organskom materijom i koloidima. Intenzivnom uporabom nanočestica u pesticidima, aerosolnim sprejevima, četkicama za zube, pastama za zube, filterima, kremama, strojevima za pranje i slično, povećala se zabrinutost za okoliš.

Nedavne studije procjenjuju da se godišnje u okoliš oslobodi oko 8,300 tona nanočestica širom svijeta. Ipak, točne koncentracije ispuštenih nanočestica teško je procijeniti. Izravan unos nanočestica u okoliš može proizlaziti iz namjernog i nenamjernog raspadanja proizvoda, iz industrijskih i otpadnih voda, mulja, pesticida i izgaranja. Pri oslobađanja nanočestica u okoliš, njihova veličina se povećava zbog kondenzacije čestica nukleacijom organskih i anorganskih para, taloženjem, koagulacijom, aglomeracijom i reakcijama s biomolekulama (Sajid i sur., 2015).

3. Zaključak

Nanotehnologija je brzo rastuće područje djelovanja koje omogućuje razvoj materijala s novim svojstvima. Nanočestice se sve više koriste i ulaze u sastav različitih tvari kao što su SIM kartice mobitela, kreme za sunčanje, boje i maziva, automobilske gume pa čak i aditivi u hrani. Nakon konzumacije tih proizvoda, slobodne se nanočestice oslobađaju u okoliš, te dopiru u zrak, vodeni medij i tla te tako postaju raspoložive organizmima koji se nalaze u okolišu. Dosadašnja istraživanja otkrila su kako oslobođene nanočestice mogu proći kroz različite zaštitne barijere, raspodjeliti se po tijelu organizama i akumulirati u mnoge organe. Toksični učinci nanočestica zabilježeni su na plućnim, srčanim, reproduktivnim, bubrežnim, kožnim i staničnim razinama, a značajne akumulacije tj. nakupljanje nanočestica zapažene su u plućima, mozgu, jetri, slezeni i kostima. Štetni učinci nanočestica izravno su povezani s njihovim kemijskim sastavom. Toksičnost se može pripisati i njihovoj veličini manjoj od 100 nm. Zbog njihove male veličine, nanočestice imaju veliku kontaktnu površinu po jedinici mase. Također, nanotoksičnost se može pripisati elektrostatskoj interakciji između nanočestica s biomembranama i njihovim nakupljanjima u citoplazmi.

Do sada su provedena mnoga istraživanja o štetnim učincima nanočestica na mnogim animalnim organizmima čiji je život vezan za tlo (sisavci i gujovice), na poluvodenim organizmima (vodozemcima) te na vodenim organizmima, i slatkovodnim i morskim (ribama, školjkašima, rakovima). Učinci nanočestica počinju biti poznati, ali istraživanja treba nastaviti s velikim naporima kako bi se omogućila učinkovita zaštita okoliša.

4. Literatura

Asghari, S., Johari, S.A., Lee, J.H. (2012). Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. *Journal of Nanobiotechnology*. 10, 14, 1–11.

Canas, J.E., Qi, B., Li, S. (2011). Acute and reproductive toxicity of nano-sized metal oxides (ZnO and TiO₂) to earthworms (*Eisenia fetida*). *Journal of Environmental Monitoring*. 13, 12, 3351-3357.

Canesi, L., Prochazkova, P. (2014). The invertebrate immune system as a model for investigating the environmental impact of nanoparticles. *Nanoparticles and the Immune System. Safety and Effects*. 7, 91–112.

Christen, V., Capelle, M., Fent, K. (2013). Silver nanoparticles induce endoplasmatic reticulum stress response in zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 272, 2, 519–528.

Coradeghini, R., Gioria, S., García, C.P. (2013). Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts. *Toxicology Letters*. 217, 3, 205–216.

Coutris, C., Hertel-Aas, T., Lapied, E., Joner, E.J., Oughton, D.H. (2012). Bioavailability of cobalt and silver nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*. *Nanotoxicology*. 6, 2, 186–195.

Edwards, C.A., Bohlen, P.J. (1996). *Biology and Ecology of Earthworms*. Chapman & Hall, London, 426.

Exbrayat, J.M., Moudilou, E., Lapied, E. (2015). Harmful Effects of Nanoparticles on Animals. *Journal of Nanotechnology*. 2015, 1-10.

Falugi, C., Aluigi, M. G., Chiantore, M. C. (2012). Toxicity of metal oxide nanoparticles in immune cells of the sea urchin. *Marine Environmental Research*. 76, 114–121.

González, C., Salazar-García, S., Palestino, G. (2011). Effect of 45nm silver nanoparticles (AgNPs) upon the smooth muscle of rat trachea: role of nitric oxide. *Toxicology Letters*. 207, 3, 306–313.

Hinther, A., Vawda, S., Skirrow, R.C. (2010). Nanometals induce stress and alter thyroid hormone action in amphibia at or below North American water quality guidelines. *Environmental Science and Technology*. 44, 21, 8314–8321.

Joner, E.J., Hartnik, T., Amundsen, C. (2008). Environmental fate and ecotoxicity of engineered nanoparticles. Norwegian Pollution Control Authority Report. 1–64.

Lapied, E., Moudilou, E., Exbrayat, J-M., Oughton, D. H., Joner, E. J. (2010). Silver nanoparticle exposure causes apoptotic response in the earthworm *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Nanomedicine*. 5, 6, 975–984.

Okanović, E. (2014). Profesionalna izloženost nanočesticama kao zdravstveni rizik. Diplomski rad. Zagreb: Medicinski fakultet.

Pipal, A. S., Taneja, A., Jaiswar, G. (2014). Chemistry: the key to our sustainable future. In: Gupta Bhowon M, Jhaumeer-Laulloo S, Li Kam Wah H, Ramasami P (eds) Springer Netherlands, Dordrecht. 93–103.

Sajid, M., Ilyas, M., Basheer, C. (2015). Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects. *Environmental Science and Pollution Research*. 22, 4122–4143.

Salvaterra, T., Alves, M. G., Domingues, I. (2013). Biochemical and metabolic effects of a short-term exposure to nanoparticles of titanium silicate in tadpoles of *Pelophylax perezi* (Seoane). *Aquatic Toxicology*. 128-129, 190–192.

Shaw, B.J., Al-Bairuty, G., Handy, R.D. (2012). Effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): physiology and accumulation. *Aquatic Toxicology*. 116-117, 90–101.

Thit, A., Selck, H., Bjerregaard, H.F. (2013). Toxicity of CuO nanoparticles and Cu ions to tight epithelial cells from *Xenopus laevis* (A6): effects on proliferation, cell cycle progression and cell death. *Toxicology in Vitro*. 27, 5, 1596–1601.

Trickler, W.J., Lantz S.M., Murdocketal, R.C. (2010). Silver nanoparticle induced blood-brain barrier inflammation and increased permeability in primary rat brain microvessel endothelial cells. *Toxicological Sciences*. 118, 1, 160–170.

Trickler, W. J., Lantz, S. M., Schrand, A.M. (2012). Effects of copper nanoparticles on rat cerebral microvessel endothelial cells. *Nanomedicine*. 7, 6, 835–846.

Web izvori:

1.url: https://en.wikipedia.org/wiki/Carbon_nanotube

2.url: https://en.wikipedia.org/wiki/Quantum_dot

3.url: https://en.wikipedia.org/wiki/Eisenia_fetida#/media/File:Eisenia_fetida_HC1.jpg

4.url: <https://hr.wikipedia.org/wiki/Zebrica>

5.url: https://en.wikipedia.org/wiki/Daphnia_magna