

# 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:057141>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

TOKSIČNOST NANOESTRUKTURA 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 Kloiber

Zagreb, 2012.

## SADRŽAJ

<b>1. Uvod</b>	
<b>2. Toksi nost nano estica zlata</b>	
2.1 Stabilnost nano estica zlata ovisi o površinskim konjugatima	5.
2.2 <i>In vitro</i> studije citotoksi nosti nano estica zlata	6.
2.3 Imunogeni nost nano estica zlata	6.
2.4 Utjecaj nano estica zlata na stani nu morfologiju	8.
2.5 Akutna oralna toksi nost nano estica zlata u miša	9.
2.6 Biodistribucija i bubrežna ekskrecija nano estica zlata	11.
2.7 Genotoksi nost nano estica zlata	12.
2.8 Mutageni u inak nano estica zlata na modelu vinske mušice	13.
<b>3. Toksi nost nano estica srebra</b>	
3.1 <i>In vitro</i> studije toksi nosti nano estica srebra	14.
3.2 <i>In vivo</i> studije toksi nosti nano estica srebra	15.
3.3 Molekularni mehanizmi toksi nosti nano estica srebra	15.
<b>4. Zaklju ak</b>	<b>16.</b>
<b>5. Literatura</b>	<b>17.</b>
<b>6. Sažetak</b>	<b>18.</b>
<b>7. Summary</b>	<b>18.</b>

## 1. UVOD

Nanotehnologija podrazumijeva sintezu i primjenu estica 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.

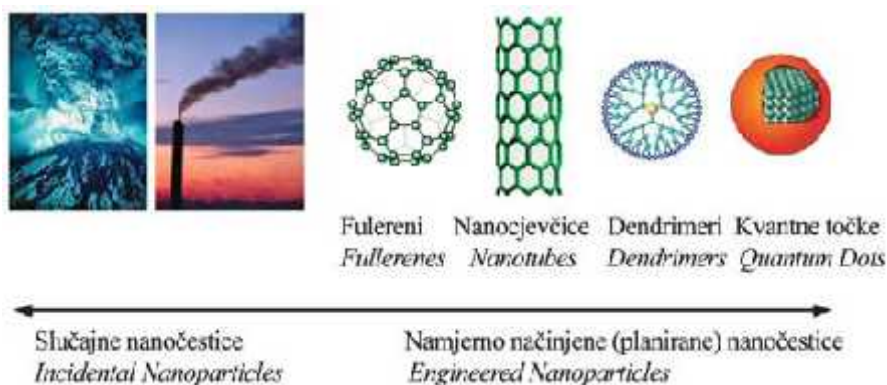
Fizikalna svojstva nano estica razlikuju se bitno od svojstava estica veće dimenzija. Bilo koji materijal sveden na veličinu u nanometrima ima drugačija svojstva koja ponekad mogu rezultirati u neekvivanom ponašanju tog materijala. Npr. izolatori postanu vodljivi, netopljive tvari topljivima jer na vidjelo izlaze kvantno mehaničke značajke pojedinih atoma unutar materijala.

Iako je nanotehnologija relativno mlada znanost, ovdje anstvu su nano estice 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 lanom 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 vrlo široku primjenu u gotovo svim poljima ljudske djelatnosti upravo zbog jedinstvenih svojstava nano estica. Poznato je da smanjenjem veličine estice za određeni volumen materijala znatno raste broj atoma na njenoj površini, tj. povećava se omjer površine i volumena. Zbog toga se nano estice koriste u katalizi. Primjerice zlato, iako plemeniti metal u makro dimenzijama, kao nano estice dispergirane u aluminij ili željezo oksidu katalizira oksidaciju ugljikova monoksida. Nadalje, mehaničke i magnetna svojstva nano estica također su jedinstvena upravo zbog omjera površine naspram volumena. Nano estice 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. Nano estice 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 nano estica proizlaze iz zajedničke oscilacije elektrona vodljive vrpce nano estice koji ekscitirani svjetlošću u momentuma istog njihovom povećaju amplitudu oscilacije. Međutim, amplituda se brzo smanjuje putovanjem kroz dielektrično okoliš. Opažene promjene boje rezultat su dakle apsorpcije prilikom pobuđivanja elektrona. Primarni interes za

nano estice na polju je biologije i medicine. Njihova primjena u dijagnostici, kulturi tkiva i razvoju u inkovitijih na ina primjene lijekova name e potrebu za istraživanjem njihove biokompatibilnosti. To je vrlo zahtjevan posao jer postoje brojni na ini za njihovu sintezu i modifikaciju odnosno funkcionalizaciju te je potreban individualni pristup u istraživanju svake pojedine vrste nano estica. Njihovoj potencijalnoj toksi nost može biti uzrok veli ina, molekule kojima su konjugirane ( u eng. literaturi *capping agents*), na in pripreme itd. Uglavnom vrijedi da se smanjenjem veli ine pove ava toksi nost (Prema Shukla R., 2007.)

Prema podrijetlu, nano estice 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. Tehni ke nano estice ( kvantne to ke, dendrimeri) stvorene su radi iskorištavanja svojstava poput vodljivosti, spektralnih svojstava, bioraspodjele karakteristi nih za nanorazinu. Ugljikove nanocjev ice i fulereni mogu pripadati i jednoj i drugoj skupini. Na slici 1. Prikazani su ti ovi nano estica . (Prema Ivankovi M., 2011.)



**Slika 1.** Vrste nano estica

Nanotoksikologija kao grana znanosti unutar nanotehnologije ima za cilj odrediti potencijalne štetne uinke nano estica na organizme kao i sudbinu nano estica u okolišu. Istraživanja se temelje na prouavanju citotoksi nosti, imunotoksi nosti i imunogeni nosti nano estica in vitro i in vivo. Neki od mogu ih dosad opaženih patofizioloških u inaka nano estica prikazani su u tablici 1. (Preuzeto i prilago eno prema Shukla R. 2007.)

**Tablica 1. Toksi ni i patofiziološki učinci nanomaterijala**

<b>Eksperimentalni efekti NM</b>	<b>Mogući patofiziološki učinci</b>
Stvaranje ROS	Oštećenje membrane, proteina i DNA, oksidativni stres
Oksidativni stres	Indukcija enzima faze 2., upala, perturbacija mitohondrija
Perturbacija mitohondrija	Oštećenje unutarnje membrane, promjene u permeabilnosti otvaranje pora, energetska 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 zgrušavanje krvi
Stvaranje neoantigena, smanjivanje imunotolerancije	autoimunost, efekt adjuvansa
Oštećenje DNA	mutageneza, metaplazija, karcinogeneza

Nano estice plemenitih metala lako se pripremaju, jednostavno biokonjugiraju i njihova se optička svojstva mogu kontrolirati. Nano estice zlata odavno se koriste u vizualiziranju substanci njihovim komponenti elektronskom mikroskopijom. Nadalje, pokazalo se da nano estice zlata posebne strukture 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 nano estica srebra i zlata unutar i izvan stanice te o njihovoj biokompatibilnosti.

## **2.1 Stabilnost nano estica zlata ovisi o površinskim konjugatima**

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

kiselom i pri bazi nom 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 odgovaraju ih nano estica za biološku uporabu. Injenica da serumski albumin štiti od aglomeracije daje naslutiti isti slučaj u sustavima in vivo.

## 2.2 In vitro studije citotoksičnosti nano estica zlata

Sumistha Das i suradnici (2012) analizirali su citotoksičnost spomenuta tri tipa nano estica (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 disulfon) koju reducira mitohondrijski enzim sukcinat-reduktaza na ljubičasti produkt formazan u živim stanicama što se mjeri spektrofotometrijski. Za sva tri tipa nano estica 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<sub>50</sub> 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 nano estica zlata različitih u promjeru (4, 12, 18 nm) i različito konjugiranih (citrat, cistein, glukoza, biotin, cetiltrimetilamonij-bromid) na ljudskim tumorskim limfocitima (Connor et al. 2005.). Shukla Ravi i suradnici (2007) proučavali su citotoksičnost nano estica 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 rastu tim koncentracijama nano estica 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 koncentraciji iznosio je otprilike 65%. Ovo saznanje daje mogućnost korištenja nano estica zlata u selektivnom uzgoju stanica epitela, sprječavanju kontaminacije kultura stanica fibroblastima te u cijeljenju rana za sprječavanje stvaranja ožiljaka.

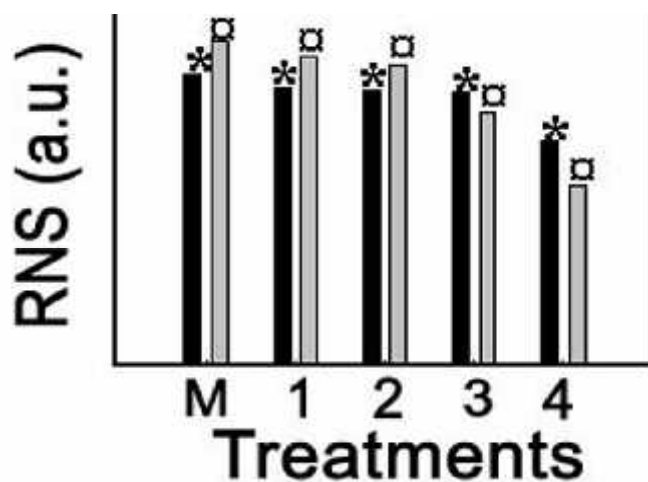
Deleted:

## 2.3 Imunogeni učinak nano estica zlata

Citotoksičnost nije jedini mehanizam djelovanja nano estica. 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 utjecaj 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 rastu im koncentracijama koloidnog zlata tijekom 24 i 48 sati.

Makrofagi su glavne imunoregulacijske stanice i ine 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-oksidsintazom te degranulacija i otpuštanje lizosomskih enzima na površinu ciljne stanice. U slučaju endocitoze nanoestica 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 100μ nanoestica zlata.

Proizvodnja ROS mjerena je prototom citometrijom na fluorescencijom aktiviranom razvrstava u stanica. ROS su esencijalni intermedijeri oksidativnog metabolizma, ali pretjerano proizvedeni peroksidiraju lipide, narušavaju strukturu proteina, enzima i nukleinskih kiselina. Prototom citometrom vizualizirana je internalizacija nanoestica zlata u mišjim tumorskim makrofagim u ovinosti o dozi i vremenu na temelju razlika u raspršivanju svjetlosti. Makrofagi koji su sadržavali nanoestice zlata razvrstavani su citometrom prema razini fluorescencije koja je direktno ovisna o proizvodni ROS. Naime, 2,7-dikloro-dihidro-fluorescein-diacetat (H<sub>2</sub>DCF-



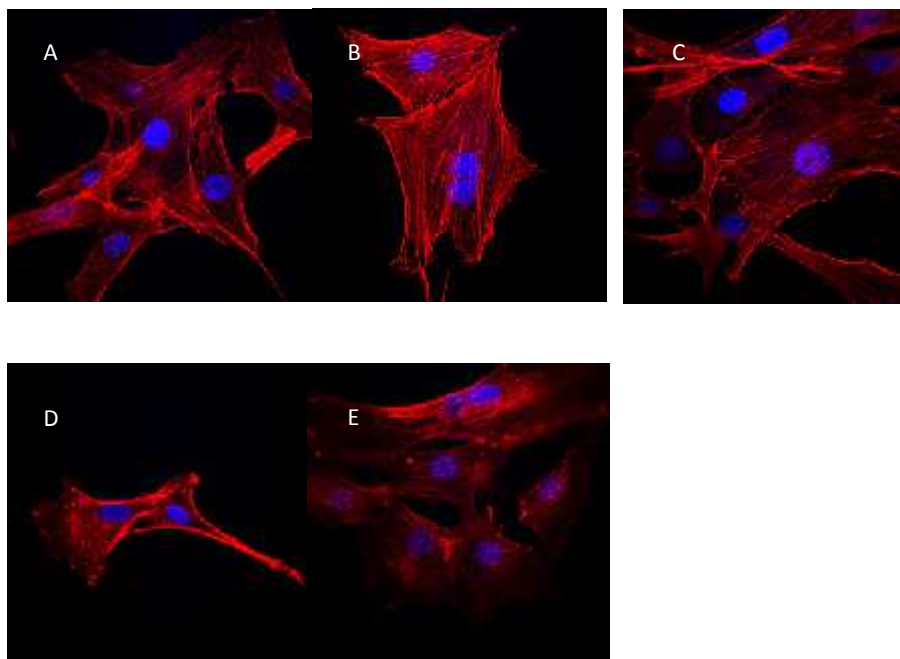
DA) kojim su tretirani stani ne esterase makrofaga cijepaju na nefluorescentni 2,7-diklorodihidro-fluorescein (H<sub>2</sub>DCF) koji se u prisutnosti vodikovog peroksida oksidira na fluorescentni 2, 7-diklorofluorescein (DCF). (Preuzeto i prilagođeno prema <http://www.protocol-online.org/biology-forums-2/posts/13855.html>). Opaženi rezultati poklapaju se s rezultatima za RNS, odnosno pokazuju smanjenje ROS pri većoj koncentraciji nano estica zlata (100 μM) i produljenom vremenu izloženosti (48h). Shukla Ravi i suradnici uspoređuju svoje rezultate s rezultatima jedne prijašnje studije kojom je utvrđeno da nano estice zlata (Au<sup>0</sup>) onemogućuju vezivanje transkripcijskih faktora AP-1 i NF- $\kappa$ B i negativno reguliraju ekspresiju tih gena uključujući u sintezu receptora interleukina-2 i drugih upalnih citokina s posljedičnim smanjenjem proizvodnje RNS i ROS. Pretpostavljaju sličnost u mehanizmu djelovanja ispitivanih nano estica zlata (Au<sup>0</sup>) sa spomenutim (Au). Takvi rezultati upućuju na antioksidacijsko djelovanje ispitivanih nano estica zlata (Au<sup>0</sup>) što bi moglo biti od koristi u tretiranju autoimunih bolesti poput reumatoidnog artritisa. (Preuzeto i prilagođeno prema Shukla Ravi 2007. ).

Imunogeni učinak nano estica zlata testiran je i proveden u proučavanju i proizvodnji upalnih citokina TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  na razini mRNA (nakon 3h) i proteina (nakon 24h) u mišjim tumorskim staničnim linijama makrofaga. RT-PCR-om (reverzna transkriptaza PCR) nije utvrđena prisutnost mRNA niti za jedan od dva spomenuta citokina, niti su bili dokazani proteinski produkti metodom ELISA za koncentracije nano estica do 100 μM. Uz spomenute studije citotoksičnosti i imunogeni učinak napravljen je i profil staničnih proteina makrofaga tretiranih nano esticama zlata konc. 100 μM na SDS-PAGE-u koji se nije razlikovao od proteinskog profila netretiranih makrofaga iz čega je jasno da nano estice zlata konc. do 100 μM nemaju utjecaj na stanične funkcije i metabolizam makrofaga. (Prema Shukla Ravi 2007.)

## **2.4 Utečaj nano estica zlata na staničnu morfologiju**

Stanični citoskelet važan je za lokomotivnu, endocitotičku, unutarstanični prijenos proteina, oblik i morfologiju stanice, obrambene mehanizme i prijenos signala. Glavne su to 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 nano esticama zlata konc. 50 i 100 μM tijekom 48 i 96h. Obilježeni su faloidin-tetrametilrodamin-izotiocijanatom (faloidin-TRITC; faloidin veže aktinske tubule, TRITC fluorescira narandžasto) i promatrani pod mikroskopom. Manjak aktinskih filamenata zbog depolimerizacije ili poremećaja u sintezi opažen je na fibroblastima izloženim višim koncentracijama nano estica zlata (100 μM) kroz

dulje vrijeme (96h). Potpuno smanjenje veličine fibroblasta i eventualna stanja na smrt opažena je u tretmanu prekursorom nano estica zlata, tetrakloroaurinom 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. nano estica zlata  $100 \mu\text{M}$ , 48h, (D)  $100 \mu\text{M}$ , 96h, (A)  $50 \mu\text{M}$ , 96h, (E)  $50 \mu\text{M HAuCl}_4$ , 48h. Jezgra je bojana DAPI-em.

## 2.5 Akutna oralna toksičnost nano estica 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 nano estica na modelu miša proučavajući i hematološke vrijednosti i histopatologiju jetre i bubrega. Sva tri tipa nano estica 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 nano esticama 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 <sup>6</sup> mm <sup>-3</sup> )	4.1 ± 0.4	4.6 ± 0.7	4.3 ± 0.3	5.1 ± 0.2
Leukociti (X 10 <sup>2</sup> mm <sup>-3</sup> )	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 <sup>5</sup> mm <sup>-3</sup> )	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 nano estica 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.** *U inak nano estica zlata na parametre bubrega*

Parametri	Kontrola	GNPA	GNPB	GNPC
Kreatinin (mg/dl)	0.71 ± 0.03	0.76 ± 0.08	12 ± 1	11 ± 2
Mokra na 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*

\* zna ajna razlika u odnosu na kontrolu, P < 0.05

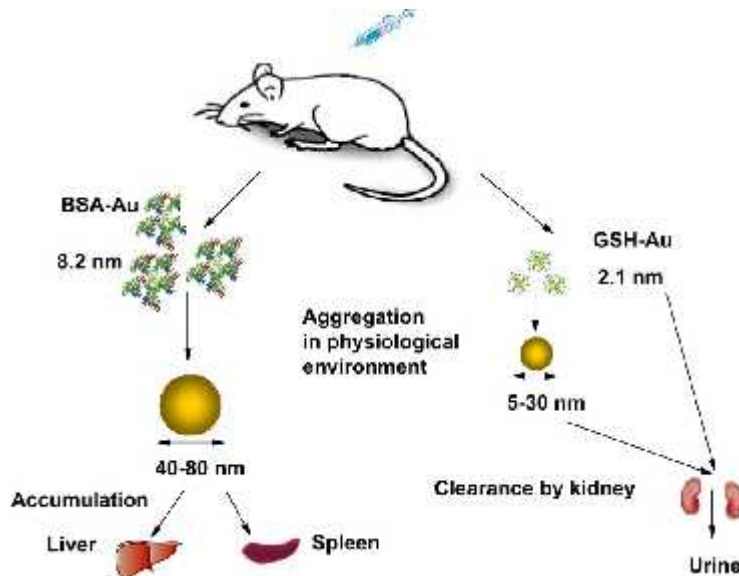
Histopatološke promjene na jetri uo ene su pri tretmanu sa GNPA i GNPC. One uklju uju infiltraciju upalnih stanica u portalnu trijadu, dilataciju sinusoida, vrlo proširenu centralnu venu prepunu krvi, nate ene hepatocyte s poreme ajem u metabolizmu masti zbog njihove peroksidacije i posljedi nog uništenja endoplazmatske mrežice. Sve su ovo zna ajke imunosnog odgovora protiv stranih nano estica.

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 utvr ene u tkivima jajnika, testisa, srca, plu a i slezene niti za jedan od tri tipa nano estica zlata. Vjerojatno je da jetra i bubreg pokušavaju o istiti organizam od nano estica i tako zapravo sprje avaju sekundarne i tercijarne patološke promjene na drugim organima. Mogu e je da su najizraženije histopatološke promjene u jetri kao što je proširena centralna vena rezultat pove anog ulaska vode i iona natrija u stanice. (Prema Sumistha Das i suradnici, 2012.)

## 2.6 Biodistribucija i bubrežna ekskrecija nano estica zlata

Xiao-Dong Zhang i suradnici (2012) proveli su in vivo studiju s razli ito konjugiranim nano esticama zlata sli nu ranije opisanoj s jednog novog aspekta. Prou ili su tendenciju nakupljanja nano estica u jetri i slezeni i toksi ne u inke time uzrokovane. Zanimalo ih je kako veli ina i konjugati utje u na iš enje tkiva od nano estica i njihov eventualni izlazak iz organizma. Mjerili su hematološke i biokemijske parametre kod miševa tretiranih nano esticama zlata konjugiranih gove im serumskim albuminom (BSA-NP) i glutationom (GSH-NP) koncentracije 7550 µg/kg nakon 24h i 28 dana. Pokazali su da se BSA-NP uglavnom nakupkalju u jetri i slezeni, dok je relativno niska koncentracija GSH-NP bila prisutna u svim organima. Nakon 24h 36% GSH-NP, a samo 1% BSA-NP izba eno je iz organizma urinom. Nakon 28 dana taj

omjer iznosi 94% : 5%. Povišenje količine bijelih krvnih stanica opaženo je za oba tipa nano estica nakon 24h. Također je povišena razina kreatinina što ukazuje na toksičnost u inak BSA-NP i GSH-NP na bubrege. Međutim, nakon 28 dana toksičnost u inak 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 nano estica zlatne oznake je biokompatibilnim nano esticima zlatne konjugirane gove serumskim albuminom, ali je iz istraživanja biodistribucije vidljivo da se teško metaboliziraju te stoga ne mogu biti primjenjive na polju biomedicine.



Slika 4. Biodistribucija i bubrežna ekskrecija BSA i GSH konjugiranih nano estica zlata.

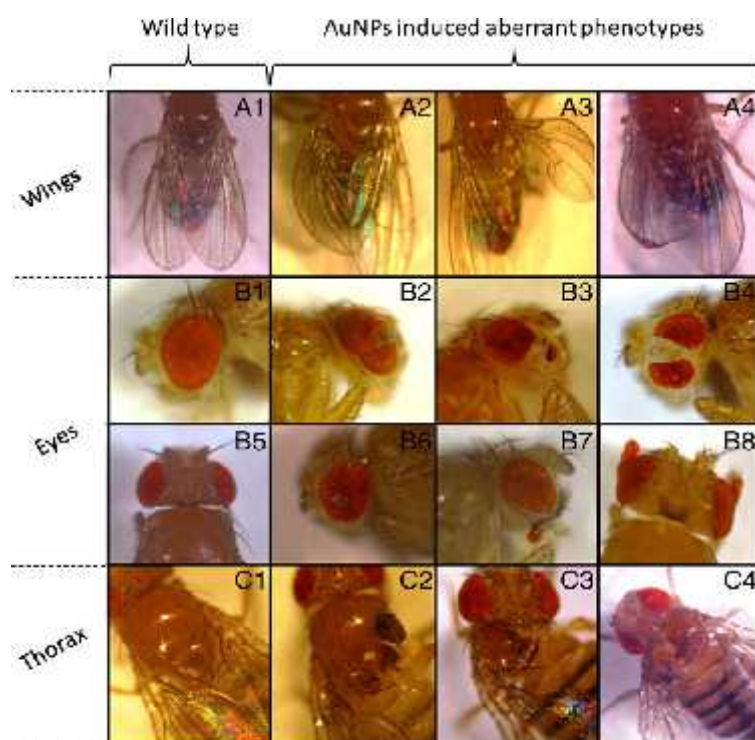
## 2.7 Genotoksičnost nano estica zlata

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

druge provedene studije o utjecaju veli ine na toksi nost. Male nano estice inaktivirane su imunološkim odgovorom, nano estice srednje veli ine nakupljaju se u razli itim organima uzrokuju i citotoksi nost dok ve e nano estice uglavnom ne prolaze tkivnu barijeru.

## 2.8 Mutageni u inak nano estica zlata na modelu vinske mušice

Giuseppe Vecchio i suradnici (2012) tretirali su vinske mušice nano esticama zlata veli ine 15 nm. Ustanovili su genotoksi ni u inak na hemocitima koji su analogni limfocitima sisavaca i imaju istu funkciju. Fragmentaciju DNA utvrdili su TUNEL testom, a ak 15% hemocita prou avanih aneksin V/PI testom bilo je apoptoti no. Mjerili su razinu ekspresije proteina p53 koji se povezuje sa stresnim odgovorom stanice i ošte enjem DNA real-time PCR-om te i tu dobili potvrdu genotoksi nosti jer je se ekspresija pove ala ak tri puta kod tretiranih mušica u odnosu na netretirane. Ovi rezultati potaknuli su ih da prou e dugotrajniji mutageni potencijal nano estica zlata. Tretirali su mušice kroz cijeli životni ciklus i ustanovili smanjenu fertlnost, smanjenu vijabilnost zbog letalnih mutacija i nasljednje promjene u fenotipu kao što su abnormalna krila, toraks i o i (slika 5.). Mutacije u podlozi opaženih fenotipskih aberacija pokazale su se dominantnima križanjem s mušicama divljeg tipa gdje je potomstvo imalo 50% promijenjeni, 50% fenotip divljeg tipa. (Prema Giuseppe Vecchio i suradnici, 2012.)

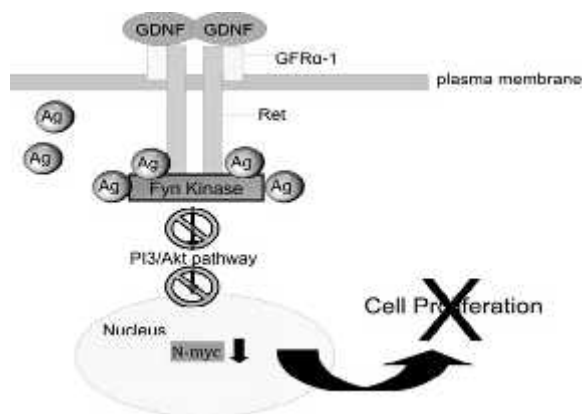


Slika 5. Mutageni u inak nano estica zlata na fenotip vinske mušice

### 3.1 In vitro studije toksi nosti nano estica srebra

Zbog njihovog antimikrobnog djelovanja, nano estice 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 u inku koji nano estice srebra imaju na ljudske keratinocite. Nakon što su 24h bili izloženi nano esticama srebra MTT testom izmjerena je smanjena aktivnost mitohondrija pri konc. od 100 i 330  $\mu\text{M}$ . Sli ni rezultati dobiveni su istraživanjem toksi nog u inka nano estica 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 stani nih proteina, odnosno indeks stani ne biomase koja je bila ponešto smanjena nakon izlaganja najve o j konc. nano estica 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 nano esticama srebra. Iz navedenih rezultata i na temelju nekih drugih provedenih studija kojima je utvr ena kromosomska nestabilnost i zastoj u G2 fazi kao posljedica izloženosti nano esticama srebra autori zaklju uju da one imaju antiproliferacijski u inak na keratinocite (Caterina Zanette i suradnici, 2012.).

Laura K. Braydich-Stolle i suradnici (2012) pokazali su da nano estice srebra smanjuju vijabilnost i proliferaciju zametnih stanica sperme u ovisnosti o veli ini i koncentraciji te da konjugati na nao esticama zapravo nemaju utjecaj na toksi nost jer se degradiraju u lizosomima s mogu im posljedi nim otpuštanjem iona srebra koji su sami po sebi toksi ni. Nadalje, utvr ena je proizvodnja reaktivnih kisikovih radikala kao posljedica izloženosti stanica manjim nano esticama srebra koja vodi putem apoptoze zbog ošte enja DNA i aktivacije stani nih kaspaza. Stvaranje ROS ne objašnjava potpuno opaženu smanjenu proliferaciju i vijabilnost pa su autori prou avali utjecaj nano estica srebra na GDNF signalni put. GDNF je faktor rasta bitan za proliferaciju zametnih stanica sperme i pokazalo se da nano estice srebra neovisno o veli ini i konjugatima inhibiraju aktivnost Fyn kinaze ovog signalnog puta onemogu uju i signalne u inke nizvodno od Fyn kinaze kao što pokazuje slika 5. (Preuzeto i prilago eno prema Laura K. Braydich Stolle i suradnici 2012.)



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

### 3.2 In vivo studije toksici nosti nano estica srebra

Za sada nema baš puno studija in vivo o toksici nosti nano estica srebra i ve ina ih je proveden na vodenim organizmima. Tako er ih ve ina prati toksici ni u inak ionskog srebra jer se vjeruje da je taj oblik srebra bioaktivniji.

Kod zebrića (*Danio rerio*) se toksici nost nano estica srebra u ovisnosti o dozi (0.19 nM se pokazala kriti nom) o ituje razli itim abnormalnostima u embriju (deformacije kralježnice, sr ana aritmija te smanjeno preživljenje). Zbog izmjerene pretjerane ekspresije katalaze ovi u inci pripisani su stvaranju ROS s posljedi nim ošte enjem DNA. (Prema A. Lapresta-Fernandez i suradnici, 2011. ). Kod grege a (*Perca fluviatilis*) je utvr eno da se nano estice srebra veli ine 81 nm konjugirane PVP-om (polivinilpirolidon) akumuliraju u škrgama i smanjuju toleranciju na hipoksi ne uvjete. U pastrve (*Salmo trutta*) je uo eno stvaranje ROS u tkivu škrga pri tretmanu nekonjugiranim nano esticama srebra veli ine 10-35 nm. (Prema pregledu Julie Fabrega i suradnika, 2010 )

### 3.3 Molekularni mehanizmi toksici nosti nano estica srebra

Toksici ni u inci nano estica srebra i iona srebra koji se iz njih u odre enim uvjetima (pH, ionska jakost, temperatura) otpuštaju ogledaju se u proizvodnji ROS te poreme ajem u ionskoj ravnoteži stanica i posljedi nom energetskom kolapsu zbog narušenog membranskog integriteta kroz interakciju tiolnih grupa proteina membrane sa spomenutim nano esticama (Prema A. Lapresta Fernandez i suradnici, 2011.)



#### 4. Zaključak

Toksičnost nanoestica 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 nanoestica stoga se na to treba obratiti posebna pažnja pri sintezi i istraživanju biokompatibilnih nanoestica za medicinske potrebe. Općeniti molekularni mehanizmi toksičnosti nanoestica zlata i srebra sastoje se u produkciji ROS i RNS (oksidativni stres), narušavanju stabilnosti membrana i poremećenom protoku iona s posljednjim energetske kolapsom te oštećenjem DNA (bilo zbog direktnog djelovanja nanoestica ako su dovoljno male da uđu u jezgru ili kao posljedica oksidativnog stresa). Dakako, postoje još mnogi nedovoljno istraženi specifični toksični učinci nanoestica kao što je njihova uloga u regulaciji genske ekspresije te najrazličitiji učinci na metabolizam stanice zbog specifičnih interakcija nanoestica s proteinima koji su ovisni o veličini i konjugatima pa je svaku novosintetiziranu nanoesticu potrebno individualno odrediti. Zbog svega ovoga, teško je utvrditi opću proceduru karakterizacije nanoestica 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.

Ivankovi M. (2011.), Nanomaterijali i nanoproizvodi, mogu nosti 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 esticama 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. Nano estice srebra se već koriste u komercijalne svrhe u raznim antibakterijskim sredstvima, a nano estice 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 nano estice 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 nano estica 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. Nano estice 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 receive much interest due to their potential applications in medicine and many other fields. Silver nanoparticles are commercially available in various antibacterial products while gold nanoparticles show great potential in cancer treatment and diagnostics. 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 accumulate 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.