

Cytotoksyczność nanocząsteczek srebra

JOANNA MAŁACZEWSKA

Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM,
ul. Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn

Małaczewska J.

Cytotoxicity of silver nanoparticles

Summary

Nanotechnology concerns the study, creation and manipulation of structures, devices, and systems at a nanoscale level. Such materials exhibit unique biological, physical and chemical properties compared to bulk materials, and are readily utilized in modern medicine and industry.

Currently silver nanoparticles (SNP) are among the most commonly used nanomaterials due to their antimicrobial properties. Nanosilver can be found in medical devices, filters for water purification and in many consumer products as well. However, some recent studies indicate that nanosilver formulations may be cytotoxic to various types of both animal and human cells. Because their size is similar to cellular components they are able to bypass cell membranes, which results in cytotoxicity, although the exact mechanism of such an interaction is yet to be established. Several studies have reported the accumulation of SNP inside cells and their impact on cell morphology, while many of them claim that nanosilver induces cell necrosis or apoptosis due to decreasing function of mitochondria and catalyzes the production of reactive oxygen species, which leads to oxidative stress. Some reports indicate NPS can affect the physiology of immune competence and even of stem cells, which is of great importance for such crucial biological phenomena as the immunity and fertility of organisms.

Taking into consideration all of the above and the fact of growing exposure of human bodies to increasing doses of nanoparticles, there is a real need for evaluating the potential risks of using nanosilver in our everyday lives.

Keywords: silver nanoparticles, cytotoxicity, in vitro

Nanotechnologia zajmuje się projektowaniem, syntezą i manipulowaniem materiałami o rozmiarach poniżej 100 nm. W związku z ogromną powierzchnią nanocząstek w stosunku do objętości ich właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne różnią się znacząco od właściwości materiałów tradycyjnych, zaś rozmiary zbliżone do białek lub składników komórki umożliwiają im penetrowanie naturalnych barier, jak błony biologiczne. Po ogólnoustrojowym wprowadzeniu nanocząstki mogą dotrzeć do najdrobniejszych kapilar organizmu i dowolnych typów komórek, znalazły więc zastosowanie jako narzędzia analityczne w biotechnologii i naukach przyrodniczych. Najnowsze badania wskazują jednak na ich niekorzystne oddziaływanie na organizmy żywe. Ten niezamierzony wpływ spowodował powstanie nowej dziedziny nauki – nanotoksikologii. Srebro jest obecnie najczęściej używanym nanomateriałem, głównie dla swoich właściwości przeciwbakteryjnych i dezynfekujących, a łatwość wbudowywania go w inne substancje czy powlekania ich powierzchni sprawia, że ilość jego zastosowań rośnie w szybkim tempie. Używane jest w medycynie, po wbudowaniu w antybakteryjne opatrunki, narzędzia

chirurgiczne i implanty, jak również zostało dopuszczone, jako czynnik biobójczy, w oczyszczaniu i uzdatnianiu wody. O ile w powyższych przypadkach korzyści stosowania wydają się przeważać nad potencjalnym ryzykiem skutków ubocznych, o tyle niepokojąca jest masowa już produkcja artykułów codziennego użytku, zawierających nanosrebro – tkanin, bielizny, kosmetyków, a nawet butelek i smoczków dla niemowląt, dzięki której wzrasta codzienna ekspozycja ludzkiego organizmu na oddziaływanie tego nowego materiału (5, 10, 14, 15, 20, 21, 24).

Potencjalny mechanizm cytotoksycznego działania nanocząstek srebra, mimo badań prowadzonych przez liczne laboratoria, wciąż pozostaje nie w pełni wyjaśniony. Przez długi czas przypuszczano, że jedyną toksyczną formą srebra są jony Ag^+ , wysoce reaktywne w związku z posiadaniem ładunkiem. Nanocząstki srebra, skonstruowane przez człowieka z wielu atomów srebra metalicznego, jonów srebra lub związków tego pierwiastka, mają zdolność uwalniania jonów w roztworach. Dla tej właściwości zostały zresztą skonstruowane – ich zadaniem jest dostarczenie jonów do środowiska komórek docelowych, czyli drobnoustro-

jów, w celu szybkiego i skutecznego działania biobójczego. Okazało się jednak, iż niekorzystne działanie nanosrebra może być znacznie silniej wyrażone niż działanie samych jonów, uwalnianych z nanomateriału. Wysznuło więc wniosek, że również same nanocząstki wpływają na komórkę. Jeden z przypuszczalnych mechanizmów takiego działania wiąże się z bezpośrednim kontaktem nanocząstek z powierzchnią komórki i zaburzaniem jej czynności poprzez działanie na błonę komórkową i procesy z nią związane, zaś drugi, określany jako mechanizm „konja trojańskiego”, polega na przedostawaniu się srebra w postaci nanocząsteczek do wnętrza komórki i uwalnianiu wysoce reaktywnych jonów dopiero wewnątrz, w sąsiedztwie niezwykle wrażliwych organelli. Ponadto cząsteczki srebra, które same nie wniknęły do komórki, mogą uwalniać jony w bezpośrednim sąsiedztwie błony cytoplazmatycznej, co zwiększa ilość Ag^+ dostających się do komórki niezależnie od procesu dyfuzji przez kanały jonowe. Mechanizm wnikania nanosrebra do wnętrza komórki jest zresztą różny od kontrolowanego poboru jonów Ag^+ przez komórkę (naśladowanie jonów sodowych). Zasadniczą rolę w przypadku nanocząstek odgrywa proces endocytozy, w rezultacie którego wnikają one do komórki zamknięte w endosomie, a ich dalsze losy mogą być różne. Zwykle, aby doszło do działania cytotoksycznego, cząstki muszą kumulować się w obrębie komórki, a zjawisko takie w przypadku nanosrebra potwierdzają niektóre z przeprowadzonych badań (6, 13, 14).

Do tej pory opisanych zostało kilka efektów cytotoksycznego działania nanosrebra, choć wyniki poszczególnych badań nie zawsze są zgodne. Przyczyn tego stanu rzeczy jest kilka. Pierwsza to brak standaryzacji metod i możliwość doboru różnych testów, których wyniki nie muszą się idealnie pokrywać. Drugim powodem jest stosowanie różnych typów podłoży biologicznych. Niektórzy badacze preferują pierwotne hodowle komórkowe, inni linie ciągłe. Te pierwsze, ze względu na dobre reprezentowanie tkanek, są lepszym narzędziem do badań toksykologicznych *in vitro*, z drugiej strony jednak, linie komórkowe są łatwiejsze w utrzymaniu i zapewniają powtarzalność wyników, stąd stosowane są częściej (2). Ponadto w użyciu są komórki pozyskane z różnych tkanek, od różnych gatunków, a nawet rodzajów kręgowców, co przekłada się na istotne różnice ich wrażliwości. Wreszcie trzecim powodem rozbieżności są, niemożliwe do zbagatelizowania, różnice dotyczące używanych w badaniach nanocząsteczek (różni producenci, cząsteczki o różnym stopniu jednorodności, rozmiarze, kształcie i skłonności do agregacji, rozpuszczane przed użyciem w różnych mediach, czy wreszcie rozbieżne zakresy badanych stężeń). Z drugiej jednak strony, opisana różnorodność umożliwia szerszą i bardziej kompleksową ocenę problemu. Do tej pory zaobserwowano następujące typy zmian w komórkach poddanych działaniu nanocząsteczek srebra:

Odkładanie srebra w komórce

Badania dotyczące tego zagadnienia należą do stosunkowo rzadkich w dostępnej literaturze (3, 9, 10, 17, 24). Gromadzenie cząsteczek srebra przy wyższych stężeniach (do 50 $\mu g/ml$) obserwowano w liniach szczurzych hepatocytów (BRL3A) i fibroblastów mysich (NIH3T3). W hepatocytach cząstki gromadziły się głównie na powierzchni błon komórkowych i tylko część przedostawała się do wnętrza komórek, zaś w przypadku fibroblastów kumulacja cząstek zachodziła wewnątrzkomórkowo, choć w obu przypadkach autorzy nie określili precyzyjnie ich lokalizacji (9, 10). Hsin i wsp. (9) wykazali ponadto różnice w czasie gromadzenia srebra w komórce w zależności od badanego źródła nanocząstek. Bardziej toksyczny preparat powodował kumulację cząsteczek w komórce już po 1 minucie, zaś mniej toksyczny dopiero po 8 godzinach inkubacji. Arora i wsp. (3) poszli w swoich obserwacjach o krok dalej, ustalając przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego lokalizację nanocząstek srebra w pierwotnych fibroblastach i hepatocytach mysich (30 i 225 $\mu g/ml$). Agregaty cząstek gromadziły się w mitochondriach i cytoplazmie obu typów komórek oraz w wakuolach hepatocytów. Lokalizacja srebra w mitochondriach mogła, według autorów, prowadzić do zaburzeń w systemie enzymów antyoksydacyjnych i wzmożonej generacji reaktywnych form tlenu, toksycznych dla komórki.

Innym typem komórek, łatwo kumulującym w swym wnętrzu nanocząstki, w związku ze swoją naturalną zdolnością do ich aktywnego pochłaniania, są komórki żerne. Yen i wsp. (24) wykazali obecność cząstek srebra we wnętrzu makrofagów mysich po 3 h ekspozycji komórek na ich działanie. Pozostawały one zamknięte w pęcherzykach cytoplazmatycznych, gdzie tworzyły zlepy i nie docierały do organelli komórkowych. Natomiast najnowsze badania na mysich makrofagach potwierdziły mechanizm „konja trojańskiego” w cytotoksyczności nanosrebra. Obecność cząstek obserwowano bowiem w cytozolu aktywowanych makrofagów, nie stwierdzono natomiast ich występowania w komórkach martwych, co wskazuje na proces jonizacji cząstek wewnątrz komórek i następujące po nim uwolnienie jonów z komórek uszkodzonych do podłoża hodowlanego. Fagocytoza nanosrebra aktywowała w tym przypadku odpowiedź zapalną i stymulowała wydzielanie przez makrofagi $TNF-\alpha$, co prowadziło do uszkodzenia błony komórkowej i apoptozy, a wszystkie te zdarzenia, według autorów, były bezpośrednim następstwem wewnątrzkomórkowej jonizacji srebra (17).

Zmiana morfologii komórek

Ten efekt toksycznego działania nanosrebra, zależny od użytego stężenia cząstek i manifestujący się zmianą typowego kształtu komórek, był obserwowany często. Zakresy dawek powodujących takie zmiany osiągały jednak znaczną rozpiętość, zależnie od typu

komórek, a linie ciągłe, zgodnie z przewidywaniami, były bardziej wrażliwe od hodowli pierwotnych. Pierwotne fibroblasty i hepatocyty mysie po 24 h ekspozycji na wysokie stężenia nanosrebra (odpowiednio: 25 i 100 $\mu\text{g/ml}$) nie zmieniały swojego wyglądu, choć dochodziło do nieznacznego naruszenia ciągłości hodowli. Dopiero dawki 50 i powyżej 200 $\mu\text{g/ml}$ wywoływały widoczne zmiany (3). W przypadku nowotworowych linii ciągłych HT-1080 (komórki ludzkiego włókniakomięsaka) i A431 (ludzkie komórki raka skóry) tylko niskie stężenia nie zaburzały morfologii komórek, nieco wyższe, 6,25-50 $\mu\text{g/ml}$, powodowały już istotne zmiany w obu liniach (2). Podobne obserwacje, przy zbliżonym zakresie stężeń, poczyniono w stosunku do linii szczurzych hepatocytów, mysich komórek macierzystych plemników czy bydłych komórek endotelium siatkówki (5, 10, 11). Natomiast zmiana kształtu i wielkości mysich makrofagów pod wpływem nanosrebra (10 ppm), obserwowana przez Yen i wsp. (24), prócz działania cytotoksycznego wskazywała dodatkowo również na aktywację komórek.

Obniżenie żywotności komórek

Obniżenie żywotności lub aktywności proliferacyjnej to kolejny efekt niekorzystnego oddziaływania nanosrebra na większość badanych typów komórek, o nasileniu zwykle wprost proporcjonalnym do użytej dawki cząstek i czasu ekspozycji. Ponownie obserwowano szeroką rozpiętość dawek $LC_{50}/IC_{50}/EC_{50}$ (lethal/inhibitory/effective concentration 50%), w zależności od użytej hodowli i testu, za pomocą którego tę wartość wyznaczano. Wspomniana dawka dla komórek linii nowotworowych wynosiła od 10,6 $\mu\text{g/ml}$ (linia HT-1080), przez 11,6 $\mu\text{g/ml}$ (A431), 27 $\mu\text{g/ml}$ (HT29 – ludzkie komórki gruczolakoraka okrężnicy), po aż 92 $\mu\text{g/ml}$ (HeLa – ludzkie komórki raka szyjki macicy) (2, 8, 15). Dla komórek linii nienowotworowych rozpiętość powyższych dawek była równie duża. Stężenia 1-10 $\mu\text{g/ml}$ hamowały proliferację komórek endotelium wieńcowego (CEC), dla rybniej linii OLHNI2 dawka LC_{50} wynosiła 0,33 $\mu\text{g/cm}^2$, dla mysich komórek macierzystych plemników (C18-4) – 8,75 $\mu\text{g/ml}$, dla hepatocytów szczurzych (BRL3A) wahała się między 19 i 24 $\mu\text{g/ml}$, w zależności od rozmiarów cząstek, dla komórek endotelium siatkówki bydłowej (BRECs) wynosiła 500 nM (ok. 25 $\mu\text{g/ml}$), dla komórek nerki chomika (BHK21) – 27 $\mu\text{g/ml}$, zaś dla mysich fibroblastów (NIH3T3) i szczurzych komórek aorty (A10) była zbliżona do 50 $\mu\text{g/ml}$ (5, 8-11, 19, 22). Ponownie, wyższe stężenia nanosrebra były potrzebne dla wywołania efektu w komórkach hodowli pierwotnych ssaków: 50% spadek żywotności fibroblastów i hepatocytów mysich zanotowano dopiero przy dawkach 61 (fibroblasty) i 449 $\mu\text{g/ml}$ (hepatocyty) (3). Analogicznej zależności nie odnotowano jednak w przypadku rybich hodowli pierwotnych: LC_{50} dla hepatocytów pstrąga tęczowego wynosiła zaledwie 1,9 $\mu\text{g/ml}$ (6).

Pewne rozbieżności wyników dotyczą też wpływu nanosrebra na aktywność proliferacyjną komórek immunokompetentnych. Według Shin i wsp. (21), stężenia powyżej 15 ppm znacząco obniżały żywotność jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka, zaś stężenia od 10 ppm – ich zdolność do proliferacji. Podobnie w badaniach Yen i wsp. (24) na mysich makrofagach, stężenie 10 ppm drastycznie obniżało proliferację komórek, podczas gdy dawka 1 ppm nie wpływała na ten parametr. Z drugiej jednak strony, Park i wsp. (17) donoszą o toksycznym działaniu na mysie makrofagi otrzewnowe nanosrebra w dawce zaledwie 1,6 ppm.

Niektórzy autorzy wzmiankowali o problemach technicznych z testowaniem wysokich stężeń nanosrebra, w związku z tendencją do koagulacji i precypitacji cząsteczek w podłożu hodowlanym (5, 8). Rutynowo problem ten niwelowano przez dodawanie różnych stabilizatorów chemicznych do roztworu cząsteczek przed wprowadzeniem go do podłoża hodowlanego, jednak bezpieczniejszą metodą zapobiegającą aglomeryzacji nanocząstek jest powlekanie ich powierzchni już na etapie produkcji. Toksyczność takich cząstek również oznaczano. Nanocząstki srebra pokryte PVP charakteryzowała wysoka toksyczność dla linii ludzkich monocytów (THP-1), z EC_{50} na poziomie 2,4 $\mu\text{g/ml}$ (7), natomiast Murawała i wsp. (16) wykazali nietoksyczność nanocząstek srebra pokrytych albuminą bydłą (stężenia 10^{-4} – 10^{-7}) w stosunku do fibroblastów mysich (NIH-3T3), wysnuwając wniosek o ich zgodności biologicznej, wynikającej właśnie z zastosowania biokompatybilnego czynnika powlekającego (9).

Szkodliwe dawki nanosrebra, wyznaczane w badaniu ostrej cytotoksyczności, zwykle wielokrotnie przekraczały jego stężenia dodawane do komercyjnych produktów farmaceutycznych. Arora i wsp. (2) wykazali przy użyciu linii HT-1080 i A431, że stężenie przeciwbakteryjne nanosrebra (1,56-6,25 $\mu\text{g/ml}$), stosowane w opatrunkach na rany jest bezpieczne dla komórek. Podobnie dawka 20 $\mu\text{g/g}$, którą wzbogacono żel antybakteryjny na rany i oparzenia, nie działała cytotoksycznie na pierwotne fibroblasty i hepatocyty mysie (3). W związku z powyższym, zgoła inaczej planowano doświadczenia dotyczące działania *in vitro* dostępnych na rynku produktów zawierających nanosrebro. Ich zadaniem było określenie ryzyka toksyczności przewlekłej, związanej z długotrwałą ekspozycją tkanek na działanie niskich, progowych dawek cząstek. Badania takie są jak najbardziej zasadne, co dobitnie wykazali Wataha i wsp. (23), poddając ludzkie monocyty (THP-1) długotrwałemu działaniu (do 4 tygodni) niskich stężeń jonów srebra, odpowiadających 1-10% dawki wywołującej ostre działanie cytotoksyczne. Okazało się, że różnice między stężeniem Ag^+ wywołującym minimalny efekt biologiczny a stężeniem letalnym były bardzo małe (8 i 12 $\mu\text{mol/l}$). Celem podobnego eksperymentu, przeprowadzonego przez Santoro i wsp. (20) było sprawdzenie użyteczności na-

nosrebra jako czynnika antybakteryjnego w produkcji soczewek kontaktowych. Po 3 tygodniach ekspozycji ludzkich komórek nabłonka rogówki i makrofagów na działanie niskich koncentracji nanocząstek (2, 4, 6 μM), zwykle wykazujących działanie przeciwbakteryjne, autorzy nie uzyskali obniżenia żywotności komórek, choć jednocześnie badane stężenia okazały się niewystarczające dla uzyskania oczekiwanego efektu biologicznego w stosunku do *Pseudomonas aeruginosa*.

Z kolei Poon i Burd (18) zbadali wpływ komercyjnego opatrunku na rany poparzeniowe, zawierającego nanocząsteczki srebra (Acticoat), na komórki zaangażowane w proces gojenia – keratynocyty i fibroblasty. Ku zaskoczeniu badaczy, Acticoat okazał się wysoce toksyczny dla obu typów komórek. Dawka LD_{50} dla keratynocytów wynosiła $12,5 \times 10^{-40}\%$, zaś koncentracja $78 \times 10^{-40}\%$ całkowicie hamowała ich aktywność metaboliczną i proliferacyjną. W przypadku fibroblastów 90% redukcję aktywności wykazano przy stężeniu $33,3 \times 10^{-40}\%$. Dawki toksyczne dla komórek były zbliżone do uznawanych za skuteczne w zwalczaniu bakterii, co nasunęło autorom wnioski o konieczności stosowania badanego produktu z należytą ostrożnością, bowiem uwalniane z niego jony Ag^+ nie wywierają wybiórczego działania na same bakterie, lecz z podobną siłą uderzają w komórki zaangażowane w proces gojenia. Co prawda, po określeniu wpływu opatrunku na komórki jednowarstwowych hodowli, cytowani badacze, dla lepszego oddania warunków *in vivo*, przeprowadzili dalsze doświadczenia na modelu hodowli tkankowej, wykazując jej mniejszą wrażliwość, uznali jednak, że efekt ten wynikał z ograniczonej biodostępności nanosrebra, związanej z dużą koncentracją białek w podłożu hodowlanym, wiążących srebro i redukujących jego stężenie efektywne (EC).

W związku z wątpliwościami dotyczącymi bezpieczeństwa stosowania opatrunku Acticoat, Agarwal i wsp. (1) podjęli próbę opracowania podobnego, mniej toksycznego produktu. Po przygotowaniu cienkich filmów zawierających ustalone stężenia nanosrebra (0,4-23,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) badali ich aktywność przeciwbakteryjną i wpływ na mysie fibroblasty (NIH-3T3). Stężenie cząstek na poziomie 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ było już cytotoksyczne, jednak najniższa z testowanych dawek (0,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), wykazująca nadal silne działanie bakteriobójcze w stosunku do *Staphylococcus epidermidis*, nie tylko nie była toksyczna, lecz wręcz wspomagała adhezję i proliferację komórek. Jest to jedno z zaledwie dwóch doniesień na temat proliferacyjnego efektu działania nanosrebra. Drugie dotyczy jego wpływu na komórki endotelium wieńcowego (CEC), gdzie, co prawda, również zanotowano dwojaki efekt działania w zależności od stężenia cząstek, jednak w tym przypadku niskie stężenia (1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hamowały proliferację komórek, zaś wysokie (50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stymulowały, a wpływ ten był odwrotnie proporcjonalny do działania cytotoksycznego (19).

Apoptoza/nekroza

Niekorzystny wpływ nanosrebra na żywotność komórek wiązał się z wprowadzaniem ich na drogę nekrozy lub apoptozy, zależnie od użytego stężenia. Progowa dawka powodująca apoptozę była zwykle znacznie niższa od wywołującej nekrozę, tak w przypadku komórek prawidłowych, jak i nowotworowych. Arora i wsp. (2) wyznaczyli stężenie apoptotyczne dla linii nowotworowych HT-1080 i A431 na, odpowiednio: 0,78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ i 1,56 $\mu\text{g}/\text{ml}$, podczas gdy nekrozę obu typów komórek wywoływało dopiero stężenie 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. W przypadku pierwotnych fibroblastów i hepatocytów mysich stężenie inicjujące apoptozę (3,12 i 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) było również wielokrotnie niższe od powodującego nekrozę (100 i 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (3). Dużo mniejsza rozpiętość odpowiednich stężeń srebra dotyczyła natomiast ludzkich monocytów (stężenia 2,5 i 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), komórek macierzystych plemników mysich (5 i 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), komórek linii HeLa (poniżej 60 i powyżej 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$), a także linii nowotworowej HT29 i komórek nerki chomika BHK21 (11 i powyżej 44 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (5, 7, 8, 15).

W cytowanych pracach, potwierdzających proapoptotyczne działanie niższych stężeń nanosrebra, autorzy wykazywali fragmentację DNA w komórkach, charakterystyczny dla komórek apoptotycznych sposób wiązania barwników fluorescencyjnych i aktywację kaspazy-3, która uważana jest za punkt bez powrotu w zjawisku programowanej śmierci komórki (2, 3, 7-9, 11, 15). Ponadto Park i wsp. (17), po inkubacji z nanosrebrem mysich makrofagów otrzewnowych (RAW264.7), stwierdzili zwiększenie liczby komórek w fazie G1, a następnie całkowitą blokadę cyklu komórkowego w fazie S, również wskazujące na apoptozę. Pojawiały się także doniesienia o wpływie nanosrebra na ekspresję regulatorów apoptozy (zwiększona fosforylacja proapoptotycznego białka p53 i kinazy JNK, blokowanie szlaku antyapoptotycznej kinazy PI3K/Akt), prowadzącą do uwalniania cytochromu c z mitochondriów do cytozolu, translokacji Bax z cytozolu do mitochondriów i aktywacji kaskady kaspazowej, uruchamiającej cykl zjawisk prowadzących do zniszczenia komórki. Taki schemat oddziaływania nanocząstek świadczy, zdaniem autorów, o istotnej roli stresu oksydacyjnego w cytotoksyczności srebra i indukcji apoptozy na drodze mitochondrialnego szlaku śmierci komórki (2, 7, 9, 11).

W praktyce natomiast stymulacja apoptozy była zjawiskiem wielce pożądanym w przypadku leków antyangiogenetycznych, preparatów hamujących nadmierną odpowiedź immunologiczną, a zwłaszcza w terapii nowotworów. Gopinath i wsp. (8) oprócz działania proapoptotycznego nanosrebra w stosunku do komórek nowotworowych HT29 stwierdzili również, że uwrażliwiała ono komórki na działanie przeciwnowotworowego 5-fluorouracylu, a działanie synergistyczne obu czynników znacząco nasilało apoptozę komórek w porównaniu do efektu działania pojedynczych

substancji, co w praktyce klinicznej mogłoby pozwolić na zminimalizowanie skutków ubocznych terapii. Z drugiej jednak strony, w dostępnej literaturze jest też doniesienie dotyczące antyapoptotycznego efektu działania nanosrebra na komórki nowotworowe HCT 116 (ludzkie komórki raka okrężnicy), polegającego na wzmożonej ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl, co może świadczyć o zmiennej aktywności nanosrebra w zależności od rodzaju komórek nowotworowych (9).

Stres oksydacyjny/generacja ROS

Większość znanych nanocząstek po wnikięciu do komórki dostaje się do mitochondriów, powodując ich przeładowanie lub interferując z obroną antyoksydacyjną, co prowadzi do wzmożonej generacji reaktywnych form tlenu (ROS), której rezultatem jest brak równowagi, określanej jako stres oksydacyjny. Konsekwencje tego stanu są wielokierunkowe i obejmują procesy takie, jak peroksydacja lipidów (zmiana właściwości błon biologicznych), modyfikacja lipoprotein czy wreszcie uszkodzenie białek (utrata aktywności enzymatycznej) i kwasów nukleinowych. Te zmiany przyczyniają się do rozwoju schorzeń zapalnych i degeneracyjnych, natomiast na poziomie samej komórki mogą skutkować apoptozą lub nekrozą na drodze mitochondrialnego szlaku śmierci komórki (4).

Wzrost poziomu ROS, zależny od stężenia nanosrebra, zanotowano w liniach szczurzych hepatocytów BRL3A i ludzkich monocytów THP-1, a najwyższe jego nasilenie w obu przypadkach występowało po 6 godzinach ekspozycji komórek na działanie srebra (7, 10). Również Rosas-Hernandez i wsp. (19) w doświadczeniu na komórkach endotelium naczyń wieńcowych i izolowanym pierścieniu aorty uzyskali stymulację wytwarzania NO przez endotelium pod wpływem wysokich stężeń srebra, zaś podniesiony poziom tego wolnego rodnika działał rozkurczająco na pierścień aorty. Działania takiego nie potwierdzili natomiast Farkas i wsp. (6) w pierwotnej hodowli hepatocytów pstrąga tęczowego.

Pojawienie się zwiększonego poziomu reaktywnych form tlenu w komórce początkowo skutkuje uruchomieniem komórkowej obrony antyoksydacyjnej, której ważnymi składowymi są: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) i wewnątrzkomórkowy glutation (GSH). Badania Arora i wsp. (3) na pierwotnych hodowlach fibroblastów i hepatocytów albinotycznych myszy typu Swiss wskazują na sprawne uruchomienie tej obrony, wystarczające, w przypadku badanych komórek, dla powstrzymania rozwoju stresu oksydacyjnego pod wpływem nanosrebra. Autorzy wykazali wzrost poziomu GSH i obniżenie peroksydacji lipidów w fibroblastach, zaś w komórkach wątroby wzrost poziomu SOD i GSH. Co prawda, dawka nanosrebra, przy której uzyskali taki efekt, była stosunkowo niewysoka ($1/2 IC_{50}$), jednak podobna dawka w liniach HT-1080 i A431 wywołała już poważne objawy stresu oksydacyjnego (2). Dopiero po wyczerpaniu możliwości systemu

ochronnego dochodzi do uruchomienia kaskady kaspaz i apoptozy komórki. Na taki z kolei scenariusz wskazuje wyraźne obniżenie poziomu SOD i GSH pod wpływem nanosrebra w linii mysich makrofagów i liniach nowotworowych HT-1080 i A431, zwiększona peroksydacja lipidów w liniach HT-1080 i A431, spadek poziomu GSH w linii szczurzych hepatocytów, zwiększony poziom metaloproteinaz, uczestniczących w degradacji komórek pod wpływem stresu oksydacyjnego w mysich makrofagach, czy wreszcie wzrost ekspresji genów stresu oksydacyjnego mt-2A i ho-1 w linii nowotworowej HeLa (2, 10, 15, 17).

Zaburzenia metabolizmu i naruszenie integralności błon komórkowych

Te dwa zjawiska są bezpośrednim następstwem stresu oksydacyjnego, a standardowe testy szacujące żywotność komórek – MTT i LDH opierają się właśnie na określeniu nasilenia metabolizmu na poziomie mitochondriów (MTT) i stopnia integralności błon komórkowych (LDH). Autorzy większości cytowanych prac posługiwali się tymi testami przy szacowaniu żywotności komórek, choć stosunkowo nieliczni wspominali o ich bezpośrednim znaczeniu. Znaczący spadek funkcji mitochondriów wypunktowany został w przypadku hepatocytów szczurzych (BRL3A), pierwotnej hodowli hepatocytów pstrąga tęczowego, keratynocytów, fibroblastów i mysich komórek macierzystych plemników (C18-4), zaś znaczący wyciek LDH z komórek, świadczący o uszkodzeniu błon komórkowych tylko w przypadku linii BRL3A i hepatocytów pstrąga tęczowego (5, 6, 10, 18). Ostatnie zjawisko zaobserwowali także Braydich-Stolle i wsp. (5) w linii C18-4, jednak niewielki stopień jego nasilenia wskazywał raczej, ich zdaniem, na oddziaływanie nanocząsteczek na metabolizm komórek, nie zaś na błonę cytoplazmatyczną.

Wpływ na produkcję cytokin (działanie pro/przeciwzapalne)

Najmniej zgodne są natomiast wyniki badań wpływu nanosrebra na odpowiedź komórek immunokompetentnych *in vitro*. Shin i wsp. (21), badając wpływ nietoksycznych stężeń srebra na jednojądrzaste leukocyty człowieka, stymulowane PHA, stwierdzili jego działanie przeciwzapalne, manifestujące się hamowaniem produkcji IL-5, IFN- γ i TNF- α , co, zdaniem autorów, może pozwolić na jego użycie w terapii schorzeń immunologicznych i zapalnych. Tego korzystnego działania nie potwierdziły jednak inne doświadczenia. Yen i wsp. (24) wykazali, co prawda, aktywację mysich makrofagów pod wpływem nanosrebra, nie wpływało ono jednak na ekspresję genów cytokin prozapalnych: IL-1, IL-6 i TNF- α . Z kolei brak statystycznie istotnego wpływu na wytwarzanie IL-1 β , IL-4, IL-6 i IL-8 przez ludzkie komórki rogówki i mysie monocyty/makrofagi wiązał się już z pewnym wzrostem poziomu cytokin prozapalnych (20), a jednoznacznie

działanie prozapalne nanosrebra wykazali Park i wsp. (17) w linii mysich makrofagów, notując wzmożoną produkcję NO, zwiększony poziom TNF- α oraz nasiloną ekspresję genów TNF- α .

Działanie genotoksyczne

Ten ostatni rodzaj oddziaływania należy do najbardziej niepokojących, gdyż może stanowić zagrożenie dla samoodnawialności organizmów, być przyczyną zaburzeń płodności, muta-, kancero- lub teratogenezy. Co więcej, zjawisko to dotyczy nie tylko komórek zwierzęcych. Kumari i wsp. (12), badając wpływ nanosrebra (50-100 ppm) na komórki stożka wzrostu korzenia cebuli zwyczajnej (*Allium cepa*), stwierdzili obniżenie indeksu mitotycznego, pojawienie się aberracji chromosomowych i zaburzenie metafazy. Obserwowane zmiany, zdaniem autorów, wynikać mogły z degradacji lub depolimeryzacji chromosomowego DNA i prawdopodobnie były nieodwracalne. Ponadto najwyższa dawka cząstek powodowała dezintegrację ściany komórkowej w większości komórek. Wyniki te jednoznacznie wskazują na zdolność nanocząstek srebra do penetrowania, wchodzenia w interakcje ze składnikami komórek roślinnych i zaburzenia ich podziałów, co pozwala dodatkowo domniemywać o ich ekotoksyczności. Podobny efekt oddziaływania nanosrebra na komórki zwierzęce, polegający na zaburzeniu metafazy, powstawaniu aberracji chromosomowych i aneuploidności komórek, zanotowali Wise i wsp. (22) w stosunku do rybniej linii komórkowej OLHN12. Ryżówka japońska, której komórek użyto w doświadczeniu, jest organizmem modelowym w badaniach mających odniesienie do organizmu człowieka, stąd uzyskane wyniki nie dotyczą wyłącznie wrażliwości organizmów wodnych. Również komórki ssaków nie były obojętne na oddziaływanie nanosrebra w opisywanym zakresie – Park i wsp. (17) po inkubacji mysich makrofagów ze srebrem stwierdzili zwiększenie liczby komórek w fazie G1 cyklu komórkowego, a następnie całkowitą blokadę cyklu w fazie S, co jest, zdaniem autorów, typowe dla czynników hamujących syntezę DNA.

Reasumując, coraz chętniej wykorzystywane w życiu codziennym nanosrebro może nie być tak drobną i obojętną dla organizmu człowieka substancją, jak do tej pory przypuszczano. Trudno oczekiwać pełnego przełożenia wyników badań przeprowadzonych *in vitro* na skomplikowany układ biologiczny, jakim jest żywy organizm, powinny one jednak wzbudzić pewną ostrożność. Szybki rozwój nanotechnologii wiąże się ze stałą ekspozycją konsumentów na wzrastające dawki nanocząstek. Biorąc zaś pod uwagę zdolność nanosrebra do penetrowania błon biologicznych, wpływania na sprawne funkcjonowanie mitochondriów i związaną z nimi ochronę antyoksydacyjną komórki, a także jego potencjalne działanie genotoksyczne, przy jednoczesnej zdolności do kumulowania się w komórce, można spodziewać się niekorzystnych, długofalowych efektów tej ekspozycji. Rozważny „bilans

zysków i strat” przed użyciem modnych i intensywnie promowanych nanoproductów w życiu codziennym wydaje się odpowiednim wyborem.

Piśmiennictwo

1. Agarwal A., Weis T. L., Schurr M. J., Faith N. G., Czuprynski C. J., McAnulty J. F., Murphy C. J., Abbott N. L.: Surfaces modified with nanometer-thick silver-impregnated polymeric films that kill bacteria but support growth of mammalian cells. *Biomaterials* 2010, 31, 680-690.
2. Arora S., Jain J., Rajwade J. M., Paknikar K. M.: Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol. Lett.* 2008, 179, 93-100.
3. Arora S., Jain J., Rajwade J. M., Paknikar K. M.: Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009, 236, 310-318.
4. Bogacka A., Kucharska E.: Wpływ hemodializy na produkcję wolnych rodników i nasilenie stresu oksydacyjnego. *Immunologia kliniczna: wybrane aspekty*. EDYCJA s.c., Olsztyn 2010, 193-202.
5. Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J. J., Hofmann M. C.: In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol. Sci.* 2005, 2, 412-419.
6. Farkas J., Christian P., Gallego Urea J. A., Roos N., Hassellöv M., Tollefsen K. E., Thomas K. V.: Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 2010, 96, 44-52.
7. Foldbjerg R., Olsen P., Hougaard M., Dang D. A., Hoffmann H. J., Autrup H.: PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induced reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol. Lett.* 2009, 190, 156-162.
8. Gopinath P., Gogoi S. K., Chattopadhyay A., Ghosh S. S.: Implications of silver nanoparticle induced cell apoptosis for in vitro gene therapy. *Nanotechnology* 2008, 19, 1-10.
9. Hsin Y. H., Chen C. F., Huang S., Shih T. S., Lai P. S., Chueh P. J.: The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol. Lett.* 2008, 179, 130-139.
10. Hussain S. M., Hess K. L., Gearhart J. M., Geiss K. T., Schlager J. J.: In vitro toxicity of nanoparticles in BRL3A rat liver cells. *Toxicol. in Vitro* 2005, 19, 975-983.
11. Kalishwaralal K., Banumathi E., Ram Kumar Pandian S., Deepak V., Muniyandi J., Eom S. H., Gurunathan S.: Silver nanoparticles inhibit VEGF induced cell proliferation and migration in bovine retinal endothelial cells. *Colloids Surf. B* 2009, 73, 51-57.
12. Kumari M., Mukherjee A., Chandrasekaran N.: Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Sci. Total Environ.* 2009, 407, 5243-5246.
13. Lubick N.: Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles – or both? *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42, 8617.
14. Luoma S. N.: Silver nanotechnologies and the environment: old problems or new challenges? *PEN* 15, september 2008 (report by Project on Emerging Nanotechnologies; <http://www.nanotechproject.org/publications/>).
15. Miura N., Shimohara Y.: Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009, 390, 733-737.
16. Murawala P., Phadnis S. M., Bhone R. R., Prasad B. L.: In situ synthesis of water dispersible bovine serum albumin capped gold and silver nanoparticles and their cytocompatibility studies. *Colloids Surf. B* 2009, 73, 224-228.
17. Park E. J., Yi J., Kim Y., Choi K., Park K.: Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicol. in Vitro* 2010, 24, 872-878.
18. Poon V. K., Burd A.: In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. *Burns* 2004, 30, 140-147.
19. Rosas-Hernandez H., Jimenez-Badillo S., Martinez-Cuevas P. P., Gracia-Espino E., Terrones H., Terrones M., Hussain S. M., Ali S. F., Gonzalez C.: Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings. *Toxicol. Lett.* 2009, 191, 305-313.
20. Santoro C. M., Duchsherer N. L., Grainger D. W.: Minimal in vitro antimicrobial efficacy and ocular cell toxicity from silver nanoparticles. *Nanobiotechnol.* 2007, 3, 55-65.
21. Shin S. H., Ye M. K., Kim H. S., Kang H. S.: The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. *Int. Immunopharmacol.* 2007, 7, 1813-1818.
22. Sir Wise J. P., Goodale B. C., Wise S. S., Craig G. A., Pongan A. F., Walter R. B., Thompson W. D., Ng A.-K., Aboueiassa A. M., Mitani H., Spalding M. J., Mason M. D.: Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. *Aquat. Toxicol.* 2010, 97, 34-41.
23. Wataha J. C., Lockwood P. E., Schedle A., Noda M.: Ag, Cu, Hg and Ni ions alter the metabolism of human monocytes during extender low-dose exposures. *J. Oral Rehabil.* 2002, 29, 133-139.
24. Yen H. J., Hsu S. H., Tsai C. L.: Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small* 2009, 5, 1553-1561.

Adres autora: dr Joanna Małaczewska, ul. Oczapowskiego 13, 10-957 Olsztyn; e-mail: j.malaczewska7@wp.pl